

尿液与血液病毒载量在肾移植受者 BK 病毒性肾病诊断中的应用

范宇 石炳毅 钱叶勇 解俊杰 王新颖

【摘要】 目的 对比尿液和血液样本 BK 病毒 DNA 载量检测在肾移植受者 BK 病毒性肾病诊断中的应用价值。方法 2011 年 2 月至 2012 年 1 月间接受同种异体肾移植的受者 88 例,应用实时荧光定量聚合酶链反应法对其血液和尿液样本定期进行 BK 病毒 DNA 载量检测;对具备指征的移植受者行移植肾组织活检,通过免疫组织化学法明确 BK 病毒性肾病(BKVN)诊断。结果 88 例中病毒尿症者 35 例(39.8%),病毒血症者 18 例(20.5%),病理学明确诊断为 BKVN 者 5 例(5.7%)。统计学分析显示,BKVN 患者尿液和血液样本中的 BK 病毒 DNA 载量均显著高于非 BKVN 患者($P < 0.05$)。尿液样本预测 BKVN 发生的敏感性为 100%,特异性为 57.7% ($P = 0.003$);血液样本预测 BKVN 发生的敏感性为 100%,特异性为 82.9% ($P = 0.0002$)。将尿液 BK 病毒 DNA $\geq 10^7$ 拷贝/ml 和血液病毒 DNA $\geq 10^5$ 拷贝/ml 做为预测诊断 BKVN 发生的阳性指标时,尿液阳性指标的阳性预测值为 26.3%,阴性预测值为 95.7%;血液阳性指标的阳性预测值为 83.3%,阴性预测值为 98.8%。结论 血液 BK 病毒 DNA 载量 $\geq 10^5$ 拷贝/ml,可作为辅助诊断 BKVN 发生的阳性指标,而尿液 BKV DNA 载量监测可作为 BKV 感染的筛查。

【关键词】 肾移植;BK 病毒;BK 病毒性肾病;聚合酶链反应

The cut-off value of BK virus DNA load in urine or plasma for diagnosis of BKVN in renal transplantation recipients FAN Yu, SHI Bing-yi, QIAN Ye-yong, XIE Jun-jie, WANG Xin-yin. Institute of Organ Transplantation, 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China

Corresponding author: SHI Bing-yi, E-mail: shibingyi@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To compare the applied value of BK virus DNA load detection in urine and plasma for diagnosis BK virus nephropathy (BKVN) in renal transplantation recipients. **Method** In 88 renal transplantation recipients receiving renal allograft from February 2011 to January 2012 in our institute, BK virus DNA load in urine and plasma was detected by using real-time PCR, and renal biopsy was performed on the recipients with gradual deterioration of the graft function or the loads of BKV replication being very high. The diagnosis of BKVN was confirmed by using immunohistochemistry. **Results** Of 88 recipients, there were 35 cases (39.8%) of viruria, 18 cases (20.5%) of viremia and 5 cases (5.7%) of BKVN. The median BKV DNA load in both urine and plasma in BKVN recipients was significantly higher than in non-BKVN recipients ($P < 0.05$). The viruria sensitivity and specificity for BKVN were 100% and 57.3% ($P = 0.03$), and the viremia sensitivity and specificity for BKVN was 100% and 82.9% ($P = 0.0002$), respectively. We regraded viral load $\geq 10^5$ copies/mL in plasma or $\geq 10^7$ copies/mL in urine as the best discriminant cut-off value to predict the disease and to identify patients at risk of developing BKVAN. The positive cut-off value of urine's positive predictive value (PPV+) was 26.3% and negative predictive value (PPV-) was 95.7%, and the positive cut-off value of plasma's positive predictive value (PPV+) was 83.3% and negative predictive value (PPV-) was 98.8%. **Conclusion** The viral load $\geq 10^5$ copies/mL in plasma can be used as the best discriminant cut-off value to predict the disease and to identify patients at risk of developing BKVAN, but the cut-off value of urine should be only used for screening BKV infection.

