

# Tesi Doctoral

## Infecció activa pel citomegalovirus (CMV) en el pacient amb malalties associades a inflamació en absència d'immunosupressió canònica

### Doctoranda

Marifina Chilet Sáez

### Director de la tesi

Prof. Dr. David Navarro Ortega

Universitat de València

Departament de Microbiologia i Ecologia

Febrer de 2014



---

---

---

© Marifina Chilet Sáez  
Edita: Mónica Cebrián Pinar  
Imprimeix: Imprenta Rápida Llorens S.L.

Queden rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del copyright, sota les sancions establertes a la llei, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol mitjà o procediment, compresos la reprografia i el tractament informàtic, i la distribució d'exemplars d'aquesta mitjançant lloguer o préstec públics.

# Índex

|  |    |
|--|----|
| 1. Agraïments .....  | 5  |
| 2. Abreviatures i acrònims .....   | 7  |
| 3. Presentació .....   | 11 |
| 4. Prefaci .....   | 13 |
| 5. Introducció .....   | 15 |
| 5.1. Citomegalovirus .....   | 15 |
| 5.1.1. Generalitats .....  | 15 |
| 5.1.2. Patogènia i immunitat .....   | 16 |
| 5.2. CMV en el pacient crític .....  | 18 |
| 5.3. CMV i les malalties inflamatòries cardiovasculars .....   | 19 |
| 5.3.1. Inflamació endotelial i CMV .....   | 20 |
| 6. Justificació i objectius .....  | 23 |
| 7. Resums dels treballs publicats en compliment de l'article 7.2 del Reglament<br>sobre dipòsit, avaluació i defensa de la tesi Doctoral ..... | 25 |
| 8. Articles originals .....  | 37 |
| 8.1. Primer .....  | 39 |
| 8.2. Segon .....   | 49 |
| 8.3. Tercer .....  | 57 |
| 8.4. Quart .....   | 69 |
| 8.5. Cinquè .....  | 75 |
| 9. Resultats .....   | 83 |
| 10. Discussió conjunta .....   | 89 |
| 11. Limitacions metodològiques .....   | 99 |

---

---

|   |     |
|---|-----|
| 12. Conclusions i aplicabilitat dels resultats .....  | 103 |
| 13. Annexos .....   | 105 |
| <b>Annex I.</b> Informe raonat del lloc de signatura del doctorand en les<br>publicacions compendiades en la tesi Doctoral .....  | 107 |
| <b>Annex II.</b> Escrit del director de la tesi Doctoral sobre el factor d'impacte de les<br>diferents revistes on es publiquen els articles que es recullen en la<br>tesi Doctoral ..... | 109 |
| <b>Annex III.</b> Informe favorable del director de la tesi Doctoral .....  | 111 |
| <b>Annex IV.</b> Premi d'investigació Mèdica Bancaixa 2013 .....  | 113 |
| <b>Annex V.</b> Premi al millor pòster en la "XXXIV Reunión de la Sociedad<br>Española de Neumología Pediátrica (SENP)" .....   | 115 |
| 14. Bibliografia .....  | 117 |

# 1. Agraïments

La presentació de la Tesi Doctoral suposa la culminació d'un procés acadèmic i representa un punt on dues trajectòries fonamentals, es troben.

Indubtablement, la primera trajectòria és la professional. En aquesta, done les gràcies a totes aquelles persones que m'han servit de model de treball des del primer instant en que comencí a estudiar, a l'escola, i durant els meus anys de formació pre-universitària. La Facultat de Medicina i la formació especialitzada m'han permès posteriorment, tindre uns bons referents en el meu procés de maduració com a metgessa.

D'aquells professionals que he trobat pel camí i que han marcat en positiu la meua manera d'entendre la Medicina i la Vida, destaque al Prof. Dr. David Navarro Ortega qui va creure en mi des de l'inici de la meua residència i amb qui he compartit i compartisc l'entusiasme per la Virologia en aquest projecte al servei del pacients. El seu guiatge i suport han estat la clau dels meus èxits, entre ells, aquesta tesi Doctoral i de ben segur, farà palesa més enllà de la meua pròpia carrera. Gràcies també al Dr. Gerardo Aguilar, Dr. Julio Núñez, Dr. José Blanquer, Dra. Amparo Escribano i els seus equips de treball, sense els quals no haguera sigut possible dur endavant aquest projecte.

De la gent tan diversa i necessària que ha contribuït al desenvolupament d'aquest estudi, ha estat fonamental l'ajuda i consell de Julia García, Matilde Pastor i Mónica Reig en l'assistència tècnica al laboratori de Biologia Molecular, Núria Tormo i Rosa Mancheño amb les seues anotacions matemàtiques i, les "xiques de Serologia" per l'atenció constant amb les mostres. D'altres com Concha Molina, Paco Fito, M<sup>a</sup> Josep Muñoz, Emilia Llobregat, Maribel Cebolla, JuanMa Pazos, Pilar Ondé, Mónica Cebrián, resta de personal del Servei de Microbiologia i companys de residència, que s'han involucrat i han facilitat la realització d'aquesta Tesi, cadascun d'ells, en el seu àmbit i en diferents etapes d'aquesta. Per a tots ells, també el meu agraïment.

La segona de les trajectòries que conflueix amb l'esdevenir professional i que m'ha conduït a aquesta fita és la trajectòria personal. Més enllà de la indistingible frontera entre els aspectes personals i professionals quan el compromís amb un mateix i els altres és el motor de la nostra vida, hi ha aspectes, fruit de les nostres vivències fora de l'àmbit professional, que ens fan com som.

---

---

Sortadament, el respecte, la valentia, el compromís, el desig de millorar dia a dia, la generositat i l'empatia cap als altres han estat els valors primordials que han influït en el meu creixement com a persona on, indiscutiblement, els meus pares són clarament responsables. No tinc prou paraules per agrair-los tot que han fet per mi.

Per acabar, diré que durant el meu camí personal he trobat el meu company Carlos. La seua paciència i comprensió en el meu desenvolupament professional i l'amor que ens uneix conformen l'eix fonamental per a assolir la plena felicitat. Tots dos junts caminem de la mà en la nostra vida en comú conscients de la bona fortuna de poder gaudir d'una vida junts. Gràcies, Carlos.

## 2. Abreviatures i acrònims

|           |  |
|-----------|--|
| APACHE II | <i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>                             |
| ARA II    | Antagonistes dels Receptors de l'Angiotensina II                                     |
| AT        | Aspirat Traqueal   |
| CA125     | <i>Carbohydrate antigen 125</i> ; Antígen Carbohidrat 125                            |
| CMV       | Citomegalovirus  |
| CMVM      | Citomegalovirus Muri   |
| CP        | <i>Chlamydia pneumoniae</i>  |
| DNA       | <i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Àcid dexosiribonucleic                                |
| ECG       | Electrocardiograma   |
| ELISA     | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ; Assaig per immunoabsorció lligat a enzims |
| FEVE      | Fracció d'Ejecció del Ventricle Esquerre   |
| FvW       | Factor von Willebrand  |
| HHV-6     | Herpesvirus humà 6   |
| HHV-7     | Herpesvirus humà 7   |
| IAM       | Infart Agut de Miocardi  |
| IC        | Insuficiència Cardíaca   |
| ICA       | Insuficiència Cardíaca Aguda   |
| ICC       | Insuficiència Cardíaca Crònica   |
| IE-1      | <i>Intermediate-early 1</i> ; Intermedi-precoç 1                                     |

|               |  |
|---------------|--|
| IECA          | Inhibidors de l'Enzim Convertidor de l'Angiotensina-II                                     |
| IFN- $\gamma$ | <i>Interferon gamma</i> ; Interferó gamma  |
| IL-10         | Interleuquina 10   |
| IL-1 $\beta$  | Interleuquina 1 beta   |
| IL-2          | Interleuquina 2  |
| IL-6          | Interleuquina 6  |
| IL-8          | Interleuquina 8  |
| IM            | Infart de Miocardi   |
| IQR           | <i>InterQuartile Range</i> ; Rang Interquartílic   |
| IRR           | <i>Incidence Rate Ratio</i> ; Taxa de proporció d'incidència                               |
| LDLox         | <i>Oxidized low density lipoprotein</i> ; Lipoproteïnes de baixa densitat oxidades         |
| MCP-1         | <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i> ; Proteïna quimiotàctica de monòcits 1               |
| MI            | Marcadors Inflamatoris   |
| MIP-1a        | <i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i> ; Proteïna inflamatòria de macròfags 1 alfa |
| mRNA          | <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> ; Àcid Ribonucleic missatger                             |
| NK            | <i>Natural Killer cells</i> ; Cèl·lules assassines naturals                                |
| NT-proBNP     | Fragment aminoterminal del Pèptid natriurètic tipus B                                      |
| NYHA          | <i>New York Heart Association</i>  |
| PAD           | Pressió Arterial Diastòlica  |
| PAS           | Pressió Arterial Sistòlica   |
| PBMCs         | <i>Peripheral Blood Monocytes Cells</i> ; Monòcits de sang perifèrica                      |



|               |  |
|---------------|--|
| PCR           | <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reacció en cadena de la polimerasa  |
| PL            | Plasma   |
| pp65          | <i>Phosphoprotein 65</i> ; Fosfoproteïna 65  |
| qPCR          | <i>Polymerase chain reaction qualitative</i> ; Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa   |
| qRT-PCR       | <i>Reverse Transcription Polymerase chain reaction qualitative</i> ; Reacció en cadena de la polimerasa amb la transcripció reversa quantitativa |
| RANTES        | <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i> ; Regulació de l'activació de cèl·lules T normals expressades i secretades  |
| SDRA          | Síndrome de distrès respiratori de l'adult   |
| SMC           | <i>Smooth muscle cell</i> ; Cèl·lules del múscul llis  |
| SR-A          | <i>Class A scavenger receptor</i> ; Receptor "eliminador" classe A   |
| STEMI         | <i>ST-segment elevation acute myocardical infarction</i> ; Elevació del segment ST en el infart agut de miocardi                                 |
| TAC           | Tomografia Axial Computada   |
| TACM          | Transplantament Al·logènic de Cèl·lules Mare   |
| TNF- $\alpha$ | <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> ; Factor de Necrosi Tumoral Alfa  |
| TOS           | Transplantament d'Òrgan Sòlid  |
| TRI           | Tracte Respiratori Inferior  |
| TRS           | Tracte Respiratori Superior  |
| UCI           | Unitat de Cures Intensives   |
| VEB           | Virus d'Epstein-Barr   |
| VIH           | Virus de la immunodeficiència humana   |



### 3. Presentació

Aquesta tesi Doctoral es presenta com a compendi de publicacions en compliment del nou Reglament sobre dipòsit, avaluació i defensa de la tesi Doctoral aprovat pel Reial Decret 99/2011, de 29 d'octubre, pel qual es regulen els ensenyaments oficials de doctorat, així com l'article 136 del Estatus de la Universitat de València i, tenint en compte els requisits que es contemplen a l'article 8 d'aquest Reglament, mitjançant el qual els doctorands poden usar articles publicats per a la seua tesi Doctoral.

L'any 2008 des del Servei de Microbiologia i Parasitologia Clínica iniciarem aquesta línia d'investigació clínica, en col·laboració amb els Serveis d'Anestesia-UCI, seguidament treballarem amb Cardiologia i finalment, Pediatria; tots ells pertanyents a l'Hospital Clínic Universitari de València. Aquest treball conjunt ha donat com a resultat la publicació de cinc articles en revistes internacionals, cinc comunicacions a congressos nacionals, finançat en part pel Ministeri de Sanitat i Consum, Instituto de Salud Carlos III de Madrid, RED HERACLES, i cal mencionar el cinquè i últim article publicat el qual ha rebut el Premi d'investigació Mèdica Bancaixa 2013.

L'oportunitat de presentar la tesi Doctoral com a compendi de publicacions científiques en revistes de renom, desperta i estimula la investigació entre la comunitat científica i facilita l'elaboració de tesis doctorals a investigadors amb resultats notables en aquells àmbits on la manca de representativitat en els assajos clínics clàssics n'és més evident. Així doncs, cinc articles publicats conformen aquesta tesi Doctoral on la justificació i la discussió són els punts clau d'aquests treballs.



## 4. Prefaci

Actualment, desxifrar l'enigmàtic comportament del citomegalovirus humà (CMV) s'ha convertit en un autèntic repte per a la comunitat científica, per la necessitat de saber si existeix realment una relació etiològica o causal en el desenvolupament de diferents malalties inflamatòries.

Tal i com han fet palès diversos estudis, en el model murí s'ha observat que, un estat pro-inflamatori pot reactivar el CMV des de la seua latència, i són els pulmons el principal lloc de reactivació [Cook et al., 2003; Cook et al., 1998; Heinger et al., 2001; Jaber et al., 2005; Kutza et al., 1998; Limaye et al., 2008; von Müller et al., 2006].

S'han observat freqüents episodis d'infecció activa pel CMV en malats crítics sense immunosupressió canònica, especialment aquells amb sèpsia greu, atesos en la UCI, i s'han relacionat amb un major temps d'hospitalització i necessitat de ventilació mecànica, major incidència d'infeccions nosocomials i major mortalitat [Chiche et al., 2009; Domart et al., 1990; Papazian et al., 1996; von Müller et al., 2006; Ziemann et al., 2008].

És intrigant el fet que, presumptament, els pacients immunocompetents com els de la UCI, comunament desenvolupen episodis de reactivació sistèmica pel CMV, esdeveniment que poques vegades s'observa en persones sanes amb infecció latent pel CMV. No obstant això, poc se'n sap sobre la patobiologia d'aquest fenomen.

En l'última dècada, s'ha demostrat que la immunitat cel·lular juga un paper important en el control i prevenció de la replicació del CMV. S'ha vist com el CMV és capaç de manipular el cicle cel·lular, així com la resposta immune, i promoure la seua replicació i propagació dins de la cèl·lula hoste. L'habilitat del CMV per modular els components del sistema immunitari de l'hoste i la resposta a la infecció, molt probablement contribuïska a la patologia associada al virus [Castillo i Kowalik, 2004; Lenac et al., 2008].

D'entre les malalties cardiovasculars, la insuficiència cardíaca (IC) n'és d'interès. Malgrat les innovacions tecnològiques terapèutiques, la IC avançada segueix sent una malaltia amb taxes de morbiditat i mortalitat elevades i, encara que el paper de la inflamació no és tant rellevant com en la sèpsia o la leucèmia, la seua implicació es cada vegada més valorada per diferents autors, que no descarten la participació de diferents marcadors inflamatoris (MI) com factors de risc per a la iniciació i progressió de la malaltia [Borgia et al., 2001; Gredmark

---

et al., 2007; Prösch et al., 1995; Schlitt et al., 2005]. Uns exemples d'aquests MI són les citoquines pro-inflamatòries com ara, el TNF- $\alpha$  i la IL-6, amb possibles efectes perjudicials sobre la funció cardíaca [Torre-Amione, 2005; von Haehling et al., 2009; Yndestad et al., 2006], elements immunològics, proteïna C reactiva, proteïnes implicades en la coagulació, fins a altres tipus de molècules com els polisacàrids [Anker, S.D. i S. von Haehling, 2004]. En aquest context, estudis previs han suggerit la participació del CMV en processos d'aterosclerosi, re-estenosi després d'angioplàstia coronària i TVS [Söderberg-Nauclér, 2008].

