

肾移植受者 BK 病毒感染的临床诊断

黄刚¹, 陈立中¹, 王长希¹, 费继光¹, 邱江¹, 李军¹, 邓素雄¹, 陈国栋¹, 曾文涛², 付茜², 纪玉莲³(中山大学附属第一医院¹器官移植科,²器官移植实验室,³肾内科, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 探讨肾移植受者 BK 病毒感染的诊断方法、监测指标。方法 采集 234 例肾移植受者的血、尿样本, 行 BKV 尿沉渣细胞学计数与实时荧光定量 PCR 检测方法。结果 234 例受者的尿 Decoy 细胞、BK 病毒尿症与病毒血症的阳性率分别为 33.3%、33.3% 和 16.2%。尿 Decoy 细胞阳性者 Decoy 细胞中位数水平为 6 个/10HPF, BKV DNA 阳性者尿液和外周血 BKV 中位数水平分别为 7.62×10^3 copy/ml 和 7.61×10^3 copy/ml。尿液 BKV 阳性率较外周血明显升高 ($P=0.000$)。尿液 Decoy 细胞计数与尿液 BKV 含量相关 ($r=0.59$, $P=0.000$), 但尿液和外周血中 BKV 含量无明显相关性 ($P=0.14$)。结论 肾移植受者易发生 BKV 再活化, 定量尿沉渣细胞学检测简单、易行、敏感, 可以作为 BKV 活化的指标, 间接反映肾脏病理情况, 也可检测血、尿 BKV DNA 了解病毒活化情况、筛查 BKV 相关的移植肾肾病。

关键词: 肾移植; BK 病毒; Decoy 细胞

中图分类号: R617; R699.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2007)10-1593-04

Clinical diagnosis of BK virus infection in renal transplant recipients

HUANG Gang¹, CHEN Li-zhong¹, WANG Chang-xi¹, FEI Ji-guang¹, QIU Jiang¹, LI Jun¹, DENG Su-Xiong¹, CHEN Guo-dong¹, ZENG Wen-tao², FU Qian², JI Yu-lian³

¹Department of Organ Transplantation, ²Laboratory of Transplantation Surgery, ³Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To explore the clinical diagnosis of BK virus (BKV) infection in renal transplant recipients. Methods Urine and peripheral blood samples were taken from 234 renal transplant recipients for BKV detection with cytological test and real-time PCR. Results The occurrence rate of urine decoy cells, BKV viruria and viremia in these patients was 33.3%, 33.3% and 16.2%, respectively, and the median level of urine decoy cells was 6/10 HPF, with the median level of urine and peripheral blood BKV of 7.62×10^3 copy/ml and 7.61×10^3 copy/ml, respectively. The positivity rate of BKV in the urine samples were significantly higher than that in peripheral blood samples ($P=0.000$). The amount of decoy cells was related to BKV load in the urine samples ($r=0.59$, $P=0.000$), but the BKV load in the urine samples was not related to that in peripheral blood samples ($P=0.14$). Conclusions Renal transplantation is associated with increased BKV shedding, indicating the necessity of BKV monitoring in renal transplant recipients with urine cytology, which is convenient and sensitive and indicates renal histological changes indirectly. Urine and peripheral blood BKV DNA detection is of value in identifying BKV activation to prevent irreversible graft damage of BKV-associated nephropathy.

Key words: renal transplantation; BK virus; decoy cells

BK 病毒 (BKV) 是目前已知的能引起人类感染的 3 种多瘤病毒 (Polyomaviruses) 的一种。原发性 BKV 感染发生在 4~5 岁时, BKV 血清阳性率在 5~9 岁时达 91%, 感染后将永久存在于肾脏、泌尿道和淋巴组织中、免疫正常人群无症状, 当免疫力受到抑制时病毒可激活致病^[1,2]。肾移植术后持续性 BKV 感染是引起同种移植肾失功或丢失的重要诱发因素。BKV 相关性肾病 (BKVAN) 在肾移植受者人群中发病率约 5%, 有的中心甚至报道达 8%, 在这些发病人群中约有 50%~70% 发生移植肾功能丢失^[3,4]。人们已认识到 BKVAN 已成为影响肾移植患者远期疗效和

