

# 肾移植后 BK 病毒感染的流行病学特点 ——单中心、前瞻性研究

解俊杰 石炳毅 范宇 柏宏伟 李钢 李昆 钱叶勇

**【摘要】** 目的 研究肾移植术后 BK 病毒感染的流行病学特征。方法 选取 2010 年 2 月 1 日至 2011 年 1 月 31 日接受肾移植并长期随访的 116 例受者。分别于术后 0.5、1、3、6、9、12 和 15 个月,用巴氏染色法检测受者尿沉渣 Decoy 细胞,采用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测尿液和外周血 BK 病毒 DNA 的载量,并对部分受者进行移植肾组织穿刺活检,以确诊 BK 病毒相关性肾病(BKVAN)。结果 116 例受者中,共发现尿沉渣 Decoy 细胞阳性受者 62 例,发生率为 53.5%;52 例受者尿 BK 病毒 DNA 阳性,发生率为 44.8%;24 例受者血 BK 病毒 DNA 阳性,发生率为 20.7%;4 例受者经移植肾组织活检证实为 BKVAN,发生率为 3.45%。术后 3~9 个月是 BK 病毒感染的高峰时间段,且术后尿和血 BK 病毒 DNA 载量的变化趋势基本一致。结论 肾移植后 3~9 个月是 BK 病毒感染的高发时段,需密切监测受者尿沉渣 Decoy 细胞及尿和血液中 BK 病毒 DNA 载量的变化,及时对 BK 病毒血症受者进行临床干预,可减少进展为 BKVAN 的概率。

**【关键词】** 肾移植;BK 病毒;流行病学

**Epidemiological study of polyomavirus type BK infection in renal transplant recipients—single center and prospective study** XIE Jun-jie, SHI Bing-yi, FAN Yu, BAI Hong-wei, LI Gang, LI Kun, QIAN Ye-yong. Institute of Organ Transplantation, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: QIAN Ye-yong, E-mail: qianyy@medmail.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the epidemiological characteristics of polyomavirus type BK infection in renal transplant recipients. **Method** We systematically screened for active BKV infection preoperation and at 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 and 15 months after transplantation in 116 renal transplant recipients. The screening tests included urine cytology (by the Papanicolaou method) and BKV DNA PCR (the kit for testing the BK virus) assay of both urine and plasma, and the results were recorded. Renal biopsy was performed if the graft function was deteriorated gradually or the loads of BKV replication were very high. Routine histopathological examination and immunohistochemistry were performed on renal tissues from partial patients who received the tests of renal biopsy. **Result** Throughout the follow-up of 15 months, urinary decoy cells (median 8/10 HPF, [1~48/10 HPF]), BKV viruria (median  $2.63 \times 10^5$  copies/mL, [ $1.78 \times 10^3 \sim 8.54 \times 10^9$  copies/mL]), BKV viremia (median  $2.70 \times 10^4$  copies/mL, [ $1.95 \times 10^3 \sim 6.31 \times 10^6$  copies/mL]), and BKVAN (4 patients) occurred in 53.46%, 24.17%, 20.72% and 3.45% of renal-transplant recipients, respectively. The positive rate of the decoy cell and BKV DNA in urine reached the peak at the third month to the ninth month after transplantation, and the peak time of the BK viremia was the fifth month post-transplantation throughout the follow-up period. The change in BKV DNA level remained constant in blood and urine throughout the follow-up period. **Conclusion** The peak time of BKV infection was apparently three to nine months after transplantation, suggesting the importance of monitoring urine cytology and BKV DNA loads in post-transplantation patients closely during this period in order to reduce BKVAN after transplantation.

