

· 综述 ·

隐匿性丙型肝炎病毒感染

杨玉英 郭江 刘庄 郎振为

引起肝脏功能异常的原因很多,有感染(尤其是病毒感染)、化学物质(包括药物)、酒精、脂肪沉积、代谢疾病、自身免疫、肝脏肿瘤(原发或继发)、淤血性肝损害等,但临床上仍有5%~10%患者出现的肝功异常不能用上述病因来解释,被称为“隐源性肝炎”^[1]。在这类肝炎患者中,越来越多的研究资料证实隐匿性乙型病毒性肝炎及丙型病毒性肝炎的存在,并引起了广大学者的关注。

一直以来,HCV感染的诊断主要是根据血清中检出抗-HCV和/或HCV RNA。但近年来研究发现,一些原因未明的肝病患者,其血清抗-HCV和HCV RNA阴性,但其肝细胞或外周血单个核细胞(PBMCs)中可检测到HCV RNA,且干扰素治疗有效。此类HCV感染者被称为隐匿性HCV感染(occult HCV infection)^[2]。隐匿性丙型肝炎的发现,对目前研究肝脏疾病的流行病学及临床有重要意义。有文献报道,隐匿性HCV感染者的70%外周血PBMCs中可发现HCV RNA^[2],这对献血员、肝脏或骨髓移植者供体及血液透析患者应格外加以注意。本文就隐匿性丙型肝炎病毒感染的发现、诊断方法、临床特征及治疗等方面的研究进展作一简要综述。

一、隐匿性HCV感染的发现

2004年,Castillo等^[2]应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和原位杂交法检测肝活体组织中HCV RNA,对100例病因不明(排除已知的肝病病因)、且均进行了肝穿刺检查、肝功能持续异常、血清抗-HCV和HCV RNA均阴性的肝病患者进行研究分析,发现其中有57例HCV RNA阳性,其中有48例肝组织中HCV抗原阳性,并且70%肝活体组织HCV RNA阳性患者的PBMC也呈HCV RNA阳性,故确定这是一种新形式的HCV感染,即隐匿性HCV感染,这是隐匿性HCV感染首次被正式报道。

2003年,Casato等^[3]报道血清抗-HCV和HCV RNA阴性的3例冷球蛋白血症患者中,2例用干扰素治疗后病情减轻,但在停药后病情复发,并从其冷球蛋白沉淀中检测到HCV RNA;另1例为疱疹病毒感染相关的冷球蛋白血症患者,在其急性发作时,从其冷球蛋白沉淀中也检测到HCV RNA。Stapleton^[4]、Schmidt等^[5]也报道了在一些原因未明而持续肝功异常的肝病患者中存在血清阴性的HCV感染。

二、隐匿性HCV感染的诊断方法

1. RT-PCR和原位杂交法:应用这两种方法检测肝活体组织中的HCV RNA

作者单位:100011 北京市,北京地坛医院

通讯作者:杨玉英 Email: yangyuying@vip.sina.com

是诊断隐匿性 HCV 感染的金指标。但特别要求检测技术,即要采用合适的冰冻肝活体组织标本,要求从采集到冷冻的时间要尽可能短,这样才能使肝组织中 HCV RNA 不被降解,从而保证样本中 HCV RNA 的浓度^[6]。早在 1992 年及 1996 年, Bresters 和 Geller 等^[7,8]检测隐匿性肝硬化和非甲非乙型肝炎患者的肝活体组织标本中的 HCV RNA,但均未检出,考虑可能与肝组织标本中 HCV RNA 被降解有关。Geller 等检测的是石蜡包埋的肝组织切片中的 HCV RNA,可能因标本保存时间过长, HCV RNA 已被降解^[9]; Bresters 等虽用冰冻的肝活体组织标本,但未提及从标本采集到冷冻的时间,如果间隔过长, HCV RNA 也可能已降解^[6];而 Castillo 等^[2]所检测的冰冻肝活体组织标本从采集到冷冻的时间仅为 25 ~ 30 s,这样就保证了样本中 HCV RNA 的浓度。

由于肝组织活体检查有创伤,且在肝组织标本中检测 HCV RNA 有一定的技术难度。因此,本法难以作为诊断隐匿性 HCV 感染的常规技术,所以寻找其他检测外周血的可替代方法尤显重要。

2. 应用 RT-PCR 法检测外周血 PBMC 中 HCV RNA: Carreno^[10]等对 21 例隐匿性 HCV 感染者,应用 RT-PCR 和原位杂交法比较血浆、PBMCs 和全血 HCV RNA 检出情况。结果血清 HCV RNA 阴性者,其血浆 HCV RNA 亦为阴性;3 例全血 HCV RNA 阳性;12 例 PBMCs 中检出 HCV RNA。这表明 PBMCs 的检出率明显高于全血和血浆,应用此法可确诊更多的隐匿性 HCV 感染。Castillo 等^[11]的研究也进一步支持了这一观点。