【Key words】 Kidney transplantation; BK virus; BK virus nephropathy; Polymerase chain reaction

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2013.10.005

基金项目:首都临床特色应用研究“定期监测 BK 病毒载量防治肾移植术后受者 BK 病毒感染的前瞻性随机对照研究”(Z131107002213139)

作者单位:100091 北京,解放军第三〇九医院器官移植研究所泌尿外科器官移植研究所 器官移植与免疫调节北京市重点实验室

通信作者:石炳毅, E-mail: shibingyi@medmail.com.cn

肾移植术后 BK 病毒性肾病(BKVN)由 BK 病毒(BKV)感染所致,是导致移植肾功能损害甚至功能丧失的重要原因之一^[1]。据文献报道,肾移植术后约有 5%~8% 的受者会发生 BKVN,其中超过半

数会最终导致移植肾功能丧失。目前对于已发生的 BKVN 尚无有效的治疗方法,监测并控制 BKV 在体内的复制和激活是防治 BKVN 的主要手段。明确 BKV 感染的方法主要通过聚合酶链反应(PCR)技术,对尿液或血液样本中的 BKV DNA 扩增并进行检测。实时荧光定量 PCR 可对 BKV DNA 载量进行定量检测,进而区分 BKV 的感染程度并明确诊断 BKVN 的阳性指标。肾移植术后对 BKV 进行定期监测能够有效提高 BKVN 的诊断率已得到公认^[2-3]。然而,单独检或者同时监测尿液样本和血液样本,以及监测时间点等问题尚未完全规范统一^[4-5]。本研究针对以上问题,对在我院接受肾移植的受者定期检测尿液和血液样本的 BKV DNA 载量,对比分析两类样本 BKV 检测对防治 BKVN 的临床价值,现报告如下。

资料与方法

一、研究对象的选择与一般资料

2011 年 2 月至 2012 年 1 月间,根据入组标准选择在我研究所接受同种异体肾移植的受者作为研究对象。入选标准:(1)接受同种异体肾移植的受者,年龄为 18~60 岁;(2)愿意接受尸体供肾或有 HLA 错配的亲属供肾;(3)术后常规应用钙调磷酸酶抑制剂+抗代谢类药物+皮质激素为主的三联免疫抑制方案;(4)所有入选对象均在肾移植手术前签署知情同意书,并获得伦理委员会批准,自愿并且能够参加术后随访研究的全过程。排除标准:(1)未在我研究所定期复查或受者死亡与失随访者;(2)移植后 6 个月内由于其他原因移植肾功能丧失者;(3)已参加其他的临床试验研究者。根据研究纳入标准,共纳入研究对象 88 例,其中男性 58 例(65.9%),女性 30 例(34.1%),患者年龄为(42.6±6.9)岁。患者的原发病为慢性肾小球肾炎 68 例(77.3%),多囊肾 6 例(6.8%),终末期糖尿病肾病 4 例(4.5%),其他病因 10 例(11.4%)。术前接受血液透析者 75 例(85.2%),接受腹膜透析者 9 例(10.3%),未接受透析治疗者 4 例(4.5%)。术前供、受者 ABO 血型均相同,所有受者群体反应性抗体<10%。供肾来源于尸体 62 例(70.5%),活体供肾 26 例(29.5%)。肾移植后受者平均随访 12 个月(6~15 个月)。

二、样本的采集时间和处理方法

分别于移植术后第 1、3、6、9、12 个月收集研究对象的尿液和外周血样本。若发现阳性结果,将收

集样本检测间隔时间改为 1 个月,直至连续 2 次检测结果转为阴性。若病理活检发现 BKVN 或连续 BKV DNA 检测结果呈显著升高趋势(以数量级>10²为标准),则检测间隔时间改为 1 次/周,或根据临床需要(药物浓度及血肌酐变化等)随时收集样本。

尿液样本采集及 BKV DNA 的提取步骤:留中段晨尿约 20 ml,密封送检。将样本送检管振荡 15 s,彻底混匀,取待测样本 1 ml 至 1.5 ml 离心管中,15000×g 离心 10 min,弃去上清液,加入 BKV 裂解液 50 μl,吹洗 5 次并振荡 15 s 将沉淀充分打散,100℃条件下温育 10 min,15000×g 再次离心 10 min,后取上清液,即纯化的 DNA 溶液。