**【Key words】** Kidney transplantation; BK virus; Epidemiology

多瘤病毒主要分成病毒性脑病相关的 JC 病毒和肾病相关的 BK 病毒两类<sup>[1]</sup>, 大约 80% 的人群存

在多瘤病毒抗体。BK 病毒在终末期肾病患者、供肾者和肾移植受者中的发生率尚无明确界定。据国外文献报道<sup>[2]</sup>, 肾移植受者 BK 病毒尿症、BK 病毒血症和 BK 病毒相关性肾病(BKVAN)的发生率分别为 30%、13% 和 8%。而国内对 BK 病毒的研究

才刚刚起步,尚无统一的检测方法,也缺乏大规模、前瞻性的相关研究。因此,我们对肾移植术后 BK 病毒感染的流行病学特征进行了单中心、前瞻性研究。现报告如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象

选择 2010 年 2 月 1 日至 2011 年 1 月 31 日在我院接受肾移植的受者。入选标准:(1)受者年龄范围 18~60 岁;(2)愿意接受尸体供肾或有 HLA 错配的亲属供肾;(3)术后常规选择钙调磷酸酶抑制剂(CNI) + 抗代谢类药物 + 皮质激素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,并获得医院伦理委员会审批,自愿并且能够参加术后随访研究的全过程。排除标准:(1)未在我院定期复查或死亡或失随访的受者;(2)术后 6 个月内由于其他原因(非 BK 病毒感染)导致移植肾功能丧失;(3)已经参加其他临床试验研究的受者;(4)受者明确表示拒绝参加研究全过程。在所有 186 例受者中,共有 116 例受者纳入本研究。

### 二、研究对象的一般临床资料

116 例受者中,男性 79 例,女性 37 例,年龄(46 ± 5)岁(18~62 岁);术前诊断为慢性肾小球肾炎 99 例,多囊肾 2 例,糖尿病肾病 4 例,其他病因 11 例;术前供、受者 ABO 血型均相同,群体反应性抗体(PRA)水平均 < 0.1;术前接受血液透析 104 例,腹膜透析 10 例,未接受透析治疗 2 例;97 例接受尸体供肾移植,19 例亲属活体供肾移植。术后平均随访时间为 15 个月(6~20 个月)。

### 三、免疫抑制方案

根据受者术前风险评估,48 例受者应用了抗胸腺细胞球蛋白(ATG)和 63 例受者应用了巴利昔单抗行免疫诱导,其余 5 例未行免疫诱导。术后 2 d 内开始常规给予 CNI + 抗代谢类药物 + 皮质激素的三联免疫抑制方案,其中采用环孢素 A(CsA) + 吗替麦考酚酯(MMF) + 泼尼松(Pred)方案者 40 例,采用 CsA + 咪唑立宾(MZR) + Pred 方案者 5 例,采用他克莫司(Tac) + MMF + Pred 方案者 63 例,采用 Tac + MZR + Pred 方案者 8 例。CsA 起始用量为 6~8 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, Tac 起始用量为 0.1~0.15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,根据术后时间变化和移植肾功能的恢复情况,将血 CsA 和血 Tac 浓度分别维持在 0.15~0.25 mg/L 和 8~12 μg/L。MMF 的用量为

1 g/d,每天分 2 次给药。Pred 在术中麻醉后给予 1000 mg,术后第 3 天给予 500 mg/d,第 4 天起改为 50 mg/d,然后每 5 天调整 1 次,1 个月后减量至 10 mg/d 长期维持。

### 四、检测方法

1. 尿液和血液样本的采集:分别在术后 0.5、1、3、6、9、12 和 15 个月随访时,采取受者尿液和血液样本。留取受者的中段晨尿约 20 ml,密封送检。采集受者外周静脉血 3~5 ml,室温下离心 5 min,分离出血清,将血清转移到 1.5 ml 灭菌离心管中,备检。

2. 尿液沉渣脱落细胞学 Decoy 检测:根据文献[3]的方法,用巴氏染色法观察尿沉渣涂片中细胞核内的病毒包涵体形态。在 400 倍显微镜下,典型的“Decoy 细胞”形态表现为细胞核肿大,由致密、均匀的嗜碱性包涵体组成,核膜围绕着毛玻璃或凝胶样的染色质;有的表现为细胞核内包涵体呈小囊样改变,或仅围绕一圈光晕和染色质成簇状;或可见大量 Decoy 细胞聚集,细胞核与细胞浆的比例明显高于正常细胞,类似于肿瘤细胞,核内有密集的蓝色嗜碱性颗粒。如果尿沉渣中存在大量 BK 病毒感染的细胞,一般同时存在大量移行上皮、肾小管上皮或管型和炎症细胞。

