

移植患者 BK 病毒监测的临床意义

吴蓓颖, 蔡刚, 林佳菲, 范臻佳, 樊绮诗

(上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025)

摘要: 目的 通过对患者血或尿 BK 病毒(BKV)载量的监测,探讨性别、年龄、人巨细胞病毒(HCMV)及免疫抑制剂浓度等对患者 BKV 载量的影响,以及 BKV 载量对患者疾病的影响。方法 用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测移植患者血浆及尿液的 BKV 载量。分析血浆 HCMV 浓度及免疫抑制剂浓度对患者 BKV 载量的影响以及 BKV 载量高低对患者肾功能的影响。结果 1 985 例移植和非移植肾病患者中 BKV 阳性 242 例(12.1%),其中血浆阳性 211 例(10.6%),尿液阳性 118 例(5.9%)。骨髓移植患者、肾移植患者及非移植肾病患者的 BKV 阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$),几乎所有移植患者检测到 BKV 阳性都发生在移植后的前 3 个月中。HCMV 的感染与否与患者的 BKV 载量差异无统计学意义($P = 0.2729$)。骨髓移植及肾移植患者血浆的免疫抑制剂浓度和环孢素 A(CsA)浓度(> 150 ng/mL)对患者 BKV 载量的影响差异有统计学意义($P < 0.01$);他克莫司浓度(FK506)(> 8.0 ng/mL)与 BKV 载量差异无统计学意义($P = 0.2785$)。BKV 阳性患者与 BKV 阴性患者比较,肾功能中的肌酐(CREA)水平差异有统计学意义($P = 0.0207$)。结论 BKV 的复制与性别、年龄、是否有 HCMV 合并感染无关,而与血浆免疫抑制剂的浓度有关。通过对 BKV 载量的连续监测,调节患者免疫抑制剂的浓度,可以减少由 BKV 带来的二次损伤。

关键词: BK 病毒; 移植; 免疫抑制剂

Clinical significance of monitoring BK virus in transplanting patients WU Beiyong, CAI Gang, LIN Jiafei, FAN Zhenjia, FAN Qishi. (Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To monitor blood and urine BK virus (BKV) load and discuss the influence of sex, age, human cytomegalovirus (HCMV) and immunosuppressor on BKV load and the influence of BKV load on diseases. **Methods** BKV loads of plasma and urine from patients were measured by real-time fluorescence quantitation polymerase chain reaction (PCR). The influence of plasma HCMV concentration and immunosuppressor concentration on BKV load and the influence of high or low BKV load on diseases were analyzed. **Results** BKV was detected in 242 (12.1%) cases of 1 985 patients with or without transplantation. A total of 211 cases were positive in plasma (10.6%), while 118 cases were positive in urine (5.9%). Bone marrow transplantation, kidney transplantation and none transplantation patients had different BKV positive rates with statistical significance ($P < 0.01$). Almost all cases of BKV positive occurred in the first 3 months after transplantation. There was no statistical significance between HCMV infection and BKV load ($P = 0.2729$). Among bone marrow transplantation and kidney transplantation patients, the differences of BKV load to plasma immunosuppressor concentration and cyclosporine A (CsA) concentration (> 150 ng/mL) had statistical significance ($P < 0.01$), those to tacrolimus (FK506) (> 8.0 mg/mL) had no statistical significance ($P = 0.2785$). For BKV positive and negative patients, there was statistical significance when monitoring serum creatinine (CREA) ($P = 0.0207$). **Conclusions** There is no relationship of sex, age and concurrent infection of HCMV infection with BKV replication. However, the concentration of plasma immunosuppressor is related with BKV replication. The secondary damage can be reduced by adjusting the dose of immunosuppressor from continuously monitoring BKV load.

