

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.10.037

肾移植术后巨细胞病毒感染的检测方法与研究进展^{*}

白敏凤¹综述,尹利民^{2△}审校

1. 昆明医科大学附属甘美医院检验科,云南昆明 650000;2. 云南省昆明市
第一人民医院检验科,云南昆明 650000

关键词:肾移植; 巨细胞病毒; 感染; 检测方法

中图分类号:R699.2;R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)10-1431-04

巨细胞病毒(CMV)感染是影响肾移植效果的最常见的机会性感染之一。尽管目前有多种方法来检测是否感染 CMV,但由于近年来移植后 CMV 感染的发病率和病死率呈上升趋势,因此快速检测 CMV 从而采取有效的预防和治疗措施十分关键。本文就肾移植术后 CMV 的检测方法进行综述。

1 肾移植术后 CMV 感染及诊断

CMV 感染是肾移植术后最常见的并发症之一^[1]。CMV 属疱疹病毒 β 亚科,成熟的病毒颗粒直径为 150~200 nm,为具有包膜的双链线性 DNA 病毒,基因组全长为 225~240 kb,其翻译后的产物超过 200 种蛋白质^[2]。这种病原体的感染在全世界范围内具有很高的流行率。尽管在有免疫能力的宿主中感染通常是无害的,但却是器官移植接受者发病和死亡的主要原因。在不同的肾移植接受者中,有 40%~100% 的患者发生主动感染^[3]。CMV 与肾移植后肺炎、肝炎、视网膜膜及肾移植后急、慢性排斥反应的发生有密切的联系^[4]。

CMV 感染会对外周 T 细胞数量和表型有明显影响,与移植肾的功能相关^[5]。肾移植后 CMV 感染可导致直接损害和间接损害,直接损害包括 CMV 综合征,具体表现为发热、乏力、肌痛、关节痛、厌食等,以及入侵组织产生肺炎、肝炎、脑炎、视网膜炎、肾炎等;间接损害包括细菌和(或)真菌的感染、移植肾的功能和总体存活,比如间质性肾炎、肾动脉狭窄或血栓性微血管病变及肾移植后急性排斥反应、慢性排斥反应等^[6]。

CMV 复制存在于组织、血液或其他体液中,与症状无关,可通过核酸检测(NAT)、抗原检测和病毒培养法来检测 CMV 的复制。根据所使用的方法,血液中的 CMV 复制可以称为 CMV DNAemia 或 RNAemia、CMV 抗原血症(抗原检测法)和 CMV 病毒血症(培养法)^[7]。CMV 感染的发病机制极为复杂,CMV 与免疫系统存在多种相互作用,这由多种机制介导,包括病毒对人白细胞抗原表达、细胞因子产生和黏附分子的影响。这些相互作用可以解释 CMV

感染继发细菌和真菌感染的风险增加,以及 CMV 感染与急性(和)慢性移植物抗宿主病(GVHD)的关联^[2]。器官移植术后检测 CMV 的实验室方法包括分子测定、抗原血症检测、组织病理学、病毒培养和血清学检测等^[8]。目前,临床上常规的 CMV 检测多采用酶联免疫吸附试验(ELISA)或间接免疫荧光试验(IF)通过检测血清中的 IgG、IgM 抗体,并采用实时荧光定量 PCR 检测移植术后 CMV 的感染。目前,临床对于肾移植后 CMV 感染最主要的预防包括“先发制人”的策略和预防策略两种方式。但是,对活动性感染或疾病的有效治疗,以及采取“先发制人”的策略都需要准确、早期的诊断,因此需要快速且准确的 CMV 感染诊断方法^[3]。

2 肾移植术后 CMV 的检测方法

2.1 病毒培养法 对于实体器官移植(SOT)接受者,病毒培养法对 CMV 感染的诊断具有高度特异性^[8]。此方法通过采集器官移植接受者的外周血白细胞、血浆、支气管灌洗液、组织、脑脊液和尿液,将标本接种于人成纤维细胞后,通过观察细胞的病理变化来判断是否存在 CMV 感染。最初病毒培养法采用传统组织试管培养(噬斑测定),由于试管培养费力,并且可能需要数周才能进行病毒分离和检测,因此,其在临床实践中的实用性有限^[9];随后,使用壳瓶离心培养技术对其进行了改进,缩短了周转时间(48 h)。尽管病毒培养法对 CMV 感染的诊断具有高度特异性,但与较敏感和快速的分子检测法相比,病毒培养法由于灵敏度低和周转时间长而使用较少^[8,10]。对于尿液或口腔分泌物,由于对 CMV 的特异性较差(相对于病毒脱落),病毒培养法不适用^[1]。尤其对于肾移植术后 CMV 感染患者,由于病毒培养时间长,不能对早期 CMV 感染及时诊断,而且培养过程可能出现污染,造成假阴性,这可能导致诊治不及时而影响肾移植效果。