3. 用超高速离心机浓缩血清检测循环中 HCV RNA: Bartolome^[12]等对 106 例肝组织 HCV RNA 阳性的隐匿性 HCV 感染者,常规抽取 2 ml 血清用超高速离心机以 16 666 r/min,离心 17 h 后用 RT-PCR 法检测血清中 HCV RNA,结果显示 62 例患者呈阳性,平均滴度为 70.5 拷贝/ml (18 ~ 192 拷贝/ml),提示隐匿性 HCV 感染者循环中存在低载量的 HCV RNA,经超高速离心机将其浓缩后可被检出。

4. HCV 抗原-抗体的联合检测: Juan 等^[13]应用 Monolisa HCV Ag-Ab Ultra 试剂对 115 例隐匿性 HCV 感染者的血清进行检测,除 1 例有阳性反应,3 例有弱阳性反应外,其他病例均为阴性,提示 HCV 抗原-抗体的联合检测对隐匿性 HCV 感染的诊断无帮助。

5. HCV 相关多肽抗体(GOR 抗体)-IgG 检测:有文献报道 HCV 感染后可产生抗-GOR,并在多数 HCV 感染的个体中可检出抗-GOR,即抗-GOR 与 HCV 感染密切相关^[14,15],抗-GOR 检测有助于 HCV 感染的诊断^[16]。对此, Quiroga 等^[17]对 115 例隐匿性 HCV 感染者血中-GOR IgG 进行检测,发现其中 22 例(20%)患者呈阳性,而无 HCV 相关疾病的患者均为阴性,其诊断的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 100%、20%、100% 及 44.3%。由此可以得出抗-GOR IgG 检测有助于未行肝活体组织检查的隐匿性 HCV 感染患者的诊断,但同时也发现无论是抗-GOR IgG 的阳性率还是阳性滴度,在隐匿性 HCV 感染者中均较慢性 HCV 患者明显低下,且两组差异具有统计学意义。

6. 其他: Castillo 等^[2]报道, 100 例病因不明的肝病患者中, 33% 肝组织活体检查 HCV RNA 阳性患者和 30% PBMCs HCV RNA 阳性患者的血清 GGT 水平升高, 但 ALT 水平正常。因此, 对隐匿性 HCV 感染者建议同时检测 ALT 和 GGT。

另 Quiroga 等^[18]在隐匿性 HCV 感染者的外周血中发现 HCV 特异性的 T 细胞反应。Juan 等^[19]也报道了类似的发现, 并观察到在隐匿性 HCV 感染者外周血 HCV 特异性的 T 细胞反应较慢性 HCV 患者明显活跃, 可能的解释是隐匿性 HCV 感染患者肝损伤程度较慢性 HCV 感染患者轻^[20], 可能与 HCV 特异性的 T 细胞反应抑制了 HCV 对肝细胞的损伤有一定关系^[21]。

三、隐匿性 HCV 感染的临床特点

Castillo 等^[2]将肝功能异常、病因不明的 100 例肝病患者分为 2 组进行研究。第 1 组 57 例为隐匿性 HCV 感染者, 即在其肝活体组织中检测到 HCV RNA, 且基因分型均为 1b 型; 第 2 组 43 例为病因不明肝病患者, 即在其肝活体组织中未检测到 HCV RNA。2 组比较结果表明: 隐匿性 HCV 感染组的肝功能及血脂水平与病因不明肝病患者无明显差异, P 均 > 0.05 ; 肝组织学炎症坏死评分在隐匿性 HCV 感染组 A1 级或以上者占 35%, 肝纤维化 F1 级或以上者占 18%, 而原因不明肝病组分别为 14% 和 2%。说明隐匿性 HCV 感染可导致肝损伤, 其肝组织学炎症坏死和肝纤维化程度较原因不明肝病组严重, 用 logistic 回归统计学分析显示, 肝组织学炎症坏死和肝纤维化程度只与患者的年龄、肝内 HCV RNA 是否存在有独立相关性。

Pardo 等^[20]比较了 68 例隐匿性 HCV 感染者与 69 例未经治疗的慢性 HCV 感染者(血清-HCV 和 HCV RNA 阳性)的临床特点。结果显示隐匿性 HCV 感染者的病情、炎症坏死度和纤维化程度不如慢性 HCV 感染者重, 且被 HCV 感染的肝细胞数量较慢性 HCV 感染者少。

