

**Impactul infecției cu citomegalovirusul uman la pacienții
cu hepatite cronice virale B și C**

– TEZĂ DE DOCTORAT –

Autor: Chiorean Erica

Conducător științific: Prof. Dr. Victor Cristea



Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”

2010

I. INTRODUCERE

Virusul citomegalic uman (hCMV, *human cytomegalovirus*), cunoscut și ca herpesvirusul uman 5, este un virus cu ADN ce aparține familiei *Herpesviridae* subfamilia *Betaherpesvirinae*. El infectează în proporție de 40%-100% populația generală, determinând infecții persistente, clinic manifeste sau subclinice, cu reactivări periodice și spontane. La persoanele imunocompetente, infecția primară cu hCMV, care apare de obicei în primele două decade de viață, evoluează în general asimptomatic sau se manifestă în forma unui sindrom pseudogripal, sau mononucleozic, dar fără anticorpi heterofili. Infecția primară este de obicei benignă, autolimitată, urmată de constituirea infecției latente, pe toată durata vieții organismului gazdă, cu posibilitatea reactivărilor periodice ale virusului. În cazul persoanelor cu imunodepresie, hCMV poate genera tablouri clinice severe.

Coevoluția herpesvirusurilor cu gazdele umane le-a permis dezvoltarea unor mecanisme de modulare a răspunsurilor imune. Dintre toate herpesvirusurile, virusurile citomegalice conțin cel mai mare număr de gene „dedicate” alterării acestor răspunsuri, atât înnăscute, cât și adaptative. Aceste **mecanisme de manipulare a sistemului imunitar**, specifice herpesvirusurilor, inclusiv hCMV, sunt încă incomplet elucidate și reprezintă elementul cheie în patogeneză infecției virale, permițând, în cadrul unui cvasi-parteneriat, atât supraviețuirea virusului, cât și a gazdei. În timp ce o parte din proteinele virale facilitează evaziunea imună, interferând cu capacitatea gazdei de a recunoaște eficient și de a elimina virusul, alte proteine hCMV induc sau modifică răspunsuri imune specifice, în scopul securizării propriului ciclu de viață. Acest oportunitism al hCMV se poate valida și în alte situații clinice asociate cu depresie imună, cum este cazul activării cronice a sistemului imun din cadrul bolilor inflamatorii sau al altor infecții virale.

Hepatita citomegalică este relativ rară la **adultul imunocompetent** [1] și se prezintă ca un sindrom febril prelungit, cu febră înaltă (39-40°C), ce se poate asocia cu dureri articulare, astenie, adenopatie cervicală, episoade de hemoliză și tablou hematologic de mononucleoză infecțioasă. hCMV generează leziune hepatică parchimală prin infecția citolitică a hepatocitelor, ficatul este moderat mărit, cu citoliză (alaninaminotransferaza ALAT: 100 – 200 UI) care se normalizează în circa 30 de zile [2]. Sistemul nervos central este a doua localizare afectată (ca frecvență), exprimată clinic prin combinații variate ale următoarelor simptome/semne: febră, frison, astenie, mialgii, deficit motor, afectarea sensibilității, tulburări de vedere, retenție urinară, constipație, dezorientare, confuzie, sau comă. Manifestările hematologice ale infecției hCMV la subiecții imunocompetenți includ: anemie hemolitică, trombocitopenie simptomatică, coagulare intravasculară diseminată, sindroame de tip mielodisplazic, pancitopenie și ruptură splenică.

Infecția cu hCMV poate genera boală mai ales la pacienții care prezintă **deficiențe ale imunității celulare**. Aceste deficiențe pot fi tranzitorii sau permanente, și se pot constitui în situații precum: sarcina, administrare de tratamente antineoplazice sau radiații ionizante, tratamentele imunosupresoare aplicate primitorilor de transplante, în cursul sau după alte infecții virale. Infecția citomegalică la organisme imunocompromise poate cauza probleme severe. Datorită largului tropism celular al virusului, se pot produce îmbolnăviri în aproape

orice tip de organ și țesut, astfel că și tabloul clinic poate lua forme foarte variate: forma pneumonitei, hepatitei, colitei, esofagitei, ulcerărilor de tract gastrointestinal, și, mai rar, a retinitei sau encefalitei [3]. **Hepatita** este cea mai frecventă manifestare digestivă, sub formă ușoară sau persistentă, cu icter, putând fi asociată cu artralgiile, adenopatii cervicale, uneori cu caracter granulomatos, cu hepatosplenomegalie, adinamie, fatigabilitate și hepatocitoliză ușoară sau marcată. În timpul latenței, expresia genelor virale este minimizată, probabil pentru a evita detectarea de către sistemul imunitar, și nici un virion nu este produs. Infecțiile latente se pot reactiva periodic, sub forma infecțiilor litice (infecție în urma căreia celula infectată moare) care cauzează boala și permit diseminarea virusului [4].

Controlul imunologic al replicării virusului citomegalic rezultă din activitatea câtorva categorii de celule efectoare: celule NK, celule prezentatoare profesionale de antigen, limfocite B, limfocite T de tip $\gamma\delta$ și $\alpha\beta$. Dintre toate, limfocitele T virus-specifice, $CD8^+$ și $CD4^+$, par să joace un rol cheie [5]. Problemele generate de virusul citomegalic uman la persoanele imunocompromise constituie un argument important pentru rolul imunității celulare în controlul infecției cu hCMV. Măsurarea citokinelor intracelulare, ca răspuns la lizatele virale de hCMV, a evidențiat prezența LT producătoare de citokine în procente extrem de variabile la persoanele hCMV-seropozitive [6]. O anumită ierarhie a LT citokin-pozitive poate fi observată în infecția cronică hCMV: $TNF-\alpha$ (*tumor necrosis factor- α*) > $IFN-\gamma$ > $IL-2$ [7].

În lucrarea de față am studiat impactul infecției citomegalice umane în contextul unor infecții virale hepatotrope, și anume cu virusul hepatitei B (VHB) și virusul hepatitei C (VHC). Se știe că evoluția infecției cu aceste două virusuri hepatitice este influențată atât de răspunsul imun al organismului, cât și de mecanismele de evaziune imună ale virusurilor. Un răspuns antiviral ineficient se poate datora unui profil citokinic ineficient al limfocitelor T specifice sau al celulelor prezentatoare de antigen, realizarea unor infecții virale hepatice persistente, de către virusuri care nu uzează neapărat de acțiuni citopatice (de exemplu VHC), este posibilă mai ales prin mecanisme de tip imunopatologic, favorizate și de particularitățile imunologice ale ficatului.

II. CERCETĂRI PROPRII

1. OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul lucrării de față a fost testarea reflectării în sângele circulant a inflamației în hepatitele virale cronice B și C asociate cu infecția cu hCMV, domeniu prea puțin investigat până în prezent. Am ales testarea unor citokine atât proinflamatoare, cât și antiinflamatoare: $IL-12$, $IFN-\gamma$, $IL-1$, $IL-4$, $IL-5$ cu impact major în patogeniza unor afecțiuni inflamatorii acute și cronice.

În al doilea rând am vrut să evidențiem efectul dublei infecții virale hepatice asupra unor teste funcționale nivelele: ASAT, ALAT, GGT, fosfatazei alcaline, bilirubinei totale.

În plus am studiat prezența sau absența interrelațiilor dintre parametrii imuni studiați, dintre citokinele respective, dar și dintre secreția de citokine și nivelul testelor funcției hepatice.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1. Pacienți

Testele serice au fost făcute la 300 de subiecți împărțiți în trei loturi: 100 de pacienți cu coinfecție hCMV și VHB, 100 cu infecție hCMV asociată cu VHC și 100 martori sănătoși, de vârste și sex similare, proveniți de la Centrul de Transfuzii, având teste funcționale hepatice în limite normale și markeri serologici (AgHBs și Ac. anti-VHC) negativi. Au fost excluși bolnavii cu afecțiuni cronice hepatice de etiologie diferită de infecția cu virus B sau C, precum cei cu hepatită autoimună, boala Wilson, hemocromatoză, hepatită cronică alcoolică, coinfecție cu HIV etc.

2.2. Metode

Toate testările s-au făcut în duplicat pe serul provenit din sângele recoltat dimineața à jeun.