2.2 组织病理学检查 组织病理学检查仍然是诊断组织浸润性 CMV 疾病的金标准^[9,11]。细胞和细胞核的增大及嗜碱性细胞质包裹体(又称为巨细胞)的存

^{*} 基金项目:昆明医科大学研究生创新基金项目(2021S081)。

[△] 通信作者,E-mail:ylmbj@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220429.1147.004.html\(2022-05-10\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220429.1147.004.html(2022-05-10))

在表明 CMV 的存在^[11],或者通过免疫组织化学染色、原位杂交检测到细胞内病毒。但由于该方法需要进行侵入性操作才能获得用于 CMV 诊断的组织标本,因此,通过组织病理学检查诊断组织浸润性 CMV 疾病逐渐减少^[8]。如果同种异体排斥反应是诊断考虑因素,建议进行组织病理学检查。在临床上,很难将 CMV 感染与同种异体排斥反应区分开,有时两种情况并存,因此可能需要病理活检来诊断^[11]。组织病理学检查对于区分继发于 CMV 和同种异体移植排斥的肾脏改变很有效^[12]。当怀疑 CMV 感染但血液中 CMV 核酸检测呈阴性时,需要进行组织病理学检查,如在某些胃肠道 CMV 感染病例中^[8,13]。重复组织病理学检查证明,从受累器官(如胃肠道)清除 CMV 感染在大多数情况下是不必要的,除非在最初诊断时有严重的组织受累^[8,14]。因此,由于是侵入性操作,肾移植后患者通常情况下不必做组织病理学检查,但当无法区分 CMV 感染和同种异体移植排斥的肾脏改变,或者有严重组织受累时,此检查具有一定意义。

2.3 血清学检测 血清学检测 CMV IgM 和 IgG 是证明在有免疫能力的宿主中感染 CMV 的最常见检测方法。常用的血清学方法有 ELISA、IF、间接血凝试验(IHA)、放射免疫试验(RIA)、免疫印迹(WB)等。CMV 在感染过程中(急性或近期感染)早期诱导 IgM 抗体的产生,随后则是 IgG 抗体(既往或潜在的感染)。但 IgM 抗体通常在感染后 10~15 d 才可检出,不利于早期诊断,而且由于 CMV 在人群中隐性感染率很高,约半数以上的健康成人血清 CMV IgG 抗体阳性,因此,CMV 抗体 IgM 和 IgG 的检测对于器官移植后 CMV 感染的诊断均无临床价值^[15]。但当 CMV IgG 的滴度升高 4 倍以上时,提示 CMV 活动性感染^[16]。器官移植后可使用 CMV 血清学测定 CMV 血清阴性 SOT 接受者的持续敏感性,尽管其预测能力仅为中等^[17]。在解释 SOT 后的 CMV 血清学结果时,应考虑到移植期间或移植后接受血液制品(包括静脉注射用免疫球蛋白)的患者,由于被动转移抗体可能产生假阳性结果^[8]。移植中 CMV 血清学检测可用于供体和候选移植物的移植前筛选。供体和受体的 CMV 血清学检测有助于将器官移植后的 CMV 疾病风险分为高风险(CMV D+/R-)、中风险(CMV D+/R+, CMV D-/R+)和低风险(CMV D-/R-)^[11]。因此,CMV IgM 抗体和 IgG 抗体检测可以对供体和受体是否感染过 CMV 进行初筛,而由于 IgM 出现延迟或 IgG 的普遍性,容易造成假阴性结果,这些因素都限制了血清抗体检测在 CMV 感染诊断过程中的作用。

2.4 抗原血症检测 机体感染 CMV 后,可在外周血白细胞中检测到 CMV 抗原,称为 CMV 抗原血症。抗原血症测定法是一种快速定量方法,可通过使用针对 CMV 基质蛋白 pp65(UL83)的单克隆抗体直接对血液标本中的多形核白细胞(PMN)进行免疫染色来