移植肾远期功能的重要因素。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选取 1998 年 11 月至 2007 年 4 月在本院移植中心进行肾移植的受者 234 例, 其中男性 161 例 (68.8%), 女性 73 例 (31.2%), 年龄 3~71 岁, 平均 (40.4 ± 1.9) 岁。检测距离手术间隔平均为 16 个月。活体供肾 22 例。

1.2 检测指标

1.2.1 尿沉渣细胞形态学检测 方法: 取受者新鲜中段晨尿 10 ml, 置于无菌管中, 1500 r/min 离心 5 min。取沉淀细胞涂片, 相差显微镜分别于 100 倍、400 倍下观察, 同时 Papanicolaou 染色后制片, 分别于 100 倍、400 倍光镜下观察。诊断标准: Decoy 细胞阳性

收稿日期: 2007-08-06

作者简介: 黄刚 (1979-), 男, 博士生, 电话: 13711562714, E-mail: huanggang_791021@163.com

通讯作者: 陈立中 (1958-), 男, 博导, 教授, E-mail: cz@medmail.com.cn

定义为:脱落的肾小管上皮细胞胞核明显增大,不规则的细胞外形与肿瘤细胞相似,肿大的细胞核由嗜碱性的包涵体组成。根据 Nিকেলেইত等^[5]将核内的包涵体形态分为 4 型: 型为无定形嗜碱性毛玻璃样物或凝胶样; 型为嗜伊红颗粒,外周有一不完整的晕似泉眼; 型为无光晕的光滑颗粒; 型为囊状物件有细胞核显著增大、染色质浓集不规则。Decoy 细胞计数采用的定量标准^[6]:计数 10 个高倍视野的阳性细胞个数,并分为:阴性;少量(1~5/10 个高倍视野 [HPF]);中量(5~10/10HPF);大量(>10/10HPF)。

1.2.2 血、尿样本的病毒学检测 标本收集与处理:采血 2 ml 存于 EDTA 抗凝管,同时无菌管取新鲜中段尿 20 ml,提取 30 μ l BKV DNA (上海生工病毒抽提试剂盒),置 -20 保存待测。引物:实时荧光定量 PCR 引物(P1、P2)为 BKV VP1 基因区(GenBank V01108)特异引物,拟扩增该区片段长 95 bp, P1(forward): 5'-AGTGGATGGGCAGCCTATGTA-3' (2511-2531 nt); P2 (reverse): 5'-TCATATCTGGGTCCCCTGGA-3'(2605-2586 nt)。TaqMan 探针: 5'-AGGTAG AAGAGGTTAGGGTGTGGATGGCACAG-3' (2546-2578 nt), 5' 端使用 FAM 标记, 3' 端使用 TAMRA 标记。以上引物和探针用 Primer Express 软件设计,并参考了 Leung 等^[7]的研究,经 BLAST 校对后证实为 BKV 特异性序列并为 BKV 各型所共有,由大连宝生物公司合成。外参照标准品的克隆:以 P1、P2 为引物,应用高保真 PCR 扩增系统从可疑感染标本获得扩增片段并基因测序验证(大连宝生物公司),应用割胶回收试剂盒回收、纯化扩增的 PCR 产物,与 19-T Simple Vector(大连宝生物公司)连接,转化 GM109 菌株,在含 X-gal、IPTG、氨苄青霉素的 LB 平板上筛选白色转化子菌落,培养细菌后提取质粒 pMD-BK(QIAGEN Plasmid Mini Kit, Qiagen),经 DNA 测序(大连宝生物公司)证实含有 95bp 目的 DNA 片段,配成不同浓度作为标准品使用。实时荧光定量 PCR 反应体系:使用 Premix Ex Taq™ PCR 试剂盒(大连宝生物公司),在反应管中加入 PCR 反应液 20 μ l,其中 P1、P2 各 200 nmol/l, TaqMan 探针 50 nmol/l, 4 μ l 待测样品提取液或系列浓度质粒标准品 pMD-BK,低速离心后,置于 DNA Engine Opticon™ 连续荧光检测 PCR 仪扩增(MJ research™ 公司)。扩增条件为:50 2 min, 95 10 s; 95 10 s, 60 31 s, 40 个循环。连续测定荧光强度,利用 Opticon Monitor™ 软件分析检测结果。Ct 值规定为 PCR 扩增仪默认设置,即 1~15 个循环计算出的荧光信号的标准偏差的 10 倍值对应的循环数。每次检测均以 10³~10⁸ copy/ml 系列梯度浓度的标准品 pMD-BK 构建标准曲线,可