– Testările imunologice au cuprins citokinele: IL-12, IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-5, IgG anti-CMV și au fost realizate prin metode cantitative imunoenzimatică în sandwich (ELISA) conform protocolului firmei furnizoare, respectiv Quantikine® de la R&D System (Minneapolis USA, distribuit de R&D System Europe).

– Pentru a evidenția diferențele dintre cele trei loturi au fost investigați inițial parametrii standard: sex, vârstă, hematocrit (Htc), numărul de hematii (H), de leucocite (L) și trombocite (T), concomitent cu testele biochimice: valorile serice ale transaminazelor ALAT/TGP și ASAT/TGO, gamaglutamil transpeptidaza (GGT), fosfataza alcalină (FA) și bilirubina totală (Bil). Valorile normale ale parametrilor biochimici testați pe analizorul automat Konelab 30 I – Thermo Electron Corp Finland au fost următoarele: ALAT serică bărbați <42 U/L, femei <32 U/L, ASAT bărbați <37 U/L, femei <31 U/L, GGT serică la bărbați 11-50 U/L, femei 7-32 U/L, FA serică la bărbați 80-306 U/L, la femei 60-300 U/L, bilirubina totală < 1 mg/dl.

– În cazul testelor hematologice rezultatele normale ale laboratorului au fost: leucocite 4,1-10,9 K/ μ L, hemoglobina 12,0-18,0 g/dl, hematocrit 37,0-51,0%, trombociti 140-440 K/ μ L

– Analiza statistică a rezultatelor s-a realizat utilizându-se programul computerizat SPSS versiunea 14 și programul Excel 2007. Au fost calculate valorile medii obținute la loturile studiate (media), eroarea standard a mediei (EM) și deviația standard (SD). Semnificațiile statistice ale diferențelor (p) dintre valorile obținute la cele trei loturi au fost calculate prin testul t Student. S-au calculat coeficienții de corelație (CC) Pearson și Spearman (r), precum și analiza regresiei care stabilesc gradul de interrelație dintre diverșii parametri individuali testați. Valoarea lui *p* mai mică decât 0,05 a fost considerată semnificativă.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Analiza anticorpilor anti-CMV în funcție de sex și vârstă

În cazul analizei loturilor în funcție de sex, diferențele obținute nu au fost statistic semnificative ($p > 0,05$) cu toate că la bolnavii cu hepatită B raportul între femei și bărbați a fost ceva mai mic (0,89) comparativ cu martorii (1,33) și cu cei cu hepatită C (1,22).

Incidența anticorpilor IgG anti-CMV constatată de noi a fost mai mare decât cea publicată în literatură atât la martori (94%), cât și la pacienții cu hepatită B (98%) sau C (98%), ceea ce pledează pentru existența unei infecții latente la martori și a reactivării infecției virale la celelalte două loturi și nu o primoinfecție, întrucât prezența anticorpilor IgM+IgG anti-CMV a fost constatată doar la 5% din pacienții cu hepatită virală cronică C, respectiv 7% din cei cu hepatită B.

Concentrațiile IgG anti-CMV la pacienții cu hepatită cronică virală B (6,91 UI/mL) și C (7,64 UI/mL) prezintă valori apropiate, dar semnificativ superioare ($p < 0,0005$) celor ale martorilor (4,05 UI/mL) clinic indemni (fig.1). Din rezultatele obținute de noi, reiese însă existența unei asocieri pozitive, statistic semnificative ($p = 0,01$), între nivelul anticorpilor serici anti-CMV din izotipul IgG și vârstă, însă numai la pacienții cu hepatită C, probabil datorită acțiunii conjugate a celor doi factori imunodepresivi: infecția cu VHC și senescența sistemului imun [8].

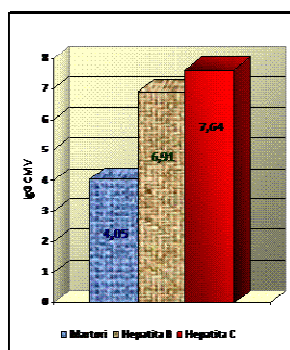


Fig.1. Concentrațiile IgG anti-CMV

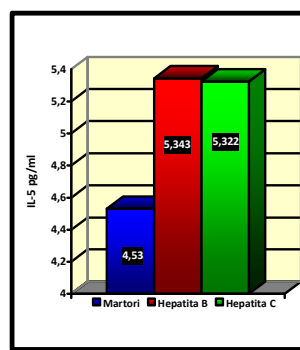


Fig. 2. Nivelele medii ale IL-5 la cele 3 loturi

3.2. Secreția de citokine

La studierea nivelelor serice ale citokinelor produse de limfocitele T (Th1, Th2) și macrofage am constatat prezența unor valori diferite ale martorilor comparativ cu pacienții cu hepatită cronică virală B și/sau C (Tabelul I). La toate cele trei loturi însă, nivelele cele mai ridicate au fost cele ale IFN- γ , urmate de interleukina-5 (IL-5) și reduse ale IL-1 și IL-4 (IFN- γ > IL-5 > IL-12 > IL-4 > IL-1).

Tabelul I. Nivelele medii \pm deviația standard ale citokinelor serice la martori și pacienții cu hepatite.

	Nr. cazuri	Martori		Hepatită B		Hepatită C	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
IL-12	100	1,4216	0,21247	1,3067	0,53612	1,6217	0,38964
IFN- γ	100	8,03727	1,231497	7,3114	1,11046	8,05391	0,656941
IL-5	100	4,5306	0,64319	5,3430	1,46775	5,3223	0,91948
IL-1	100	0,1443	0,08331	0,1607	0,11402	0,1382	0,09713
IL-4	100	0,1840	0,02281	0,1838	0,02272	0,1850	0,04166

Nu am obținut diferențe statistic semnificative între concentrațiile serice ale IL-1 la martori comparativ cu pacienții cu hepatită B sau C, sau între cele două loturi cu hepatită. În plus, la martorii care nu au avut o primoinfecție cu CMV nivelele serice ale IL-1 au fost similare cu cele ale martorilor cu infecție latentă. Absența inducerii producției de către monocite/macrofage de IL-1, citokină proinflamatoare precoce, în infecția cu CMV ar putea constitui una din cauzele ineficienței sistemului imun de eradicare a infecției cu CMV și de menținere a virusului sub o formă latentă.

Concentrațiile medii ale IL-12 \pm SE (eroarea standard) au fost asemănătoare la pacienții cu hepatită B ($1,307 \pm 0,064$ pg/ml) cu cele ale martorilor ($1,422 \pm 0,021$ pg/ml), dar semnificativ ($p < 0,005$) mai mici decât la pacienții cu hepatită C ($1,622 \pm 0,039$ pg/ml). Sinteza IL-12 de către LT ar putea constitui explicația creșterii exclusive, fără IL-1, a nivelului sangvin al IL-12. În acest sens pledează și asocierea statistic semnificativă a nivelului seric al acestei interleukine cu IFN- γ la pacienții cu hepatită cronică virală B ($r = 0,487$; $p < 0,001$) și hepatită cronică virală C ($r = 0,383$; $p < 0,001$). Faptul că pe de o parte infecția cu CMV nu a stimulat producerea de IFN- γ , iar pe de altă parte proteinele codificate de virus inhibă căile de semnalizare legate de IFN- γ R determină reducerea substanțială a acțiunilor proinflamatoare și a efectelor salutare a IFN- γ , ceea ce ar putea constitui, de asemenea, o cauză a eșecului eradicării virusului de către sistemul imun și a menținerii acestuia sub formă latentă.

Nivelele medii ale producției de IL-5 la loturile cu hepatită B și C au fost semnificativ superioare celor ale martorilor (fig. 2). Am constatat existența unor corelații pozitive, statistic semnificative, ale IL-5 cu IL-12 ($p < 0,001$) și cu IFN- γ ($p < 0,005$) la pacienții cu hepatită B, asociere care pare paradoxală dat fiind faptul că IL-12 și IFN- γ sunt produse de subsetul limfocitar Th1, pe când IL-5 este apanajul subsetului Th2, cele două subseturi limfocitare excluzându-se reciproc. O situație similară am obținut și în cazul pacienților cu hepatită C care au prezentat corelații înalt semnificative ale IFN- γ cu IL-5 ($p < 0,001$) și cu IL-4 ($p < 0,005$), concomitent cu o asociere semnificativă a IL-12 cu IL-5 ($p < 0,03$) și cu IL-4 ($p < 0,02$). Prezența acestor corelații între nivelele serice ale IFN- γ cu IL-12, amprenta citokinică a Th1, dar și cu IL-5 și IL-4, caracteristice subsetului Th2 constituie un argument puternic în favoarea implicării celulelor „T cu memorie efectoră” [9] la pacienții cu dublă infecție: CMV și hepatită virală B sau C investigați de noi.

