泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1180-04

同种异体肾移植前活动性 CMV 感染及其影响

姜 庆[1],王平贤[2],张银甫[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010;2.第三军医大学第二附属医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:明确肾移植患者术前活动性巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV)感染的发生状况及其对术后 CMV 的影响。方法:2006 年 6 月~2008 年 11 月期间,使用荧光素标记的抗 CMV-pp65 单克隆抗体,检测 156 例肾移植患者术前外周血 CMV-pp65 抗原血症;肾移植后每 2~4 周检测 1 次 CMV-pp65 抗原血症,共为期 6 个月;分析术前 CMV-pp65 抗原血症状况对术后患者 CMV-pp65 抗原血症强度和 CMV 病发生率的影响;另于同期内检测 32 例健康成人 CMV-pp65 抗原血症作相关对照。结果:32 例健康成人 CMV-pp65 抗原血症均为(-);肾移植前有 12.2%(19/156)的尿毒症患者 CMV-pp65 抗原血症为(+);这类患者肾移植后发生高活动性 CMV 感染(即 CMV-pp65 抗原血症指数>100)和 CMV 病的发生率均明显高于移植前 CMV-pp65 抗原血症为(-)的患者。结论:肾移植前活动性 CMV 感染高达 12.2%;术前活动性 CMV 感染是导致肾移植后发生高活动性 CMV 感染和 CMV 病的重要原因。

【关键词】肾移植;巨细胞病毒

【中国图书分类法分类号】R972.4;R692.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

Active cytomegalovirus infection before renal transplantation and it's affection on the patients

JIANG Qing, et al

(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To discover the matter of active Cytomegalovirus (CMV) infection before renal transplantation and its affection on the patients after transplantation. *Methods*: the numbers of pp65 positive cells in peripheral blood in 32 normal persons who were used as control and 156 uremia patients before renal transplantation were determined between June 1, 2006 and November 30, 2008. The variations of number of pp65 positive cells in peripheral blood in patients after renal transplantation were investgated. *Results*: In control group the number of pp65 positive cells in peripheral blood was $0/5 \times 10^4$ WBC. Before renal transplantation there was 12.2 percent of uremia patients whose pp65 positive cell counting was more than 0 cell $/5 \times 10^4$ WBC.In this kind of patient the case number of serious active CMV infection(pp65 positive cell counting was more than 100 cells $/5 \times 10^4$ WBC) and CMV disease after renal transplantation was more than others.The difference was significant. *Conclusions*: The findings suggest that active CMV infection before renal transplantation is an important sake that causes serious active CMV infection and even CMV disease after renal transplantation.

【Key words】Kidney transplantation; Cytomegalovirus

巨细胞病毒(Cytomegalovirus,CMV)感染是肾移植后常见的并发症。移植后早期活动性 CMV 感染高达 60%~80%,且 15%~30%为有症状的 CMV 病[1,2],CMV 感染被认为不仅是肾移植术后近期死亡的重要原因,而且可能与急性排斥反应和慢性移植物肾病有关,肾移植后能否有效、及时地防治 CMV 感染是影响移植效果的关键[3]。鉴于肾移植前活动性 CMV 感染的发生状况、移植前活动性 CMV 感染对移植后的影响目前尚不清楚,本研究旨在通过检测 CMV-pp65 抗原血症,探讨移植前活动性 CMV 感染对移植后活动性 CMV 感染的严重程度及发生 CMV 病的影响,为临床防治 CMV 感染提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验组 于 2006 年 6 月~2008 年 11 月期间,首次行肾移植的 212 例患者中,术后未使用过抗淋巴细胞球蛋白(ATG 或 OKT3)、带肾存活 6 个月以上者,共有 156 例(A

作者介绍:姜 庆(1966-),男,副教授,
研究方向:普通泌尿与肾移植。
通讯作者:张良甫,男,教授,E-mail: wpx8@21cn.com。

组)。其中男 93 例、女 63 例,年龄 17~62 岁。

1.1.2 对照组 取 32 例健康成人(献血员)(B 组)作相关对照。男 17 例、女 15 例,年龄 21~40 岁。

1.2 肾移植患者术后免疫抑制方案

肾移植后最初 3~5d 使用甲基强的松龙针剂 500 mg/d 静脉注射;能进食后即开始口服霉酚酸酯(MMF),1.0 g/d;当血肌酐(Cr)≤250 μmol/L 时,给予环孢素 A(CsA)8 mg/(kg·d)或普乐可复(FK-506)0.15 mg/(kg·d),均分为 2 次口服,以后根据血药浓度逐渐减量;泼尼松(Pred)维持量为 10~15 mg/d。