Per tot açò, el pacient immunocompetent, centra la nostra atenció i, definir el paper del CMV com un cofactor per aquestes malalties inflamatòries; n'és la clau. Des del nostre punt de vista aquest nou perfil de pacient ha de predominar en els estudis futurs, ja que suposa per al professional un nou repte en el seu maneig clínic per 2 motius fonamentals: la relació del CMV amb la presència de malalties inflamatòries i la manca de representativitat en els assajos clínics clàssics. Aquestes dues necessitats, no cobertes fins ara, són objecte d'estudi del present treball de recerca.

## 5. Introducció

### 5.1. Citomegalovirus

#### 5.1.1. Generalitats

El citomegalovirus humà (CMV) membre de la subfamília *Betaherpesvirinae*, família *Herpesviridae*, anomenat també herpesvirus humà tipus 5, és un virus complex, considerat un dels majors virus que infecta l'espècie humana. Conegut i important patògen, es troba àmpliament distribuït, i estableix infeccions latents en totes les poblacions [Britt i Mach, 1996]. La primoinfecció esdevé durant la infantesa amb una incidència del 30 al 40% durant el primer any de vida i s'adquireix a través de teixits i tot tipus de fluids corporal [Britt i Alford, 1996; Grillner i Strangert, 1986; Onorato et al., 1985]. Presenta un DNA bicatenari de 180 a 200 nm, lleugerament pleomòrfic i un pes molecular d'aproximadament 250 kb. De dins cap a fora presenta: un nucli amb DNA víric i proteïnes associades, una càpside icosaèdrica de 162 capsòmers protèics, una matriu protèica i una envolta derivada de la membrana nuclear de les cèl·lules hospedadores. El lloc de síntesi de les subunitats és el nucli i l'ensamblatge de les partícules víriques; el citoplasma i el nucli. El cicle replicatiu d'aquest virus és un poc més llarg que el de la resta d'herpesvirus i presenta 3 tipus de gens ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) que s'expressen de forma seqüencial i originen proteïnes intermedies-precoces, precoces i tardanes, respectivament. Algunes proteïnes presenten característiques antigèniques que s'apliquen al diagnòstic com ara, la proteïna intermedia-primèria de 72 kD, IE1, o la fosfoproteïna pp65 [Castillo i Kowalik, 2004]. Només és capaç de desenvolupar-se en fibroblastos humans embrionaris i les lesions són lentes. Les cèl·lules infectades augmenten de tamany (citomegalia), s'arredoneixen i els primers focus de degeneració cel·lular s'observen als 8-10 dies després la infecció [Ho, 1991].

Cal considerar el CMV com un oportunista típic que només origina infeccions que cursen amb símptomes en casos molt concrets. Les manifestacions clíniques poden presentar-se de formes diverses, des de la infecció latent a l'extrema gravetat, tant en pacients sans com, més freqüentment, en immunodeprimits. Provoca major morbiditat i mortalitat en pacients trasplantats, si més no, la major part d'infeccions actives produïdes per CMV en el total de la

població, són asimptomàtiques o amb manifestacions molt inespecífiques. Per aquesta raó, les proves de laboratori són una peça clau en el seu diagnòstic.

### 5.1.2. Patogènia i immunitat

La infecció pel CMV pot produir-se per 3 vies diferents: infecció primària (congenita, intranatal o adquirida), reactivació d'una soca latent i/o reinfecció per una soca externa.

Durant la infecció primària, es produeixen anticossos IgG, IgM i IgA que per sí sols no confereixen protecció davant CMV. En el pacient immunocompetent, la resposta mediada per cèl·lules NK i sobretot, per Limfòcits T citotòxics, aconseguen el control [Bron et al., 1991]. Després, s'estableix un estat latent en les cèl·lules mieloides on, l'activació i diferenciació en macròfags permissius (a partir de monòcits estimulats per citocines com ara, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), sembla ser un procés immunomeditat que requereix la reactivació i replicació del virus [Gnann et al., 1988; Ibanez et al., 1991; Jarvis i Nelson, 2002; Pulliam et al., 1991, 1995; Sinzger et al., 1995, 1996; Taylor-Wiedeman et al., 1991].

En la fase de latència, s'assumeix que l'evasió immune té un impacte sobre la càrrega genòmica del CMV als òrgans infectats, i possiblement predisposa la reactivació i consegüentment, la recurrència. L'associació entre la càrrega viral i la recurrència s'ha demostrat en ratons [Reddehase et al., 1994; Steffens et al., 1998].

La reactivació del CMV esdevé a l'organisme quan el sistema immunitari es debilita, principalment com a conseqüència de la infecció per VIH i el tractament immunosupressor en receptors de trasplantament. Si més no, la reactivació a nivell cel·lular pareix ser molt comuna en individus immunocompetents i pot ocórrer sense detecció d'infecció activa per les tècniques convencionals de diagnòstic, ja que la inhibició de la disseminació viral s'aconsegueix a nivell local. Per tant, el curs natural de la reactivació és diferent en funció de l'individu i la seua situació clínica.

En el model animal, es detecten els primers passos de la reactivació de CMV sense immunosupressió *per se* en trasplantament al·logènics [Hummel et al., 2001]. Posteriorment, en el model humà, en pacients amb trasplantament renal s'ha pogut mostrar que la immunosupressió aïllada pre-trasplantament no estimulava el desenvolupament de la



recurrència del CMV i, la inflamació va ser regularment associada al desenvolupament d'una infecció activa com a conseqüència d'una reactivació [von Müller et al., 2006]. En aquesta línia, diversos autors han observat que la reactivació per depleció de cèl·lules T post-transplantament se segueix d'una replicació viral desrestringida i una elevada càrrega viral [Boeckh i Boivin G; 1998; Emery et al., 2000; von Müller et al., 2007]. Tanmateix, s'han detectat cèl·lules T reactives a CMV post-transplantament on, el desenvolupament de recurrències s'associa amb una càrrega viral més baixa i amb l'aclariment viral sense teràpia antiviral [Einsele et al., 2002; von Müller et al., 2006].

Altres estudis mostren que el començament de la infecció activa per CMV s'ha detectat en diferents temps després de transplantament o sèpsia, la qual cosa significa que el temps de reactivació es distingeix en ambdós grups: entre 1 i 3 mesos post-transplantament [Fishman, 2007] i les primeres 2 setmanes després de l'inici del xoc sèptic [von Müller et al., 2006]. Si més no, el mecanisme responsable de l'acceleració o desacceleració de la reactivació és, hui per hui, desconegut. Cal afegir en este punt que, la predisposició a la reactivació en el pulmó podria estar associada amb l'augment de cèl·lules infectades latents en aquest òrgan, tal i com es demostra en el model animal [Reddehase et al., 1994].

A més, cal destacar que CMV pot ser reactivat sota certs estímuls com, per exemple, una àmplia secreció de citoquines ('turmenta de citoquines'), tal i com es demostra en pacients amb i sense immunosupressió *per se* en situacions de sèpsia, i on, conjuntament, fenòmens d'hiper-inflamació (SIRS) i anti-inflamació (CARS), s'associen amb un elevat augment de la secreció de citoquines, les quals semblen ser responsables de la reactivació del CMV en aquests grups de pacients [Rennekampff i Hamprecht, 2006; von Müller et al., 2006].

Totes aquestes observacions que suggereixen que la infecció latent en macròfags de sang perifèrica pot ser activada per la resposta immune, amb la participació de les cèl·lules CD4+ i CD8+, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i potser, altres citoquines solubles, desperta interès i és clínicament rellevant en malalties inflamatòries com per exemple, cardiopaties, processos tumoral i autoimmunes que poden proporcionar un microambient afavoridor de la reactivació del virus que agreuja i sosté la inflamació existent.

## 5.2. CMV en el pacient crític

Malgrat la incontrovertible evidència que el CMV es reactiva en pacients immunocompetents davant processos crítics, queden per resoldre les conseqüències clíniques d'aquest fenomen. Les dades clíniques que tenim fins ara, demostren que la reactivació del CMV durant una procés crític, està associada a major morbiditat i mortalitat, fet que ens fa pensar en la inducció d'un compromís immunològic transitori. A més, el significatiu nombre de pacients immunocompetents que alberguen el virus latent, els transforma en pacients "de risc" per a la reactivació durant l'estat crític. Tanmateix, és probable una reactivació 'silent' en aquests individus, que faria pensar en un estat d'equilibri entre l'hoste i el virus.

Actualment la detecció de DNA viral és la tècnica més sensible, si més no, el preu és alt i requereix de la distinció entre malaltia per CMV i excreció viral, ja que aquest fenomen podria ocórrer en pacients immunocompetents en els quals, alguns episodis de la reactivació podrien ser significatius, mentre que d'altres serien trivials. De fet, la presència d'altres càrregues virals durant la reactivació s'han associat amb pitjor evolució clínica dels pacients afectats. [Limaye et al., 2008].

Si tractem de precisar la incidència actual de la reactivació, trobem diferents factors de confusió: el mètode de monitorització utilitzat, moment d'obtenció de la mostra i l'etiologia del procés crític. S'ha observat una incidència del 22 al 42% si només s'analitzen pacients seropositius per a CMV (IgG positiva) [Kalil i Foescu, 2009] i una subestimació de la reactivació si aquesta anàlisi es realitza molt aviat, ja que la reactivació normalment esdevé entre la primera i la tercera setmana de l'inici del procés crític [Cook et al., 2003, Limaye et al., 2008]. Per últim, s'ha vist que els pacients cremats i traumatològics presenten major risc de reactivació que el cardíacs o de l'UCI [Limaye et al., 2008].

Actualment, està obert el debat sobre la implicació del CMV en aquest context clínic. Actua realment aquest virus com un patògen o es tracta d'un epifenomen que només informa de l'estat immunològic del pacient? Ara per ara, hi ha suficients dades que suggereixen que la reactivació en pacients prèviament sans pot provocar conseqüències clíniques durant el procés crític. L'increment en la durada de ventilació mecànica [Cook et al., 2003; Heininger et al., 2001; Jaber et al., 2005; Ziemann et al., 2008], l'associació al SDRA

[Papazian et al., 2007] i una major estada a l'UCI en pacients crítics [Chiche et al., 2009; Domart et al., 1990]; en són exemples.

Hi ha la hipòtesi que els pulmons són un lloc primari i constant de reactivació [Cook et al., 2003]. Gràcies a les similituds genètiques i funcionals entre el CMV humà i el murí s'ha usat el model animal per estudiar el seu comportament [Baltesen et al., 1993, 1994; Hummel i Abecassis, 2002; Tanaka et al., 2007].

Per últim, cal assenyalar, que no totes les reactivacions en UCI podrien ser veritables reactivacions, és a dir, poden ser reinfeccions per una soca diferent del CMV. S'ha vist també, que les transfusions sanguínies transmeten el CMV probablement per mediació dels leucòcits que proporcionarien un estímul al·logènic que desencadenaria la reactivació [Söderberg-Nauclér et al., 1997]. En general, la immensa majoria de pacients en els quals s'ha documenta activitat antiviral, eren seropositius a l'inici i, encara que és possible que la positivitat per a IgG els faça més susceptibles per reinfectar-se, l'explicació més senzilla per a aquest fenomen és la reactivació del virus latent.

En aquesta línia, considerem que el nostre estudi pot ajudar a definir millor aquells pacients qui corren més risc d'una reactivació i un pitjor pronòstic.

### **5.3. CMV i les malalties inflamatòries cardiovasculars**

La síndrome clínica d'insuficiència cardíaca és la via final de la majoria de les malalties cardíques. En les últimes dècades els avanços en el coneixement de la fisiopatologia i el maneig farmacològic i no farmacològic d'aquesta síndrome han estat espectaculars [Jessup i Brozena, 2003; Dickstein et al., 2008]. No obstant això, la mortalitat i morbiditat associada a la ICC és molt elevada. En el nostre país el nombre de defuncions atribuïdes a la ICC es manté relativament estable però, la taxa de mortalitat ajustada per edat mostra un clar descens [Centro Nacional de Epidemiología].

En contraposició a aquestes dades, la taxa d'hospitalització per ICC ha augmentat en les últimes dècades i les hospitalitzacions per ICC reaguditzada s'han multiplicat per 3 [Rodríguez-Artalejo et al., 2004]. Segons dades de l'Institut Nacional d'Estadística, aquesta tendència ha estat similar en els últims anys malgrat els avanços en el tractament

[www.ine.es]. La reagudització de la ICC constitueix la primera causa d'ingrés hospitalari en pacients de més de 65 anys i suposa en alguns països el 20% de totes les hospitalitzacions en aquesta franja d'edat [Dickstein et al., 2008]. A part de l'impacte sobre el pacient, l'efecte de la reagudització de la malaltia és molt negatiu des d'un punt de vista econòmic: la ICC consumeix prop del 2% del pressupost sanitari en els països desenvolupats i el 70% de la despesa és deguda a l'hospitalització [Anguita et al., 2008; Stewart et al., 2002].

De forma congruent, els esforços que s'han realitzat per identificar i tractar els factors que prediuen l'hospitalització recurrent i l'avaluació de l'impacte dels nous tractaments, no només en termes de mortalitat, sinó també en termes d'hospitalització, han estat intensos [Dickstein et al., 2008]. En aquest sentit, l'ús dels IECA, d'ARA-II, betablocadors, antialdosterònics, l'ús de dispositius com el desfibril·lador implantable (DAI), la teràpia de resincronització (TRC), la realització d'altres tècniques quirúrgiques i la implantació d'equips multidisciplinaris per tractar la ICC han demostrat reduir la mortalitat, la taxa d'hospitalitzacions i millorar en alguns casos l'estat funcional dels pacients [Dickstein et al., 2008; Roccaforte et al., 2005].