Key words: BK virus; Transplantation; Immunosuppressor

作者简介: 吴蓓颖,女,1983年生,硕士,技师,主要从事分子遗传学研究。

通讯作者: 樊绮诗,联系电话: 021-67888236。

BK 病毒(BK virus, BKV) 属乳多空病毒科多瘤病毒属。尽管 BKV 在全世界有很高的感染率(超过 80% 的成人其血清学检测呈阳性),但 BKV 感染对健康人并不致病。病毒大量潜伏于肾小管及尿道上皮细胞中,当宿主免疫功能低下可导致病毒激活,形成间歇性病毒尿症。当机体免疫监视功能亢进时, BKV 复制可致造血干细胞移植患者发生出血性膀胱炎。对肾移植患者而言, BKV 复制所致的 BKV 相关性肾病是造成移植物失功能的重要原因之一。尽管 BKV 感染是影响移植患者预后的重要因素,但由于目前缺乏有效的针对 BKV 抗病毒治疗手段,使得持续、有效地对 BKV 感染进行监测显得尤为重要。在本研究中,对瑞金医院 342 例肾移植患者和 122 例骨髓移植患者的 BKV 感染情况进行了回顾性分析,同时以肾病患者作为对比,为临床评估移植患者预后、防范 BKV 感染提供相关依据。

材料和方法

一、研究对象

选取瑞金医院移植患者 464 例,男 283 例,女 181 例,平均年龄(44 ± 15)岁,其中骨髓移植患者 122 例,肾移植患者 342 例。另选取肾病患者 1 521 例,男 838 例,女 683 例,平均年龄(48 ± 19)岁。对上述 1 985 例患者的 6 444 份血浆/尿标本进行 BKV 载量检测。

二、方法

1. 病毒检测 移植患者检测其移植术后 2 周的血浆及尿液的 BKV 载量及血浆人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) 载量,若是阴性,则前 6 个月每月监测,之后每 3 ~ 4 个月检测 1 次。如果血或尿任何一个指标阳性,则每 2 ~ 4 周重复检测 1 次,与此同时,患者缓慢地减少免疫抑制剂的用量。我们将 BKV 在 2 个月内有 3 次或 3 次以上阳性定义为病毒持续阳性。肾病患者 BKV 载量检测作为临床常规测试项目。(1) BKV 检测: 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝血 2 mL, 无菌中段尿 10 mL, 分别抽提 DNA, -20 °C 保存,用以 BKV 的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 定量检测^[1]。BKV 定量检测的范围为 $6.0 \times 10^2 \sim 6.0 \times 10^7$ 拷贝/mL, 并且 BKV 阳性的定义是 BKV > 1.0×10^3 拷贝/mL; (2) HCMV 检测: 取 2 mL 血浆抽提病毒 DNA, 使用 Roche Lightcycler 480 及凯

杰公司试剂检测 HCMV 载量。

2. 免疫抑制剂检测 移植患者术后检测血浆免疫抑制剂浓度。取 2 mL 全血,使用雅培 i2000 化学发光免疫分析仪和 Architect Tacrolimus 普乐可复试剂盒及 Architect cyclosporine 普乐可复试剂盒分别检测患者血浆他克莫司(tacrolimus, FK506) 及环孢霉素 A(cyclosporin A, CsA) 浓度(谷值)。

3. 肾功能检测 移植患者术前及术后监测肾功能,肾病患者治疗过程中监测肾功能。取血清 2 mL,使用 Beckman-Coulter Dx C800 全自动生化分析仪及配套试剂分别检测血清肌酐(creatinine, Cr) 及尿素氮(urea nitrogen, BUN)。

三、统计学方法

用 SAS 9.0 对数据进行分析,分别使用两样本均数比较的 *t* 检验、秩和检验及 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、BKV 的阳性率

共检测了 1 985 例患者的 6 444 份标本,其中血浆 5 281 份、尿液 1 163 份。BKV 阳性率为 12.1%,其中血浆阳性率 10.6%,尿阳性率 5.9%。血浆 BKV 阳性载量的中位数(四分位数)为 1.04×10^4 (2.6×10^3 , 6.3×10^5) 拷贝/mL; 尿 BKV 阳性载量中位数(四分位数)为 2.92×10^6 (3.04×10^3 , 3.50×10^6) 拷贝/mL,明显高于血浆中的病毒载量($P < 0.01$)。

二、BKV 与临床特征的关系

通过对 1 985 例患者的分析发现,不同 BKV 载量患者的年龄及性别构成差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

三、BKV 在不同疾病间阳性率的差异

本研究检测 BKV 载量的患者主要集中在骨髓移植病区、肾移植病区及肾内科病区,其中骨髓移植病区 122 例患者中 BKV 阳性 65 例(53.2%); 肾移植病区 342 例患者中 BKV 阳性 79 例(23.1%); 肾内科 1 521 例患者中 BKV 阳性 97 例(6.3%),不同的移植患者及非移植患者间 BKV 阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 279.4205$, $P < 0.01$)。见表 1。