3.3. Corelațiile dintre citokine și IgG anti-CMV

Studierea corelațiilor între valorile serice ale citokinelor, precum și cu cele ale IgG anti-CMV au furnizat unele rezultate interesante. În cazul lotului martor nu am obținut niciun fel de corelații semnificative. La lotul cu hepatită cronică B am obținut corelații semnificative între IL-12 cu IFN- γ și cu IL-5. În schimb, la pacienții cu hepatită cronică virală C am obținut mult mai multe corelații semnificative atât între citokinele studiate, cât și cu anticorpii anti-CMV. Prezența corelației slabe, dar semnificative între IgG anti-CMV și IL-4 ($r = 0,2$; $p < 0,03$), interdependență care nu apare la niciunul din celelalte loturi investigate, pare să sugereze stimularea predilectă a subpopulației limfocitare Th2 în cazul infecției cu CMV sau a dublei infecții CMV-HCV. În plus, am obținut corelații pozitive neașteptate, statistic semnificative, între citokinele proinflamatoare de tip Th1, IL-12, IFN- γ și cele de tip Th2 IL-4 și IL-5. Înclinarea balanței spre subsetul Th2, în dauna Th1, ar putea constitui o altă cauză a

menținerii sub formă latentă a infecției cu CMV, nu numai a celei cu HCV [10, 11], sau a imposibilității eradicării infecției duble (CMV și HCV).

3.4. Analizele biochimice

Dacă se face o comparație se constată existența unor diferențe mari între martori și pacienții cu hepatită B sau C în cazul transaminazelor, GGT, FA și bilirubinei (Tabelul II).

În plus, rezultatele testărilor biochimice obținute de noi demonstrează că dubla infecție virală (CMV plus un virus hepatitic B sau C) agravează lezarea hepatică determinând o creștere semnificativă a nivelurilor transaminazelor serice, iar primoinfecția cu CMV (IgM anti-CMV pozitivă) provoacă o creștere mai mare a nivelelor transaminazelor comparativ cu infecția cronică (IgG anti-CMV pozitivă) (Tabelul II). Diferențe între valorile medii ale pacienților seropozitivi și seronegativi am constatat și la testarea fosfatazei alcaline la pacienții cu hepatită B (185,714 U/L la seropozitivi, 143,0 U/L la seronegativi) și a bilirubinei la ambele loturi cu hepatită cronică virală, însă nu la nivelul GGT

Tabelul II. Valorile analizelor biochimice obținute la martori și pacienții cu hepatită virală și C (FA= fosfataza alcalină, Bil.=bilirubina).

	Nr. cazuri	Martori		Hepatită B		Hepatită C	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
ASAT	100	21,870	6,8470	63,520	48,2130	59,810	50,5982
ALAT	100	28,080	6,9277	87,520	67,2812	76,490	58,5358
FA	100	160,200	63,9214	186,350	45,4053	201,720	49,7956
GGT	100	28,220	9,7800	62,340	39,0623	63,070	47,1934
BIL.	100	0,4328	0,1409	0,7698	0,3645	0,8255	0,3401

3.5. Corelații, inclusiv cu analizele hematologice

La calcularea coeficienților de corelație am obținut unele corelații semnificative interesante:

– La martori am constatat existența interrelațiilor ale nivelelor: IgG anti-CMV cu FA ($p < 0,02$) și cu GGT, ale IL-12 cu ALAT/GPT, FA și cu hematocritul (Htc) ($p < 0,05$).

– La pacienții cu hepatită B: ale IL-5 nu numai cu IL-12 și IFN- γ ($p < 0,05$), ci și cu hemoglobina (Hb) și hematocrit (Htc) ($p < 0,001$); iar ale IgG anti-CMV cu ASAT/GOT și ALAT/GPT ($p < 0,0005$), cu FA, Bilirubina și Htc ($p < 0,05$). Demonstrarea asocierii dintre nivelele IgG anti-CMV și GOT, respectiv IgG anti-CMV și GPT, care nu au fost menționate în literatura studiată până în prezent, sunt demne de subliniat. Tot la lotul cu hepatită B am obținut asocieri între numărul de leucocite și nivelele serice ale GOT ($r = 0,210$; $p < 0,02$), GPT ($r = 0,191$; $p < 0,03$) și GGT ($r = 0,174$; $p < 0,05$). Sunt greu de interpretat aceste asocieri, cu atât mai mult cu cât nu putem afirma dacă interesează numărul global de leucocite sau o anumită

populație, cum ar fi cea limfocitară sau mai specific LT CD4⁺ ori CD8⁺, Th1 sau Th2. Pentru elucidarea acestora sunt necesare studii ulterioare.

– La pacienții cu hepatită C: sunt neașteptate corelațiile inverse ale IL-12 cu FA (p<0,03), IFN- γ cu Leu și Hb (p<0,05), IL-5 cu Leu și Hb (p<0,05), IL-4 cu Bilirubina și Leu (p<0,05), IgG anti-CMV cu GOT, GPT, Bilirubina și Htc (p<0,0005), cu Hb și Htc (p<0,05). Asocierea, nesemnălată în literatură, între IL-5 cu fosfataza alcalină (r=0,372; p<0,0005), și cu leucocitele (r=0,182; p<0,04) și cu trombocitele (r=0,200; p<0,03), în lumina datelor care atestă rolul trombocitelor în lezarea țesutului hepatic, pare să aibă o semnificație patogenetică.

4. CONCLUZII

1. Absența inducerii producției de IL-1 de către CMV, citokină proinflamatoare precoce, de către monocite/macrofage ar putea constitui una din cauzele ineficienței sistemului imun de eradicare a infecției CMV, de menținere a virusului sub o formă latentă.

2. Se pare că există o sinteză preferențială a IL-12 de către LT, nu de macrofage. În acest sens pledează și asocierea statistic semnificativă a nivelelor serice a acestei interleukine cu IFN- γ la pacienții cu hepatită B.

3. Faptul că pe de o parte infecția cu CMV nu a stimulat producerea de IFN- γ , iar pe de altă parte proteinele codificate de virus inhibă căile de semnalizare legate de IFN- γ R determină reducerea substanțială a acțiunilor proinflamatoare și a efectelor salutare a IFN- γ , ceea ce ar putea constitui încă o cauză a eșecului eradicării virusului de către sistemul imun și a menținerii acestuia sub formă latentă.

4. Am remarcat că la pacienții cu hepatită C este prezentă o corelație semnificativă între nivelul seric al IgG anti-CMV și cel al IL-4 (r=0,200; p<0,03), ceea ce pare să sugereze stimularea predilectă a subpopulației limfocitare Th2 în cazul infecției cu CMV sau a dublei infecții CMV-HCV. Înclinarea balanței spre subsetul Th2, în dauna Th1, ar putea constitui o altă cauză a menținerii sub formă latentă a infecției cu CMV, sau a ambelor virusuri, a imposibilității eradicării infecției (CMV și HCV).

5. Prezența unor corelații statistic semnificative între nivelele serice ale IFN- γ cu IL-12, amprenta citokinică a Th1, dar și cu IL-5 și IL-4, caracteristice subsetului Th2 constituie un argument puternic în favoarea implicării celulelor „T cu memorie efectoare” la pacienții cu dublă infecție: CMV și hepatită B sau C investigați de noi.

6. Rezultatele testărilor biochimice obținute de noi demonstrează, că dubla infecție virală (CMV plus un virus hepatitic B sau C) agravează afectarea hepatică determinând o creștere semnificativă a nivelurilor transaminazelor serice. În plus, primoinfecția cu CMV (IgM anti-CMV pozitivă) provoacă o creștere mai mare a nivelelor transaminazelor comparativ cu infecția cronică (IgG anti-CMV pozitivă).

7. Diferențe între valorile medii ale pacienților seropozitivi și seronegativi am constatat și la testarea fosfatazei alcaline la pacienții cu hepatită B (185,714 U/L la seropozitivi, 143,0 U/L la seronegativi) și a bilirubinei la ambele loturi cu hepatită cronică virală, însă nu la nivelul GGT.

