

Occult HCV infection in hemodialysis patients with elevated liver enzymes

Ramezani A¹, Eslamifar A¹, Banifazl M², Keyvani H³, Razeghi E⁴, Ahmadi F⁴, Amini M⁴,
Gachkar L⁵, Bavand A¹, Aghakhani A^{*1}

1. Department of Clinical Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Iranian Society for Support of Patients with Infectious Diseases, Tehran, Iran
3. Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Nephrology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Infectious Diseases Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 10 Nov 2013, Accepted: 18 Dec 2013

Abstract

Background: Occult hepatitis C virus (HCV) infection is defined as the presence of HCV-RNA in liver or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the absence of detectable hepatitis C antibody (anti-HCV) or HCV-RNA in the serum. Although occult HCV infection is less aggressive than classic chronic HCV infection, nevertheless it is important in management of hemodialysis (HD) patients. Occult HCV infection has been described in two different clinical settings: in patients with normal liver enzymes or in patients with abnormal values of liver enzymes. The aim of this study was to detect the occult HCV infection in hemodialysis patients with elevated liver enzymes.

Patients & Methods: This cross sectional study was performed in hemodialysis patients referring to 3 dialysis units in Tehran. In 30 anti-HCV negative HD patients with elevated liver enzymes, presence of HCV-RNA in plasma samples was tested by Reverse Transcriptase-Nested Polymerase Chain Reaction (RT-nested PCR). In cases with negative anti-HCV and plasma HCV-RNA, HCV-RNA was checked in PBMC specimens by RT-nested PCR.

Results: A total of 30 HD patients with mean age 54.4 ± 14.1 years and mean dialysis duration 81.2 ± 64.4 months were enrolled in the study. All HD subjects were negative for HCV-RNA in plasma and occult HCV infection with RT-nested PCR method.

Conclusion: Occult HCV infection was rare in HD patients with elevated levels of liver enzymes.

Keywords: Aspartate Aminotransferase, Hemodialysis, Hepatitis C

*Corresponding author:

Address: Clinical Research Dept. Pasteur Institute of Iran;
Email: araghakhani@hotmail.com

عفونت نهفته هپاتیت C در بیماران همودیالیزی دارای سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی

آمیثیس رضانی¹، علی اسلامی فر²، محمد بنی فضل³، حسین کیوانی⁴، عفت رازقی⁵، فرخ لقا احمدی⁵، منوچهر امینی⁵، لطیف گجگار⁶، آناهیتا باوند⁷، آرزو آقاخانی^{2*}

1. دانشیار، بخش تحقیقات بالینی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
 2. دانشیار پاتولوژی، بخش تحقیقات بالینی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
 3. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور، تهران، ایران
 4. استاد، گروه ویروولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
 5. دانشیار، بخش نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 6. استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، ایران
 7. کارشناس علوم آزمایشگاهی، بخش تحقیقات بالینی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- تاریخ دریافت: 92/8/19 تاریخ پذیرش: 92/9/27

چکیده

زمینه و هدف: عفونت نهفته ویروس هپاتیت C با حضور HCV-RNA در بیوپسی کبد یا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران، بدون وجود آنتی بادی ضد هپاتیت C یا HCV-RNA در سرم توصیف می‌گردد. هر چند که عفونت نهفته هپاتیت C نسبت به عفونت مزمن کلاسیک خفیف‌تر است با این حال می‌تواند در نحوه برخورد و درمان بیماران همودیالیزی حائز اهمیت باشد. عفونت نهفته هپاتیت C در دو گروه از بیماران دارای آنزیم‌های کبدی طبیعی و افراد دارای سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی مشاهده می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین حضور عفونت نهفته هپاتیت C در بیماران همودیالیزی دارای سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی بیماران همودیالیزی مراجعه کننده به 3 مرکز دیالیز شهر تهران انجام گرفت. از بین بیماران فاقد آنتی بادی هپاتیت C مراجعه کننده به این مراکز 30 بیمار که دارای افزایش آنزیم‌های کبدی بودند از نظر حضور HCV-RNA در پلاسما با روش RT-nested PCR بررسی شدند و در افراد HCV-RNA منفی، وجود HCV-RNA در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بررسی گردید.