四、BKV 与其他病毒合并感染的关系

在同时检测 BKV 和 HCMV 的 552 例患者中,单一 BKV 阳性 121 例(21.9%),BKV 及 HCMV

双阳性 66 例(11. 9%)。BKV 与 HCMV 合并感染的发生率与单一 BKV 感染的发生率差异无统计学意义($\chi^2 = 1. 202 3, P = 0. 272 9$)。见表 2。

五、不同免疫抑制剂对 BKV 感染的影响

血浆中 CsA 浓度升高,导致 BKV 阳性率升高,当 CsA 的浓度 > 150 ng/mL 时, BKV 的阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 10. 37, P < 0. 01$) ,然而 FK506 的血药浓度的差异(> 8. 0 ng/mL)对 BK

阳性率的影响无统计学意义($\chi^2 = 1. 17, P = 0. 278 5$)。见表 2。

六、BKV 与肾功能的关系

通过检测 BKV 载量、Cr 及 BUN 发现, BKV 阳性患者与 BKV 阴性患者比较,血清 Cr 水平差异有统计学意义($\chi^2 = 5. 34, P = 0. 020 7$) ,而血清 BUN 水平差异无统计学意义($\chi^2 = 0. 013 9, P = 0. 906 2$)。见表 3。

表 1 1 985 例患者基本临床信息

组别	例数	年龄	性别(男/女)	科室			出血性膀胱炎	BKV 相关性肾炎
				肾移植病区	骨髓移植病区	肾内科		
BKV 阳性组	241	41 ± 15	147/94	79	65	97	5/5	1/1
BKV 阴性组	1 744	45 ± 17	974/770	263	57	1 424	-	-
合计	1 985	45 ± 16	1 121/864	342	122	1 521	5/1 985	1/1 985

表 2 影响 BKV 载量的因素

组别	性别		HCMV		移植			CsA(μg/mL)		FK506(ng/mL)	
	男	女	阳性	阴性	骨髓移植	肾移植	非移植	> 150	≤ 150	> 8. 0	≤ 8. 0
BKV 阳性组	147	94	66	121	65	79	97	206	66	16	63
BKV 阴性组	974	770	112	253	57	262	1 424	84	55	20	52
P 值	0. 130 9		0. 272 9		< 0. 01			< 0. 01		0. 278 5	

表 3 BKV 对患者肾功能的影响

组别	BUN		Cr	
	升高	正常	升高	正常
BKV 阳性组	68	59	40	27
BKV 阴性组	83	70	67	20
P 值	0. 906 2		0. 020 7	

讨 论

BKV 的复制主要对免疫功能受损或抑制的患者造成伤害,最主要的 2 种疾病表现即为骨髓移植患者伴发的出血性膀胱炎和肾移植患者伴发的 BKV 相关性肾炎。目前国内尚缺乏这两种疾病发病率及风险因素评估的相关数据。本研究通过对大样本量的患者信息进行分析,发现 BKV 的载量在骨髓移植患者、肾移植患者及非移植患者的标本中检出率不同,患者体内免疫抑制剂浓度对 BKV 的感染率有影响,而 BKV 又会影响患者的 Cr 水平。同时从本研究的数据也得出了 BKV 的感染与否和年龄、性别及是否合并 HCMV 感染

无统计学差异的结论,这与国外报道^[2]的结论相似。

出血性膀胱炎是造血干细胞移植后常见的并发症之一,发病率为 7% ~ 68%,临床表现多样化,从镜下血尿、肉眼血尿,到合并血凝块,是引起肾功能衰竭和患者死亡的重要原因。以往多认为环磷酰胺(cytoxan, CTX) 的药物毒性是引起出血性膀胱炎的主要原因。但随着预防措施的加强,发病率仍达 10. 9% ~ 40. 0%^[3]。目前有文献报道 CTX、马利兰等药物毒性主要与移植后早期出血性膀胱炎相关,而迟发性出血性膀胱炎与造血干细胞移植后 BKV、HCMV、腺病毒等感染相关。由于细胞免疫异常、供者 T 淋巴细胞的去除及移植抗宿主病导致病毒活化可能与机体不同的免疫状态有关,腺病毒可能与免疫功能低下有关,而 BKV 可能与免疫功能亢进有关^[4-6]。最近的研究越来越支持 BKV 是引起造血干细胞移植后伴发出血性膀胱炎的主要原因。国外大量研究显示造血干细胞移植术后患者尿中 BKV 检出率可达 40% 以上, BKV 相关性出血性膀胱炎的发病率为 5% ~ 20%,多为迟发性,且持续时间长。本研究