8. La pacienții cu hepatită B am constatat existența unei corelații statistic semnificative între numărul de leucocite și nivelul enzimelor serice ALAT, ASAT și GGT. La aceiași pacienți valorile medii ale hemoglobinei și hematocritului au fost semnificativ superioare

celor obținute la martori sau la bolnavii cu hepatită C ($p < 0,03$, respectiv $p < 0,01$), dar fără diferențe între subiecții seropozitivi și seronegativi pentru CMV ceea ce sugerează că infecția cu CMV nu afectează nivelele hemoglobinei și hematocritului.

9. Valorile medii ale trombocitelor au fost scăzute la ambele loturi cu hepatită studiate de noi, diferențele față de martori fiind statistic semnificative ($p < 0,0005$). În plus, la martorii seronegativi numărul de trombocite a fost mai mare decât la cei seropozitivi.

10. Existența corelațiilor statistic semnificative negative ale numărului de trombocite cu: ASAT, ALAT, fosfataza alcalină și GGT, în hepatita B, deși pare destul de greu de interpretat, sugerează însă implicarea trombocitelor în patogeniza leziunilor hepatice.

11. Studiarea corelațiilor între valorile obținute la testele biochimice și cele imunologice ne-a permis evidențierea unor asocieri deosebit de interesante, nesemnalate încă în literatura consultată, ca de exemplu: asocierea dintre nivelul anticorpilor IgG anti-CMV cu fosfataza alcalină și GGT la martorii cu infecție latentă cu citomegalovirus.

12. Subliniem corelațiile înalt semnificative ale anticorpilor IgG anti-CMV cu transaminazele ALAT și ASAT ($p < 0,0005$), cu fosfataza alcalină ($p < 0,01$) și cu bilirubina ($p < 0,04$) sau ale IL-12 cu ALAT și fosfataza alcalină la pacienții cu hepatită B, precum și interrelațiile negative ale numărului de leucocite, hemoglobinei și bilirubinei cu nivelul IFN- γ , reprezintă asocieri încă nesemnalate în literatură (cu excepția celei între ALAT și IgG anti-CMV). În schimb, este de remarcat absența oricăror corelații între testele biochimice și IgG anti-CMV la pacienții cu hepatită C.

13. Am constatat de asemenea asocieri încă nesemnalate în literatură ale IL-5: negativă cu fosfataza alcalină, cu numărul de leucocite și trombocite la pacienții cu hepatită virală C, precum și ale aceleiași interleukine, dar pozitivă, cu nivelele hemoglobinei și hematocritului în hepatita B.

5. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1 Vujacich C, Vidiella G, Barcelona L, Sturba E, Stamboulian D. Cytomegalovirus infection with hepatic involvement in immunocompetent adults. *Medicina (B Aires)* 2006;66:206-210.

2 Sinzger C, Bissinger AL, Viebahn R, et al. Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and in vivo. *J Infect Dis* 1999;180:976-986.

3 Pass R. F. Cytomegalovirus. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4 ed., vol. 2. Raven Press, New York, NY 2001;2675-2706

4 Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006;87:1763-1779.

5 Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection. HLA-restricted T-lymphocyte and non-T lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982;307:7-13.

6 Sinclair E, Black D, Epling CL, et al. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFN γ expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. *Viral Immunol* 2004;17:445-454.

-
- 7 Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry* 2000;40:60-68.
 - 8 Seale H, MacIntyre CR, Gidding HF, Backhouse JL, Dwyer DE, Gilbert L. National Serosurvey of Cytomegalovirus in Australia. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1181-1184
 - 9 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potential and effector functions. *Nature* 1999;401:708-712
 - 10 Tsai S-L, Liaw Y-F, Chen M-H, Huang C-Y, Kuo GC: Detection of type-2 like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25: 449-458.
 - 11 Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP et al: Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: *ex vivo* analysis of helper T-cell responses. *J Viral Hepatol* 2006;13:708-714

CURRICULUM VITAE

Nume: Chiorean

Prenume: Erica

Data și locul nașterii: 19 mai 1951, Abrud, jud. Alba

Activitate profesională

1966-1970 - Liceul "Horia, Cloșca și Crișan" Abrud, jud Alba

1970-1976 - Facultatea de Medicină Generală, UMF Cluj-Napoca

1976-1977 - Medic Dispensar Comunal, comuna Dolhasca, jud. Suceava

1977-1980 - Medic Dispensar Policlinica Abrud, jud. Alba

1980-1983- Medic secundar laborator clinic, Spitalul Clinic de Adulți, Cluj-Napoca

1983-1993- Medic specialist laborator clinic, Spitalul Clinic de Adulți, Cluj-Napoca

Din 1993- Medic primar laborator clinic, Spitalul Clinic de Adulți, Cluj-Napoca

Din 1994 - Medic șef secție Laborator Central, Spitalul Clinic de Urgență "Prof. Dr. O. Fodor" Cluj-Napoca

Activitate științifică

2008 - doctorand, domeniul Medicină, titlul lucrării " Impactul infecției cu citomegalovirusul uman în populația municipiului Cluj-Napoca și prevalența acestei infecții la persoanele cu hepatite cronice virale", conducător științific Prof. Dr. Victor Cristea

Membru în societăți profesionale

Membru al Societății Române de Medicină de Laborator

Membru al Fundației de Laborator Clinic „Marcela Zamfirescu Gheorghiu”

Participări la manifestări științifice - congrese, simpozioane și conferințe

- 50th Congress of the Hungarian Society Of Clinical Pathology, Debrecen august 2000
- Simpozionul Național de Gastroenterologie, Hepatologie și Endoscopie Digestivă, Cluj-Napoca, iunie 2002

-
- A III-a Conferință a Fundației de Laborator Clinic Marcela Zamfirescu Gheorghiu în colaborare cu Societatea Română de Microbiologie, Felix-Oradea mai 2004
 - Magyar Laboratórium Diagnosticszakai Társaság 52. Nagygyűlése, Sopron septembrie 2004
 - SRML- Al 4-lea Simpozion Național de Medicină de Laborator și RoEQALM – Al 2-lea Simpozion de Asigurare a Calității în Medicina de Laborator , Cluj-Napoca noiembrie 2004
 - Masa rotundă: „Prezent și viitor în bolile alergice”, Cluj-Napoca, decembrie 2004
 - Masa rotundă: „Evoluția fenomenului de rezistență a microorganismelor (bacterii, funghi) și importanța acestia în terapia și profilaxia bolilor infecțioase” , Cluj-Napoca, decembrie 2004
 - „Progrese în ultrasonografie” , Cluj-Napoca , decembrie 2004
 - „Noutăți în Pneumoftiziologie – Strategia DOTS cu Includerea Întregii Rețele Medicale” , Cluj-Napoca, februarie 2005
 - The 2nd Danubian Symposium on Laboratory Medicine, 4th National Congress on Laboratory Medicine and 3rd Symposium on Quality Assurance in Laboratory Medicine, Arad, september 2005
 - Simpozionul „Nebivololum – de la speranță la certitudine”, Cluj-Napoca, noiembrie 2005
 - Simpozionul „Actualități în diagnosticul și tratamentul hepatitelor cronice virale”, Sighișoara, mai 2006
 - Congesul societății laboratoarelor de medicină Marcela Zamfirescu Gheorghiu, Timișoara , mai 2006
 - Magyar Laboratórium Diagnosticszakai Társaság 53. Nagygyűlése, Szeged august-septembrie 2006

Cursuri postuniversitare

- „Actualități în laboratorul clinic de hematologie”, Institutul de Hematologie Fundeni, București, aprilie-mai 1987
- „Curs de citologie hematologică” Institutul de Oncologie, Cluj-Napoca, iunie 1994
- „Curs cu tema: Actualități în ecografie”, Cluj-Napoca, octombrie 1995
- „Curs de formare a specialiștilor desemnați cu proiectarea și implementarea sistemelor calității conform standardelor SR-EN-45001, ISO/CEI Ghid 25 (Proiect ISO-17025) în vederea acreditării laboratoarelor”, Cluj-Napoca, 2000
- „Curs de citologie oncologică”, Institutul de Oncologie, Cluj-Napoca, martie-aprilie 2002

Articole științifice

Articole publicate ca prim autor

1. **Erica Chiorean**, N. Miron, V. Cristea. Evaziunea imună – factor important în patogeneza infecției cu virusul citomegalic. Clujul Medical 2009; 82(2): 167-170.
2. **Erica Chiorean**, Mirela-Mihaela Miron, N. Miron, V. Cristea. Infecția cu virusul citomegalic uman – prevalența și impactul biologic în populația generală și la pacienții cu hepatită cronică virală B sau C. Clujul Medical 2010; 83(1): 157-162.