血浆样本采集及 BKV DNA 的提取步骤:抽取研究对象静脉血 3~5 ml,室温下 230×g 离心 5 min,分离出的血清转移到 1.5 ml 灭菌离心管中备用。取待测样本 100 μl 至 1.5 ml 离心管中,加入 BKV 浓缩液 50 μl,振荡 15 s 混匀,15000×g 离心 10 min 后去上清液,保留沉淀,再次加入 BKV 裂解液 25 μl,吹洗 5 次并振荡 15 s 将沉淀充分打散,100℃条件下温育 10 min,15000×g 再次离心 10 min,后取上清液,即纯化的 DNA 溶液。

三、尿液和血液样本 BKV DNA 载量的检测

采用实时荧光定量 PCR 法。引物为 5'-AGAAGTCTCCTCAATGGATG-3', 5'-AGCTGCCCTGGACACTCT-3'。Taqman 荧光探针为 TGCTCTTGAAGCATATGAAGATGGCCCA, 5'端用 6-羧基荧光素标记,3'端标记的淬灭基团是黑洞淬灭剂 1。PCR 反应体系包括 10×反应缓冲液 2.5 μl,引物 0.5 μl 和 0.25 μl,探针 0.5 μl,脱氧核糖核苷酸 2.0 μl,无菌超纯水 19.8 μl。扩增条件为 94℃,4 min;94℃,15 s;60℃,35 s,共 40 个循环。结果分析利用 Opticon Monitor3 软件分析检测结果,以标准品 10⁵~10⁸拷贝/ml 绘制标准曲线,标准曲线的相关系数 R₂≥0.99,检测结果≥10³拷贝/ml 时为阳性。此反应与 JC 病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒等病毒无交叉反应。

四、移植肾穿刺及病理学诊断

BKVN 特异性诊断的金标准仍是肾组织活检,主要应用免疫组织化学法[猿猴空泡病毒 40 (SV40)或大 T 抗原染色]明确移植肾组织中 BKV 存在。研究对象 BKVN 的诊断均通过病理学明确

诊断。

当研究对象出现以下情况时,建议进行移植肾穿刺病理学检查明确病因。**穿刺标准:(1)移植后受者出现持续的不明原因的血清肌酐升高者;(2)发生急性排斥,经过治疗后血清肌酐未恢复至基线水平者;(3)移植肾功能恢复延迟者;(4)移植后 1~2 个月肾功能未恢复至预期水平者;(5)新出现的蛋白尿或不明原因的尿蛋白/尿肌酐 ≥ 3.0 g/g或 24 h 尿蛋白 ≥ 3.0 g 者;(6)新出现的尿液或者血液样本中 BKV DNA 载量阳性(BKV DNA 载量 $> 1 \times 10^3$ 拷贝/ml),且伴血肌酐上升者(较术后最低肌酐值升高 $> 10\%$)。**

所有穿刺活检术均在 B 型超声引导下(6 号穿刺针)进行,活检样本用甲醛固定后送病理学检查。普通病理学切片应用 HE、过碘酸雪夫、Masson 染色,普通光镜下观察移植肾病理改变,诊断依照 Banff 2007 标准进行分级。采用鼠抗 SV40T 抗原(德国 Merck 公司, Cat. No. DP02)试剂盒,对石蜡包埋的肾组织进行免疫组织化学染色,如果移植肾组织中肾小管上皮细胞核内着色阳性,即可确诊 BKVN。

五、统计学分析

数据录入和资料整理应用 Excel 软件(2010 版),统计学分析应用 SPSS 统计软件(16.0 版),图形绘制应用 GraphPad Prism 软件(5 版)。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的计量资料以中位数表示。计量资料的统计主要采用 *t* 检验及非参数检验;计数资料主要采用秩和检验、卡方检验、Logistic 回归和相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、受者 BKVN 的发生情况