3. 尿液和血液 BK 病毒的检测:采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测尿液和外周血 BK 病毒 DNA 的载量<sup>[4]</sup>。BK 病毒检测试剂盒由北京鑫诺美迪基因检测公司提供,按照研究的时间计划进行,并一一记录结果。

4. BKVAN 的病理诊断:根据 2011 年肾脏疾病改善全球预后(KDIGO)临床实践指南(肾移植受者的诊治)的建议,当受者出现以下情况时,建议选择移植肾穿刺活检行病理诊断:(1)出现持续不明原因的血肌酐升高;(2)发生急性排斥反应经治疗后血肌酐未恢复至基线水平;(3)发生移植肾功能恢复延迟,期间每 7~10 d 进行 1 次移植肾活检;(4)移植后 1~2 个月肾功能未恢复至预计水平;(5)当新出现蛋白尿,或不明原因的尿蛋白与尿肌酐比 ≥ 3.0 g/g,或 24 h 尿蛋白 ≥ 3.0 g。采用普通染色及免疫组织化学法对 BKVAN 进行病理诊断。

### 五、统计学方法

采用 SPSS 统计软件(16.0 版)进行处理,利用 EpiDate 数据录入,绘图采用 GraphPad Prism 5 软件。正态分布的计量资料以均数 ± 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。计量资料主要采用 *f* 检验及非参数检验;计数资料主要采用应用 *t* 检验、秩和检验、卡方检验、Logistic 回归和相关分析进行数据分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 一、术后受者 Decoy 细胞、BK 病毒尿症与 BK 病毒血症的发生情况

Decoy 细胞检测结果及分级见表 1, 116 例受者中,共发现尿沉渣 Decoy 细胞阳性受者 62 例, Decoy 细胞阳性率为 53.5%。每 10 个高倍视野下 Decoy 细胞中位数为 7 个(1~48 个);52 例受者尿 BK 病毒 DNA 阳性(病毒尿症),发生率为 44.8%,尿 BK 病毒 DNA 载量中位数为  $3.42 \times 10^5$  拷贝/ml ( $6.72 \times 10^3 \sim 8.24 \times 10^9$  拷贝/ml);24 例受者血 BK 病毒 DNA 阳性(病毒血症),发生率为 20.7%,血 BK 病毒 DNA 载量中位数为  $4.55 \times 10^3$  拷贝/ml ( $3.28 \times 10^3 \sim 9.38 \times 10^6$  拷贝/ml);4 例受者经移植肾组织活检证实为 BKVAN,发生率为 3.4%(图 1)。

表 1 肾移植受者尿沉渣 Decoy 细胞的检测结果与分级

诊断等级	例数	诊断等级标准 (细胞数/10 个高倍视野)
阴性(A 级)	54 (49.1%)	0 个
少量(B 级)	30 (25.9%)	1~5 个
中量(C 级)	24 (20.7%)	6~10 个
大量(D 级)	8 (6.9%)	>10 个

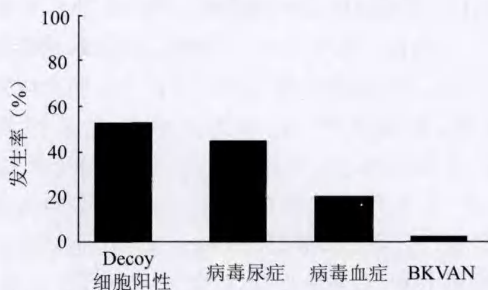


图 1 肾移植术后 Decoy 细胞阳性、BK 病毒尿症、BK 病毒血症和 BKVAN 的发生率

#### 二、术后 Decoy 细胞、BK 病毒尿症及 BK 病毒血症发生率的变化

术后 Decoy 细胞、BK 病毒尿症及 BK 病毒血症的发生率均呈现先升高,术后 3~9 个月时达到高峰,然后再逐渐下降(图 2)。在 BK 病毒尿症受者中,随着尿沉渣 Decoy 细胞数的增加,尿 BK 病毒