Articole publicate ca și coautor

1. Dumitrașcu D, Radu D, Stanciu L, **Erica Chiorean**, Baluna R, Belascu I, Dumitrascu DL, Andreica V: Discriminative value of fibronectine in ascitic fluid. Rom J Gastroenterol 1992; 1(3): 113-117.
2. Varga M, Dumitrașcu D, Pillof L, **Erica Chiorean**. Skin manifestation in parasite infection. Rom Arch Microbiol Immunol 2002; 60: 359-369.
3. Andreica V, Pascu O, Claudia Hagi, Daniela Pașca, Dumitra D, Dumitrașcu DL, **Chiorean Erica**, Georoceanu A. Whipple's disease. Case report. Rom J Gastroenterol, 2002; 11(4): 325-330.
4. Olimpia Chira, Badea R, Diana Dumitrașcu, Șerban A, Branda H, al Hajjar N, **Erica Chiorean**, Carmen Cruciat. Eosinophilic Ascites in a Patient with Toxocara Canis Infection. A Case Report. Rom J Gastroenterol 2005; 14(4): 397-400.
5. Monica Acalovschi, Anca Ciocan, Ofelia Mostean, Simona Tarziu, **Erica Chiorean**, Hildegard Keppeler, Ramin Schirin-Sokhan, Frank Lambert. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphism? A preliminary study in siblings with gallstones. Eur J Intern Med 2006;17 (2006) 490-494.
6. Tripon S, Grigorescu M, Suteu T, Branda H, Cavași A, Spîrchez Z, **Chiorean E**, Badea R. Efficacy of ultrasound as a screening test for early detection of hepatocellular carcinoma. A 6-year prospective study by ultrasound and alpha-fetoprotein. Medical Ultrasonography 2009; 11(4): 17-24.

Lucrări publicate în volum de rezumate la manifestări științifice naționale ca coautor

1. Monica Acalovschi, Lammart F, Ciocan A, Moștean O, **Erica Chiorean**. Polimorfismul ABCG5/G8 factor predispozant pentru litiaza biliră, Al V-lea Congres Național de Medicină Internă cu participare internațională, Călimănești- Căciulata, aprilie 2005

Limbi străine

- limba engleză
- limba franceză

Experiența acumulată în alte proiecte de cercetare

1. GRANT CNCSIS nr. 1263 (2005-2007): Polimorfismele genelor ABCG5/G8, ABCB4, ABCB11 la pacienții cu litiază biliară, în familiile de litiazici și la populația generală. Agregarea familială a litiazei biliare. Director: Prof. Dr. Monica Acalovschi
2. CEEX 2006: Ficatul gras nealcoolice, hepatita virală C și litiaza biliară – Componente ale sindromului metabolic. Epidemiologie clinică, aspecte patogenetice, mijloace neinvazive de diagnostic, finalism. Director de proiect: Prof. Dr. Mircea Grigorescu

**The impact of human cytomegalovirus infection in chronic
viral hepatitis B and C patients**

– DOCTOR’S DEGREE THESIS –

Author: **Chiorean Erica**

Scientific leader: **Prof. Dr. Victor Cristea**



Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”

2010

1. Introduction

Human Cytomegalovirus (hCMV), also known as Human Herpesvirus 5, is a virus with DNA which belongs to the *Betaherpesvirinae* subfamily of *Herpesviridae*. It infects between 40% and 100% of worldwide population and it causes persistent infection, clinically and sub clinically persistent infection, with periodic and spontaneous reactivations. In immunocompetent persons, primary infection with hCMV which usually appears during the first two life decades generally develops asymptotically or manifests as a false fever syndrome or mononucleosis, but without haeterophylic antibodies. Primary infection is usually benign, self-limited, followed by latent infection for the life of host, with the possibility of the virus to be periodically reactivated. In immunodepressed persons, hCMV may cause severe clinical patterns.

Coevolution of herpes viruses and human hosts had lead to development of mechanisms for modulating the immune response. Of all the herpes viruses, cytomegalovirus has the biggest number of genes “dedicated” to manipulating the host immune response, both genetic and adaptative. These mechanisms of manipulating the imunitary system, specific to herpes viruses, hCMV inclusive, are still incompletely elucidated and represent the key-term in patogenesis of viral infection. Due to a cvasi-partnership they allow both virus and host to survive. While a part of the viral proteins facilitates the immune evasion, interfering with the host’s ability to efficietly recognize and eliminate the virus, other proteins hCMV induce and modify immun specific reactions in order to protect the own life cycle. This oportunism of HCMV could be also validated in other different clinical sitations associated to immun depression, as example the immunitary system chronic reactivation in inflamatory deseases and other viral infections.

Cytomegalic hepatitis in **immunocompetent adults** ^[1] is relatively rare and manifests as a prolonged febrile syndrome with high fever (39- 40 C), which could be associated with articular aches, asteny, cervical adenopathy, hemolytic episodes and hematological pattern of infectious mononucleosis. HCMV generates hepatic parenchimal lesion through cytolytic infection of hepatocytes, lever is moderately enlarged, with cytolysis (alanine aminotransferase ALAT: 100 – 200 UI) which normalizes within approximately 30 days ^[1].

From the point of view of frequency the central nervous system is the second localization that is affected. This clinically manifests through various combinations of the following symptoms: fever, frisson, asteny, mialgia, motric deficit, affection of sensibility, eye problems, urinary retention, constipation, disorientation, confusion or coma. In immunocompetent persons hematological manifestations of HCMV infection contain: hemolytic anemy, symptomatic thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation, mielodisplasic syndromes, pancytopenia and spleen rupture.

HCMV infection could lead to disease especially in patients with **cellular immunity deficiency**. This deficiency could be transitory or permanent and reprezent situations like: pregnancy, administration of anti-neoplastic treatment or ionic radiations, immunosuppressive treatment in transplant receivers, during or after other viral infections. Cytomegalic infection in immunocompromised hosts could cause severe problems. Because of wide cellular tropism

of the virus almost all types of organs and tissues could be injured, so that the clinical pattern could show different manifestations: pneumonitis, hepatitis, colitis, esofagitis, ulcerations of gastrointestinal tract and less frequent retinitis and encephalitis [11].

Hepatitis is the most frequent digestive manifestation, in simple or persistent form, with icterus, and occasionally it could be associated with arthralgia, cervical adenopathy, sometimes in granulomatous form, hepatoesplenomegalia, adynamy, fatigue and slight or moderate hepatic cytolysis. During latency, viral genes expression is minimized, probably in order to avoid to be detected by the immunitary system, and no virion is produced. Latent infections could be reactivated periodically, under the form of lytic infections (infection with subsequent death of the infected cell) which cause disease and allow the virus to disseminate [11].

The immune control of cytomegalic virus replication results from the activity of some categories of effective cells: NK cells, professional antigene presenting cells (APC), B lymphocytes, T- $\gamma\delta$ lymphocytes and T- $\alpha\beta$ lymphocytes. Of all, virus-specific T lymphocytes, CD8⁺ and CD4⁺ seem to have a key-role [11].

Problems generated by human cytomegalic virus in immunocompromised persons represent an important reason for the role of cellar immunity in controlling CMV infection. Measuring intracellular cytokines as response to viral lysis of CMV has proved the presence of LT cytokines producers in variable proportions in HCMV- seropositives persons [11]. A certain hierarchy of cytokine-positive LT could be noticed in chronic HCMV infection : TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) > IFN- γ > IL-2 [11].

In this paper we have tried to study the impact of human cytomegalic infection in the context of some hepatotropic viral infection, especially Hepatitis B virus (HBV) and Hepatitis C virus (HCV). It is commonly known that the evolution of this infection is influenced both by organism immune response and immune-evasion mechanisms of virus. An inefficient antiviral response could be due to an inefficient cytokinic profile of specific T lymphocytes.

Persistent viral hepatitis infections due to viruses that do not use particularly cytopathic actions (HCV) are likely to occur especially because of immune-pathological mechanisms, favoured by the immune particularities of the lever as well.