یافته‌ها: 30 بیمار همودیالیزی با میانگین سنی $54/4 \pm 14/1$ سال و میانگین مدت زمان دیالیز $81/2 \pm 64/4$ ماه در مطالعه وارد شدند. همه بیماران از نظر HCV-RNA پلاسما و عفونت نهفته هپاتیت C با روش RT-nested PCR منفی بودند.

نتیجه گیری: مطالعه ما نشان داد که در بیماران همودیالیزی دارای افزایش آنزیم‌های کبدی نیز میزان عفونت نهفته هپاتیت C ناچیز می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز، بیماران همودیالیزی، عفونت نهفته هپاتیت C

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات بالینی

Email: araghakhani@hotmail.com

مقدمه

ویروس هپاتیت C (Hepatitis C virus- HCV) یک RNA ویروس تک رشته‌ای متعلق به خانواده فلاوی ویریده و ژنوس هپاسی ویروس می‌باشد (1). عفونت HCV بیش از 170 تا 200 میلیون نفر را در دنیا آلوده نموده است. این ویروس هپاتوتروپیک و لنفوتروپیک بوده و مهم‌ترین علت بیماری‌های مزمن کبدی از جمله سیروز یا هپاتوسلولار کارسینوما می‌باشد (4-2). تشخیص عفونت HCV براساس حضور آنتی بادی ضد HCV (anti-HCV) یا وجود HCV-RNA در سرم است (5). فرم جدیدی از عفونت مزمن HCV تحت عنوان عفونت نهفته HCV (Occult HCV infection) اولین بار توسط کاستیلو و همکاران در سال 2004 معرفی شد (6). عفونت نهفته HCV با حضور HCV-RNA در بیوپسی کبد بیماران، بدون وجود anti-HCV یا HCV-RNA در سرم بیماران تعریف می‌شود. عفونت Occult HCV در دو حالت بالینی متفاوت مشاهده می‌گردد (7). حالت اول افرادی هستند که دارای anti-HCV مثبت، HCV-RNA منفی و مقادیر طبیعی آنزیم‌های کبدی می‌باشند (کریه‌های اسمپتوماتیک هپاتیت C) که نزدیک به 90 درصد دارای RNA ویروس در کبد و سلولهای تک هسته ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells- PBMCs) می‌باشند. این افراد کسانی هستند که عفونت HCV در آنها به صورت خود به خود یا پس از درمان ضد ویروسی بهبود یافته است و در این بیماران HCV-RNA در کبد و PBMCs سال‌ها پس از بهبودی، یافت می‌گردد. گروه دوم افراد مبتلا به عفونت نهفته HCV، سرولوژیکال silent نامیده می‌شوند. در این افراد به طور ثابت سرولوژی anti-HCV و HCV-RNA سرم منفی بوده و تنها افزایش آنزیم‌های کبدی مشاهده می‌شود (8).

استاندارد طلایی و دقیق‌ترین روش برای مشخص نمودن عفونت نهفته HCV یافتن HCV-RNA در کبد می‌باشد، ولی زمانی که بیوپسی کبد در دسترس نباشد،

بررسی حضور HCV-RNA در PBMCs برای تشخیص مفید است (9، 10). بنابر این در حال حاضر عفونت نهفته HCV با سرولوژی منفی هپاتیت C و عدم حضور HCV-RNA در پلاسما و حضور HCV-RNA در بیوپسی کبد یا PBMCs بیماران تعریف می‌گردد (10).

به نظر می‌رسد که عفونت نهفته هپاتیت C نسبت به عفونت مزمن کلاسیک HCV خفیف‌تر باشد با این حال این بیماران امکان پیشرفت به سمت سیروز کبدی و حتی کارسینوم کبد را دارند. بنابر این بیماران با سرولوژی منفی HCV دارای عفونت نهفته هپاتیت C ممکن است از درمان‌های ضد ویروسی شامل pegylated interferon و ریبویرین سود ببرند (11).