DNA 载量也随之增加;而在 BK 病毒血症受者中,随着尿 BK 病毒 DNA 载量的增加,血 BK 病毒 DNA 载量也相应增加。尿 BK 病毒 DNA 载量与血 BK 病毒 DNA 载量的变化趋势基本一致,进行对数换算( $\log_{10}$  拷贝/ml)后,尿 BK 病毒 DNA 载量约为血 BK 病毒 DNA 载量的 2.56 倍,两者比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),即尿 BK 病毒 DNA 载量比血 BK 病毒 DNA 载量平均高 100 倍左右(图 3)。

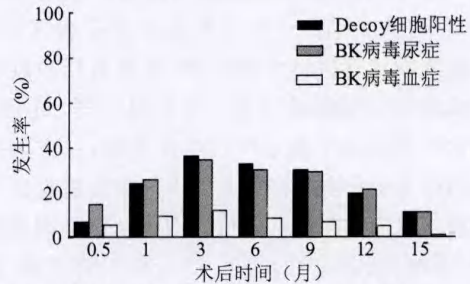


图 2 肾移植术后 Decoy 细胞、BK 病毒尿症和 BK 病毒血症发生率的变化趋势

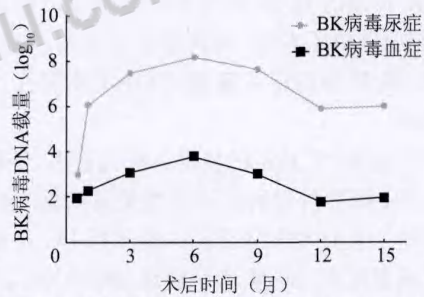


图 3 血、尿 BK 病毒定量对数值随术后时间变化趋势

#### 三、术后受者 BKVAN 的发生情况

共有 20 例受者接受移植肾活检,其中 4 例经病理学检查证实发生 BKVAN,发生率为 3.4%(4/116)。移植肾组织可见肾小管上皮细胞核内有大量病毒包涵体,肾小管上皮细胞灶性坏死,间质中出现不同程度的嗜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞浸润,同时还可见肾间质纤维化(图 4)。

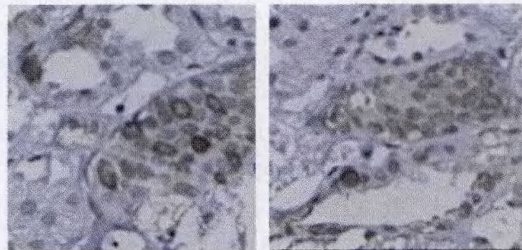


图 4 肾移植术后 BKVAN 的病理表现

## 讨 论

目前, BK 病毒感染的天然传播途径目前尚未完全明了<sup>[6]</sup>。肾移植术后 BK 病毒感染早期肌酐一般在正常水平, 没有任何临床症状, 晚期则出现不同程度的移植肾功能减退, 可以引起急性肾小管上皮细胞坏死和出血性膀胱炎, 还有蛋白尿、血尿、排尿困难、尿路狭窄、发热等症状<sup>[7]</sup>。尽管 BK 病毒感染及 BKVAN 已成为肾移植术后最严重的并发症之一, 但目前我国尚无临床机构对供受者术前 BK 病毒血清学状态进行常规检测, 也没有行政性医疗机构像巨细胞病毒和 EB 病毒一样, 对 BK 病毒做出常规检测的规定<sup>[4]</sup>。综合考虑, 一方面是缺乏有效的 BK 病毒检测方法; 另一方面是我国尚无对肾移植术后 BK 病毒流行病规律及危险因素的大规模、系统的、前瞻性研究。结合国内外文献, 我院与北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司展开合作, 首先设计并建立了一套有效的实时荧光定量 PCR 检测 BK 病毒的方法, 并研发成检测 BK 病毒的试剂盒, 成功申请了专利, 为移植受者进行快速、有效的检测 BK 病毒奠定了基础, 填补了我国在这一方面的空白。