II. OUR RESEARCH

1. RESEARCH OBJECTIVES

The present study was undertaken to examine the way the inflammations in viral chronic hepatitis B and C associated to HCMV infection reflect in circulation blood. This topic has been less investigated up the present. We chose to test both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines: IL-12, IFN- α , IL-1, IL-4, IL-5, with major impact in pathogenesis of acute and chronic inflammatory affections.

Second, it was our hope to highlight the effect of double viral hepatitis infection on functional tests: ASAT, ALAT, GGT, alkaline phosphatase and total bilirubin. Moreover we studied the presence or the lack of interrelations among the studied immune parameters, among the respective cytokines, but also between cytokine secretion and level of hepatic function tests.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients

300 patients were included in the study and were subjected to serological tests. They were divided in three groups: 100 patients with HCMV and HBV co-infection, 100 patients with HCMV infection associated to HCV and 100 healthy subjects matched for age and sex, provided by Centre of Transfusion, were used as a control having functional hepatic tests within normal limits and serologically markers negative (HBsAg and anti-HCV). Patients having chronic hepatic affections with etiology different from infection with virus B and C, and those suffering from auto-immune hepatitis, Wilson disease, hemochromatosis, chronic alcoholic hepatitis, AIDS co-infection were excluded.

2.2 Methods

All tests were done in duplicate using serum provided by prelevating blood in the morning, before breakfast.

– Immunological tests included cytokines: IL-12, IFN- α , IL-1, IL-4, IL-5, and IgG anti-CMV used immune enzymatic quantitative methods in sandwich (ELISA), according to the protocol of the company that provided materials, respectively Quantikine® , R&D System (Mineapolis USA, distributed by R&D System Europe).

– In order to highlight the differences between the three groups under investigated we initially observed the standard parameters: sex, age, hematocrit, number of hematies, of leucocytes and trombocytes, simultaneously with biochemical tests: serological values of transaminase ALAT/TGP and ASAT/TGO, gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase and total bilirubin. Normal values of biochemical parameters tested on automated analyser Konelab 30 I – Thermo Electron Corp Finland were: ALAT serological men <42 U/L, women <32 U/L, ASAT men <37 U/L, women <31 U/L, GGT serological men 11-50 U/L, women 7-32 U/L, FA serological men 80-306 U/L, women 60-300 U/L, total bilirubin < 1 mg/dL.

– In hematological tests normal values of analyzer were: leucocytes 4.1-10.9 K/ μ L, haemoglobin 12.0-18.0 g/dl, hematocrit 37.0-51.0%, trombocytes 140-440 K/ μ L.

– Statistical analysis of results was undertaken using SPSS computer programme, version 14, and Excel programme 2007. We calculated mean values of studied groups, standard error of mean (EM) and standard deviation (SD). Statistical significances of differences (p) among values occurred in the three groups were calculated by Student's t test. Single regression analysis was performed and the statistical significance of correlation was determined with Pearson's and Spearman's correlation test (r) which estimate the level of correlation among different individual parameters that were tested. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Analysis of CMV antibodies depending on sex and age

In analysis of groups depending on sex, differences that occurred were not statistically significant ($p > 0.05$), even if in patients with B hepatitis the balance between men and women was approximately less (0.89) as compared to controls (1.33) and those with C hepatitis (1.22).

We observed that incidence of IgG anti-CMV antibodies was bigger than that that had been published in specialised literature, both in controls (94%) and in patients with B hepatitis (98%) and C hepatitis (98%). That supports the idea of existence of a latent infection in patients-witness and of reactivation of viral infection in the other two groups. At the same time we argue against a prime-infection, because the presence of antibodies IgM+IgG anti-CMV was observed only in 5% of patients with viral chronic hepatitis C, respectively in 7% of those with hepatitis B.

Concentration of IgG anti-CMV in patients with viral Hepatitis B (6.91 UI/mL) and C (7.64 UI/mL) shows close values, but significantly superior ($p < 0.0005$) to those of patients-witness clinically indemn (fig.1) (4.05 UI/mL). But our results highlight the existence of a statistically significant positive association, ($p = 0.01$) between the level of serological anti-CMV antibodies of IgG isotype and age, but only in patients with hepatitis C. This is probably due to conjugate action of two immune-depressive factors: HCV infection and senescence immune system senescence [11].

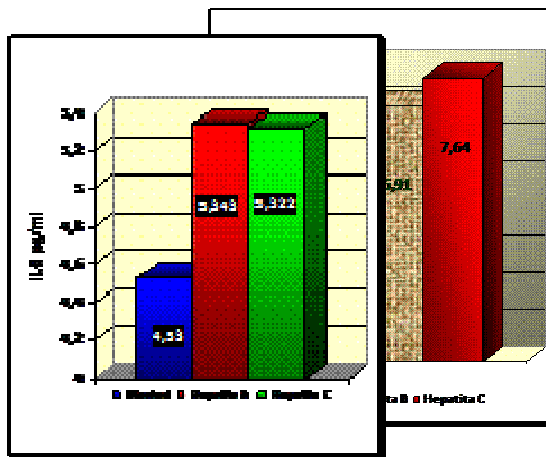


Fig.1. Concentrations of IgG anti-CMV **Fig. 2.** Mean levels of IL-5 in all three groups

3.2. Secretion of cytokines

In studying the serological levels of cytokines produced by lymphocytes (Th1, Th2) and macrophages we observed the presence of different values in controls and patients with B and/or C hepatitis (Table I). In all three groups the highest levels were: IFN- α and interleukina (IL-5) and the most reduced values were: IL-1 și IL-4 (IFN- α > IL-5 > IL-12 > IL-4 > IL-1).

Table I. Mean levels \pm standard deviation of serological cytokines in controls and patients with hepatitis

	Number of subjects	Controls		Hepatitis B		Hepatitis C	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
IL-12	100	1.4216	0.21247	1.3067	0.53612	1.6217	0.38964
IFN-γ	100	8.03727	1.231497	7.3114	1.11046	8.05391	0.656941
IL-5	100	4.5306	0.64319	5.3430	1.46775	5.3223	0.91948
IL-1	100	0.1443	0.08331	0.1607	0.11402	0.1382	0.09713
IL-4	100	0.1840	0.02281	0.1838	0.02272	0.1850	0.04166

We did not obtain statistically significant differences between the serological concentrations of IL-1 in controls as compared with patients with hepatitis B and C, or between the two groups with hepatitis. Moreover, in controls, that did not have a CMV prime-infection, the serological levels of IL-1 were similar to those in controls with latent infection. The absence of induction of production IL-1 by CMV, an early proinflammation cytokine, by monocytes/macrophages could represent one of the reasons for explaining inefficiency of immune system in eradicating CMV infection and in maintaining virus latency.

Mean concentrations \pm SE of IL-12 were similar in patients with hepatitis B (1.307 ± 0.064 pg/ml) and in controls (1.422 ± 0.021 pg/ml), but significantly ($p < 0.005$) less than in patients with C hepatitis (1.622 ± 0.039 pg/ml). Synthesis of IL-12 by LT could reveal the explanation of exclusive growth (without IL-1) of blood level of IL-12. This is also demonstrated by the association statistically significant of serological levels of the interleukin-12 and IFN- γ in patients with chronic hepatitis B ($r = 0.487$; $p < 0.001$) and hepatitis C ($r = 0.383$; $p < 0.001$). The fact that, on the one side CMV infection did not stimulate production of IFN- γ and on the other side the proteins codified by virus inhibit the IFN- γ R signaling pathways, determines the substantial reduction of pro-inflammation actions and of salutary effect of IFN- γ . This could also explain the failure to eradicate the virus by the immune system and to maintain virus latency.

Average levels of production of IL-5 in groups with chronic hepatitis B and C were significantly superior to those of patients-witness (fig. 2). We observed the existence of statistically significant positive correlations in patients with hepatitis B between IL-5 and IL-12 ($p < 0.001$) on the one hand and between IL-5 and IFN- γ ($p < 0.005$), on the other hand. This association is paradoxical: IL-12 and IFN- γ are produced by Th1 lymphocyte subset and IL-5 belongs to Th2 lymphocyte subset and these two lymphocyte subsets are proved to be mutually exclusive.