检测 CMV 抗原^[9]。有研究表明,pp65 抗原血症在指导先发治疗、快速敏感地诊断 CMV 疾病及指导治疗反应方面与 CMV NAT 法相当^[8,18]。在病毒复制过程中,会产生 3 种类型的抗原,即刻早期抗原(IEA),早期抗原(EA)和晚期抗原(LA)^[19]。IEA 在感染后 1~3 h 出现在被感染细胞的细胞核中,并在潜伏感染期间持续存在。EA 在感染后 3 h 甚至在 DNA 合成开始之前就出现在细胞质中。LA 是结构蛋白,仅在 DNA 合成后出现,因此与主动感染相关。pp65 抗原是早期抗原之一^[19]。CMV pp65 抗原(6.5 kb)是病毒的被膜蛋白,由位于 CMV 衣壳和包膜之间的磷酸化蛋白构成,占病毒蛋白的 15%,在 CMV DNA 复制前就有合成,在出现临床症状前 2~10 d 内可明显增高,CMV pp65 抗原阳性提示体内活动性 CMV 复制完成,是 CMV 活动性感染的早期标志性感产物^[20]。早在 1988 年 VAN DER 等^[21]建立了采用葡聚糖沉淀分离白细胞、固定、间接免疫过氧化物酶染色的直接检测肾移植接受者外周血白细胞中 CMV 抗原的方法,并于之后进行了一系列改进。有研究提出使用流式细胞术检测 CMV pp65 抗原^[22]。随后,ESSA 等^[23]通过对 CMV 流式细胞仪检测与抗原血症检测比较发现,流式细胞仪检测具有与抗原血症检测大致相同的灵敏度。与荧光标记法相比,使用流式细胞仪进行细胞计数结果更为准确,操作更加简单易行,还可以减少因人为操作原因造成的荧光,导致出现假阴性^[20]。抗原血症检测的缺点在于需要在 8 h 内送检标本,否则会影响检出率,而且对外周血白细胞数量有一定要求,白细胞数量不足也会影响实验结果。但由于 pp65 抗原在 DNA 合成之前就出现在细胞质中,与 NAT 法相比,更能早期诊断肾移植后 CMV 活动性感染,而且也有很高的灵敏度和特异度。目前,越来越多的实验室通过 CMV 抗原血症检测来指导肾移植术后抗病毒治疗的时机及监测抗病毒药物的疗效,pp65 抗原血症检测对于肾移植后的 CMV 感染有较大的临床意义。

2.5 细胞免疫测定 CMV 感染可以导致机体的免疫功能受到抑制,而 T 淋巴细胞是反映人体免疫状态的重要指标^[20]。免疫监测通过测定非特异性和 CMV 特异性 T 细胞的数量和功能,可帮助 SOT 后 CMV 风险分层和管理^[8,24]。非特异性指标,如绝对淋巴细胞计数、CD4⁺T 细胞计数和非特异性 T 细胞免疫反应与 SOT 后 CMV 疾病的风险相关^[8,25]。器官移植后,CMV 特异性 CD8⁺T 淋巴细胞的复苏被认为是保护 CMV 复发的重要因素^[20]。评估 CMV 特异性 T 细胞反应,包括干扰素- γ 释放测定(IGRA)^[26]、酶联免疫斑点测定法(ELISPOT)^[27],以及使用流式细胞术对干扰素- γ (或其他细胞因子)进行细胞内细胞因子染色(ICS)等方法^[8]。有研究强调了细胞免疫测定在 CMV 风险评估中的潜在作用^[8]。总之,无论采用何种检测方法,缺乏足够的 CMV 特异性 CD4⁺和(或)CD8⁺T 细胞免疫与 CMV 疾病、治疗

失败和 CMV 复发的较高风险相关。因此,可以通过对肾移植后的患者细胞免疫进行监测,帮助肾移植后 CMV 风险分层和管理,但对于早期检测 CMV 感染的诊断有一定限制。