El maneig intensiu d'aquesta síndrome i un millor treball en el camp de la prevenció cardiovascular ha comportat un augment de la supervivència. Aquests factors, juntament amb l'envelliment de la població, han tingut per conseqüència un augment de la prevalença de la IC en el nostre entorn [Rodríguez-Artalejo et al., 2004; Anguita et al., 2008]

### 5.3.1. Inflamació endotelial i CMV

Encara que el paper de la inflamació en la IC no és tan rellevant com en la sèpsia o la leucèmia, la seua implicació és cada vegada més valorada per diferents autors. Hui en dia, l'aterosclerosi es considerada una malaltia inflamatòria on, la majoria de T cèl·lules presents en les plaques ateroscleròtiques són CD4+ i les citoquines produïdes per aquestes cèl·lules poden exercir profunds efectes sobre altres cèl·lules localitzades dins del microambient de la placa com l'endoteli, les SMC i els macròfags [Hansson, 2005]. No obstant això, se'n sap ben poc sobre l'especificitat de les cèl·lules T en les plaques ateroscleròtiques i, si la naturalesa del antigen podria influir en el manteniment de la inflamació. CMV és un excel·lent candidat a això. Auto-antígens, com ara LDL-ox, Hsp60 i microorganismes infecciosos, com el CMV i *Chlamydia pneumoniae* (CP), el virus d'Epstein-Barr (VEB), el virus herpes símplex 1 i el VIH, s'han vist fortament implicats en el desenvolupament de malalties vasculares, que podrien

actuar sols i/o en combinació amb altres, per exercir efectes sinèrgics que contribuïren al desenvolupament de l'aterosclerosi [Zhu et al., 2000, 2001]. De fet, diversos estudis clínics han suggerit l'existència d'una correlació entre la seropositivitat per a CMV i la presència d'aterosclerosi, re-estenosi després d'angioplastia coronària i trombosi venosa superficial (TVS) [Blum et al., 1998; Hendrix et al., 1989; Hendrix et al., 1990, 1991; McDonald et al., 1989; Melnick et al., 1990; Melnick et al., 1993; Nieto et al., 1996; Speir et al., 1994; Streblov et al., 2001; Zhou et al., 1996; Zhu et al., 1999]. A més, s'han observat cèl·lules Ag-positives en regions de les aortes lesionades que semblen normals i en estries greixoses, però no en les plaques dins dels mateixos vasos, la qual cosa suggereix que l'expressió d'Ags del CMV s'associa amb els primers esdeveniments aterogènics a l'aorta humana [Pampou et al., 2000]. També s'ha trobat antigenèmia de CMV en pacients amb infart agut de miocardi, fenomen que reflecteix tant una infecció primària com la reactivació d'una infecció latent [Prösch et al., 2000].

La lesió de la cèl·lula endotelial es considerada el denominador comú inicial en el desenvolupament de diverses malalties vasculars. Tradicionalment, la disfunció endotelial s'ha pres en consideració davant estadis avançats de la IC però els avanços científics han demostrat que la disfunció del miocardi forma part de la fisiopatologia de la IC, implicada des de la seua aparició i afavorint el seu manteniment. En les proximitats de la inflamació, es produeixen una sèrie d'esdeveniments en resposta a les lesions de les cèl·lules endotelials (alliberament local de factors de creixement, quimiocines i citoquines) que culminen en la formació d'una placa fibrosa que més tard s'estabilitzarà i on, l'activació plaquetària promourà la formació d'un trombus que pot donar lloc a arteriotrombosi i patologia vascular aguda; processos que també poden ser influenciats per una infecció.

Per una banda, la infecció activa de les cèl·lules endotelials pel citomegalovirus, *in vitro*, s'associa amb la trombogènesi ja que condueix a activació i agregació plaquetària mitjançant l'alliberament del factor von Willebrand (FvW) per les cèl·lules infectades [Abgueguen et al., 2003; Rahbar et al., 2005], alhora que indueix la producció de RANTES, MCP-1, MIP-1a, IL-8 i fractalquina, els quals atrauen els leucòcits al lloc de la infecció [Bolovan-Fritts et al., 2004; Hirsch et al., 1999; Michelson et al., 1997; Murayama et al., 1997; Varani et al., 2005] i poden agreujar encara més la inflamació, així com contribuir a la propagació del virus dintre d'altres cèl·lules de la paret vascular, com per exemple les cèl·lules endotelials, SMCs, fibroblasts i macròfags.

---

Per altra banda s'ha observat que, davant la formació d'una estria grassa, la lesió inicial d'una placa ateroscleròtica, la infecció pel CMV *in vitro*, augmenta el consum de LDLox induït per l'expressió de SR-A i CD36 [Carlquist et al., 2004; Zhou et al., 1996; per tant, pot provocar i mantenir la inflamació a la paret vascular, fet que agreuja encara més el procés ateroscleròtic. En suport d'aquesta hipòtesi, la seropositivitat per a CMV, els nivells de proteïna C reactiva elevats en sèrum, i/o l'augment dels nivells sèrics d'IL-6, tots ells marcadors de la inflamació sistèmica, s'han proposat, sols i/o en combinació, com factors de risc de mortalitat en pacients amb processos cardíacs aguts [Blankenberg et al., 2001; Muhlestein et al., 2000; Zhu et al., 2000].

El possible paper del CMV en la promoció del desenvolupament de la malaltia vascular és recolzada pels resultats obtinguts a partir d'estudis amb animals d'experimentació [Berencsi et al., 1998; Bruggerman et al., 1999; Fabricant et al. 1978, 1983; Lemstrom et al., 1993; Zhou et al., 1999].

Amb tot el que hem comentat anteriorment, podem concloure que el CMV sembla infectar amb freqüència els teixits vasculars, però la rellevància clínica del virus en el desenvolupament de malalties vasculars necessita d'investigacions addicionals. Definir el seu paper com un cofactor per aquestes malalties és important, però difícil, ja que aquest procés patològic es desenvolupa durant diverses dècades abans que done lloc a símptomes clínics.

## 6. Justificació i objectius

El CMV desperta interès com a patògen en diferents tipus de malalties inflamatòries en absència d'immunosupressió canònica. S'ha vist que pacients immunocompetents, especialment aquells qui presenten sepsi severa, sovint experimenten episodis d'infecció activa pel CMV. Malgrat la disponibilitat d'informació que suggereix causalitat patogènica del CMV en aquest marc clínic, els assajos clínics controlats mitjançant l'ús de teràpia antiviral, en són ben pocs.

La motivació d'aquesta tesi, que es presenta com compendi de publicacions i està integrada per cinc treballs de recerca que es reproduïxen a continuació, és la necessitat de donar resposta a una qüestió fonamental emergent: si el CMV té cap paper en el desenvolupament i/o agravament de malalties inflamatòries o és merament un epifenòmen, aspecte que s'enfronta, a més, a una manca d'evidència respecte l'abordatge terapèutic de la infecció activa pel CMV en el pacient immunocompetent i en el maneig de la pròpia malaltia. En aquest sentit, en el primer dels treballs (Article primer) s'explora el curs natural de la infecció activa per CMV en una cohort de pacients crítics amb l'intenció d'observar el seu comportament i d'informar de la rellevància del virus en aquest àrea.

El segon dels treballs presentats (Article segon) du a terme una comparació entre el tracte respiratori inferior i el compartiment sistèmic, segons els resultats obtinguts en el primer treball, per tractar d'aclarir la interacció entre el CMV i el sistema immune. Varem estendre les nostres inquietuds al camp de la Cardiologia i iniciarem el tercer i quart treballs (Article tercer i quart) per ajudar a definir millor aquells pacients qui presenten un major perfil del risc i un pitjor pronòstic. Amb l'últim treball (Article cinquè) hem volgut saber a què s'enfronta el pacient pediàtric davant un context de similars característiques inflamatòries.

En conclusió, aquestes necessitats, no cobertes fins ara, són objecte d'estudi de la present tesi amb el qual pretenem aportar coneixements que puguen obrir el camí a noves estratègies de detecció, diagnòstic i seguiment dels pacients sense immunosupressió canònica en el context d'una malaltia inflamatòria. Cal assenyalar que la població estudiada ha sigut l'habitual en la pràctica clínica, sense inclusió de pacients participants en assajos clínics i, per tant, els resultats obtinguts són més fàcilment extrapolables a la resta de pacients que puguen presentar les mateixes característiques que aquests.





## 7. Resums del treballs publicats en compliment de l'article 7.2 del Reglament sobre dipòsit, avaluació i defensa de la tesi Doctoral

### Article primer

#### **Títol**

*Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1384- 91.*

#### **Objectiu**

Caracteritzar el curs natural de la infecció activa pel citomegalovirus (CMV) en una cohort de pacients quirúrgics i traumatològics en estat crític atesos en una UCI.

#### **Metodologia**

Estudi prospectiu i observacional que va incloure 53 pacients seropositius per a CMV sense immunosupressió canònica atesos en la unitat de cures intensives (UCI) del Hospital Clínic Universitari de València, durant un període de temps comprés entre novembre de 2008 i desembre de 2009. Els criteris d'inclusió comprenien: seropositivitat per a CMV en el moment de l'ingrés, estada en l'UCI superior a 5 dies, no presentar immunodeficiències congènites o adquirides conegudes, sense tractament antiretroviral durant els 10 dies previs i/o immunosupressor durant el mes anterior. Els pacients ingressaren a l'UCI després de cirurgies abdominals (n = 23), cardiovasculars (n = 18), traumatològiques (n = 7), neurològiques (n = 3), de coll (n = 1), i urinàries (n = 1). Tots ells van ser ventilats mecànicament. Les mostres de plasma (PL) i aspirats traqueals (AT) s'obtingueren setmanalment. La infecció activa per CMV es va definir com la presència de DNA de CMV en PL, AT o ambdós. La durada d'un episodi va ser aquella compresa entre el primer resultat positiu per PCR i el primer resultat negatiu per PCR tant en AT com en PL. El diagnòstic de sèpsia i xoc sèptic es va fer sobre la base de criteris de consens [Levy et al., 2003]. El diagnòstic de pneumònia associada a ventilació mecànica es va aconseguir seguint els

critèris publicats prèviament. Els anticossos IgG contra CMV van ser detectats per un immunoassaig comercial. La monitorització virològica amb periodicitat setmanal dels pacients inclogué la determinació quantitativa de DNA de CMV en AT (pacients ventilats) i PL. La càrrega viral de CMV va ser mesurada mitjançant una PCR en temps real. El límit de detecció de l'assaig (interval de confiança del 95%) és de ~25 còpies/mL de DNA de CMV. Les mostres amb càrregues virals de CMV inferiors a 25 còpies/mL van ser reanalitzades amb una alíquota diferent i es consideraren positives si conjuntament, d'elles s'obtenia un valor reproducible de la càrrega viral de CMV i els pacients dels quals es van obtenir, tenien una o més mostres obtingudes durant el seu seguiment, del mateix compartiment (AT o PL) amb un resultat major de 25 còpies/mL. Per a l'anàlisi de citocines plasmàtiques, els nivells de TNF- $\alpha$  en plasma es van mesurar amb l'ús d'un immunoassaig de captura comercial amb un límit de detecció d'aproximadament 3.0 pg/mL. Pel que fa a l'anàlisi immunològic, per a l'enumeració de limfòcits T CD8+ i CD4+ productors d'IFN- $\gamma$  pp65 i l'IE-1 CMV-específics (superposició de mescleres de pèptids 15-mer) es va usar la citometria de flux per a la tinció intracel·lular de citocines. La sang completa s'estimulà simultàniament amb dos jocs de pèptids superposats 15-mer que comprenen la seqüència de proteïnes de CMV pp65 i IE-1 (2 $\mu$ g/mL/pèptid), en presència d'1 mg/mL de coestimulador mAbs per a CD28 i CD49d. Les cèl·lules van ser analitzades en un citòmetre. Una resposta específica es va considerar >0.1%. Les dades van ser analitzades amb l'ajuda del paquet estadístic SPSS (versió 17.0). Les comparacions es van realitzar utilitzant el *Mann-Whitney U test* per a variables discontinues, el *Wilcoxon test* per variables contínues, i el *Fisher's exact test* per a les variables categòriques. El *Spearman rank test* es va utilitzar per a l'anàlisi de correlació entre les variables contínues. Un valor de  $p < 0,05$  va ser considerat estadísticament significatiu.

## Conclusions

L'anàlisi de mostres procedents del tracte respiratori inferior és crucial per a optimitzat del seguiment de la reactivació per CMV en el pacient crític, establir-ne un diagnòstic precoç i certificar amb solvència la resolució de l'episodi.

---

---

## Article segon

### Títol

*Immunological insights into the pathogenesis of active CMV infection in non-immunosuppressed critically ill patients. Blanquer J, Chilet M, Benet I, Aguilar G, Muñoz-Cobo B, Tellez A, Costa E, Bravo D, Navarro D. J Med Virol 2011; 83: 1966- 71.*

### Objectiu

Observar les característiques virològiques i immunològiques de la infecció activa pel citomegalovirus (CMV) en una cohort de pacients crítics atesos en l'UCI en el context d'un estat pro-inflamatori sistèmic.

### Metodologia

Estudi prospectiu i observacional que inclogué 1 pacient seropositiu per a CMV prèviament sa, atès primerament en el Servei d'urgències mèdiques (UMED) amb diagnòstic presumptiu d'hemorràgia alveolar difusa i, un grup de 6 pacients seropositius per a CMV atesos en l'UCI amb infecció activa per CMV sense immunosupressió canònica. Per al primer pacient, es van dur a terme estudis d'hemograma, coagulació i bioquímica standard, gasometria arterial i TAC, proves de detecció ràpida d'antigen urinari per a *Legionella pneumophila* serogrup 1 i *Streptococcus pneumoniae*, detecció de RNA del virus de la grip, inclosa la pandèmia del virus H1N1 2009 per PCR en temps real i detecció de VIH amb un assaig de quarta generació. Es va iniciar tractament empíric intravenós amb ceftriaxona (2 g/24 h), levofloxací (500 mg/24 h) i gentamicina (80 mg/una dosi). L'empitjorament de la funció respiratòria va requerir l'ingrés a l'UCI i l'aplicació de ventilació no invasiva amb pressió positiva. Es va establir un diagnòstic presumptiu d'hemorràgia alveolar difusa, i es va iniciar tractament amb plasmafèresi. El pacient va rebre impulsos d'altas dosis de corticosteroides (1 g/24 h) durant un període de cinc dies. La teràpia amb esteroides es va administrar al pacient en una dosi de manteniment (20-40 mg/dia) fins al dia 36. Sis dies després de l'ingrés, el pacient va ser sotmès a una fibrobroncoscòpia. Es van realitzar cultius bacterians i detecció de *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* per PCR de mostres respiratòries (broncoaspirats i llavats broncoalveolars) i citologia bronquial. La càrrega viral de CMV es detectà mitjançant una qPCR en temps real capaç de quantificar les càrregues de DNA de CMV de forma fiable en més de 10 còpies/mL amb 500 mL de plasma i

aspirats traqueals o llavats broncoalveolars pretractats amb ditiotreitòl. Quan les mostres utilitzades van ser llavats broncoalveolars, el volum de fluid de recobriment epitelial es va calcular utilitzant la urea com un marcador de dilució. Per a l'anàlisi immunològica, els nivells d'IL-6 en mostres respiratòries i en plasma es van mesurar amb l'ús d'un immunoassaig de captura comercial. Els espècimens d'aspirats traqueals (pretractats amb 0,1% ditiotreitòl) es van agitar i centrifugar a 1.500 rpm/min durant 5 minuts. Els sobrenadants de cèl·lules es va emmagatzemar a -80 °C fins al seu ús en l'assaig. Per a les mostres de llavat broncoalveolar, el volum de revestiment líquid epitelial es va calcular utilitzant la urea com un marcador de dilució. El límit de detecció de l'assaig és de 2 pg/mL. Les mostres amb valors de citoquines per damunt del límit superior de la quantificació de l'assaig es van diluir convenientment i es tornaren a analitzar. Les cèl·lules T CMV-específiques d'IFN- $\gamma$  en les mostres de sang obtingudes de forma seqüencial durant aquest primer episodi d'infecció activa per CMV (n = 4) es van quantificar per citometria de flux amb la tinció intracel·lular de citoquines. La sang sencera va ser estimulada simultàniament amb dos jocs de pèptids superposats 15-mer que comprenen les seqüències de proteïnes pp65 i IE-1 de CMV (1  $\mu$ g/mL/pèptid) i les cèl·lules es van analitzar amb un citòmetre de flux. Respostes >0,1% van ser considerades específiques. Els nivells d'IL-10 es van mesurar en les mostres del tracte respiratori inferior i en plasma que figuren anteriorment per a IL-6, utilitzant un kit comercial. Límit de detecció 2 pg/mL.