There was a similar situation in patients with hepatitis C who showed highly significant correlations between IFN- γ and IL-5 ($p < 0.001$) on the one hand and IFN- γ and IL-4 ($p < 0.005$), on the other hand. Simultaneously there was a significant association of IL-12 with IL-5 ($p < 0.03$) and with IL-4 ($p < 0.02$). The presence of these correlations between the serological levels of IFN- γ and IL-12, the cytokinic characteristic of Th1, and IL-5 și IL-4

(specific to Th2 subset) strongly argue in favour of implication *effector memory T-cells* [11] in patients with double infection (CMV and hepatitis B and C viruses) that we investigated.

3.3. Correlations between cytokines and IgG anti-CMV

Studying correlations among serological values of cytokines and correlations between cytokines and IgG anti-CMV revealed interesting results. No significant correlations were observed in control group. In group with hepatitis B we found significant correlations between IL-12 and IFN- γ and between IL-12 and IL-5. On contrary, in patients with hepatitis C we found more significant correlations among cytokines that we investigated and between cytokines and anti-CMV antibodies. The presence of slight but significant correlation between IgG anti-CMV and IL-4 ($r=0.2$; $p<0.03$) correlation that is absent in the other groups that we investigated, seems to suggest predilection for stimulation of Th2 lymphocytes sub-population in CMV infection and double infection CMV-HCV. Moreover, we found unexpected statistically significant positive correlations between proinflammation cytokines of type Th1, IL-12, IFN- γ and those of type Th2 IL-4 and IL-5. Th2 subset was prioritized in detriment to TH1, which could represent another reason of maintaining latency of CMV infection, not only that of HCV infection[11, 11]. It could also be an explanation of the impossibility of eradication double infection (CMV and HCV).

3.4. Biochemical analysis

By comparison, we observe the existence of great differences between controls and patients with hepatitis B or C in transaminases, GGT, AF and bilirubin. (Tabel II).

Moreover the results of our biochemical tests document that viral double infection (CMV plus a hepatic viruses B or C) aggravates liver lesions and causes a significant elevation of serological transaminases levels. At the same time prime-infection with CMV (IgM + IgG anti-CMV positive) causes an elevation of transminase levels greater that chronic infection (only IgG anti-CMV positive) (Table II).

We also observed differences between average values of seropositive patients and those of seronegative patients in testing alkaline phosphatase in patients with hepatitis B (185.714 U/L in seropositive patients; 143.0 U/L in seronegative patients) and bilirubin in both groups with viral chronic hepatitis, but not at GGT level.

Table II. Values of biochemical analysis obtained in patients-witnes and patients with viral hepatitis and hepatitis C (AF= alkaline phosphatase, Bil.=bilirubin)

	Number of cases	Patients-witness		Hepatitis B		Hepatitis C	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ASAT	100	21.870	6.8470	63.520	48.2130	59.810	50.5982
ALAT	100	28.080	6.9277	87.520	67.2812	76.490	58.5358
AF	100	160.200	63.9214	186.350	45.4053	201.720	49.7956
GGT	100	28.220	9.7800	62.340	39.0623	63.070	47.1934

BIL.	100	0.4328	0.1409	0.7698	0.3645	0.8255	0,3401
-------------	-----	--------	--------	--------	--------	--------	--------

3.5 Correlations, hematological analysis inclusive

After calculating correlation coefficients we observed several interesting significant correlations:

– In patients-witness we observed the following correlations: IgG anti-CMV with AF ($p < 0.02$) and GGT; IL-12 and ALAT/GPT; AF and hematocrit (Htc) ($p < 0.05$).

– In patients with hepatitis B: IL-5 not only with IL-12 and IFN- γ ($p < 0.05$), but with haemoglobin (Hb) and hematocrit (Htc) ($p < 0.001$) as well; IgG anti-CMV with ASAT/GOT and ALAT/GPT ($p < 0.0005$), and with AF, Bilirubin and Htc ($p < 0.05$). Our study for the first time proves the association between levels of IgG anti-CMV and ASAT/GOT respectively ALAT/GPT. In the same group with chronic hepatitis B we observed correlations between the number of leucocytes and serological levels of ASAT ($r = 0.210$; $p < 0.02$), ALAT ($r = 0.191$; $p < 0.03$) and GGT ($r = 0.174$; $p < 0.05$). These associations are difficult to be interpreted, especially as we can not affirm that global number of leucocytes or a certain population – as example lymphocytes population, more specific LT CD4⁺ or CD8⁺, Th1 or Th2 – is to be taken into account. Further studies must be completed to elucidate this topic.

– In patients with chronic hepatitis C: there are unexpected inverse correlations between IL-12 and AF ($p < 0.03$); between IFN- γ and Leu and Hb ($p < 0.05$); between IL-5 and Leu and Hb ($p < 0.05$); between IL-4 and bilirubin and Leu ($p < 0.05$); between IgG anti-CMV and ASAT/GOT, ALAT/GPT; between bilirubin and Htc ($p < 0.0005$) and Hb and Htc ($p < 0.05$). For the first time the association between IL-5 and alkaline phosphatase ($r = 0.372$; $p < 0.0005$) and leucocytes ($r = 0.182$; $p < 0.04$) and trombocytes ($r = 0.200$; $p < 0.03$) is recorded, and seems to have a pathogenetic relevance if we take into consideration the data that proves the role of trombocytes in injury of hepatic tissue.

4. CONCLUSIONS

1. The absence of induction of producing IL-1 by CMV, an early proinflammation cytokine, by monocytes/macrophages could represent one of the reasons for explaining inefficiency of immune system in eradicating CMV infection and in maintaining virus latency.
2. A preferential synthesis of IL-12 by LT and not by macrophages is likely to occur. The statistically significant association of serological levels of this interleukin with IFN- γ in patients with hepatitis B pleads for it.
3. The fact that, on the one side CMV infection did not stimulate production of IFN- γ and, on the other side, the proteins codified by virus inhibit the IFN- γ R signaling pathways, determines the substantial reduction of pro-inflammation actions and of

salutary effect of IFN- γ . This could also explain the failure to eradicate the virus by the immune system and to maintain virus latency.

4. We observed that there is a significant correlation between serological level of IgG anti-CMV with IL-4 ($r=0.200$; $p<0.03$) in patients with chronic hepatitis C infection, which seems to suggest predilection for stimulation of Th2 lymphocytes sub-population in CMV infection and double infection CMV-HCV. Th2 subset was prioritized in detriment to Th1, which could represent another reason of maintaining latency of CMV infection or of the two viruses and of the impossibility of eradication double infection (CMV and HCV).
5. The presence of several statistically significant correlations between the serological levels of IFN- γ and IL-12, the cytokinic characterisc of Th1, but also with IL-5 and IL-4 (specific to Th2 subset) strongly argue in favour of implication of *effector memory T-cells* in patients with double infection (CMV and hepatitis B and C) that we investigated.
6. The results of our biochemical tests document that viral double infection (CMV plus a hepatitis virus B or C) aggravates hepatic affection and causes a significant elevation of serological transaminases levels. Moreover prime-infection with CMV (IgM anti-CMV pozitive) causes an elevation of transminase levels greater than chronic latent infection (only IgG anti-CMV pozitive).
7. We also observed differences between average values of sero-positive patients and those of sero-negative patients in testing alkaline phosphatase in patients with hepatitis B (185.714 U/L in sero-positive patients; 143.0 U/L la sero-negative patients) and bilirubin in both groups with viral chronic hepatitis, but not at GGT level.
8. In patients with hepatitis B we observed that there is a statistically significant correlation between number of leucocytes and number of serological enzymes ALAT, ASAT and GGT. In the same patients the average values of haemoglobin and hematocrit were significantly superior to those observed in controls and patients with hepatitis C ($p<0.03$ and $p<0.01$ respectively), but without differences related to CMV between sero-positive subjects and sero-negative subjects, which suggests that CMV infection does not influence levels of haemoglobin and hematocrit.
9. Average values of trombocytes were decreased in the two groups with hepatitis we investigated, differences compared to controls being statistically significant ($p<0.0005$). Moreover, in seronegative patients-witness the number of platelets were greater that in seronegative patients.
10. In hepatitis B evidence of statistically significant negative correlations between number of platelets and ASAT, ALAT, alkaline phosphatase and GGT suggests the implication of trombocytes in patogenesis of hepatic injuries, even if it is rather difficult to interpretate it.