中有 5 例 BKV 阳性的造血干细胞移植患者被确诊为出血性膀胱炎,其中 2 例死亡,均在移植 15 d 后发生。此 5 例患者的尿液 BKV 载量的检测值超出了我实验室的最高检测限。表明 BKV 在患者细胞内的大量复制可能是导致出血性膀胱炎的直接原因。故 BKV 载量的监测结果可能是患者病情转归的一个预判指标,对出血性膀胱炎的早期发现及防治有决定性作用。

BKV 相关性肾炎的确诊金标准是通过免疫组化技术在肾活检组织的肾小管上皮细胞核内发现多瘤细胞 T 抗原沉积^[7]。然而此项目为有创性检测,会给患者带来痛苦,因此对尿液和血液中 BKV 的载量检测便显示出了其操作的简便性,尤其在长期监测中体现出优势。BKV 相关性肾炎首发的临床表现是 Cr 升高^[8]。通过回顾性分析可以发现,BKV 感染造成的患者肾功能损伤表现为 Cr 水平上升,显示出长时间缓慢上升的特征,不同于急性排斥期的短期内急剧升高^[8]。

病毒尿症是 BKV 激活的标志,提示病毒处于活动性感染状态。肾移植患者 BKV 活动性感染常见于免疫抑制最强烈的术后 3 个月内,可以是一过性,也可以持续数周到数月^[9]。Hirsch 等^[10]发现 BKV 相关性肾炎的发生率为 1%~7%,平均在移植后 44 周(6~270 周) BKV 相关性肾炎才得到确诊,在移植后 24 周达到高峰,并认为 BKV 相关性肾炎的持续存在和患者的移植器官不可逆性失功能有关。另一项研究显示血浆中病毒数量 > 7 700 拷贝/mL 时所有患者均出现了 BKV 相关性肾炎的病理表现^[2]。而瑞金医院的 BKV 相关性肾炎诊断率远低于此水平。由此可见,我们对 BKV 相关性肾炎的认识亟待提高。

随着免疫抑制剂的使用,移植后短期的存活率有了明显提高。然而可以造成移植肾失功能的病毒感染问题也随之而来,包括 BKV,它最终可导致移植物的丢失^[2,11]。BKV 相关性肾炎的临床及病理表现与急性排斥反应相似,但是快速的免疫抑制剂减量会使免疫抑制不足而导致急性排斥,Randhawa 等^[12]报道免疫抑制剂减量提高病毒清除率,但同时也增加了移植肾丢失的风险。第 3 代免疫抑制剂尤其是 FK506 与霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF) 广泛使用后,BKV 肾病的发病率逐年增多。大剂量 FK506 或 MMF 使 BKV 肾病的发病率增加了 13 倍^[13-14]。正确、适量地减少免疫抑制剂强度使得 BKV 相关性肾

炎预后较好,反之则可以加快 BKV 相关性肾炎的进展。有随机研究比较使用 FK506 与 CsA,两组 BKV 尿症和 BKV 血症的发生率差异无统计学意义($P > 0.05$),使用免疫诱导治疗及选用免疫抑制剂的种类均不是 BKV 感染的危险因素^[15]。通常认为这一类药物的使用会降低免疫功能,潜在在肾小管的 BKV 复制,最终导致发病。本研究的患者在肾移植后首先使用的是 CsA,其血浆浓度的谷值升高时,超过 70% 的患者出现 BKV 阳性;然而换用 FK506 进行免疫抑制治疗后,仍未发现 BKV 能迅速有效清除;另外 FK506 的血药浓度与 BKV 载量水平也未见明显联系。由此推测可能是这些患者在早期使用大剂量 CsA 已造成免疫功能严重抑制,即使换用 FK506, BKV 可能也无法在短期内快速下降。故 BKV 的连续监测在肾移植患者的检测中显得更为重要。