Per al grup de 6 pacients, cal aclarir que l'ingrés d'aquests a l'UCI va esdevenir per presentar sèpsia severa o xoc sèptic després d'una cirurgia abdominal (n = 2) o cardiovascular (n = 1) o, per dificultat respiratòria després d'una pneumònia nosocomial (després de la cirurgia cardiovascular) (n = 3). Tots els pacients van ser ventilats mecànicament i no reberen altes dosis de corticoides (>2 mg/kg/dia) durant l'hospitalització. Cap d'aquests pacients van ser tractats amb antivirals durant la seva estada a l'UCI. La metodologia per a l'extracció de DNA de CMV, l'obtenció de la càrrega viral de CMV i la detecció de l'IL-10 va ser idèntica a la que es descriu anteriorment per a l'estudi del primer pacient.

## Conclusions

La presència de nivells més alts d'IL-10 en el tracte respiratori inferior respecte del plasma, pot donar lloc al deteriorament creixent de la resposta efectora de cèl·lules T CMV-específiques al pulmó, en comparació amb el compartiment sistèmic, i facilitar la replicació local de CMV.

## Article tercer

### Títol

*Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. Núñez J, Chilet M, Sanchis J, Bodí V, Núñez E, Miñana G, Tormo N, Clari MA, Pellicer M, Chorro FJ, Llàcer, Navarro D. Clin Sci (Lond). 2010; 119: 443-52.*

### Objectiu

Determinar en una cohort de pacients amb insuficiència cardíaca aguda (ICA): (i) la prevalença de la infecció per CMV, (ii) si la infecció activa per CMV s'associa a curt termini, amb un major risc de mortalitat per totes les causes, o reingrés per ICA, i (iii) si els pacients amb una infecció activa per CMV tenen unes taxes més altes de dies d'hospitalització per setmana de seguiment.

### Metodologia

Van ser inclosos un total de 132 pacients ingressats en el Servei de Cardiologia de l'1 novembre 2008 al 19 maig 2009 amb el diagnòstic d'insuficiència cardíaca aguda (ICA). El diagnòstic d'ICA es defineix com la ràpida aparició de símptomes i signes secundaris a alteració de la funció cardíaca i la presència d'evidència objectiva d'anormalitat estructural o funcional del cor en repòs (cardiomegàlia, tercer soroll cardíac, buf cardíac, alteracions en l'ecocardiograma o elevació dels nivells de peptid natriurètic), seguint les directrius actuals i establertes per un cardiòleg. Els criteris d'exclusió van incloure: infeccions conegudes o sospitades, una malaltia inflamatòria sistèmica diferent d'insuficiència cardíaca, immunodeficiència, malaltia renal terminal sotmesa a diàlisi, càncer, transfusió de sang dins de 30 dies, i la necessitat de ventilació mecànica abans de prendre mostres de sang. La informació demogràfica, la història clínica, els signes vitals, l'ECG de 12 derivacions, les dades de laboratori i la utilització de medicaments es van determinar de forma rutinària en el Servei d'Urgències i durant l'estada hospitalària després de qüestionaris de registre pre-establerts. La fracció d'ejecció del ventricle esquerre (FEVE) es va avaluar mitjançant l'ecocardiografia bidimensional en tots els pacients durant l'hospitalització inicial. Tots els pacients van rebre tractament amb furosemida, almenys durant les primeres 48 h de l'ingrés. El tractament amb IECA, ARA II, bloquejadors  $\beta$ , un antagonista de l'aldosterona,

anticoagulants i altres estratègies terapèutiques va ser individualitzat seguint les normes establertes.

El seguiment dels pacients es va discontinuar si esdevenia la mort, o després d'haver estat sotmesos a trasplantament cardíac o una cirurgia cardíaca de reemplaçament valvular. La variable que combina la mortalitat per totes les causes i la readmissió per ICA va ser seleccionada com el principal objectiu clínic. Com a criteri de valoració secundari, es va comparar la taxa d'incidència acumulada de dies d'hospitalització per setmana de seguiment entre aquells amb i sense DNAèmia per CMV. Els anticossos IgG i IgM contra el CMV es van detectar mitjançant un immunoassaig comercial. La càrrega viral de CMV es va determinar mitjançant PCR quantitativa en temps real amb 500 µl de plasma. El límit informat de detecció de l'assaig [interval de confiança del 95% és de 25 còpies/mL. Les mostres amb càrregues virals de CMV inferior a 25 còpies/mL van ser analitzades de nou utilitzant una alíquota diferent i es va considerar positiva si es produïa un valor de càrrega viral de CMV reproducible. Els mesuraments van ser realitzats per un tècnic que desconeixia el diagnòstic del pacient i la seua evolució. Els nivells plasmàtics de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-10 van ser quantificats per ELISA utilitzant kits comercials. La sensibilitat segons el fabricant es de 3,0 pg/mL per a TNF- $\alpha$ , 4,0 pg/mL per a IL-1 $\beta$ , 2 pg/mL per a IL-6, i 2,0 pg/mL per a IL-10.

Les variables contínues són expressades com mitjana (IQR). Les variables categòriques es presenten com a números (percentatges). Les característiques basals van ser comparades entre els pacients amb i sense DNAèmia per CMV. La DNAèmia per CMV es va classificar per la presència de >25 còpies/mL,  $\leq$ 25 còpies/mL o resultats negatius (no es va detectar DNA de CMV). La combinació de taxes de mortalitat/rehospitalització per ICA va ser representada per l'estat de DNAèmia per CMV utilitzant el mètode de *Kaplan-Meier*, i les seves diferències es van analitzar mitjançant el *Peto-Peto Prentice test*. L'associació independent entre les categories de DNAèmia per CMV i el resultat principal, es va avaluar mitjançant anàlisi de regressió de *Cox*. Les covariables candidates pel model multivariable inicial van incloure totes les variables que figuren a la Taula 1, incloent citoquines. A continuació, es va derivar un model reduït i par si i moni ós mitjançant el *Royston and Altman model-selection algorithm*. El model de *Cox* inclogué les següents covariables: admissió prèvia per insuficiència cardíaca aguda, pressió arterial sistòlica en el moment de l'admissió (en mmHg), índex de comorbiditat de *Charlson*, sodi sèric (mmol/l), concentracions de NT-proBNP (pg/mL) i CA125 sèric. El supòsit de proporcionalitat per la funció de risc en el temps es va detectar mitjançant els *Schoenfeld's residuals*. La capacitat de discriminació del model es va avaluar amb l'ús del *Harrell's C-statistic* mentre que per al seu calibratge es va usar el *Gronnesby and*

---

---

*Borgan test.* Per a l'anàlisi secundari, la regressió binomial negativa es va utilitzar per determinar la IRR de dies de pacient hospitalitzat per setmana de seguiment d'acord amb l'estat de DNAèmia per CMV. Els predictors independents inclosos en aquest model van ser: l'edat, el tabaquisme, l'última classificació NYHA mesurada en condicions estables, l'ingrés previ per insuficiència cardíaca aguda, la malaltia valvular cardíaca, l'anèmia, el recompte de limfòcits, la relació de CA125, l'àcid úric, el TNF- $\alpha$ , la FEVE i el tractament amb furosemida, espironolactona, estatines i el suport inotròpic.

### **Conclusions**

La infecció activa per CMV ocorre, encara que rarament, en pacients amb insuficiència cardíaca aguda, i pot ser un marcador de gravetat de la malaltia.





## Article quart

### Títol

*Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction. Núñez J, Chilet M, Blasco ML, Clari MA, Sanjuan R, Muñoz-Cobo B, Bodí V, Costa E, Bravo D, Sanchis J, Miñana G, Navarro D. Atherosclerosis 2012; 222: 295-7.*

### Objectiu

Determinar la incidència precoç de la infecció activa pel citomegalovirus (CMV) després d'un infart agut de miocardi (IAM).

### Metodologia

A l'estudi es van incloure 86 pacients seropositius per a CMV ingressats a la Unitat coronària de l'Hospital Clínic Universitari de València entre el 14 de gener i el 2 de juliol de 2010 amb el diagnòstic d'IAM, seguint les directrius actuals, incloent 38 pacients amb IAM sense elevació del segment ST (NO-STEMI) i 48 amb IAM amb elevació del segment ST (STEMI). Se'ls va fer un seguiment de DNA de CMV en plasma mitjançant PCR en temps real, durant els 3 dies posteriors a un IAM. En el moment de l'ingrés es van obtenir una detallada història clínica, signes vitals, electrocardiograma de 12 derivacions, i anàlisis de laboratori de rutina. La Troponina-I es va mesurar a l'ingrés i en sèrie, cada 8-12 hores durant les primeres 24 hores. Tots els pacients van ser inicialment ingressats a la Unitat de cures intensives i tractats farmacològicament d'acord amb les directrius actuals. L'angiografia coronària es va realitzar durant la primera hospitalització en el 90,7% de la mostra a una mitjana de  $96 \pm 48$  hores després de l'ingrés del pacient. La FEVE es va avaluar amb l'ecocardiografia bidimensional en tots els pacients durant l'hospitalització inicial. La indicació de revascularització es va basar en els resultats angiogràfics. L'estat serològic de CMV dels pacients es va analitzar mitjançant kits comercials. La càrrega viral de CMV en plasma es va quantificar per PCR en temps real amb 500µl de mostra. La càrrega viral de CMV es va normalitzar a UI/mL mitjançant l'ús de la primera norma internacional de l'OMS per al CMV basat en els assajos d'amplificació d'àcids nucleics (NAT). Els nivells plasmàtics d'IL-6 van ser quantificats per ELISA utilitzant un kit disponible comercialment. La infecció activa per CMV es defineix per la presència de qualsevol nivell de DNA de CMV en el plasma. Les variables contínues es van expressar mitjana (IQR) i les variables discretes es presenten com a

---

---

percentatges. Les característiques basals van ser comparades entre els pacients amb i sense infecció per CMV utilitzant el *Fisher exact test* i el *Mann-Whitney U test*.

### **Conclusions**

Les dades que presentem estan en contra d'una implicació constant de CMV en el desencadenament de la incidència d'IAM, si més no, estan a favor de la idea que la replicació del CMV a nivell sistèmic pot agreujar el pronòstic clínic d'STEMI.

## Article cinquè

### Títol

*Frequent detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in the lower respiratory tract in CMV-seropositive pediatric patients with underlying chronic bronchopulmonary diseases lacking canonical immunosuppression. Escribano A, Chilet M, Clari MA, Lucas R, Costa E, Bravo D, Muñoz-Cobo B, Borrás R, Navarro D. J Med Virol 2013; 85: 888-92.*

### Objectiu

Investigar la freqüència d'infecció activa pel citomegalovirus (CMV) en pacients pediàtrics amb malalties broncopulmonars cròniques o recurrents en què la inflamació juga un paper principal potencialment patogènic.

### Metodologia

Van ser analitzades un total de 42 mostres del TRI i 11 parelles de PL de 42 nens atesos a la Unitat de Pneumologia de l'Hospital Clínic Universitari de València. Els pacients tenien història prèvia de símptomes crònics/recurrents del TRI i/o presència d'alteracions radiològiques persistents/recurrents. Es van realitzar fibrobroncoscòpies entre maig de 2009 i juliol de 2011, ja fóra per al diagnòstic primari, per al diagnòstic de reavaluació en els pacients que van respondre insatisfactòriament a les teràpies convencionals, com un procediment de diagnòstic complementari o per avaluar l'eradicació de *Pseudomonas aeruginosa* en pacients amb Fibrosi Quística amb cultius d'esput negatius després d'un any amb teràpia antibiòtica, segons els protocols locals. Cap dels pacients presentava signes o símptomes respiratoris del TRI i/o TRS en el moment de la fibrobroncòpia. Ningun pacient presentava una causa coneguda d'immunosupressió. Les mostres del TRI es van processar utilitzant cultius bacterians i fúngics convencionals quantitativs. La identificació microbiana es va dur a terme mitjançant procediments convencionals. En alguns pacients també es va realitzar la detecció molecular dels virus respiratoris, poc després de la fibrobroncoscòpia. Els llavats broncoalveolars i aspirats bronquials o traqueals tractats prèviament amb 0,1% ditiotreitòl (en una proporció de 2 mL per cada 1 g de broncoaspirat) es van agitar i centrifugar a 462 g durant 5 minuts a 4°C per sedimentar les cèl·lules. Els sobrenedants cel·lulars es van emmagatzemar a -20 °C i es van recuperar per a posteriors anàlisis moleculars i mesurament de citoquines. Per poder avaluar l'estat serològic de CMV disposarem de mostres de sèrum de

26 pacients. Aquestes mostres es van obtenir abans de, o en el moment de la fibrobroncoscòpia. Els sèrums van ser congelats a -20 °C i recuperats per a les proves serològiques. Les IgGs de CMV es van detectar utilitzant un immunoassaig comercial. La càrrega de DNA de CMV es va quantificar per PCR a temps real amb un assaig capaç de quantificar de manera fiable les càrregues de DNA de CMV >10 còpies/mL. Les extraccions de DNA es van realitzar a partir d'un volum de 500 µL (PL o mostres del TRI). La detecció i quantificació de l'HHV-6 i l'HHV-7 es va realitzar en mostres respiratòries mitjançant una PCR a temps real. El límit de detecció d'aquests assajos és d'aproximadament 25 còpies/mL. La detecció de virus respiratoris es va realitzar mitjançant PCR múltiple per a: virus influença A, els subtipus H1, H3 o H5, virus influença B; VRS A i B; VPI 1, 2, 3, i 4, adenovirus, metapneumovirus humà; coronavirus 229E, NL63, OC43, i HKU1; enterovirus/rinovirus, i bocavirus humà. Es va utilitzar un immunoassaig de captura comercial per quantificar l'IL-6 en les mostres respiratòries. Per a les mostres de llavat broncoalveolar, el volum líquid de revestiment epitelial es va calcular utilitzant la urea com a marcador de dilució. Les dades van ser analitzades amb l'ajuda del paquet estadístic SPSS, versió 17.0. Les comparacions es van realitzar mitjançant el  $\chi^2$  test per les variables categòriques i el *Mann-Whitney U test* no paramètric per a dades independents. Es van presentar valors exactes de *P* en ambdós anàlisis. Un valor de *p* <0,05 va ser considerat estadísticament significatiu.

## Conclusions

Les dades obtingudes van indicar que la presència de DNA de CMV és un esdeveniment relativament freqüent en nens amb malalties broncopulmonars cròniques o recurrents. Altres estudis prospectius observacionals són necessaris per avaluar l'impacte d'aquest fenomen en el curs clínic d'aquests pacients.