见 Ct 值和浓度对数之间具有很好的相关性,所有测定标准曲线的相关系数 R² 0.99。动态范围测定显示在 10³~10¹⁰ copy/ml 之间标准曲线具有良好的相关性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示,不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距表示。计数资料主要采用 Pearson 卡方检验或 Fisher's 精确检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿沉渣细胞计数及形态学检测结果

Papanicolaou 染色后制片观察,78 例(33.3%)受者的尿沉渣细胞可检测到阳性 Decoy 细胞。Decoy 细胞阳性者,细胞计数在 1~65/10 HPF,中位数水平为 6/10HPF。若按照等级分类,少量者 38 例(占 48.7%),中量者 30 例(占 38.5%),大量者 10 例(占 12.8%)。发现受者尿 Decoy 细胞阳性的中位时间为 7.5 月。其中 I 型者占大多数 71 例(占 91.0%), II 型 2 例(占 2.6%), 型 2 例(占 2.6%), 型 3 例(占 3.8%)。

相差显微镜也可很容易的观察到 Decoy 细胞(图 1)。与 Papanicolaou 染色所观察的相似:肿大的细胞核由嗜碱性的包涵体组成,周围围绕着毛玻璃或凝胶样的染色质,有时核内包涵体呈小囊样改变,或者仅围绕一圈光晕和染色质成簇状^[8]。

如果尿中存在多量病毒感染细胞,则经常同时存在移行上皮、肾小管上皮或管型及大量炎细胞。

2.2 尿、血中 BKVDNA 定量检测结果

78 例(33.3%)受者尿 BKV DNA 阳性(病毒尿症),载量在 1.15 $\times 10^3$ ~6.00 $\times 10^{11}$ copy/ml 之间,尿液 BKV DNA 阳性者病毒中位数水平为 7.62 $\times 10^3$ copy/ml。38 例(16.2%)受者在血液中检测到 BKV DNA(病毒血症),载量在 1.30 $\times 10^3$ ~6.06 $\times 10^5$ copy/ml 之间,血液 BKV DNA 阳性者病毒中位数水平为 7.61 $\times 10^3$ copy/ml。发生病毒尿症的中位时间为 6.1 月,发生病毒血症的中位时间为 4.9 月。

2.3 尿 Decoy 细胞计数、尿 BKVDNA 含量及血 BKV DNA 含量之间关系

尿液 Decoy 细胞阳性率与尿液 BKV 阳性率的差异无统计学意义(P>0.05),两种诊断方法的吻合度有统计学意义($\kappa=0.67, P=0.000$)。尿液 BKV 阳性率较外周血明显升高(P=0.000)。尿液 Decoy 细胞计数与尿液 BKV 含量相关($r=0.59, P=0.000$)。但尿液和外周血中 BKV 含量无明显相关性(P=0.14)。