虽然 BKV 相关性肾炎会引起移植肾失功能已经得到各方的认可,但是有关免疫抑制剂的使用及使用剂量仍然各持己见。最近有关个体化用药的研究结果显示,FK506 及 CsA 的代谢均与细胞色素酶中的 CYP3A5、CYP3A4 基因相关,而 CsA 的代谢还与 ATP 结合区域亚家族 B1 等基因有关^[16-17]。因此,移植患者在免疫抑制剂的选择和使用的同时进行 BKV 的连续检测,以及在治疗前个体化的基因分析可能会成为常规分析。

参 考 文 献

- [1] 刘湘帆,董雷鸣,曹文俊,等. 肾脏移植术后病人 BK 病毒检测的初步研究[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(4): 601-603.
- [2] 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): 488-496.
- [3] Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm[J]. Bone Marrow Transplant 2005, 36(11): 929-937.
- [4] Manikandan R, Kumar S, Dorairajan LN. Hemorrhagic cystitis: a challenge to the urologist[J]. Indian J Urol 2010, 26(2): 159-166.
- [5] Decker DB, Karam JA, Wilcox DT. Pediatric hemorrhagic cystitis[J]. J Pediatr Urol 2009, 4(5): 254-264.
- [6] Mori Y, Miyamoto T, Kato K, et al. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated

hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2012, 18(3): 458-465.

[7] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations [J]. Transplantation, 2005, 79(10): 1277-1286.

[8] Randhawa PS, Demetris AJ. Nephropathy due to polyomavirus type BK [J]. N Engl J Med 2000, 342(18): 1361-1363.

[9] Howell DN, Smith SR, Butterly DW, et al. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients [J]. Transplantation, 1999, 68(9): 1279-1288.

[10] Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK [J]. Lancet Infect Dis 2003, 3(10): 611-623.

[11] Stahl A, Evans JG, Pattel S, et al. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes [J]. Dev Cell 2002, 2(4): 477-488.

[12] Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney [J]. Transplantation, 1999, 67(1): 103-109.

[13] Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss [J]. Transplantation, 1999, 67(6): 918-922.

[14] Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs [J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(6): 1190-1196.

[15] Barton ES, Youree BE, Ebert DH, et al. Utilization of sialic acid as a coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease [J]. J Clin Invest 2003, 111(12): 1823-1833.

[16] García M, Macías RM, Cubero JJ, et al. ABCB1 polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients [J]. Eur J Clin Pharmacol 2013, 69(3): 385-393.

[17] Zochowska D, Wyzgal J, Paczek L. Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients [J]. Ann Transplant, 2012, 17(3): 36-44.

(收稿日期: 2013-12-17)

(本文编辑: 姜 敏)

(上接第 492 页)

坦、哌拉西林、头孢噻肟、头孢哌酮-舒巴坦、头孢呋辛、美罗培南、头孢曲松、喹诺酮、头孢吡肟、厄他培南、环丙沙星、哌拉西林-三唑巴坦和头孢他啶均敏感; 庆大霉素、阿米卡星、头孢唑啉、头孢替坦、复方磺胺甲噁唑和妥布霉素均耐药。药物敏感性纸片均为 OXOID 公司产品。

三、讨论

沙门菌属细菌广泛分布于自然界, 是人和动物常见的致病菌, 常见以下类型: 急性胃肠炎或食物中毒、血流感染、伤寒与副伤寒或病菌携带者。小儿泌尿道感染的病原菌绝大多数为革兰阴性肠杆菌科细菌(如大肠埃希菌、变形杆菌、克雷伯菌)或非发酵菌(如铜绿假单胞菌), 少数为肠球菌和葡萄球菌。而像此例中肾盂肾炎患儿尿中检

出伦敦沙门菌并引起患者典型临床症状在国内罕见。我们试图从流行病学方面进行调查, 患儿父母均未感染过此菌, 故此菌株的来源还有待进一步观察。

参 考 文 献

[1] 卢运照, 郭思建, 李 宪, 等. 败血症患儿血中分离出 1 株伦敦沙门菌 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(8): 1023.

[2] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 896.

(收稿日期: 2013-12-10)

(本文编辑: 姜 敏)