## 8. Articles originals

Per ordre de publicació, els articles compendiats en aquesta tesi Doctoral són el següents:

### Article primer

*Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1384-91.*

### Article segon

*Immunological insights into the pathogenesis of active CMV infection in non-immunosuppressed critically ill patients. Blanquer J, Chilet M, Benet I, Aguilar G, Muñoz-Cobo B, Tellez A, Costa E, Bravo D, Navarro D. J Med Virol 2011; 83: 1966-71.*

### Article tercer

*Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. Núñez J, Chilet M, Sanchis J, Bodí V, Núñez E, Miñana G, Tormo N, Clari MA, Pellicer M, Chorro FJ, Llàcer, Navarro D. Clin Sci (Lond). 2010; 119: 443-52.*

### Article quart

*Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction. Núñez J, Chilet M, Blasco ML, Clari MA, Sanjuan R, Muñoz-Cobo B, Bodí V, Costa E, Bravo D, Sanchis J, Miñana G, Navarro D. Atherosclerosis 2012; 222: 295-7.*

---

---

## Article cinquè

*Frequent detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in the lower respiratory tract in CMV-seropositive pediatric patients with underlying chronic bronchopulmonary diseases lacking canonical immunosuppression. Escribano A, Chilet M, Clari MA, Lucas R, Costa E, Bravo D, Muñoz-Cobo B, Borrás R, Navarro D. J Med Virol 2013; 85: 888-92.*

---

---

## 8.1. Article primer

*Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1384-91.*





# Virological and Immunological Features of Active Cytomegalovirus Infection in Nonimmunosuppressed Patients in a Surgical and Trauma Intensive Care Unit

Marifina Chilet,<sup>1</sup> Gerardo Aguilar,<sup>2</sup> Isabel Benet,<sup>3</sup> Javier Belda,<sup>2</sup> Nuria Tormo,<sup>4</sup> José Antonio Carbonell,<sup>2</sup> María Ángeles Clari,<sup>1</sup> Elisa Costa,<sup>1</sup> and David Navarro<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Anesthesiology and Critical Care Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Hematology and Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Cytomegalovirus (CMV) reactivation occurs frequently in critically ill patients. The natural course of CMV infection and the interaction between CMV and the adaptive immune system in this setting remain poorly defined. Fifty-three CMV-seropositive patients in a surgical and trauma intensive care unit were included in this study. The CMV DNA load in tracheal aspirates (TA) and plasma (PL) was monitored by qPCR. CMV-specific T-cell immunity was assessed by intracellular cytokine staining. Plasma TNF- $\alpha$  levels were determined by ELISA. CMV reactivation occurred in 39.7% of patients (23% had CMV DNA detected only in TA). The analysis of TA allowed an earlier diagnosis in 28% of patients. Clearance of CMV DNAemia preceded that of CMV DNA in TA in some episodes. Peak CMV DNA levels were significantly higher in TA than in PL ( $P=0.02$ ). CMV reactivation developed in the presence of CMV-specific T cells. Termination of CMV reactivation was associated with an expansion of functional CMV-specific T cells. Plasma levels of TNF- $\alpha$  did not allow for the prediction of the occurrence of CMV reactivation. CMV-specific T-cell immunity is preserved in most critically ill patients experiencing CMV reactivation. Analysis of respiratory specimens is imperative for an optimal monitoring of CMV reactivation in this setting. *J. Med. Virol.* **82:1384–1391, 2010.** © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** cytomegalovirus; critically ill patients; T-cell immunity; TNF- $\alpha$ ; CMV DNA load

## INTRODUCTION

Critically ill patients without canonical immunosuppression, especially those with severe sepsis, frequently experience episodes of active cytomegalovirus (CMV) infection during their stay in intensive care units (ICUs), which have been associated with prolonged hospitalization, longer duration of mechanical ventilation and higher rates of nosocomial infections, and overall mortality [Kalil and Florescu, 2009; Osawa and Singh, 2009]. Interestingly, only in a few cases have consistent clinical and histopathological evidences of CMV end-organ disease been provided [Papazian et al., 1996; Chiche et al., 2009]. Despite the availability of solid data suggesting a pathogenetic role of CMV in critically ill patients, definitive proof of causality awaits a controlled clinical trial of CMV-specific antiviral therapy [Cook, 2007; Cohen, 2009; Griffiths, 2010]. Little is known about the natural history and the pathobiology of active CMV infection in nonimmunosuppressed critically ill patients. Data obtained in the murine CMV (mCMV) model indicate that a pro-inflammatory state driven by stimuli of a diverse nature (i.e., sepsis or intra-abdominal bacterial infection) triggers CMV reactivation in the lungs of latently infected mice, which ultimately results in pulmonary

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

\*Correspondence to: Prof. David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Accepted 28 March 2010

DOI 10.1002/jmv.21825

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

fibrosis [Cook et al., 2002, 2006a,b; Forster et al., 2009]. Resident lung mCMV-specific T cells may contribute to pulmonary injury upon activation by local CMV replication by releasing fibrogenic cytokines such as TNF- $\alpha$  [Forster et al., 2009]. In this model, mCMV reactivation and subsequent lung damage was prevented by the prophylactic administration of ganciclovir [Forster et al., 2009].

Studies on severely immunocompromised patients clearly demonstrated that T-cell immunity is crucial in the control of CMV replication [Solano et al., 2008; Crough and Khanna, 2009; Tormo et al., 2009]. It is intriguing why presumptively immunocompetent patients, such as those in ICUs, commonly develop episodes of systemic CMV reactivation, a phenomenon rarely observed in healthy individuals latently infected by CMV. Available data on this issue are scarce. In a recent study, Von Müller et al. [2007] and Von Müller and Mertens [2008] showed that active CMV infection occurred in patients with septic shock despite the presence of peripheral functional CMV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. The kinetics of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in these patients was not investigated.

This study was aimed at characterizing the natural course of active CMV infection and at investigating the interaction between the immune system and CMV in a cohort of critically ill patients in a surgical and trauma ICU. With the prospect of an upcoming clinical trial of antiviral therapy [Cook, 2007; Cohen, 2009; Griffiths, 2010], the data presented herein may help to establish the optimal strategy for monitoring active CMV infection in this clinical setting.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

This prospective observational study was conducted at the Anesthesiological ICU of the Hospital Clínico Universitario of Valencia during the period of November 2008 to December 2009. Inclusion criteria included CMV-seropositivity at admission, ICU stay longer than 5 days, lack of use of antiviral agents with intrinsic activity against CMV within the last 10 days, no known cause of congenital or acquired immunodeficiency, and no previous treatment (within 1 month) with immunosuppressive drugs. Fifty-nine patients were initially enrolled in the study. Six of these patients were later excluded for analysis as they did not fulfill inclusion criteria (short ICU stay), so finally the cohort included 53 patients. Admission to the ICU followed abdominal (n = 23), cardiovascular (n = 18), trauma (n = 7), neurological (n = 3), neck (n = 1), or urinary (n = 1) surgery. No patient received corticosteroids at high doses (>2 mg/kg/day) during ICU stay. Patients were followed-up from admission (day 0) until their discharge from the ICU or their death. All patients were mechanically ventilated. CMV-specific therapy was not administered to any patient. Plasma (PL) and tracheal aspirates (TA) for virological monitoring were obtained once a week. The study was conducted in accordance with the

Helsinki Declaration. Informed consent was provided by patients or their relatives.

### Definitions

An episode of active CMV infection was defined by the presence of CMV DNA either in PL, TA, or both. The duration of a given episode was that comprised between the first positive PCR result and the first concurrent negative PCR result in both TA and PL. Diagnosis of sepsis and septic shock was made on the basis of consensus criteria [Levy et al., 2003]. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia was achieved following previously published criteria [Chiche et al., 2009].

### CMV Assays

IgG antibodies against CMV were detected by a commercial immunoassay (Architect CMV IgG assay; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL). CMV DNA load was measured by real-time PCR with the Abbott CMV PCR kit (produced by Qiagen GmbH, Hilden, Germany, for Abbott Diagnostics), as previously described [Gimeno et al., 2008]. DNA extractions (from 500  $\mu$ l of PL or dithithreitol pre-treated TA) were performed using the Abbott mSample preparation system DNA kit on the m2000 SP instrument (Abbott Molecular). The limit of detection of the assay (95% CI) according to the manufacturer is  $\sim$ 25 CMV DNA copies/ml. The assay is, however, able to quantify CMV DNA loads of between 10 and 25 copies/ml (Navarro D, unpublished observation). Specimens with CMV DNA loads <25 copies/ml were reassayed using a different aliquot and were regarded as positive if both they yielded a reproducible CMV DNA load value and the patient from whom they were obtained had one or more follow-up specimens from the same compartment (TA or PL) yielding a CMV DNA load >25 copies/ml.

### Plasma Cytokines Analysis

Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) were measured using a commercial capture immunoassay (Human TNF- $\alpha$  ELISA Ready-set Go!—eBiosciences, Inc., San Diego, CA) following the instructions of the manufacturer. The limit of detection of the assay is approximately 3.0 pg/ml.

### Immunological Analysis

Enumeration of pp65 and IE-1 (15-mer overlapping peptide mixes) CMV-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes was carried out using flow cytometry for intracellular cytokine staining (ICS; BD Fastimmune; BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA), as described previously [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2009]. Whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (2  $\mu$ g/ml/peptide), obtained from JPT peptide Technologies (GmbH, Berlin, Germany), in the presence of 1  $\mu$ g/ml of costimulatory

mAbs to CD28 and CD49d. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems). Specific responses were considered those >0.1%.

### Statistical Analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 17.0). Comparisons were carried out using the nonparametric Mann–Whitney *U*-test for unpaired continuous data, the Wilcoxon test for paired continuous data, and the Fisher's exact test for categorical variables. The Spearman rank test was used for analysis of correlation between continuous variables. A *P*-value (two-tailed) <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Incidence and Virological Features of Active CMV Infection

A total of 204 samples (99 TA and 105 PL specimens) from 53 patients were screened for the presence of CMV DNA. Forty-two TA (42%) and 31 PL (29%) tested positive. Out of the 53 patients, 21 (39.7%) experienced an episode of active CMV infection during ICU stay. Clinical and demographic data of patients either with or without active CMV infection are shown in Table I. CMV DNA was detected in both TA and PL in 14 patients. In four of these patients, detection of CMV DNA in TA preceded that in PL by a median of 7 days. In the remaining 10 patients, CMV DNA was detected concurrently in both type of specimens. In five patients CMV DNA was detected in TA without concomitant or subsequent detection of CMV DNA in PL. Plasma CMV DNAemia was also detected in two patients for whom TA were not available for analysis.

Virological data of active CMV infection episodes are shown in Table II. Overall, median time to first detection of active CMV infection after admission was 12 days (range, 0–34 days). A trend for an earlier detection of CMV DNA in TA in comparison with that in PL was observed. Resolution of active CMV infection was documented in 10 out of the 21 episodes in the absence of antiviral treatment (median duration of the episodes 22 days; range, 5–35 days). In the remaining 11 episodes CMV DNA was still detectable either in TA, PL, or both at the time of the discharge of the patients from ICU (*n* = 2) or their death (*n* = 9). Clearance of CMV DNAemia preceded that of CMV DNA in TA in three out of seven the resolved episodes in which CMV DNA was eventually detected in both PL and TA.

Overall, CMV DNA load in TA and PL correlated significantly ( $\sigma = 0.563$ ; *P* = 0.003); However, the presence of high CMV DNA loads in TA (>1,000 copies/ml) in the face of either low or undetectable levels of plasma CMV DNAemia was observed in some patients during the follow-up. Initial and peak CMV DNA levels during episodes of active CMV infection were significantly higher in TA than in PL (Fig. 1). Peak CMV DNA loads in TA or PL from patients who died were not significantly different from those measured in patients who survived.

### Plasma TNF- $\alpha$ Levels

TNF- $\alpha$  has been shown to be a key mediator of CMV reactivation in the mCMV model [Cook et al., 2002, 2006a; Forster et al., 2009]. We quantified plasma levels of this cytokine in patients with and without active CMV infection. The results are shown in Table III. High plasma TNF- $\alpha$  levels were found in all patients, especially in those with severe sepsis or septic shock (not shown). The median plasma TNF- $\alpha$  levels measured in patients without an active CMV infection (*n* = 30) shortly after ICU admission (median of 3 days) were

TABLE I. Characteristics of Patients in a Surgical and Trauma Intensive Care Unit (ICU) With or Without an Active Cytomegalovirus (CMV) Infection

| Variable                              | Active CMV infection |              | <i>P</i> -value   |
|---------------------------------------|----------------------|--------------|-------------------|
|                                       | With                 | Without      |                   |
| Patients, no.                         | 21                   | 32           |                   |
| Age, years                            | 67 (39–84)           | 68.5 (37–88) | 0.92 <sup>a</sup> |
| Sex, male/female, no.                 | 14/7                 | 23/9         | 0.76 <sup>b</sup> |
| Clinical condition <sup>c</sup> , no. |                      |              |                   |
| Severe sepsis                         | 9                    | 17           | 0.57 <sup>b</sup> |
| VAP                                   | 4                    | 3            | 0.67 <sup>b</sup> |
| Septic shock                          | 1                    | 3            | 0.53 <sup>b</sup> |
| Septic shock and VAP                  | 3                    | 1            | 0.28 <sup>b</sup> |
| Severe sepsis and VAP                 | —                    | 2            | ND                |
| Fever (Catheter-related)              | 2                    | 6            | 0.45 <sup>b</sup> |
| Cardiogenic shock                     | 2                    | —            | ND                |
| ICU stay after admission, days        | 37 (5–100)           | 11 (5–40)    | 0.01 <sup>b</sup> |
| Mortality rate, no.(%)                | 13 (61%)             | 15 (46%)     | 0.40 <sup>a</sup> |

Data are median (range) values, unless otherwise specified. ICU, intensive care unit; VAP, ventilator-associated pneumonia.

<sup>a</sup>Fisher's exact test.

<sup>b</sup>Mann–Whitney *U*-test.

<sup>c</sup>Clinical condition present at admission in ICU or during ICU stay.

TABLE II. Virological Parameters in Surgical and Trauma Intensive Care Unit (ICU) Patients With an Active Cytomegalovirus (CMV) Infection

| Variable  | Specimen              |                 | P-value           |
|---|-----------------------|-----------------|-------------------|
|   | Tracheal aspirate     | Plasma          |                   |
| Patients with positive CMV PCR result no. (%)                       | 19 (100) <sup>a</sup> | 14 (76)         |                   |
| Initial CMV DNA load (copies/ml)                                    | 124 (11–57,042)       | 18 (10–2,660)   | 0.04 <sup>a</sup> |
| Peak CMV DNA load (copies/ml)                                       |                       |                 |                   |
| Overall   | 239 (11–132,754)      | 67 (10–2,799)   | 0.02 <sup>a</sup> |
| Deceased  | 357 (11–132,754)      | 59.5 (10–2,779) | —                 |
| Survivors   | 164 (38–8,103)        | 81.5 (10–2,779) | —                 |
| Samples with CMV DNA load >1,000 copies/ml, no. (%)                 | 8 (19)                | 4 (12)          | 0.45 <sup>b</sup> |
| Time to first positive PCR after admission, days                    | 11 (0–34)             | 16.5 (0–28)     | 0.36 <sup>a</sup> |
| Time to resolution (negative PCR) of the episode, days <sup>c</sup> | 28 (18–35)            | 20 (10–35)      | 0.30 <sup>a</sup> |

Data are median (range) values unless otherwise indicated.