目前检测 BK 病毒的技术方法比较多, 各移植中心报道 BK 病毒引起的感染和相关肾病的发病率也不尽相同。中山大学报道肾移植术后 Decoy 细胞阳性、BK 病毒尿症、BK 病毒血症和 BKVAN 的发生率分别为 42.2%、45.6%、22.2% 和 5.6%<sup>[8]</sup>。我们的研究结果显示, 入选的 116 受者在术后 15 个月内共检测到 62 例 Decoy 细胞阳性受者, 发生率为 53.5%, 大量复制且持续感染的受者比例较低, 但 4 例确诊 BKVAN 的受者 Decoy 细胞数均处于较高水平。

根据我们的经验和体会, 认为脱落细胞形态学检查 Decoy 细胞有其自身局限性。首先尿沉渣脱落细胞学为形态学检查, 检查需要人为观察和计数, 不同经验的技术人员得出的结果可能存在较大差异, 因此此种检查具有较大主观性, 报告结果不稳定, 重复性较差; 其次巴氏染色操作步骤较为复杂, 技术性要求较强, 每次检查需要的时长 2~3 h 或更多, 需要大量的人力物力; 另外, 文献报道认为尿沉渣形态学检查仅对受损的脱落移行上皮细胞进行分辨, 在一般情况下无法区分 BK 病毒与 JC 病毒感染, 而 JC 病毒感染尚无明确证据可以表明其对泌尿系统有损伤作用, 因此容易增加检查 BK 病毒感染的假阳性率<sup>[9]</sup>。综上

所述, 尿沉渣脱落细胞检查 Decoy 细胞的方法与我们自行研发的 BK 病毒荧光实时定量 PCR 检测试剂盒相比较, 在特异性、敏感性、时效性等方面均存在较大差异。因此, 我们认为尿沉渣脱落细胞形态学检测 Decoy 细胞仅能作为多瘤病毒感染诊断的辅助筛查手段, 常规应用该方法应结合荧光实时定量 PCR 技术检测 BK 病毒 DNA 载量, 联合检查提高 BKVAN 的早期无创诊断率。

Hirsch 等<sup>[6]</sup>的研究还发现, 术后 BK 病毒尿症首次出现的时间中位数为 16 个月 (2~69 个月), 而 BK 病毒血症经常继 BK 病毒尿症出现几周后出现, 移植肾病则会进一步继 BK 病毒血症出现, 其发生率在移植后 2 年甚至更长的时间里累计上升。而我们的研究发现, BK 病毒尿症和 BK 病毒血症的发生高峰期均在术后 3~9 个月时间范围内, 较 Hirsch 等研究的出现时间早, 此种情况可能与术后早期免疫抑制药物的浓度控制在较高范围, 使受者易发生 BK 病毒感染有关。我们的研究发现, 当术后半年免疫抑制药物逐渐减量后, BK 病毒尿症和 BK 病毒血症发生率呈下降趋势。但本研究未详细统计免疫抑制药物浓度与 BK 病毒 DNA 载量的变化关系, 因此上述讨论尚需要进一步回顾性分析最终验证。

我们研究显示, 发生 BKVAN 受者的尿液和血液中均检测到高水平的 BK 病毒 DNA 复制, BK 病毒血症受者的尿液中 BK 病毒 DNA 载量均呈阳性结果, 而绝大多数 BK 病毒尿症受者的尿沉渣检查中发现了 Decoy 细胞。因此可以将 BK 病毒感染分为 Decoy 细胞、BK 病毒尿症、BK 病毒血症和 BKVAN 由轻到重的 4 个阶段。其中 Decoy 细胞脱落和 BK 病毒尿症紧密相关, BK 病毒血症会由严重的 BK 病毒尿症发展而来, 而发展为 BK 病毒血症则是最终发生 BKVAN 的必然过程<sup>[10]</sup>。因此对于肾移植受者来说, 术后 3~9 个月是受者发生 BK 病毒感染的高峰时段, 需密切监测受者尿沉渣 Decoy 细胞及尿和血液中 BK 病毒 DNA 载量的变化, 以便及时进行临床干预, 减少受者进展为 BKVAN 的概率。