1.3 检测方法

1.3.1 检测对象与时间 检测 A、B 两组外周血 CMV-pp65(+)白细胞计数。A 组于术前检测 1 次,术后开始每 2 周、3 个月后改为每 4 周检测 1 次,共为期 6 个月。

1.3.2 检测试剂 荧光素标记的抗 CMV-pp65 单克隆抗体,CMV 检测试剂盒为荷兰 IQ 公司产品(购自深圳晶美生物工程有限公司)。

1.3.3 检测原理 pp65 为 CMV 复制过程中产生的一种结构蛋白,在 CMV 活动性感染时,外周血白细胞作为 CMV 的易感细胞,以主动或被动的方式从血液中获取了大量的pp65 抗原,在白细胞涂片中,以荧光素标记的抗 pp65 单克隆抗体,可与白细胞内的 pp65 抗原结合,在荧光显微镜下 CMV-pp65 阳性细胞呈黄绿色(见图 1)。

1.3.4 定量方法 以 5 万个外周血白细胞(WBC)中 CMV-pp65 抗原阳性 WBC 的数量(称为"抗原血症指数")对 CMV 抗原血症进行定量。

1.4 活动性 CMV 感染和 CMV 病的临床诊断标准

1.4.1 活动性 CMV 感染 在 5 万个外周血 WBC 中,只要发现有 1 个 CMV-pp65(+)的 WBC,即"抗原血症指数"≥1 个 /5×10^4 个 WBC,就可诊断为活动性 CMV 感染。本研究将"抗原血症指数">100 个 /5×10^4 个 WBC,定为"高活动性 CMV 感染"。

1.4.2 CMV 病 活动性 CMV 感染的患者出现发热,或同时伴有白细胞降低、肺炎、肝功异常、胃肠道病症等,这些临床表现不能用其它原因进行解释(即可排除其它疾患),且抗 CMV 治疗(对 CMV 病可疑患者,使用更昔洛韦 250 mg /d 连续应用 2~3 周)有效者[4,5]。

1.5 统计学分析

采用 SPSS10.0 for windows 软件进行上述统计学处理;实验数据以"均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)"表示;使用 χ^2 检验;以 $P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A、B 两组 CMV-pp65 抗原血症

A 组 CMV-pp65 抗原血症、B 组术前 CMV-pp65 抗原血症及术后 6 个月内 CMV-pp65 抗原血症最高值(峰值)在不同数量段的例数分布见表 1。

结果显示:32 例健康成人 CMV-pp65 抗原血症均为(-);肾移植前有 12.2%(19/156)的尿毒症患者 CMV-pp65 抗原血症为(+),其外周血 CMV-pp65(+)WBC 记数为 1~116 个/5 万 WBC;肾移植后 6 个月内有 88.5%(138/156)的肾移植受者 CMV-pp65 抗原血症为(+),其外周血 CMV-pp65(+)WBC 记数为(1~2280)/5 万 WBC。

2.2 移植前 CMV-pp65 抗原血症对术后的影响

移植前 CMV-pp65 抗原血症,对肾移植后 CMV-pp65 抗原血症指数以及 CMV 病的发生率的影响。见表 2。

结果显示:2×c 表 χ^2 检验,$\chi^2=22.95$,即移植前 CMV-pp65 抗原血症为(+)的患者,术后发生高活动性 CMV 感染(CMV-pp65 抗原血症指数>100)的病例数,明显高于移植前 CMV-pp65 抗原血症为(-)的患者($P<0.01$)。

移植前 CMV-pp65 抗原血症为(+)的患者,术后 CMV 病的发生率(26.3%)明显高于移植前CMV-pp65 抗原血症为(-)的患者(其 CMV 病发生率仅为 1.5%),$P<0.01$。

表 1 A 组、B 组 CMV-pp65(+)细胞数在不同数量段的分布(例)

pp 65(+)细胞数 /5 万 WBC		0	1~116	117~2 280
B 组(n =32)		32	0	0
A 组(n =156)	术前	137	19	0
	术后(6 个月内峰值)	18	93	45

表 2 肾移植前、后 CMV-pp65 抗原血症指数以及 CMV 病的发生率

术前	n	肾移植后 6 个月内(峰值)			CMV 病	
		0	1~100	101~2280	(例)	发生率
0	137	18	89	20	2	1.5%
1~116	19	0	2	17	5	26.3%*