Castillo 等^[22]对 35 例隐匿性 HCV 感染者、17 例隐匿性 HBV 感染者与 24 例隐匿性 HBV/HCV 合并感染者(肝组织内 HBV DNA 和 HCV RNA 均阳性)的临床、病毒学及肝组织学特征进行了分析比较, 结果显示 3 组间, 临床及流行病学特征无差异; 单独隐匿性 HCV 感染者肝内 HCV RNA 病毒载量及感染肝细胞的数量与隐匿性 HBV/HCV 合并感染者相似; 单独隐匿性 HBV 感染者肝内 HBV DNA 病毒载量及感染肝细胞的数量与隐匿性 HBV/HCV 合并感染者相似; 3 组间, 肝细胞损伤程度无明显差异。由此可得出隐匿性 HBV/HCV 合并感染者肝脏损伤程度不比单独隐匿性 HCV 感染者或隐匿性 HBV 感染者重, 且乙型和丙型肝炎病毒的合并感染未对病毒复制产生抑制。

四、隐匿性 HCV 感染的治疗

有关隐匿性 HCV 感染者抗病毒的疗效, Pardo 等^[23]观察了 10 例隐匿性 HCV 感染者, 其肝细胞中检出的 HCV 基因型均为 1b, 用标准剂量的聚乙二醇化干扰素加利巴韦林治疗 24 周, 治疗结束后随访 24 周。结果在治疗 12 周时, 40% (4/10) 患者 ALT 水平恢复正常, 60% (6/10) 患者的 PBMCs 中 HCV RNA 低于检测下限。

在治疗 24 周结束时,80% (8/10) 患者的 ALT 水平正常,80% (8/10) 患者的 PBMC 中 HCV RNA 低于检测下限。在末次随访时(即治疗结束后 24 周),仍有 60% (6/10) 的患者 ALT 水平正常,70% (7/10) 患者的 PBMCs 中 HCV RNA 阴性。在治疗前后,分别对 5 例患者进行肝活体组织学检查,结果发现虽然肝细胞中 HCV RNA 持续存在,但治疗后,有 3 例患者出现肝脏炎症坏死和纤维化评分下降、肝损伤改善。由此得出隐匿性 HCV 患者应用标准剂量的聚乙二醇化干扰素加利巴韦林治疗有效,同时也提示对隐匿性 HCV 感染者进行抗病毒治疗,不能完全清除病毒。但应指出该研究病例数少,所得出的结果有待扩大病例进一步验证。

五、其他形式的隐匿性 HCV 感染

1. 血清抗-HCV 阳性、HCV RNA 阴性、肝功能正常的患者: 这些患者常被认为 HCV 感染已被清除,对此 Carreno 等^[24]做了一项研究,即观察 12 例此类患者的肝脏中是否还存在 HCV RNA。结果:10/12 (85%) 的患者肝内 HCV RNA 检测为阳性,均为 HCV 基因型 1b,且同时发现 6/12 (50%) 患者外周血 PBMC 中 HCV RNA 呈阳性。Falcon^[25]等研究也证明了在此类患者,无论在肝内还是在外周血 PBMC 中均有 HCV RNA 的存在及复制。

2. 慢性 HCV 感染者经抗病毒治疗,已达到血清中 HCV RNA 阴性、肝功能正常的患者,也被证实肝内及外周血 PBMC 中有 HCV RNA 的存在及复制^[26,27],尚不能排除在这些慢性 HCV 感染者经抗病毒治疗达到持续应答的患者中,肝脏的炎症坏死还持续存在。

六、展望

隐匿性 HCV 感染是近年来新发现的一种 HCV 感染的形式,尤其是在一些病因不明的肝病患者应格外注意,目前对该病研究资料有限,还需做大量的研究以阐明其发病机制、临床特点、诊断及治疗等方面的问题,特别是对一些特殊人群如献血员、肝脏或骨髓移植供者、需进行血液透析的患者及各种免疫缺陷患者等的发病、诊断和疗具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 缪晓辉. 隐匿性肝炎诊治方面的若干问题. 肝脏, 2001, 6: 74-78.
- 2 Castilo I, Pardo M, Bartolome J, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. J Infect Dis, 2004, 189: 7-14.
- 3 Casato M, Lili D, Donato G, et al. Occult hepatitis C virus infection in type II mixed cryoglobulinemia. J Viral Hepat, 2003, 10: 455-459.
- 4 Stapleton JT, Schmidt WN, Katz L. Seronegative hepatitis C virus infection, not just RNA detection. J Infect Dis, 2004, 190: 651-652.
- 5 Schmidt WN, Wu P, Cederna J, et al. Surreptitious hepatitis C virus (HCV) infection detected in the majority of patients with cryptogenic chronic hepatitis and negative HCV antibody tests. J Infect Dis, 1997, 176: 27-33.
- 6 Madejon A, Manzano ML, Arocena C, et al. Effects of delayed freezing of liver biopsies on the detection of hepatitis C virus RNA strands. J Hepatol, 2000, 32: 1019-1025.
- 7 Geler SA, Nichols WS, Rojter SE, et al. Hepatitis C virus is not recoverable from liver tissue in cryptogenic cirrhosis: failure to identify hepatitis C virus-RNA using reverse transcription-mediated polymerase chain reaction. Hum Pathol, 1996, 27: 1161-1165.