عفونت نهفته HCV در گروه‌های متفاوتی مانند بیماران دیالیزی، اعضای خانواده بیماران دارای عفونت HCV و افراد دارای نقص ایمنی مانند بیماران آلوده به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) مشاهده می‌گردد (10-14).

با توجه به مطالعات محدود انجام شده بر روی عفونت نهفته HCV و اهمیت آن و این که تاکنون چنین مطالعه‌ای بر روی بیماران همودیالیزی در ایران انجام نشده است بر آن شدیم تا میزان این عفونت را در بیماران همودیالیزی فاقد هپاتیت کلاسیک B و C که دارای سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی می‌باشند تعیین نماییم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی بر روی بیماران همودیالیزی مراجعه کننده به 3 مرکز دیالیز شهر تهران از مرداد تا شهریور 1392 انجام گرفت. پروتکل مطالعه در کمیته اخلاق انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور به تصویب رسید (کد اخلاق: 2-87). از بین بیماران anti-HCV، HBV surface antigen (HBsAg) و anti-HIV منفی مراجعه کننده به این مراکز 30 بیمار که دارای افزایش آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) بودند از نظر حضور HCV-RNA در پلاسما بررسی شدند و در

PCR در ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتید یو بروماید مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها در نرم افزار SPSS نسخه 16 وارد شدند و با استفاده از آزمون کای اسکور تجزیه و تحلیل شدند. یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار یا عدد و درصد گزارش گردیدند.

یافته‌ها

30 بیمار همودیالیزی با میانگین سنی $54/4 \pm 14/1$ سال (طیف 30 تا 81 سال) در این مطالعه وارد شدند. 53/6 درصد بیماران، مرد و 46/4 درصد زن بودند. دفعات تزریق خون در بیماران 3 بار در هفته و میانگین مدت زمان دیالیز در این افراد $64/4 \pm 81/2$ ماه بود. 28/6 درصد بیماران سابقه دیابت و 46/4 درصد آنها سابقه افزایش فشار خون داشتند. سطح ALT در 23 بیمار و AST در 2 بیمار افزایش یافته بود. در 5 بیمار سطوح هر دو آنزیم ALT و AST افزایش نشان داد. همه بیماران از نظر HCV RNA پلاسما و سپس عفونت نهفته HCV در PBMC با روش RT-nested PCR منفی بودند.

بحث

در این مطالعه حضور عفونت نهفته HCV در بیماران همودیالیزی anti-HCV منفی دارای افزایش آنزیم‌های کبدی بررسی گردید. مطالعه ما نشان داد که عفونت نهفته HCV در این بیماران علی‌رغم سن، جنس، طول مدت دیالیز مشاهده نمی‌گردد.

افزایش آنزیم‌های کبدی در بیماران همودیالیزی می‌تواند به دلایل ویروسی (هپاتیت B یا C) یا علل غیر ویروسی (اتوایمونیتی، هپاتیت توکسیک، اختلالات متابولیک) باشد. با این حال در 2 درصد بیماران همودیالیزی با افزایش آنزیم‌های کبدی هیچ علتی یافت نمی‌شود (10).

عفونت نهفته HCV در سراسر دنیا منتشر می‌باشد و همه ژنوتایپ‌های HCV می‌توانند در ایجاد این عفونت دخیل باشند (11). یکی از علل افزایش آنزیم‌های کبدی در

افراد HCV-RNA منفی، وجود HCV-RNA در PBMC بررسی گردید. HBsAg و anti-HCV (antibody) توسط روش الیزا با استفاده از کیت (Enzygnost, Dade Behring, Marburg GmbH, Germany) بررسی شدند. anti-HIV با کیت الیزا (bioMerieux, Durham, NC) بررسی گردید و نمونه‌های مثبت با روش وسترن بلات (Diaplus, San Francisco, USA) تایید شدند. برای کلیه بیماران 2 تست الیزا از نظر anti-HCV صورت گرفت.