* 与对应组比较 $P<0.01$

2.3 CMV 病与非 CMV 病患者多种因素比较(见表 3) 结果显示:两类患者除了术前和 CMV 病发病时 CMV-pp65(+)白细胞计数(几何均数±s)有显著差异外($P<0.01$),其它因素没有差异($P>0.05$)。

表 3 CMV 病与非 CMV 病患者不同因素比较

	CMV 病(n=7)	非 CMV 病(n=149)	P 值
年龄	44.1 ± 13.7	40.4 ± 17.2	>0.05
性别(F / M)	3/4	70/79	>0.05
血透 / 腹透 (例)	7/0	144/5	>0.05
术前 PP65(+)细胞计数(1/5 × 104 WBC)	9.80 ± 4.64	2.27 ± 2.10	<0.01
术后免疫抑制剂 FK506/CsA(例)	3/4	39/110	>0.05
CMV 病时 pp65(+)细胞数 (1/5 万 WBC)	915.3 ± 81.0	58.6 ± 6.7	<0.01

3 讨 论

巨细胞病毒为人类病毒感染中常见的病原体。该病毒可经呼吸道、消化道、输血和器官移植等多种途径传入体内,上皮细胞、血管内皮细胞和外周血中的白细胞等极易受到感染。60%~90%的健康成人曾经感染过 CMV[6]。CMV 是一种弱致病因子,对免疫力正常的个体不具有明显毒力,但一旦感染,CMV 即被宿主终生携带,潜伏的病毒以基因或基因产物存在于细胞中,机体表现为持续血清学阳性(即抗 CMV-IgG+)。当机体免疫功能下降、特别是细胞免疫力低下时,又可新感染 CMV,或潜伏的病毒再次激活、复制,形成活动性 CMV 感染。在活动性 CMV 感染中,病毒可通过血液广泛播散于全身,体内几乎所有器官都可受到 CMV 感染,这种活动性 CMV 感染轻者无症状,或似"流感"样表现,重者则为"CMV 病",患者可出现发热、白细胞降低、肺炎、肝炎、视网膜炎、胃肠道病症等各种非特异性临床表现,在这种情况下,特别是在机体免疫功能严重低下时,CMV 常与其它病原体构成二重或多重感染,病情凶险,死亡率高[7,8]。

尽管感染仍然是肾移植后主要的并发症之一,但由于免疫抑制剂的发展和临床移植水平的提高,肾移植近期效果已得到了显著的改善。然而,尽管应用了预防急性排斥反应足量的免疫抑制剂,肾移植远期效果至今却未能得以相应的提高,移植肾的平均半寿期仍徘徊在 7~10 年,这主要是因为慢性移植物肾病导致了不少患者于肾移植数月、特别是 1 年或数年后,移植肾功能进行性减退,最终移植肾功能衰竭、恢复透析[9]。然而,近年来动物实验显示 CMV 感染又是导致慢性移植物肾病的重要原因[10]。

移植后早期活动性 CMV 感染高达 60 %~ 80%,且 15% ~ 30%为有症状的 CMV 病[1,2],因此 CMV 感染被认为不仅是肾移植术后近期死亡的重要原因,而且可能与急性排斥反应和慢性移植物肾病有关,肾移植后能否有效、及时地防治 CMV 感染是影响移植效果的关键[3]。

长期以来,如何及时、准确地诊断活动性 CMV 感染成为了阻碍其临床研究的关键。正常情况下,只要能从血清中检出抗 CMV-IgM,或抗 CMV-IgG 由阴性转为阳性或双份血清显示抗 CMV-IgG 滴度升高 4 倍以上,即可诊为活动性 CMV 感染。然而,由于肾移植患者术后应用了大剂量的免疫抑制剂,其抗体反应弱而迟钝,在这个特殊的群体中,依靠血清学检查已不能做出正确的诊断;此外,如果能从病变组织中分离出 CMV,也可诊为活动性 CMV 感染,但 CMV 自身的特点,即生长缓慢、培养周期长(4~6 周)、阳性率低(长时间培养易受细菌和真菌等干扰)等,通常也使该病源学诊断失去了临床意义;至于聚合酶链反应,虽敏感性高,但其过程繁琐、要求高,阳性诊断价值低,特别是不能区分潜伏感染和活动性感染[11]。

为了克服诊断上的困难,近年来以检测外周血白细胞中 pp65 抗原,以此判断体内有无活动性 CMV 感染正逐渐应用于临床。pp65 是 CMV 基因 UL83 编码的由 561 个氨基酸构成的磷酸化蛋白,属 CMV 的结构蛋白。pp65 在病毒 DNA 复制后大量扩增,并主要积聚在宿主细胞胞浆的致密颗粒和细胞外的病毒颗粒中,它的出现提示 CMV 已复制完毕、形成了完整的病毒,是活动性 CMV 感染的标志。CMV 有着广泛的嗜细胞性,特别是血管内皮细胞、外周血中的白细胞等极易受到其侵袭[12],在活动性 CMV 感染时,外周血中的白细胞以主动或被动的方式从脱落于血循环中的内皮细胞等获取大量的病毒抗原,