2.6 定量核酸检测技术(QNAT) QNAT 是对血清和白细胞中的 CMV DNA 拷贝数进行定量分析,并通过定量分析 CMV DNA 的表达情况判断 CMV 感染的状况^[20]。由于其高灵敏度和高通量,用于血液中 CMV DNA 的定量 PCR 已成为首选的诊断测试方法,广泛用于临床中 CMV 感染诊断,确定何时开始先发性抗病毒治疗(PET),以及监测感染和(或)疾病进程^[1,28]。定量 PCR 法在非血液标本中的应用已取得了重要进展,以诊断特定部位的 CMV 疾病(如 CMV 感染所致胃肠道疾病和肺炎)^[28]。病毒载量增加率是 CMV 疾病风险的重要标志,CMV 病毒载量上升越快,CMV 疾病风险越高,CMV 复制程度与临床疾病的严重程度直接相关^[8,11]。但是,CMV QNAT 的主要缺点是缺乏适用于各种临床适应证的阈值。虽然世界卫生组织(WHO)校准国际标准的实施已明显改善了各种检测方法中病毒载量的一致性程度,但跨 PCR 检测平台/检测方法的可变性问题仍然存在^[8,28]。最近的研究已经确定了 CMV 定量 PCR 分析的扩增子大小和 DNA 提取方法会影响变异性,标品类型(如血浆与全血与外周血单核细胞)也极大地影响了变异性^[28]。因此,建议移植中心与各自的临床实验室合作,为各种临床应用定义和验证相关的中心特异性和试验特异性病毒载量阈值^[8]。数字 PCR 等较新的方法学有望降低 CMV DNA 的可变性,但尚未广泛使用^[29]。尽管 CMV NAT 法是目前首选的肾移植后 CMV 感染诊断的方法,但对于早期诊断 CMV 活动性感染,该方法不如 CMV 抗原血症检测。

3 肾移植术后 CMV 检测的进展

3.1 核酸序列依赖扩增法(NASBA) NASBA 是一项以 RNA 模板进行等温扩增并能实时观测结果的检测方法,目前该方法已广泛用于多种病原微生物的检测。CMV 可通过该方法检测到 CMV mRNA pp67 的存在。mRNA pp67 的存在表明病毒复制活跃,其是 CMV 感染的标志^[9]。但这种方法灵敏度较低且 RNA 容易变异,相比抗原血症检测及 QNAT 使用逐渐减少^[9-10]。

3.2 杂交捕获技术 杂交捕获技术利用 RNA 探针与 CMV 目的 DNA 杂交,靶标探针复合物(称为 DNA-RNA 杂合体)被杂合体特异的抗体捕获,然后通过发光计测量所得信号(化学发光)。该测定法比细胞培养测定法更灵敏,并且具有与抗原血症测定法相似的敏感性和特异性^[10]。对于移植后 CMV 的诊断还需进一步研究。

3.3 测序 下一代测序技术(NGS)可以同时检测和量化移植受者中的多种病毒,包括 CMV,其结果与标准 QNAT 相当^[30]。外周血快速全基因组测序(rWGS)已用于检测急性感染中的微生物 DNA。

rWGS 可能是一种检测 CMV 感染的快速、灵敏的方法,能尽早检测 CMV,并及时指导开始抗病毒治疗,有助于改善患者的预后^[31]。但该方法的不足在于成本高,检测通量低,过程复杂。

3.4 基因芯片技术 标本 DNA 通过 PCR 扩增荧光标记后,与固定在支持物上的寡核苷酸探针杂交,通过检测荧光信号获得相关位点的基因型信息。该方法灵敏度和准确度高,简便快速,对 CMV 的早期诊断率有较大提升,但存在成本昂贵、技术复杂等问题。

3.5 成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)技术 CRISPR 是当前极具潜力的研究领域之一,对于检测移植后 CMV 感染有较大前景,该技术成本低、使用方便、速度快,可实现频繁检测和早期诊断^[32]。

4 小结与展望

CMV 与肾移植后肺炎、肝炎、视网膜炎及肾移植后急、慢性排斥反应的发生有密切的联系,早期检测 CMV 感染对于指导肾移植后 CMV 的更昔洛韦“先发制人”疗法治疗具有关键作用,对改善移植肾功能、提高肾移植接受者存活率有重要意义。病毒培养技术由于耗时长,应用逐渐减少;血清学检测抗体出现时间影响早期诊断;CMV 抗原血症检测与 QNAT 具有很高的灵敏度和特异度,是目前较常用的检测方法,对于指导治疗肾移植后 CMV 感染有重要的临床意义。新型检测方法(如 CRISPR)有较大的应用前景,有待进一步研究与验证。

参考文献

- [1] KOTTON C N, KUMAR D, CALIENDO A M, et al. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(6): 900-931.
- [2] ARIZA-HEREDIA E J, NESHER L, CHEMALY R F. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1): 1-8.
- [3] FRANCO R F, MONTENEGRO R M, MACHADO A B, et al. Evaluation of diagnostic tests for cytomegalovirus active infection in renal transplant recipients[J]. *J Bras Nefrol*, 2017, 39(1): 46-54.
- [4] CROUGH T, KHANNA R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1): 76-98.
- [5] MEIJERS R W, LITJENS N H, HESSELINK D, et al. Primary cytomegalovirus infection significantly impacts circulating T cells in kidney transplant recipients[J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(12): 3143-3156.
- [6] LUSCALOV S, LOGA L, DICAN L, et al. Cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients after kidney transplantation[J]. *Clujul Med*, 2016, 89(3): 343-346.
- [7] CHEMALY R F, CHOU S, EINSELE H, et al. Definitions of resistant and refractory cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients for use in clinical trials[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(8): 1420-1426.