<sup>a</sup>Mann–Whitney *U*-test.

<sup>b</sup>Fisher's exact test.

<sup>c</sup>Data on the seven episodes of active CMV infection with positive CMV DNA results in tracheal aspirates and plasma specimens that eventually resolved during the follow-up.

not significantly different from those quantified in patients ( $n = 12$ ) with an active CMV infection prior to the occurrence of the episode (median of 4 days after ICU admission). In addition, we found neither significantly higher levels of TNF- $\alpha$  during the episodes of active CMV infection than in the absence of them, nor did we observe significant increases of plasma TNF- $\alpha$  levels following CMV reactivation ( $P = 0.84$  by the Wilcoxon test) in eight patients for whom basal and sequential measurements were available.

### CMV-Specific T-Cell Immunity in Patients With Active CMV Infection

Data on CMV-specific T-cell immunity were only available for 18 patients due to logistic problems: 9 experienced an episode of active CMV infection and 9 did not (Tables III and IV). Both groups of patients were comparable for age, sex, basal clinical conditions,

clinical outcome (death/discharge), and receipt of steroids (not shown).

Patients without an active CMV infection displayed detectable CMV-specific IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and IFN $\gamma$  CD4 T-cell responses (at a median of 3 days after ICU admission; range, 1–29 days). Overall, patients with ongoing CMV replication had significantly higher levels of both T-cell subsets than patients with no active CMV infection. Sequential immunological data on patients experiencing an episode of active CMV infection are shown in Table IV. Active CMV infection developed despite the presence of detectable CMV-specific T cells shortly after ICU admission (see Patients 5 and 6). In most patients, CMV DNA was detected in either TA or PL or in both in the face of detectable peripheral CMV-specific T-cell precursors. In fact, no significant correlation was found between CMV DNA levels in either specimen and the peripheral levels of IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup> ( $\sigma = -0.10$ ;  $P = 0.68$  for TA, and  $\sigma = -0.11$ ;  $P = 0.65$ , for PL) or IFN $\gamma$  CD4<sup>+</sup> T-cells ( $\sigma = -0.16$ ;  $P = 0.52$  for TA, and  $\sigma = -0.41$ ;  $P = 0.10$ , for PL).

Undetectable CMV-specific T-cell responses were observed in two patients (4 and 7) with high PL and TA CMV DNA loads. Both patients died shortly after the day of immunological analysis so that subsequent measurements were not available.

Sequential immunological data were available for four episodes that were eventually resolved during the study period (Patients 1, 2, 5, and 6). In three of them (Patients 2, 5, and 6), we could demonstrate a marked expansion of both IFN $\gamma$  CMV-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during the follow-up.

### Clinical Outcome of Patients With an Active CMV Infection

The overall mortality rate was higher in patients with (61%) than in patients without (47%) an active CMV infection, although statistical significance was not reached (Table I). ICU stay was significantly longer for the former patients than for the latter. Both group

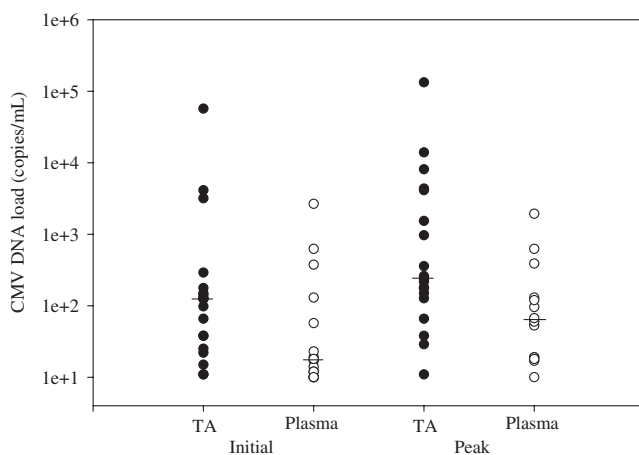


Fig. 1. Cytomegalovirus (CMV) DNA loads as determined by a quantitative real-time PCR in tracheal aspirates (TA) and plasma in critically ill patients in a surgical and trauma ICU with an active CMV infection. Initial (first positive PCR results) and peak CMV DNA values are shown. Median values are indicated (lines).

TABLE III. Immunological Parameters in Surgical and Trauma Intensive Care Unit (ICU) Patients With or Without an Active Cytomegalovirus (CMV) Infection

| Variable   | Active CMV infection        |                             | P-value           |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|
|  | Yes                         | No                          |                   |
| CMV-specific T-cell response (cells/ $\mu$ l) <sup>a</sup> |                             |                             |                   |
| IFN $\gamma$ CD8 <sup>+</sup>                              | 3.2 (0–17.3) <sup>b</sup>   | 0.84 (0.16–4.6)             | 0.05 <sup>c</sup> |
| IFN $\gamma$ CD4 <sup>+</sup>                              | 2.6 (0–3.9) <sup>b</sup>    | 0.62 (0.28–4.48)            | 0.04 <sup>c</sup> |
| Plasma TNF- $\alpha$ (pg/ml)                               |                             |                             |                   |
| Basal  | 9.6 (7.4–14.5) <sup>d</sup> | 9.9 (7.1–25.7) <sup>e</sup> | 0.80 <sup>c</sup> |
| During episodes  | 9.2 (7.4–24.4) <sup>f</sup> | NA <sup>g</sup>             |                   |

Data are median (range) values.

<sup>a</sup>Cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1 IFN $\gamma$ -producing T cells, as enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining (ICS), in nine patients with and nine patients without an active CMV infection.

<sup>b</sup>Values measured during the episodes of active CMV infection.

<sup>c</sup>Mann–Whitney *U*-test.

<sup>d</sup>Values obtained from patients (n = 30) without an active CMV infection (median 3 days after ICU admission).

<sup>e</sup>Values measured prior to the development of an active CMV infection in 12 patients (median of 4 days after ICU admission).

<sup>f</sup>Values measured during episodes of active CMV infection (28 samples in 18 patients). No significant difference with respect to values measured prior to CMV reactivation (*P* = 0.81, by the Mann–Whitney *U*-test).

<sup>g</sup>Not applicable.

populations were matched for age, sex, basal clinical conditions, or clinical complication during ICU stay, and receipt of steroids and vasopressors (not shown).

## DISCUSSION

The incidence and clinical relevance of active CMV infection in critically ill patients without canonical

TABLE IV. Evaluation of the CMV-Specific T-Cell Immunity in Surgical and Trauma Intensive Care Unit (ICU) Patients With an Active CMV Infection

| Patient | Day after ICU admission | CMV DNA load (copies/ml) in |                | IFN $\gamma$ CMV-specific T cells (cells/ $\mu$ l) <sup>a</sup> |                  |
|---------|-------------------------|-----------------------------|----------------|---|------------------|
|         |                         | TA                          | PL             | CD8 <sup>+</sup>  | CD4 <sup>+</sup> |
| 1       | 18                      | 177                         | 10             | 15.7  | 7.9              |
|         | 29                      | 151                         | 53             | 14.2  | 4.69             |
|         | 35                      | 0                           | 0              | NA  | NA               |
| 2       | 4                       | 25                          | 10             | 3.2   | 2.9              |
|         | 15                      | 29                          | 0 <sup>b</sup> | 5.9   | 6.4              |
|         | 29                      | 0                           | 0              | NA  | NA               |
| 3       | 7                       | 11                          | 0              | 1.8   | 4.3              |
|         | 12                      | 86                          | 17             | 1.3   | NA               |
|         | 22                      | 50                          | 0              | 5.5   | 4.7              |
|         | 32                      | 8,103                       | 17             | 0.79  | 1.3              |
| 4       | 4                       | 4,352                       | 623            | 0   | 0                |
|         | 1                       | 0                           | 0              | 1.3   | 1.4              |
| 5       | 15                      | 126                         | 14             | 1.0   | 0.80             |
|         | 27                      | 25                          | 16             | 4.2   | 3.2              |
|         | 40                      | 0                           | 0              | NA  | NA               |
|         | 0                       | 0                           | 0              | 1.2   | 1.1              |
| 6       | 5                       | 290                         | 57             | 17.3  | 1.2              |
|         | 19                      | 184                         | 23             | 13.9  | 2.8              |
|         | 29                      | 0                           | 0              | NA  | NA               |
|         | 36                      | 14,002                      | 1,931          | 0   | 0                |
| 8       | 3                       | 57,042                      | 375            | 4.6   | 2.3              |
| 9       | 1                       | 38                          | 0              | 0.50  | 0.70             |
|         | 7                       | 259                         | 0              | 1.8   | 0.91             |

TA, tracheal aspirate; PL, plasma; NA, not available. Patients 1 and 8 had catheter-related fever (bacteriemia), Patient 2 had septic shock of abdominal origin, Patient 3 had sepsis following VAP (ventilator-associated pneumonia), Patient 4 had a cardiogenic shock, Patients 5, 7, and 9 had sepsis of abdominal origin, and Patient 6 developed VAP.

<sup>a</sup>Enumeration of CMV pp65 and IE-1 (simultaneous stimulation with overlapping peptide libraries)-specific IFN $\gamma$ -producing T cells by intracellular cytokine staining (ICS).

<sup>b</sup>Undetectable responses were computed as 0 cells/ $\mu$ l.

immunosuppression have been assessed in a number of studies [Domart et al., 1990; Stéphan et al., 1996; Cook et al., 1998, 2003; Kutza et al., 1998; Heining et al., 2001; Jaber et al., 2005; Von Müller et al., 2006; Limaye et al., 2008; Ziemann et al., 2008; Chiche et al., 2009; Kalil and Florescu, 2009; Osawa and Singh, 2009]. Nevertheless, little is known about the natural course of CMV reactivation in this clinical setting. In this study, CMV-seropositive patients in a surgical and trauma ICU who were mechanically ventilated were examined sequentially for the presence of CMV in PL and TA by means of a highly sensitive real-time qPCR, the latter on the basis of previous studies conducted in the mCMV model indicating that the lungs are a major site of CMV reactivation under clinical conditions analogous to those of most patients in our series (presence of sepsis) [Cook et al., 2002, 2006a,b]. To our knowledge, no previous study employed a qPCR test for monitoring CMV infection in the lower respiratory tract. We assumed that the possibility of CMV detected in TA coming from the upper airways (saliva) in mechanically ventilated patients was negligible. Based on our data, we also assumed that CMV DNA detected in TA, even when present at low levels, was derived from cells lytically infected and not merely from cells harboring the CMV genome in a latent state.

Active CMV infection occurred at an exceedingly high rate (around 40%) in our cohort. In previous studies, the overall rate of systemic CMV infection in highly heterogeneous population groups of critically ill patients was 20% when the surveillance method was a qualitative PCR test or the pp65 antigenemia assay [Kalil and Florescu, 2009; Osawa and Singh, 2009], both less sensitive than the PCR assay used in this study [Gimeno et al., 2008], the highest rate being reported in patients with septic shock [Kalil and Florescu, 2009; Osawa and Singh, 2009]. An incidence of 38% was recently reported [Limaye et al., 2008] in a series of patients in different ICUs who were also monitored by a qPCR assay. In our series, patients with no evidence of active CMV infection were followed-up for a median of 11 days because of their discharge from ICU or their death. Taking into consideration that patients with active CMV infection displayed the first positive PCR result at a median of 12 days after admission, it is likely that the percentage of patients with active CMV infection might have been even higher had the former patients stayed in ICU for a longer period of time. In our opinion, two main reasons accounted for the high rate of active CMV infection observed in our cohort. Firstly, the extreme sensitivity of the PCR method employed, and secondly, the use of respiratory specimens for the surveillance of active CMV infection. In this context, CMV reactivation was diagnosed in around 25% of patients solely on the basis of the presence of CMV DNA in TA, indicating that monitoring for the presence of CMV in the blood compartment may underestimate the actual incidence of active CMV infection in critically ill patients. Taken together our data reinforce the hypothesis of lungs being a major site of CMV reactivation, and indicate that

screening of lower respiratory tract specimens is imperative for an optimal diagnosis and monitoring of active CMV infection in ICU patients.

The fact that no patient with an active CMV infection received antiviral therapy allowed us to investigate the natural history of CMV reactivation in this clinical setting. In approximately one-third of cases, CMV DNA was detected earlier in TA than in PL, and resolution of active CMV infection occurred within 2–3 weeks, which is in accordance with a previous estimation [Limaye et al., 2008]. Nevertheless, clearance of CMV DNA frequently preceded that of CMV DNA in TA. Thus, the data indicated that the analysis of lower respiratory tract specimens for the presence of CMV DNA may be more suitable than that of plasma for achieving an earlier diagnosis of an episode of active CMV infection and for demonstrating its resolution. Overall, CMV DNA loads in TA were significantly higher than those in PL. Whole blood specimens are known to yield higher CMV DNA loads than plasma specimens [Razonable et al., 2002]; Thus, our data did not prove that CMV DNA load in the lower respiratory tract was of greater magnitude than that in the blood compartment. Interestingly, in some patients, high CMV DNA loads were detected in TA in the face of either low or undetectable levels of plasma CMV DNAemia, suggesting that kinetics of CMV replication or CMV clearance in the lungs may differ from that in the blood compartment. Low levels of CMV DNAemia were observed in most patients, which is in keeping with previously reported low pp65 antigenemia values for patients in comparable series [Kalil and Florescu, 2009; Osawa and Singh, 2009].

Little is known about the interaction between CMV and the adaptive immune system in critically ill patients without canonical immunosuppression experiencing an episode of active CMV infection. In a previous study [Von Müller et al., 2007], it was demonstrated that active CMV infection may occur in patients with septic shock despite detection of CMV-specific IFN $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T-cell precursors in blood, suggesting that CMV reactivation is not primarily triggered by T-cell immunosuppression. Our data are in accordance, and extend their observations to patients with clinical conditions other than septic shock. In effect, active CMV infection developed in patients with peripheral levels of pp65 and IE-1 CMV-specific T cells comparable to those in patients who did not experience CMV reactivation during ICU stay. Higher cell counts of both T-cell subsets were found in patients with ongoing CMV replication than in patients without active CMV infection, probably reflecting the occurrence of a clonal expansion of activated T cells driven by CMV in the former patients. In this sense, an expansion of both T-cell subsets subjected to analysis could be demonstrated in three out of four episodes that were eventually cleared, and for which sequential samples were available. The presence of high peripheral levels of functional CMV-specific T cells may explain why most patients displayed low CMV DNAemia loads and finally

achieved control of CMV replication in the absence of antiviral therapy. Interestingly, however, undetectable CMV-specific T-cell responses were seen in two patients displaying high peak CMV DNAemia loads (>500 copies/ml—values above the threshold for initiation of pre-emptive antiviral therapy in allogeneic stem cell transplant recipients [Gimeno et al., 2008]). These patients did not receive high steroid doses and died shortly thereafter. Future studies should determine whether this subset of patients is at high risk of developing CMV-related clinical complications.