因此,只要能在外周血中检测到含有 pp65 抗原的白细胞,即可诊断为活动性 CMV 感染。不仅如此,PP65 阳性白细胞的数目还可以反映受者体内病毒的负荷,能体现 CMV 感染的严重程度、抗病毒治疗效果以及感染的预后[13]。

鉴于抗淋巴细胞球蛋白(ATG 或 OKT3)能显著抑制机体的细胞免疫功能,是潜伏 CMV 强效的激活剂,为了准确地反应绝大多数患者术后活动性 CMV 感染的发生规律,故本研究在病例选择上排除了使用过抗淋巴细胞球蛋白的患者。

本研究从术后 6 个月内 CMV-pp65 抗原血症检测结果来看,外周血 CMV-pp65(+)白细胞计数波动于(0~2280)个/5 万 WBC 之间,对这样一个大小悬殊超出了 $0\sim10^3$ 范围的数据,如果使用普通算术均数±标准差进行处理,则无法实施正确的统计学分析。为此本研究选择了适合于该资料的几何均数进行统计学处理,即先把有关资料变为以 10 为底的对数,在进行必要的整理后,再使用反对数将其还原为真数,以此保证了整个统计分析所得结果的真实性。

该研究显示,32 例健康成人 CMV-pp65 抗原血症均为(-);肾移植前有 12.2%(19/156)的尿毒症患者 CMV-pp65 抗原血症为(+);肾移植后 6 个月内有 88.5%(138/156) 的肾移植受者 CMV-pp65 抗原血症为(+);肾移植前抗原血症为(+)的患者,术后发生高活动性 CMV 感染(即 CMV-pp65 抗原血症指数>100)和 CMV 病的发生率均明显高于移植前 CMV-pp65 抗原血症为(-)的患者。

由此可见,不仅肾移植后早期活动性 CMV 感染发生率高(88.5%),而且肾移植前有 12.2%的尿毒症患者存在着活动性 CMV 感染,特别是这种术前活动性 CMV 感染是导致肾移植后发生高活动性 CMV 感染和 CMV 病的重要原因。因此作者认为,在临床肾移植工作中,为避免术后发生严重的 CMV感染,对肾移植前活动性 CMV 感染应予以高度重视和有效处理。

参 考 文 献

[1] Paudice N, Mehmetaj A, Zanazzi M, et al. Preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients: our preliminary experience[J]. Transplant Proc, 2009, 41(4): 1204-1206.

[2] Xue W, Liu H, Yan H, et al. Methodology for monitoring cytomegalovirus infection after renal transplantation[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(2): 177-181.

[3] Yang R, Xia T, Xu G, et al. Human cytomegalovirus specific CD8 (+) T lymphocytes display interferon-gamma secretion impairment in kidney transplant recipients with pp65 antigenemia[J]. Transplant Proc, 2008, 40(10): 3500-3504.

[4] Nickel P, Bold G, Presber F, et al. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function[J]. Transpl Immunol, 2009, 20(4): 238-242

[5] 夏吉荣, 王富兰, 祝继华. 人巨细胞病毒活动性感染的分析[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(2): 195-197.

[6] Ye Q, Luo G, He X, et al. A novel pattern of pp65-positive cytomegalic endothelial cells circulating in peripheral blood from a renal transplant recipient[J]. Acta Histochemica, 2004, 106(2): 107-110.

[7] Lee W, Tsang W K, Tong K L, et al. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation: a single-center experience [J]. Transplant-Proc, 2006, 38(1): 282-283.

[8] Babel N, Brestrich G, Gondek L P, et al. Clonotype analysis of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 344-352.

[9] 翁亚光, 王应雄, 刘学庆, 等. 人巨细胞病毒感染与染色体着丝粒点变异关系研究[J]. 重庆医科大学学报, 2000, 25(2): 113-115.

[10] Greanya E D, Partovi N, Yoshida E M, et al. The role of the cytomegalovirus antigenemia assay in the detection and prevention of cytomegalovirus syndrome and disease in solid organ transplant recipients: A review of the British Columbia experience[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005, 16(6): 335-341.

[11] Inkinen K, Soots A, Krogerus L, et al. Cytomegalovirus increases collagen synthesis in chronic rejection in the rat[J]. Nephrol-Dial-Transplant, 2002, 17(5): 772-779.

[12] Kuypers D R, Evenepoel P, Maes B D, et al. Role of immunosuppressive drugs in the development of tissue-invasive cytomegalovirus infection in renal transplant recipients[J]. Transplant-Proc, 2007, 39(4): 1164-1170.

[13] Costa C, Touscoz G A, Bergallo M, et al. Non-organ-specific autoantibodies in renal transplant recipients: relation to BK virus infection [J]. New Microbiol, 2008, 31(2): 175-180.

(责任编辑:冉明会)