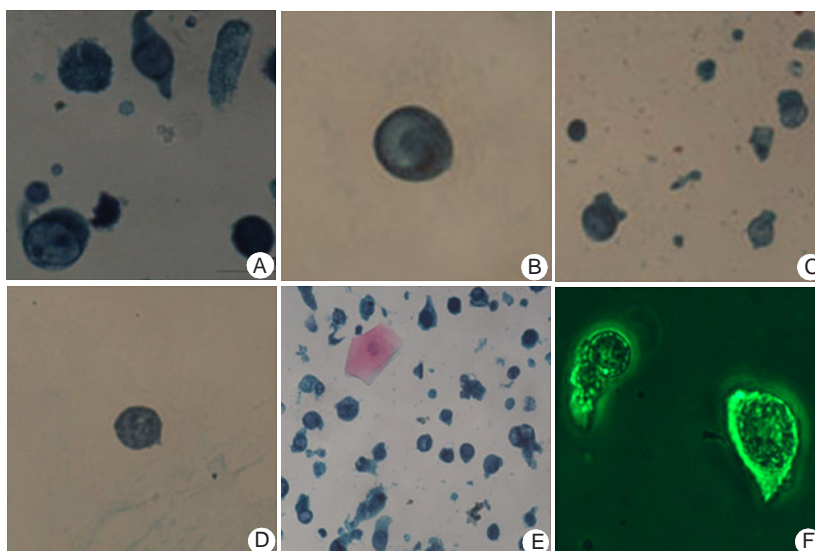


图 1 各种形态的 Decoy 细胞

Fig.1 Examples of different type of decoy cells showing chromatin migration toward the nuclear membrane (Papanicolaou staining, original magnification: $\times 400$)

A: Type I decoy cells with enlarged nuclei occupied by irregular basophilic inclusion bodies surrounded by chromatin that confer a ground-glass or gelatinous appearance; B: A type II cell with a nuclear inclusion body surrounded by a clear halo ("bird's eye" appearance); C: Type III cells in which the nuclear inclusion bodies are some smooth granules without halo; D: A type IV cell, in which the nuclear inclusion bodies are vesicular; E: Necro-inflammatory background in a urine sample containing many BKV-infected cells (original magnification: $\times 100$); F: Two typical tubular cells (decoy cells) containing polyomavirus inclusion bodies with enlarged nuclei and gelatinous appearance under phase-contrast microscope (original magnification: $\times 400$)

本组最终确诊 1 例 BKVAN, 该患者免疫抑制方案为 FK506+MMF+强的松, 肾移植后 4 个月出现肾功能减退血肌酐由正常升高至 $170 \mu\text{mol/L}$, 检测尿沉渣 Decoy 细胞 65/10 HPF, 尿液 BKV 含量 6.00×10^{11} copy/ml, 血浆 BKV 含量 5.29×10^4 copy/ml. 移植肾穿刺病理示 4/16 个肾小球硬化, 未见明显的细胞浸润, 局灶性肾小管上皮细胞核 BK-T 抗原染色阳性, 肾小管炎, 局灶性肾小管细胞萎缩, 肾间质炎症细胞浸润, 小动脉未见血管炎及玻璃样变性。根据 Hirsch 等^[9]病理分期, 该患者属 BKVAN B 期。

3 讨论

有资料显示, 肾移植受者尿 Decoy 细胞阳性率为 29.4%~40.0%, 病毒尿症发生率为 13.0%~34.7%, 而病毒血症为 5.0%~21.0%^[10]。本组与上述研究结果基本相符。

Decoy 细胞是诊断 BKVAN 很重要的线索。研究发现, 尿 Decoy 细胞阳性对诊断 BKVAN 的敏感性为 100%, 特异性为 71%^[11]。Decoy 细胞的出现标志着病毒的激活与复制, 代表着疾病的初始阶段, 但据此还不能直接诊断 BKVAN, 如予干预尚可逆转疾病的发展。定量计数每 10^4 个高倍视野下 decoy 细胞的

数量, 可以增加诊断的特异性^[12]。Nickeliet 等发现, 在疾病发生的初期 Decoy 细胞会周期性的少量排出, 已经确诊 BKVAN 的病人中会有大量典型的 Decoy 细胞排出, 而且 Decoy 细胞的大量排出往往发生在组织学可以确诊之前, 为早期诊断提供线索。Drachenberg 等研究发现^[6], 在发病的病人中尿沉渣中受感染的细胞数量同病理标本中受感染的细胞数量成正比 ($P=0.0001$)。对于病理分期为 B 的患者其尿中存在大量感染细胞及多量炎性细胞^[13]。随着疾病的发展肾间质纤维化 (C 期), 尿中受感染的细胞数量逐渐减少。尿中 Decoy 细胞的阳性预测价值是 90%, 阴性预测价值是 99%。我们采用定量计数尿中 Decoy 细胞的方法, 发现其与尿液 BKV 含量成正相关, 两种诊断方法的吻合度有统计学意义。我们确诊的这位患者, 其尿液中存在大量受感染细胞, 及炎性细胞, 病理分期属 BKVAN B 期, 尿液标本的阳性发现与 BKVAN 表现一致。因此我们认为, 通过观察 Decoy 细胞形态可间接了解肾小管上皮细胞的形态学特点, 通过计数并结合尿液中 BK 病毒负荷量可以了解疾病进展过程。二者结合有重要的临床意义。