آنزیم‌های کبدی با استفاده از دستگاه Hitachi autoanalyser, Tokyo, Japan 704 بررسی گردیدند. سطوح ALT بالاتر از 17 IU/L و سطوح AST بالاتر از 24 IU/L در بیماران همودیالیزی به عنوان مقادیر افزایش یافته تلقی گردیدند (15).

6 میلی‌لیتر خون محیطی از بیماران گرفته شده و در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری گردید. سپس پلاسما جدا شده و در -70 درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات نگهداری گردید. PBMC نیز از خون حاوی EDTA با روش استاندارد Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (Lymphoprep, Oslo, Norway) جدا شد. سپس رسوب PBMC 3 بار با محلول فسفات بافر سالین شسته شده و در 300 میکرولیتر RNALater (Ambion Inc, TX, USA) Austin, در دمای -70 درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات ذخیره گردید.

HCV-RNA از پلاسما و رسوب PBMC با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استخراج گردید.

حضور HCV-RNA در نمونه‌های پلاسما و PBMC با استفاده از روش reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) بررسی گردید. ساخت cDNA و پرایمرهای مورد استفاده براساس پروتکل توصیف شده در مطالعه کیوانی و همکاران انجام گرفت (16). محصولات

عفونت را تعیین نماید. ولی از آنجائی که بیوپسی کبد به صورت روتین در همه بیماران همودیالیزی توصیه نمی‌گردد، ممکن است بررسی PBMC به تنهایی بعضی از موارد این عفونت را نشان ندهد. بنا بر این در مطالعه ما نیز میزان عفونت نهفته HCV ممکن است کمتر از میزان واقعی باشد.

نتیجه گیری

مطالعه ما نشان داد که در بیماران همودیالیزی دارای افزایش آنزیم‌های کبدی نیز میزان عفونت نهفته HCV ناچیز می‌باشد. به هر حال با توجه به محدود بودن تعداد مطالعات بر روی بیماران همودیالیزی، مطالعات بیشتر با تعداد بیماران بیشتری برای تعیین میزان عفونت نهفته HCV در بیماران همودیالیزی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور، به جهت حمایت مالی از طرح فوق (شماره 87) قدردانی می‌نمایند.

منابع

- 1- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1631-48.
- 2- Alavian S-M. We need a new national approach to control hepatitis C: It is becoming too late. *Hepat Mon*. 2008;8(3):1-3.
- 3- Bokharaei-Salim F, Keyvani H, Monavari SHR, Alavian SM, Madjd Z, Toosi MN, et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. *Journal of medical virology*. 2011;83(6):989-95.
- 4- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and

بیماران همودیالیزی می‌تواند عفونت نهفته HCV باشد. این عفونت در گروه‌های پر خطر مانند بیماران دیالیزی، اعضای خانواده بیماران دارای عفونت HCV و افراد دارای نقص ایمنی مانند بیماران آلوده به ویروس نقص ایمنی انسانی توصیف شده است (14-10). مطالعات محدودی بر روی عفونت نهفته HCV در گروه‌های مختلف در کشورهای ژاپن، ایتالیا، مصر، کلمبیا، پاکستان و ایران انجام شده است (14-3، 19-17).

به هر حال مطالعات انجام شده بر روی عفونت نهفته HCV در بیماران همودیالیزی محدود می‌باشد. در مطالعه‌ای که باریل و همکاران در اسپانیا بر روی بیماران همودیالیزی انجام دادند، 45 درصد بیماران دارای عفونت نهفته HCV بودند. این بیماران به صورت قابل توجهی مدت زمان دیالیز بیشتر و مقادیر بالاتری از ALT داشتند (10). یاکاریلماز و همکاران شیوع عفونت نهفته HCV را در بیماران همودیالیزی ترکیه 4/8 درصد گزارش کردند (20). این میزان در بیماران همودیالیزی اندونزی 12/9 درصد تعیین شده است (21). بررسی دیگری در تایلند متعاقب یک طغیان در یک واحد همودیالیز عفونت نهفته HCV را در بیماران همودیالیزی، شایع گزارش کرد (22).