- 8 Bresters D, Cuypers HT, Reesink HW, et al. Detection of hepatitis C viral RNA sequences in fresh and paraffin-embedded liver biopsy specimens of non-A non-B hepatitis patients. *J Hepatol*, 1992, 15: 391-395.
- 9 Guerrero RB, Batts KP, Brandhagen DJ, et al. Effects of formalin fixation and prolonged block storage on detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Diagn Mol Pathol*, 1997, 6: 277-281.
- 10 Carreno V, Castillo I, Bartolome J, et al. Comparison of hepatitis C virus RNA detection in plasma, whole blood and peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*, 2004, 31: 312-313.
- 11 Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Bartolome J, et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut*, 2005, 54: 682-685.
- 12 Bartolome J, Lopez-Alcorocho JM, Castillo I, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol*, 2007, 81: 7710-7715.
- 13 Quiroga JA, Castillo I, Pardo M, et al. Combined hepatitis C virus (HCV) antigen-antibody detection assay does not improve diagnosis for seronegative individuals with occult HCV infection. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 4559-4560.
- 14 俞小忠, 李保全, 邵海枫, 等. 丙型肝炎病毒相关肽抗体的测定. *中华实验与临床病毒学杂志*, 1999, 13: 79.
- 15 Quiroga JA, Pardo M, Navas S, et al. Patterns of immune responses to the host-encoded GOR and hepatitis C virus core-derived epitopes with relation to hepatitis C viremia, genotypes, and liver disease severity. *J Infect Dis*, 1996, 173: 300-305.
- 16 俞小忠, 李保全, 邵海枫, 等. 抗 HCV 阳性的各类肝病患者 HCV-RNA、抗-GOR 及其与 ALT 关系. *蚌埠医学院学报*, 2006, 31: 180-181.
- 17 Quiroga JA, Castillo I, Bartolomé J, et al. Serum immunoglobulin G antibodies to the GOR autoepitope are present in patients with occult hepatitis C virus (HCV) infection despite lack of HCV-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14: 1302-1306.
- 18 Quiroga JA, Carreno V. HCV-indeterminate blood donors or occult HCV infection? *Lancet*, 2005, 365: 1540-1541.
- 19 Quiroga JA, Llorente S, Castillo I, et al. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *J Virol*, 2006, 80: 10972-10979.
- 20 Pardo M, Lopez-Alcorocho JM, Rodriguez-Inigo E, et al. Comparative study between occult hepatitis C virus infection and chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2007, 14: 36-40.
- 21 Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, et al. Memory CD8⁺ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, 2003, 197: 1645-1655.
- 22 Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Lopez-Alcorocho JM, et al. Comparative study on the clinical and virological characteristics among patients with single occult hepatitis B virus (HBV), single occult hepatitis C virus (HCV) and occult HBV and HCV dual infection. *J Med Virol*, 2007, 79: 236-241.
- 23 Pardo M, Lopez-Alcorocho JM, Castillo I, et al. Effect of anti-viral therapy for occult hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 23: 1153-1159.
- 24 Carreno V, Pardo M, Lopez-Alcorocho JM, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the liver of healthy, anti-HCV antibody-positive, serum HCV RNA-negative patients with normal alanine aminotransferase levels. *J Infect Dis*, 2006, 194: 53-60.
- 25 Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, et al. Evidences of hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients negative for viral RNA in serum. *Am J Infect Dis*, 2005, 1: 34-42.
- 26 Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2005, 41: 106-114.
- 27 Castillo I, Rodriguez-Inigo E, Lopez-Alcorocho JM, et al. Hepatitis C virus replicates in the liver of patients who have a sustained response to antiviral treatment. *Clin Infect Dis*, 2006, 43: 1277-1283.

(收稿日期: 2008-01-23)

(本文编辑: 温少芳)

杨玉英, 郭江, 刘庄, 等. 隐匿性丙型肝炎病毒感染[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(2): 93-97.