- [8] RAZONABLE R R, HUMAR A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients: guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice[J]. Clin Transplant, 2019, 33(9): e13512.
- [9] RAZONABLE R R, PAYA C V, SMITH T F. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 746-752.
- [10] RAZONABLE R R, HAYDEN R T. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(4): 703-727.
- [11] RAZONABLE R R. Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients[J]. Infect Dis Clin North Am, 2013, 27(2): 317-342.
- [12] MORGANTETTI G F, BALANCIN M L, DE MEDEIROS G A, et al. Cytomegalovirus infection in kidney allografts: a review of literature[J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(Suppl 2): S192-S197.
- [13] DURAND C M, MARR K A, ARNOLD C A, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in plasma as an adjunct diagnostic for gastrointestinal tract disease in kidney and liver transplant recipients[J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(11): 1550-1559.
- [14] EID A J, ARTHURS S K, DEZIEL P J, et al. Clinical predictors of relapse after treatment of primary gastrointestinal cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2010, 10(1): 157-161.
- [15] LJUNGMAN P, DE La camara-r, CORDONNIER C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT[J]. Bone Marrow Transpl, 2008, 42(4): 227-240.
- [16] PILMORE H, PUSSELL B, GOODMAN D. KHA-CARI guideline: cytomegalovirus disease and kidney transplantation[J]. Nephrology (Carlton), 2011, 16(8): 683-687.
- [17] HUMAR A, MAZZULLI T, MOUSSA G, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2005, 5(5): 1065-1070.
- [18] PANG X L, CHUI L, FENTON J, et al. Comparison of lightcycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3167-3174.
- [19] GANDHI M K, KHANNA R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(12): 725-738.
- [20] 张丽萍, 白剑. 器官移植后巨细胞病毒的院内感染: 检测与监测[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(20): 3258-3263.
- [21] VAN DER B W, TORENSMA R, VAN SON W J, et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes[J]. J Med Virol, 1988, 25(2): 179-188.
- [22] IMBERT-MARCILLE B M, ROBILLARD N, POIRIER A S, et al. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(10): 2665-2669.
- [23] ESSA S, PACSA A S, AL-ATTIYAH R, et al. The use of flow cytometry for the detection of CMV-specific antigen (pp65) in leukocytes of kidney recipients[J]. Clin Transplant, 2000, 14(2): 147-151.
- [24] KUMAR D, MIAN M, SINGER L, et al. An interventional study using Cell-Mediated immunity to personalize therapy for cytomegalovirus infection after transplantation[J]. Am J Transplant, 2017, 17(9): 2468-2473.
- [25] MEESING A, ABRAHAM R S, RAZONABLE R R. Clinical correlation of cytomegalovirus infection with CMV-specific CD8⁺ T-cell immune competence score and lymphocyte subsets in solid organ transplant recipients[J]. Transplantation, 2019, 103(4): 832-838.
- [26] MANUEL O, HUSAIN S, KUMAR D, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(6): 817-824.
- [27] BANAS B, STEUBL D, RENDERS L, et al. Clinical validation of a novel enzyme-linked immunosorbent spot assay-based in vitro diagnostic assay to monitor cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in kidney transplant recipients: a multicenter, longitudinal, prospective, observational study[J]. Transpl Int, 2018, 31(4): 436-450.
- [28] LIMAYE A P, BABU T M, BOECKH M. Progress and challenges in the prevention, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in transplantation[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 34(1): e00043-19.
- [29] HAYDEN R T, GU Z, SAM S S, et al. Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(10): 2602-2608.
- [30] SAM S S, ROGERS R, GILLANI F S, et al. Evaluation of a next-generation sequencing metagenomics assay to detect and quantify DNA viruses in plasma from transplant recipients[J]. J Mol Diagn, 2021, 23(6): 719-731.
- [31] RAMCHANDAR N, DING Y, FARNAES L, et al. Diagnosis of cytomegalovirus infection from clinical whole genome sequencing[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 11020.
- [32] KAMINSKI M M, ALCANTAR M A, LAPE I T, et al. A CRISPR-based assay for the detection of opportunistic infections post-transplantation and for the monitoring of transplant rejection[J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4(6): 601-609.