اختلاف در میزان شیوع عفونت نهفته HCV در بیماران همودیالیزی می‌تواند به دلیل شیوع متفاوت عفونت HCV در کشورهای مختلف و واحدهای دیالیز متفاوت باشد. شیوع کلی عفونت HCV در جمعیت ایرانی پایین و حدود 0/5 درصد می‌باشد ولی این میزان در بیماران همودیالیزی به 11-25 درصد در مراکز مختلف می‌رسد (23).

یافتن HCV-RNA در نمونه‌های بیوپسی کبد روش استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت نهفته HCV محسوب می‌شود و یافتن HCV-RNA در PBMC یک روش آلترناتیو در غیاب نمونه بیوپسی کبد می‌باشد و HCV-RNA در 70 درصد بیماران دارای عفونت نهفته HCV یافت می‌شود (9، 10). بنا بر این یافتن HCV-RNA در PBMC نمی‌تواند همه موارد این

- HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PloS one*. 2009;4(12):e8128-9.
- 14- Dapena M, Figueras C, Noguera-Julian A, Fortuny C, de José MI, Mellado MJ, et al. Implementation of Occult Hepatitis Screening in the Spanish Cohort of HIV-Infected Pediatric Patients. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(9):e377-9.
- 15- Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi S, Colucci P, Pagano A, Ponticelli C, et al. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *American journal of kidney diseases*. 2001;38(5):1009-15.
- 16- Keyvani H, Bokharaei-Salim F, Monavari SH, Esghaei M, Toosi MN, Fakhim S, et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Candidates for Liver Transplant With Cryptogenic Cirrhosis. *Hepatitis monthly*. 2013;13(8): e11290.
- 17- Zaghoul H, El-Sherbiny W. Detection of occult hepatitis C and hepatitis B virus infections from peripheral blood mononuclear cells. *Immunological investigations*. 2010;39(3):284-91.
- 18- Youssef SS, Nasr AS, El Zanaty T, El Rawi RS, Mattar MM. Prevalence of occult hepatitis C virus in 39gyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat Res Treat*. 2012;2012:429784.
- 19- Idrees M, Lal A, Malik FA, Hussain A, Akbar H, Butt S, et al. Occult hepatitis C virus infection and associated predictive factors: The Pakistan experience. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11(2):442-5.
- 20- Yakaryilmaz F, Alp Gurbuz O, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Renal failure*. 2006;28(8):729-35.
- 21- Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari DI, et al. Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1147-71.
- 5- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-74.
- 6- Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;189(1):7-14.
- 7- Laskus T, Operskalski EA, Radkowski M, Wilkinson J, Mack WJ, Al-Harthi L, et al. Negative-strand hepatitis C virus (HCV) RNA in peripheral blood mononuclear cells from anti-HCV-positive/HIV-infected women. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(1):124-33.
- 8- Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Reviews in medical virology*. 2008;18(3):139-57.
- 9- Bartolomé J, López-Alcorocho JM, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Quiroga JA, Palacios R, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *Journal of virology*. 2007;81(14):7710-5.
- 10- Barril G, Castillo I, Arenas MD, Espinosa M, Garcia-Valdecasas J, Garcia-Fernández N, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(12):2288-92.
- 11- Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. New perspectives in occult hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(23):2887-94.
- 12- Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V. Hepatitis C virus infection in the family setting of patients with occult hepatitis C. *Journal of medical virology*. 2009;81(7):1198-203.
- 13- De Marco L, Gillio-Tos A, Fiano V, Ronco G, Krogh V, Palli D, et al. Occult

- hemodialysis unit in Thailand. *Journal of medical virology*. 2008;80(5):808-15.
- 23- Merat S, Rezvan H, Nouraie M, Jafari E, Abolghasemi H, Radmard AR, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus: the first population-based study from Iran. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:e113-e6.
- Yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *Journal of medical virology*. 2013;85(8):1348-61.
- 22- Thongsawat S, Maneekarn N, Kuniholm MH, Pantip C, Thungsuputi A, Lumlertkul D, et al. Occult hepatitis C virus infection during an outbreak in a