受者尿液 BKV DNA 阳性(病毒尿症)者为 35 例,占 39.8%(35/88);血液 BKV DNA(病毒血症)者为 18 例,占 20.5%(18/88),此类病毒血症者的尿液样本 BKV DNA 均为阳性。根据病理学活检标准,共对 32 例受者进行移植肾穿刺活检,最终经病理学明确诊断 BKVN 者为 5 例,占 5.7%(5/88),病理学确诊者的尿液和血液样本 BKV DNA 均为阳性。

二、BKV DNA 载量预测 BKV 感染趋势及影响 BKVN 进展的分析

研究共收集样本 724 份,其中尿液样本 396 份,外周血液样本 328 份。

尿液样本中,阳性样本数为 119 份(30.1%),阴性样本数为 277 份(69.9%)。其中,病理学确诊为 BKVN 者的阳性样本为 20 份(16.8%),非确诊为 BKVN 者的阳性样本为 99 份(83.2%)。将 BKV DNA 载量行对数转换后得出, BKVN 受者尿液 BKV DNA 载量为 $(7.07 \pm 0.38) \log_{10}$ 拷贝/ml,非 BKVN 受者 BKV DNA 载量为 $(5.59 \pm 0.16) \log_{10}$ 拷贝/ml,两者相比较,差异有统计学意义($P = 0.0002$,图 1)。

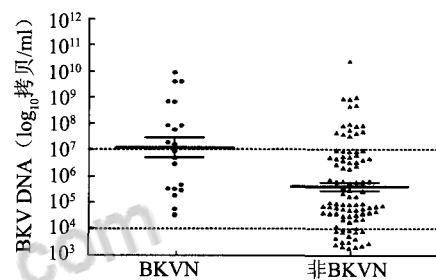


图 1 BKVN 与非 BKVN 肾移植受者尿液 BKV DNA 载量的比较

血液样本中,阳性样本数为 49 份(14.9%),阴性样本数为 279 份(85.1%)。其中,病理学确诊为 BKVN 者的阳性样本为 18 份(36.7%),非确诊为 BKVN 者的阳性样本为 31 份(63.3%)。同样进行对数转换后, BKVN 受者血液 BKV DNA 载量为 $(5.04 \pm 0.15) \log_{10}$ 拷贝/ml,非 BKVN 受者血液 BKV DNA 载量为 $(4.08 \pm 0.10) \log_{10}$ 拷贝/ml,二者相比较,差异有统计学意义($P < 0.0001$,图 2)。

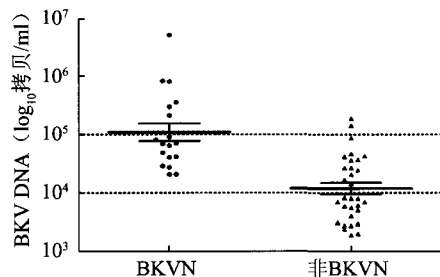


图 2 BKVN 与非 BKVN 肾移植受者血液 BKV DNA 载量的比较

进行 ROC 曲线分析,结果应用尿液 BKV DNA 载量指标预测 BKVN 发生的敏感性为 100%,特异性为 57.7% ($P = 0.003$,图 3);应用血液 BKV DNA 载量指标预测 BKVN 发生的敏感性为 100%,特异