-
11. Studying the correlations between values obtained by biochemical and by immunological tests allowed us to highlight for the first time very interesting associations: association between level of IgG anti-CMV antibodies with alkaline phosphatase and GGT in controls with latent infection with cytomegalovirus.
 12. Our study highlights the high significant correlations between IgG anti-CMV antibodies and ALAT and ASAT ($p < 0.0005$), alkaline phosphatase ($p < 0.01$) and bilirubin ($p < 0.04$) or between IL-12 and ALAT and alkaline phosphatase in patients with hepatitis B. We also point out negative interrelations of number of leucocytes, of haemoglobin and of bilirubin with the level of IFN- γ . They represent associations revealed for the first time, except for the association of ALAT and IgG anti-CMV. On the other hand, we observe the absence of any correlation between biochemical tests and IgG anti-CMV in patients with hepatitis C virus infection.
 13. We also found out for the first time that there are unknown associations of IL-5: negative with alkaline phosphatase, number of leucocytes and trombocytes in patients with viral chronic hepatitis C, but positive between the same interleukin and levels of haemoglobin and hematocrit in hepatitis B.

5. SELECTIVE REFERENCES

- 11 Vujacich C, Vidiella G, Barcelona L, Sturba E, Stamboulian D. Cytomegalovirus infection with hepatic involvement in immunocompetent adults. *Medicina (B Aires)* 2006;66:206-210.
- 11 Sinzger C, Bissinger AL, Viebahn R, et al. Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and in vivo. *J Infect Dis* 1999;180:976-986.
- 11 Pass R. F. Cytomegalovirus. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4 ed., vol. 2. Raven Press, New York, NY 2001;2675-2706
- 11 Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006;87:1763-1779.
- 11 Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection. HLA-restricted T-lymphocyte and non-T lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982;307:7-13.
- 11 Sinclair E, Black D, Epling CL, et al. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFN γ expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. *Viral Immunol* 2004;17:445-454.
- 11 Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry* 2000;40:60-68.
- 11 Seale H, MacIntyre CR, Gidding HF, Backhouse JL, Dwyer DE, Gilbert L. National Serosurvey of Cytomegalovirus in Australia. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1181-1184

11 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potential and effector functions. *Nature* 1999;401:708-712

11 Tsai S-L, Liaw Y-F, Chen M-H, Huang C-Y, Kuo GC: Detection of type-2 like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25: 449-458.

11Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP et al: Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: *ex vivo* analysis of helper T-cell responses. *J Viral Hepatol* 2006;13:708-714

CURRICULUM VITAE

Name: Chiorean

Surname: Erica

Date and place of birth: 19.05.1951, Abrud – Alba

PROFESSIONAL ACTIVITY

1966-1970 – “Horea, Cloșca și Crișan” High School, Abrud-Alba

1970-1976 – Faculty of Medicine, UMF Cluj-Napoca

1976-1977 – Doctor, Dolhasca Village Dispensary – Suceava

1977-1980 – Doctor, Abrud Polyclinic Dispensary – Alba

1980-1983 – Senior House Officer, Clinical Laboratory, Clinic Hospital for Adults, Cluj-Napoca

1983-1993 – Registrar Clinical Laboratory, Clinic Hospital for Adults, Cluj-Napoca

1993 to date – Senior Medical Practitioner Clinical Laboratory, Clinic Hospital for Adults, Cluj-Napoca

1994 to date – Consultant, Clinic Emergency Hospital “Prof. dr. O. Fodor” Cluj-Napoca

SCIENTIFIC ACTIVITY

2008 – PhD candidate, Medicine field, the title of the paper: “The impact of Cytomegalovirus infection on the patients with Hepatitis B virus (VHB) and Hepatitis C virus (VHC)” scientific coordinator prof. Victor Cristea, Ph.D

Member of professional associations:

Member of Romanian Society of Laboratory Medicine

Member of “Marcela Zamfirescu Gheorghiu” Clinic Laboratory Foundation

PARTICIPATIONS AT SCIENTIFIC EVENTS

- 50th Congress of the Hungarian Society of Clinical Pathology, Debrecen, August 2000
- National Gastroenterology, Hepathology and Digestive Endoscopy Symposium, Cluj-Napoca, June 2002
- The third Conference of “Marcela Zamfirescu Gheorghiu” Clinic Laboratory Foundation, in collaboration with Romanian Microbiology Society, Felix-Oradea, may 2004
- Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 52. Nagygyűlése, Sopron, September 2004
- SRML – the fourth National Laboratory Medicine Symposium and RoEQALM – the second Quality Assurance in Laboratory Medicine Symposium, Cluj-Napoca, November 2004
- Round table: “Present and future in allergic diseases”, Cluj-Napoca, December 2004
- Round table: “The evolution of the micro-organisms’ resistance phenomenon and its importance in the therapy and in the prevention of infectious diseases”, Cluj-Napoca, December 2004

-
- Ultrasonography progresses, Cluj-Napoca, December 2004
 - “News in Pneumophysiology – DOTS strategy including the whole Medical Network”, Cluj-Napoca, 2005
 - The 2nd Danubian Symposium on Laboratory Medicine, 4th National congress on Laboratory Medicine and 3rd Symposium on Quality Assurance in Laboratory Medicine, Arad, September 2005
 - “Nebivololum – from hope to certitude” Symposium, Cluj-Napoca, November 2005
 - “News in the diagnostic and the treatment of chronic viral hepatitis”, Sighișoara, May 2006
 - The Congress of “Marcela Zamfirescu Gheorghiu” Medicine Laboratories Society”, Timișoara, May 2006
 - Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 52. Nagygyűlése, Szeged, August-September 2006

Postgraduate courses

- “News in hematology clinic laboratory”, Fundeni Hematology Institute, Bucharest, April-May 1987
- Hematologic Cytology Course, Oncology Institute, Cluj-Napoca, June 1994
- News in echography Course, Cluj-Napoca, October 1995
- Specializing training course for design and implementation of quality systems according to European standards SR-EN-45001, ISO / CEI 25 Guide (ISO – 17025 Project) for accreditation of laboratories, Cluj-Napoca, 2000
- Oncologic Cytology Course, Oncology Institute, Cluj-Napoca, March – April 2002

Scientific papers

Papers written – first author

1. **Erica Chiorean**, N. Miron, V. Cristea. Immune invasion – an important factor in cytomegalic virus infection pathogenesis. Clujul Medical 2009; 82(2): 1667-170.
2. **Erica Chiorean**, M.M. Miron, N. Miron, V. Cristea. Human cytomegalic virus infection – prevalence and impact in general population and in patients with chronic viral B or C hepatitis. Clujul Medical 2010; 83 (1): 157-162.

Papers written – co-author

1. Dumitrașcu D, Radu D, Stanciu L, **Erica Chiorean**, Baluna R, Belascu I, Dumitrașcu DL, Andreica V: Discriminative value of fibronectine in ascetic fluid. Rom J Gastroenterol 1992; 1(3): 113-117.
2. Varga M, Dumitrașcu D, Pillof L, **Erica Chiorean**, Skin manifestation in parasite infection. Rom Arch Microbiol Immunol 2002; 60: 359-369.
3. Andreica V, Pascu O, C. Hagi, D. Pașca, Dumitra D, Dumitrașcu DL, **Chiorean Erica**, Georoceanu A. Whipple’s disease. Case report. Rom J Gastroenterol 2002; 11(4): 325-330.
4. Olimpia Chira, Badea R, Diana Dumitrașcu, Șerban A, Branda H, Al Hajjar N, **Erica Chiorean**, Carmen Cruciat. Eosinophilic Ascites in a Patient with Toxocara Canis Infection. A case report. Rom J Gastroenterol 2005; 14(4): 397-400.

-
5. Monica Acalovschi, Anca Ciocan, Ofelia Mostean, Simona Tarziu, **Erica Chiorean**, Hildegard Keppler, Ramin Schirin-Sokhan, Frank Lambert. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphism? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med* 2006; 17 (2006) 490-494.
 6. Tripon S, Grigorescu M, Suteu T, Branda H, Cavași A, Spîrchez Z, **Chiorean E**, Badea R. Efficacy of ultrasound as a screening test for early detection of hepatocellular carcinoma. A 6-year prospective study by ultrasound and alpha-fetoprotein. *Medical Ultrasonography* 2009; 11(4): 17-24.

Papers in summary of national scientific events – co-author

1. Monica Acalovschi, Lammart F, Ciocan A, Moștean O, **Erica Chiorean**. ABCG5/G8 polymorphism as a predisposing factor for biliary lithiasis. The 5th Internal Medicine National Congress with international participation, Călimănești-Căciulata, april 2005.

Foreign languages

- English language
- French language