A clear dissociation of CMV DNA levels in TA and blood (high levels in TA and low or undetectable levels in PL) was observed in a number of patients in the face of high frequencies of peripheral CMV-specific T cells (see Patients 3 and 8 in Table III). It would be of interest to determine whether intercompartmental differences in the functionality of CMV-specific T cells do occur in this setting. Should this hold true, then immune monitoring of blood levels of CMV-specific T cells would not always provide an accurate estimation of the degree of immunocompetence against CMV in the lung micro-environment.

The molecular basis of CMV reactivation in critically ill patients is largely unknown. On the basis of data obtained in the mCMV model [Cook et al., 2002, 2006a], it may be inferred that a pro-inflammatory state driven by the primary disease leads to CMV reactivation. In this mechanistic model, TNF- $\alpha$ , a cytokine known to directly stimulate immediate early (IE) CMV gene expression *in vitro* [Prosch et al., 1995], may exert a pivotal role [Döcke et al., 1994]. Furthermore, human CMV may cause abnormal pulmonary expression of TNF- $\alpha$ , as has been shown in the mCMV model [Forster et al., 2009], resulting in lung injury. We found high plasma TNF- $\alpha$  levels in our patients irrespective of their clinical condition; Nevertheless, prediction of the development of active CMV infection could not be made on the basis of plasma TNF- $\alpha$  levels measured shortly after ICU admission. In contrast to an earlier report [Kutza et al., 1998], we found that CMV reactivation did not result in a measurable increase in the plasma levels of this cytokine. These data, however, do not dismiss the pathogenetic involvement of TNF- $\alpha$ . Other factors, such as the burden of latent CMV in the lungs (or other tissue or mucosal sites) may critically determine the individual risk for developing CMV reactivation [Cook, 2007].

The limited number of patients enrolled in our series precluded a robust statistical analysis of the potential effect of active CMV infection in the clinical outcome of critically ill patients. Our data, however, are consistent with previous conclusions drawn from studies including a much greater number of patients [Jaber et al., 2005; Limaye et al., 2008; Chiche et al., 2009] in that the overall mortality rate and the length of ICU stay are higher in patients with active CMV infection than in patients who do not develop it. Nevertheless, we could not find an association between the peak CMV DNA load in either TA or PL and mortality. This is in contrast to data reported by Limaye et al. [2008]. Our data,

however, should be interpreted with caution given the scarce number of patients enrolled in the study.

Despite the evidence supporting a pathogenic role of CMV in critically ill patients, definitive data proving causality are lacking. Only a controlled clinical trial of CMV-specific antiviral therapy may shed light on this issue. With this prospect, data on the natural history of CMV reactivation in ventilated critically ill patients presented herein should be taken into consideration for an optimal monitoring of active CMV infection.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julia García and Mónica Reig for their technical assistance.

## REFERENCES

- Chiche L, Forel JM, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J, Gannier M, Zandotti C, Papazian L. 2009. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* 37:1850–1857.
- Cohen JI. 2009. Cytomegalovirus in the intensive care unit: Pathogen or passenger? *Crit Care Med* 37:2095–2096.
- Cook CH. 2007. Cytomegalovirus reactivation in “immunocompetent” patients: A call for scientific prophylaxis. *J Infect Dis* 196:1273–1275.
- Cook CH, Yenchar JK, Kraner TO, Davies EA, Ferguson RM. 1998. Occult herpes family viruses may increase mortality in critically ill surgical patients. *Am J Surg* 176:357–360.
- Cook CH, Zhang Y, McGuinness BJ, Lahm MC, Sedmak DD, Ferguson RM. 2002. Intra-abdominal infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Infect Dis* 185:1395–1400.
- Cook CH, Martin LC, Yenchar JK, Lahm MC, McGuinness B, Davies EA, Ferguson RM. 2003. Occult herpes family viral infections are endemic in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 31:1923–1929.
- Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. 2006a. Lypopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1 $\beta$  triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 80:9151–9158.
- Cook CH, Zhang Y, Sedmak DD, Martin LC, Jewell S, Ferguson RM. 2006b. Pulmonary cytomegalovirus reactivation causes pathology in immunocompetent mice. *Crit Care Med* 34:842–849.
- Crough T, Khanna R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus infection: From bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22:76–98.
- Döcke WD, Prösh S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, Syrbe U, Krüger DH, von Baehr R, Volk HD. 1994. Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* 343:268–269.
- Domart Y, Trouillet JL, Fagon JY, Chastre J, Brun-Vezinet F, Gilbert C. 1990. Incidence and morbidity of cytomegalovirus infection in patients with mediastinitis following cardiac surgery. *Chest* 97:18–22.
- Forster MR, Trgovcich J, Zimmerman P, Chang A, Miller C, Klenerman P, Cook CH. 2010. Antiviral prevention of sepsis induced cytomegalovirus reactivation in immunocompetent mice. *Antiviral Res* 85:496–503.
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (CMV PCR Kit, Abbott) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of pre-emptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 46:3311–3318.
- Griffiths PD. 2010. Cytomegalovirus in intensive care. *Rev Med Virol* 20:1–3.
- Heininger A, Jahn G, Engel C, Notheisen T, Unertl K, Hamprecht K. 2001. Human cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med* 29:541–547.

- Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault PF, Eledjam JJ. 2005. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: Associated factors and consequences. *Chest* 127:233–241.
- Kalil AC, Florescu DF. 2009. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 37:2350–2358.
- Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. 1998. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 26:1076–1082.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31:1250–1256.
- Limaye AP, Kirby KA, Rubenfels GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, Gibran NS, Huang ML, Santo Hayes TK, Corey L, Boeckh M. 2008. Cytomegalovirus reactivation in critically immunocompetent patients. *JAMA* 300:413–422.
- Osawa R, Singh N. 2009. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: A systematic review. *Crit Care* 13:1–10.
- Papazian L, Fraisse A, Garbe L, Zandotti C, Thomas P, Saux P, Pierrin G, Gouin F. 1996. Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology* 84:280–287.
- Prosch S, Wendt CE, Reinke P, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Krüger DH. 1995. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF $\alpha$  is mediated via induction of NF-KappaB. *Virology* 208:197–206.
- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, Smith TF, Paya CV. 2002. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 73:968–973.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of CMV-specific IFN $\gamma$  CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
- Stéphan F, Méharzi D, Ricci S, Fajac A, Clergue F, Bernaudin JF. 1996. Evaluation by polymerase chain reaction of cytomegalovirus reactivation in intensive care patients under mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 22:1244–1249.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. 2010. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1- specific IFN $\gamma$  CD8(+) and CD4(+) T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 45:543-549.
- Von Müller L, Mertens T. 2008. Human cytomegalovirus infection and antiviral immunity in septic patients without canonical immunosuppression. *Mol Microbiol Immunol* 197:75–82.
- Von Müller L, Klemm A, Weiss M, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Durmus N, Hampl W, Mertens T. 2006. Active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *Emerg Infect Dis* 12:1517–1522.
- Von Müller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, Hampl W, Mertens T. 2007. Cellular immunity and active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis* 196:1288–1295.
- Ziemann M, Sedemund-Adib B, Reiland P, Schmucker P, Hennig H. 2008. Increased mortality in long-term intensive care patients with active cytomegalovirus infection. *Crit Care Med* 36:3145–3150.



---

---

## 8.2. Article segon

*Immunological insights into the pathogenesis of active CMV infection in non-immunosuppressed critically ill patients. Blanquer J, Chilet M, Benet I, Aguilar G, Muñoz-Cobo B, Tellez A, Costa E, Bravo D, Navarro D. J Med Virol 2011; 83: 1966-71.*



# Immunological Insights into the Pathogenesis of Active CMV Infection in Non-Immunosuppressed Critically Ill Patients

José Blanquer,<sup>1</sup> Marifina Chilet,<sup>2</sup> Isabel Benet,<sup>3</sup> Gerardo Aguilar,<sup>4</sup> Beatriz Muñoz-Cobo,<sup>2</sup> Alexander Tellez,<sup>1</sup> Elisa Costa,<sup>2</sup> Dayana Bravo,<sup>2</sup> and David Navarro<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Intensive Care Unit, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Anesthesiology and Critical Care Department, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Dissociation of cytomegalovirus (CMV) DNA loads between the lower respiratory tract and blood, with high levels in the former compartment and low or undetectable levels in the latter, commonly occurs during active CMV infection in critically ill patients despite the presence of high frequencies of CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in blood. Data presented in this case report suggest that inter-compartmental differences in interleukin-10 (IL-10) levels may, in part, explain the pathobiology of this phenomenon. In the absence of ganciclovir treatment, a significant correlation was observed between IL-10 levels and CMV DNA loads in lower respiratory tract specimens ( $P = 0.016$ ), but not in plasma samples ( $P = 0.46$ ). Comparable data were obtained during the course of active CMV infection episodes that developed in six CMV-seropositive critically ill patients with no canonical immunosuppression. The presence of higher levels of IL-10 in the lower respiratory tract than in plasma may result in increased impairment of CMV-specific T-cell effector responses in the lung compared to the systemic compartment, facilitating local CMV replication. **J. Med. Virol. 83:1966–1971, 2011.**

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** cytomegalovirus; intensive care unit patients; T-cell immunity; IL-10; IL-6; CMV DNA load

Active CMV infection frequently occurs in critically ill patients lacking canonical immunosuppression. Although this event has been associated with prolonged intensive care unit hospitalization, a longer duration of mechanical ventilation, and higher rates of

nosocomial infections and overall mortality [for a review see Kalil and Florescu, 2009, Osawa and Singh, 2009; Griffiths, 2010; Limaye and Boeckh, 2010], definitive proof of causality is lacking. In a previous study, we showed that active CMV infections in intensive care unit patients are frequently restricted to the lower respiratory tract environment, supporting the hypothesis that the lungs are a major site of CMV reactivation in this setting [Cook et al., 2003; Chilet et al., 2010]. Furthermore, a clear dissociation of CMV DNA levels between tracheal aspirates and plasma, with high levels being detected in tracheal aspirates and low or undetectable levels observed in the plasma, was demonstrated in some patients, despite the presence of high frequencies of peripheral CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting that inter-compartmental differences in either the levels or functionality of CMV-specific T cells may be present in these patients, resulting in critical differences in CMV replication kinetics and clearance in the lungs compared to blood [Chilet et al., 2010]. The data presented in the current report may help to clarify the pathobiology of this phenomenon.

A previously healthy CMV-seropositive 68-year-old man presented to the emergency department for evaluation of a fever, cough, hemoptysis, and progressive dyspnea. Laboratory data revealed leukocytosis (14,800/mm<sup>3</sup>) and abnormal blood gasometry parameters (pH 7.51, pO<sub>2</sub> 46 mmHg and pCO<sub>2</sub> 27 mmHg). A computed tomography scan showed areas of

\*Correspondence to: David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Accepted 14 July 2011

DOI 10.1002/jmv.22202

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

consolidation, mostly at the hilar regions, interspersed with areas of ground-glass attenuation and preserved normal areas. Urinary *Legionella pneumophila* serogroup 1 and *Streptococcus pneumoniae* antigen detection tests were negative. Sputum and a nasopharyngeal aspirate were tested for the presence of influenza RNA, including the pandemic H1N1 2009 virus, by real-time PCR, yielding negative results. The patient's serum tested negative in a fourth generation HIV assay. Empirical intravenous (i.v.) antibiotic treatment with ceftriaxone (2 g/24 hr), i.v. levofloxacin (500 mg/24 hr) and i.v. gentamycin (80 mg/one dose) was initiated. Worsening respiratory function prompted intensive care unit admission and implementation of non-invasive positive pressure ventilation. A presumptive diagnosis of diffuse alveolar hemorrhage was established, and plasmapheresis treatment was initiated. The patient received high dose corticosteroid pulses (1 g/24 hr) over a period of five days. Steroid therapy was administered to the patient at a maintenance dose (20–40 mg/day) until day 36. Six days after admission, the patient underwent a fiber bronchoscopy. Bronchial aspirate and bronchoalveolar lavage bacterial cultures yielded negative results, as did PCR testing for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*. Bronchial aspirate cytology was compatible with lung adenocarcinoma. Demonstration of a progressively bloodier return from three separate subsegmental bronchi and the presence of >20% hemosiderin-laden macrophages confirmed the diagnosis of diffuse alveolar hemorrhage [Collard and Schwarz, 2004]. During hospitalization in the intensive care unit, the patient developed several episodes of bacteremia (coagulase negative Staphylococci, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), fungemia (*Candida albicans*), ventilator-associated pneumonia (due to *Klebsiella pneumoniae*) and septic shock, which required appropriate changes in antimicrobial therapy. The patient died of multi-systemic organ failure on day 202 after intensive care unit admission.

Cytomegalovirus DNA PCR detection in the lower respiratory tract and plasma was first requested by the attending physician on day 21 after admission. The CMV DNA load was quantified by real-time PCR using the Abbott CMV PCR kit (produced by Qiagen GmbH, Hilden, Germany, for Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), as previously described [Gimeno et al., 2008; Chilet et al., 2010]. This assay is able to quantify CMV DNA loads reliably at >10 copies/ml [Chilet et al., 2010]. The DNA extractions (from 500 µl of plasma, dithiothreitol pre-treated tracheal aspirates, or bronchoalveolar lavage) were performed using the Abbott mSample preparation system DNA kit on an m24 SP instrument (Abbott Molecular). When bronchoalveolar lavage specimens were used, epithelial lining fluid volume was calculated using urea as a dilution marker [Zedtwitz-Liebenstein et al., 2005]. As shown in Table I, 162,693 and 1,573 CMV DNA

copies/ml were detected in tracheal aspirate and plasma specimens, respectively. An increase in the CMV DNA load in both tracheal aspirate (190,765 copies/ml) and plasma (29,573 copies/ml) specimens was apparent on day 27. Ganciclovir therapy (i.v. 5 mg/kg/12 hr) was initiated on the basis of two facts: (i) the patient was already being treated with corticosteroids at this point; and (ii) the patient's plasma CMV DNA load was within the range of that seen in transplant recipients with CMV end-organ disease [Solano and Navarro, 2010]. During ganciclovir therapy, the CMV DNA load progressively decreased until it became undetectable in both compartments by day 70. Ganciclovir therapy was interrupted on day 77 after two consecutive negative PCR results in lower respiratory tract and plasma specimens. A recurrent episode of active CMV infection developed on day 89. This episode, in contrast to the preceding one, appeared to be notably restricted to the lower respiratory tract environment, with high CMV DNA loads in tracheal aspirate specimens (peak level, 32,575 copies/ml) and either undetectable or low CMV DNA loads in the plasma (peak level, 13 copies/ml). Ganciclovir treatment (i.v.) was started again on day 112 and interrupted on day 148, following negative PCR assay results in lower respiratory tract and plasma specimens. A third episode of active CMV infection was detected on day 181, which prompted resumption of i.v. ganciclovir therapy. The patient died a few days later.