关于免疫抑制剂与 BK 病毒感染相关性方面, 我们也做了一些研究。上世纪 90 年代中期是 BK 病毒被发现、认知和 BKVAN 逐渐被重视的过程, 这与一系列新型免疫抑制剂 (如 Tac、MMF、兔抗人胸腺免疫球蛋白及抗 IL-2 受体抗体) 的应用几乎同时发生。由此引发了新型强效免疫抑制剂可能是 BKVAN 发生发展的主要危险因素的假设。其发病

原因与巨细胞病毒和 EB 病毒发病机制相类似,很可能是由于抗 BK 病毒特异性 T 淋巴细胞受到抑制所致。几个流行病学研究显示了 **BKVAN 增加的危险因素分别与免疫抑制药物、MMF 和 Tac 的应用有关**。Egli 等进行的体外实验结果显示,高血药浓度的 CNi 可以通过 BK 病毒 LT-ag 特异性抑制抗 BK 病毒 T 淋巴细胞的反应。但在他们的研究中,却没有发现高血药浓度的 MMF、西罗莫司或来氟米特具有类似的抑制作用。Egli 的研究暗示了 CNi 中含有某种未知的成分,可能与 BKVAN 的高发病风险有关。在**免疫相关因素中,无论是单独还是联合免疫抑制方案, Tac 和 CsA 两类 CNi 药物均与术后 BK 病毒血症的发生发展显著相关**( $P < 0.05$ ),与 Decoy 细胞和 BK 病毒尿症的发生无显著相关( $P > 0.05$ ),由此我们认为,**CNi 类药物是 BK 病毒血症进展的独立危险因素,此观点与国内外大多数研究结论基本相同**。

#### 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] 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.
- [3] Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, et al. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. Transplantation, 2010, 89(12): 1462-1465.
- [4] 解俊杰, 钱叶勇, 石炳毅. 肾移植后 BK 病毒感染者实时荧光定量 PCR 检测. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 797-800.
- [5] 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.
- [6] Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. Lancet Infect Dis, 2003, 3(10): 611-623.
- [7] Johnston O, Jaswal D, Gill JS, et al. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. Transplantation, 2010, 89 (9): 1057-1070.
- [8] 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.
- [9] Rubio L, Pinczewski J, Drachenberg CB, et al. A multiplex real-time PCR method for quantification of BK and JC polyomaviruses in renal transplant patients. Diagn Mol Pathol, 2010, 19(2): 105-111.
- [10] Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, et al. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus infection. Transplantation, 2010, 90(12): 1450-1457.

(收稿日期: 2012-08-29)

#### • 消息 •

#### 中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益,现将中华医学会杂志社对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

(1)本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处,但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表过的摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。

(2)如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表,除非文种不同,否则不可再将该文投寄给他刊。

(3)请作者所在单位在来稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。

(4)凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿,则表明稿件正在处理中,作者欲投他刊,应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

(5)对于有一稿两投嫌疑的文稿,编辑部应认真收集有关资料,并仔细核对后再通知作者,同时立即进行退稿处理,在作出处理决定前,请作者就此问题作出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时,应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

(6)已刊出的论文一经查实确系一稿两投,将择期在杂志中刊出其作者单位和姓名以及撤销该论文的通告;2 年内将拒绝在中华医学会系列杂志发表该作者作为第一作者所撰写的一切文稿;就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

(中华医学会杂志社)



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](http://www.paperyy.com/reduce_repetition)

PPT免费模版下载: <http://ppt.ixueshu.com>

---