性为82.9%($P = 0.002$,图 4)。

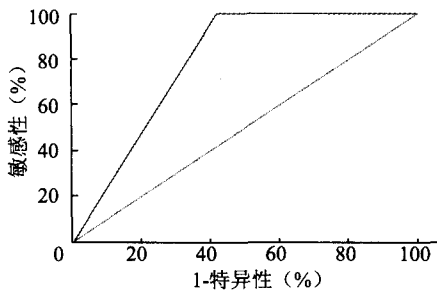


图 3 病毒尿症受者 BKV DNA 载量预测 BKVN 的 ROC 曲线

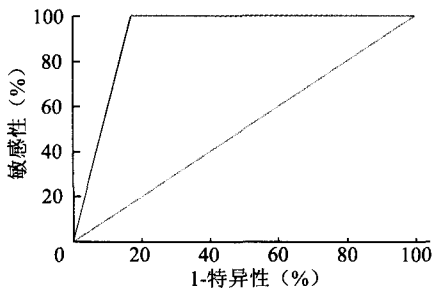


图 4 病毒血症受者 BKV DNA 载量预测 BKVN 的 ROC 曲线

根据上述结果,将尿液 BKV DNA 载量预测 BKVN 发生的阳性指标定为 10^7 拷贝/ml,血浆 BKV DNA 载量定为 10^5 拷贝/ml,计算得出尿液阳性阈值的阳性预测值为 26.3%,阴性预测值为 95.7%,而血浆阳性阈值的阳性预测值为 83.3%,阴性预测值为 98.8%。

讨 论

BKV 隶属于多瘤病毒,是导致肾移植术后移植肾的重要危险因素之一^[6-8]。自上世纪九十年代开始,随着肾移植手术的广泛开展,由 BKV 感染导致移植肾功能受损,严重者进展为 BKVN 而导致移植肾功能丧失的病例报道显著增多。BKV 感染进展的研究和 BKVN 的防治成为肾移植领域的新兴热点话题^[9-11]。

当前对 BKVN 尚缺乏有效的治疗手段,监测 BKV 的激活和复制是防治 BKVN 最重要的临床干预措施。而深入了解肾移植术后 BKV 感染的流行病学规律则成为监控其感染的前期条件。综合国内外文献报道,我院设计了开放性前瞻性的临床观察研究,对肾移植早期的受者进行规律 BKV 感染筛查,监测尿液和血液样本的病毒载量,同时对符合标

准的移植受者行穿刺活检病理学检查,明确 BKVN 诊断。为期 1 年的研究结果显示,我院移植术后早期 BK 病毒尿症、病毒血症和 BKVN 的发生率分别为 39.8%、20.5% 和 5.7%,与国内外报道相类似^[12-13]。病毒血症经常继病毒尿症出现几周后出现,而 BKVN 则会进一步继病毒血症出现。本研究发现,所有 BKVN 受者尿液和血液 BKV 检测均为阳性,而所有病毒血症受者的尿液检测病毒也均为阳性,病毒尿症、病毒血症以及 BKVN 的发生时间及波动趋势可见三者是一个连续且感染程度逐渐加重的阶段性过程,由此可以证实早期发现病毒尿症或者病毒血症并及时采取干预措施对预防和阻止 BKVN 的发生发展是最有效的方案。

然而,全球各地的专业学会组织和研究中心在监测 BKV 时对样本的选取说法不一。2009 年美国国家移植感染协会在其发布的指南中认为对 BK 病毒尿症进行监测能够有效提高 BKVN 的诊断率^[14-15]。而同年的“肾脏疾病,改善全球预后”指南中则推荐肾移植术后早期患者应该进行 BKV 血浆 PCR 检测^[4]。直接对病毒血症的监测似乎得到更多研究者的支持,即提高对 BKVN 的防治仅需筛查病毒血症而不是病毒尿症。基于这些文献讨论,本研究对移植受者筛查 BKV 感染同时检测尿液和血液样本,比较两种样本预测和诊断 BKVN 的临床价值。最终的结果显示,血液样本的敏感性和特异性均高于尿液样本,尤其在特异性方面,血液样本显著高于尿样本。

从 BKV 载量值角度分析,本研究结果同样也可以看到,在 BKVN 受者中,无论尿液还是血液中 BKV 的复制都是非常活跃的。统计学分析可得出, BKVN 受者尿液和血液中 BKV DNA 载量平均值均显著高于非 BKVN 受者。我们将上述两项平均值做为病毒尿症和病毒血症的阳性指标,通过对 BKVN 预测和诊断的统计学分析后可以看出,血液阳性指标的确定在预测和诊断 BKVN 的价值高于尿液阳性指标,尤其是阳性预测值方面,血阳性指标显著高于尿阳性指标。结合国外文献报道,目前绝大多数指南以及研究机构普遍接受的界定 BKV 阳性血症的指标是血浆 BKV 载量大于 10^5 拷贝/ml。该指标是 2006 年 Hirsch 等人发布的,他们的研究结果显示血浆 BKV 载量大于 10^5 拷贝/ml 与 93% 的特异性 BKVN 相关^[16]。由此可见,本研究界定的病毒血症阳性指标与国际指南相一致,提示该指