监测血浆中 BK 病毒负荷量, 可作为调整免疫抑制剂维持用量, 维持治疗时间是否合适的一项指标^[14]。

本研究中尿液 BKV 检出率高于外周血检出率,可以考虑将尿液 BKV DNA 指标作为早期预警标志。但尿液病毒负荷量和外周血病毒负荷量之间统计学上无明显相关性,而且还有 10 例患者外周血中检出了 BKV 而尿液中却未检出。国外亦有类似的报告,有研究者认为这是 BKV 在不同器官部位激活的结果,或是因其他种属的多瘤病毒如 JC 病毒或 SV40 病毒引起^[15]。作者认为,除了上述原因外,还可能是由于 BKV 在尿液中呈间歇性排出,加上尿流量生理性变动较大所致。因此,对于尿液中病毒含量偏低而外周血浓度相对较高者,应在短期内反复测定其尿液中 BKV 含量,以求获得尿液中病毒较为“准确”的含量。

总体上,肾移植受者易发生 BKV 再活化,BKV 感染一旦发展为间质性肾病常常是不可逆的,因此早期诊断和治疗避免远期移植失败具有临床意义。尿沉渣细胞学检测简单、易行、敏感,可以做为 BKV 活化的指标,间接反映肾脏病理情况。也可检测血、尿 BKV DNA 了解病毒活化情况。应用相差显微镜常规检测尿沉渣中的 decoy 细胞,结合检测血浆中 BK 病毒的 DNA 负荷,是临床上简便经济的监测高危患者的无创方法,并且可以为活体组织检测提供依据,对预防间质性肾病和评价治疗效果等方面具有重要意义。

参考文献:

[1] Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40[J]. J Med Virol, 2003, 71(1): 115-23.
 [2] Gu ZY, Li Q, Si YL, et al. Prevalence of BK virus and JC virus in peripheral blood leukocytes and normal arterial walls in healthy individuals in China[J]. J Med Virol, 2003, 70(4): 600-5.
 [3] Li RM, Mannom RB, Kleiner D, et al. BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy[J]. Transplantation, 2002, 74(11): 1497-504.
 [4] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-

associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations[J]. Transplantation, 2005, 79(10): 1277-86.
 [5] Nickleit V, Klimkait T, Binet IF, et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1309-15.
 [6] Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology [J]. Am J Transplant, 2001, 1(4): 373-81.
 [7] Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, et al. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients [J]. J Virol Methods, 2002, 103(1): 51-6.
 [8] Gai M, Lanfranco G, Segoloni G.P. "Decoy Cells" in urine [J]. Transplant Proc, 2005, 37(10), 4309-10.
 [9] Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients[J]. N Engl J Med, 2002, 347(7): 488-96.
 [10] Drachenberg CB, Drachenberg RC, Papadimitriou JC, et al. Histological patterns of polyoma virus disease in 55 renal allografts. Concurrent examination of biopsies and urines (Abstract 539)[J]. Am J Transplant, 2001, 1: S270.
 [11] Ahuja M, Cohen EP, Dayer AM et al. Polyoma virus infection after renal transplantation. Use of immunostaining as a diagnosis [J]. Transplantation, 2001, 71(7): 896-9.
 [12] Kahan AV, Coleman DV, Koss LG. Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics [J]. Am J Clin Pathol, 1980, 74(3): 326-32.
 [13] Randhawa P, Vats A, Shapiro R. Monitoring for polyomavirus BK and JC in Urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology [J]. Transplantation, 2005, 79 (8): 984-6.
 [14] Limaye AR, Jerome KR, Kuhr CS, et al. Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients [J]. J Infect Dis, 2001, 183 (11): 1669-72.
 [15] Si-Mohamed A, Goff JL, Desire N, et al. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients[J]. J Virol Methods, 2006, 131(1): 21-7.