标完全适合我国肾移植术后 BK 病毒血症的受者, 即当病毒血症受者达到或超过该阳性指标时, 提示可能已发生 BKVN, 可进一步行穿刺活检病理学诊断或者直接进行降低免疫抑制药物等临床干预治疗。若同时伴有肾功能异常变化, 则根据此阳性指标明确 BKVN 的诊断价值更大。

本研究虽然没有将 BKV DNA 载量的经济成本进行统计分析, 但不难看出, 对血和尿液样本进行同时监测是不符合临床实际的, 既增加了实验室工作量又增加了受者的复查费用。根据本研究结果, 可以看出病毒血症的检测对 BKVN 的预测和诊断更加准确, 临床价值较高, 因此在血、尿样本检测费用相等的情况下, 我们建议常规监测病毒血症的发生即可有效的诊断并防治 BKVN 发生发展, 而病毒血症的监测可以在不适合进行连续或者频繁病毒血症监测的受者(譬如部分儿童受者)中进行, 也可视为对 BKV 感染筛查和诊断 BKVN 的辅助手段。

因条件所限, 本研究移植术后受者 BKV 的监测间隔除术后第 1 个月外, 其余监测点为每 3 个月 1 次, 由于时间间隔较长, 并不能精确地总结 BKV 感染和 BKVN 的发生发展规律, 因此确定 BK 病毒血症的监测时间点仍需更大规模的样本量以及更密切的载量检测方能确认, 这也正是我们进一步研究的方向。

参 考 文 献

- [1] Fishman JA. BK virus nephropathy—polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med*, 2002, 347(7):527-530.
- [2] Hammarin AL, Oqvist B, Wahlgren J, et al. Systematic screening of BK virus by real-time PCR prevents BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Med Virol*, 2011, 83(11):1959-1965.
- [3] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, 2005, 79(10):1277-1286.
- [4] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, 2009, 9 Suppl 3: S1-155. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x.
- [5] Boothpur R, Brennan DC. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J Clin Virol*, 2010, 47(4):306-312.
- [6] Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 2009, 9 Suppl 4: S136-146. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02904.x.
- [7] Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis*, 1973, 128(6):784-787.
- [8] Portolani M, Marzocchi A, Barbanti-Brodano G, La Placa M. Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (BK virus). *J Med Microbiol*, 1974, 7(4):543-546.
- [9] Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, et al. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis*, 1995, 26(4):671-673.
- [10] Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(8):2145-2151.
- [11] Pappo O, Demetris AJ, Raikow RB, et al. Human polyoma virus infection of renal allografts: histopathologic diagnosis, clinical significance, and literature review. *Mod Pathol*, 1996, 9(2):105-109.
- [12] Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, 2002, 347(7):488-496.
- [13] Huang G, Chen LZ, Qiu J, et al. Prospective study of polyomavirus BK replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and clinical course. *Clin Transplant*, 2010, 24(5):599-609.
- [14] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, 2005, 79(10):1277-1286.
- [15] Egli A, Kohli S, Dickenmann M, et al. Inhibition of polyomavirus BK-specific T-Cell responses by immunosuppressive drugs. *Transplantation*, 2009, 88(10):1161-1168.
- [16] Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 577:160-173.

(收稿日期:2013-09-15)



知网查重限时 **7折** 最高可优惠 **120元**

本科定稿，硕博定稿，查重结果与学校一致

立即检测

免费论文查重: <http://www.paperyy.com>

3亿免费文献下载: <http://www.ixueshu.com>

超值论文自动降重: http://www.paperyy.com/reduce_repetition

PPT免费模版下载: <http://ppt.ixueshu.com>