Bronchial aspirate cytology performed on day 6 after admission did not reveal signs of CMV cytopathology. No autopsy study was conducted, so it was not possible to determine whether CMV end-organ disease had occurred in this patient. No obvious link was observed between the occurrence of nosocomial infections and the CMV DNA load in lower respiratory tract or plasma specimens.

The molecular basis of active CMV infection in CMV-seropositive critically ill patients is largely unknown, although data obtained using a murine CMV model [Cook et al., 2002, 2006] and in humans [Prosch et al., 1995; Von Muller et al., 2007] suggest that a pro-inflammatory state driven by the primary disease leads to CMV reactivation. Diffuse alveolar hemorrhage is primarily thought to be an inflammatory condition [Collard and Schwarz, 2004], and, as such, it may have triggered CMV reactivation in the patient. In order to assess this hypothesis, levels of IL-6, a pleiotropic cytokine involved in innate immune mechanisms driven by infection or inflammation, were measured in sequential lower respiratory tract and plasma specimens. A commercial capture immunoassay (Human IL-6 ELISA Ready-set Go!) from eBiosciences Inc. (San Diego, CA) was used for this purpose, following the manufacturer's instructions. Tracheal aspirate specimens (pre-treated with 0.1% dithiothreitol) were vortexed and centrifuged at 1,500 rpm/min for 5 min. Cell supernatants were stored at -80°C until use in the assay. For

TABLE I. Virological and Immunological Data of Episodes of Active CMV Infection in a Critically Ill Patient With Diffuse Alveolar Hemorrhage

| Day after ICU admission | CMV DNA (copies/ml) in LRT <sup>a</sup> | CMV DNA (copies/ml) in plasma | IL-10 in LRT (pg/ml) | IL-10 in plasma (pg/ml) | IL-6 in LRT (pg/ml) | IL-6 in plasma (pg/ml) | CMV-specific IFN- $\gamma$ CD8 <sup>+</sup> T cells (cells/ $\mu$ l) | CMV-specific IFN- $\gamma$ CD4 <sup>+</sup> T cells (cells/ $\mu$ l) |
|-------------------------|---|-------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|--|--|
| 21                      | 163,693                                 | 1,573                         | 334.6                | 27.6                    | 394.6               | 69.6                   | NA   | NA   |
| 27                      | 190,765                                 | 29,573                        | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 34                      | 126,213                                 | 1,703                         | 150.2                | 12.7                    | 405.4               | 56.1                   | 0.18   | 0.19   |
| 42                      | 16,986                                  | UD                            | 50.5                 | 6.2                     | 345.6               | 68.6                   | NA   | NA   |
| 54                      | 972                                     | UD                            | 25.0                 | 15.7                    | 344.2               | 168.7                  | 1.44   | 0.80   |
| 62                      | 90                                      | UD                            | 32.4                 | 24.9                    | 289.4               | 40.9                   | 1.0  | 1.2  |
| 70                      | UD                                      | UD                            | 30.2                 | 20.5                    | 290.5               | 25.5                   | 1.10   | 0.91   |
| 77                      | UD                                      | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 89                      | 26                                      | 13                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | 1.45   | 1.10   |
| 104                     | 18                                      | UD                            | 15.7                 | 15.0                    | 312.5               | 31.5                   | NA   | NA   |
| 112                     | 868                                     | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 119                     | 8,680                                   | 11                            | 1,296.1              | 10.7                    | 299.5               | 28.6                   | NA   | NA   |
| 126                     | 32,575                                  | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | 1.93   | 1.11   |
| 130                     | 2,351                                   | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 138                     | 643                                     | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 146                     | UD                                      | UD                            | 15.4                 | 10.8                    | 383.4               | 34.8                   | 1.82   | 0.92   |
| 152                     | UD                                      | UD                            | 17.7                 | 11.2                    | 339.4               | 29.4                   | NA   | NA   |
| 160                     | UD                                      | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 174                     | UD                                      | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 181                     | 258                                     | 67                            | 45.6                 | 23.2                    | 440.5               | 56.2                   | 2.1  | 1.12   |
| 188                     | 227                                     | 13                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |
| 198                     | 13                                      | UD                            | NA                   | NA                      | NA                  | NA                     | NA   | NA   |

LRT, lower respiratory tract; NA, not available (insufficient volume for analysis); UD, undetectable (<10 CMV DNA copies/ml).

<sup>a</sup>All LRT specimens were tracheal aspirates except that of day 119 which was a bronchoalveolar lavage.

bronchoalveolar lavage specimens, the epithelial lining fluid volume was calculated using urea as a dilution marker [Zedtwitz-Liebenstein et al., 2005]. The detection limit of the assay is 2 pg/ml. Samples yielding cytokine values above the upper quantification limit of the assay were conveniently diluted and re-assayed. As shown in Table I, IL-6 levels in the systemic compartment, and especially in the lower respiratory tract, were high (levels in healthy individuals are < 5 pg/ml) throughout the study period. The levels of IL-6 were significantly higher ( $P \leq 0.001$ , Mann-Whitney U-test) in lower respiratory tract specimens (median, 339.4 pg/ml; range 289.4–440.5 pg/ml) than in plasma specimens (median, 40.9 pg/ml; range, 25.5–168.7 pg/ml). Nevertheless, no significant correlation was found between CMV DNA loads and IL-6 levels in the lower respiratory tract or plasma specimens ( $P = 0.765$  and  $P = 0.821$ , respectively, Spearman's correlation test). The data thus indicated that the successive episodes of active CMV infection that occurred in this patient developed in the setting of a pro-inflammatory state, which was clearly greater in magnitude in the lower respiratory tract environment.

It was shown previously that dissociation of CMV DNA levels between the lower respiratory tract and plasma frequently occurs in intensive care unit patients displaying peripheral blood levels of CMV-specific pp65 and IE-1 IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells comparable to those found in healthy immunocompetent individuals (>1 cell/ $\mu$ l) [Chilet et al., 2010]. All

active CMV infection episodes in the patient were dissociated to some extent, the second episode being the most clearly dissociated. Interestingly, the peak CMV DNA load in the plasma during the first episode was remarkably high (29,573 copies/ml). In our experience, CMV DNA loads in plasma from intensive care unit patients with active CMV infection seldom reach >500 copies/ml in the presence of peripheral blood levels of CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells of >1 cell/ $\mu$ l [Chilet et al., 2010]. The CMV-specific IFN- $\gamma$  T cells in the blood samples sequentially obtained during this first episode of active CMV infection ( $n = 4$ ) were quantified using flow cytometry with intracellular cytokine staining (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA), as previously described [Solano et al., 2008; Chilet et al., 2010; Tormo et al., 2010]. Briefly, whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequences of pp65 and IE-1 CMV proteins (1  $\mu$ g/ml/peptide), obtained from JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany). Cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems). Responses >0.1% were considered to be specific. As shown in Table I, CMV-specific IFN- $\gamma$  T cell counts at the time of peak CMV replication were well below (0.18 cells/ $\mu$ l for IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T cells and 0.19 cells/ $\mu$ l for IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> T cells) those measured in healthy immunocompetent individuals [Chilet et al., 2010]. The fact that the patient was being

treated with high-dose corticosteroid therapy prior to the CMV episode, and was under maintenance steroid therapy at the time of the active CMV infection, most likely accounted for the above finding, as it is well known that steroid therapy is associated with a dose-dependent deleterious effect on T cell functionality [Hakki et al., 2003; Widmann et al., 2008]. A marked expansion of both IFN- $\gamma$  T-cell subsets was observed in association with CMV DNA clearance in both the lower respiratory tract and plasma. Remarkably, the two recurrent episodes of active CMV infection in this patient developed in the face of high frequencies of peripheral CMV-specific IFN- $\gamma$  T cells.

It is speculated that the dissociation of cytomegalovirus (CMV) DNA loads between the lower respiratory tract and the blood may be related to inter-compartmental differences in either the levels or functionality of CMV-specific T cells. In this sense, peripheral blood mononuclear cells could not be recovered from the bronchoalveolar lavage specimen obtained on day 119. It is uncertain whether this was due to the presence of low levels of T cells in the lower respiratory tract or to methodological problems. The possibility of impaired T-cell trafficking into the lungs in patients with dissociated episodes of active CMV infection, resulting in low levels of CMV-specific T cells in the lower respiratory tract, should be investigated in future studies.

IL-10 suppresses inflammatory immune responses through a wide range of molecular mechanisms, including the decreasing expression of MHC class II and co-stimulatory molecules by antigen presenting cells, limiting the expansion and differentiation of CD4<sup>+</sup> effector T-cell responses [Mosmann, 1994], and inhibiting the chemotactic response of CD4<sup>+</sup> T cells [Jinquan et al., 1993]. Data obtained in the transplantation setting suggest that IL-10 exerts a direct effect on CMV replication. In this context, a rise in IL-10 levels was reported to occur in renal transplant recipients with both symptomatic and asymptomatic active CMV infections [Nordøy et al., 2000]. In these patients, pp65 antigenemia results were found to correlate with plasma IL-10 levels. Other authors have also reported increased plasma IL-10 levels associated with CMV disease in solid organ transplant recipients [Cervera et al., 2007; Krishnan et al., 2010]. Furthermore, CMV clearance was observed to be prolonged in lung transplant patients with elevated levels of IL-10 in the plasma and/or bronchoalveolar lavage specimens [Zedtwitz-Liebenstein et al., 2007]. Studies on the murine model showed that the induction of host IL-10 responses and the synthesis of a viral homolog of IL-10 (vIL-10) enhance systemic or local (salivary glands) mCMV replication by suppressing mCMV-specific T-cell responses [Humphreys et al., 2007; Jones et al., 2010]. Moreover, IL-10R $\alpha$  blockade increases CMV-specific CD4<sup>+</sup> T proliferation in HIV-infected individuals [Brockman et al., 2009]. In this context, we hypothesized that IL-10 levels in the patient might have been significantly

higher in the lower respiratory tract than in blood plasma during the course of the dissociated episodes of active CMV infection. The presence of higher levels of IL-10 in the lower respiratory tract than in plasma may have led to a greater attenuation of CMV-specific T-cell responses in the lung environment versus the systemic compartment. In order to test this hypothesis, human IL-10 was measured in lower respiratory tract specimens and plasma, as described above for IL-6, using a commercial kit (Human IL-10 ELISA Ready-set Go!, from eBiosciences, Inc.; limit of detection 2 pg/ml) and following the manufacturer's instructions. It was previously shown that antibodies to human IL-10 do not cross-react with the CMV IL-10 homolog [Brodeur and Spencer, 2010]. In support of our hypothesis, we found significantly higher levels of IL-10 in lower respiratory tract specimens versus plasma in all three episodes of CMV reactivation ( $P = 0.01$ , Mann-Whitney U-test). Furthermore, the difference was greatest (up to 110-fold) during the second episode of active CMV infection, when the CMV DNA loads in the lower respiratory tract and plasma were notably dissociated. Moreover, in the absence of antiviral therapy, the IL-10 levels and CMV DNA loads were found to be significantly correlated in the lower respiratory tract specimens ( $\sigma = 0.85$ ;  $P = 0.016$ , Spearman's correlation test), but not in the plasma specimens ( $\sigma = 0.33$ ;  $P = 0.42$ ). IL-10 levels were also measured in tracheal aspirates and plasma specimens obtained during the course of active CMV infection episodes that occurred in six CMV-seropositive critically ill patients with no canonical immunosuppression. The patients' admissions to the intensive care unit were due to severe sepsis or septic shock following abdominal ( $n = 2$ ) or cardiovascular ( $n = 1$ ) surgery or to respiratory distress following nosocomial pneumonia (after cardiovascular surgery) ( $n = 3$ ). All patients were mechanically ventilated and none received high-dose corticosteroids ( $>2$  mg/kg/day) during hospitalization. None of these patients were treated with antivirals during their intensive care unit stay. Informed consent was provided by the patients or their relatives. The virological and immunological features of these episodes are shown in Table II. The episodes of active CMV infection that developed in patients 2, 3, 5, and 6 were clearly dissociated (especially those occurring in patients 2 and 5), with the peak CMV DNA levels in the lower respiratory tract being significantly higher ( $P = 0.01$ , Mann-Whitney U-test) than those in the plasma. In these episodes, IL-10 levels at the time of peak CMV DNA loads were significantly higher ( $P = 0.021$ , Mann-Whitney test) in the lower respiratory tract specimens than in plasma specimens. Differences in peak CMV DNA levels between lower respiratory tract and plasma specimens during the episodes of active CMV infection in patients 1 and 4 were substantially lower. In these episodes, IL-10 levels in lower respiratory tract and plasma specimens did not significantly differ ( $P \geq 0.5$ , Mann-Whitney U test). Moreover, overall,

TABLE II. Virological and Immunological Data of Episodes of Active CMV Infection Patients Occurring in Six Critically Ill Patients With No Canonical Immunosuppression

| Patient/<br>age/sex | Clinical<br>condition | Day after<br>ICU<br>admission | CMV DNA<br>(copies/ml)<br>in LRT | CMV DNA<br>(copies/ml)<br>in plasma | IL-10 in LRT<br>(pg/ml) | IL-10<br>in plasma<br>(pg/ml) | CMV-specific<br>IFN- $\gamma$ CD8 <sup>+</sup><br>T cells<br>(cells/ $\mu$ l) | CMV-specific<br>IFN- $\gamma$ CD4 <sup>+</sup><br>T cells<br>(cells/ $\mu$ l) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---|---|
| 1/84/F              | Septic shock/RD       | 4                             | 25                               | 30                                  | 4.4                     | 46.1                          | 3.2   | 2.9   |
|                     |                       | 10                            | NA                               | 96                                  | NA                      | NA                            | NA  | NA  |
|                     |                       | 15                            | 29                               | UD                                  | 6.4                     | 12.3                          | 5.9   | 6.4   |
| 2/60/F              | Severe sepsis/RD      | 15                            | 86                               | 17                                  | 33.1                    | 13.7                          | 1.3   | NA  |
|                     |                       | 38                            | 8,103                            | 18                                  | 94.7                    | 22.7                          | 0.8   | 1.3   |
|                     |                       | 14                            | 126                              | 14                                  | 5.7                     | 44.2                          | 1.0   | 0.8   |
| 3/62/M              | Severe sepsis/RD      | 26                            | 25                               | 16                                  | 8.1                     | 4.7                           | NA  | NA  |
|                     |                       | 32                            | 966                              | 120                                 | 28.4                    | 6.5                           | 4.2   | 3.2   |
|                     |                       | 10                            | 357                              | 66                                  | 11.6                    | 9.24                          | NA  | NA  |
| 4/78/F              | Pneumonia/RD          | 19                            | 184                              | 23                                  | 7.4                     | 3.4                           | 13.9  | 2.8   |
|                     |                       | 27                            | 90                               | 36                                  | 7.3                     | 13.1                          | NA  | NA  |
|                     |                       | 35                            | 140                              | 22                                  | NA                      | NA                            | NA  | NA  |
| 5/79/M              | Pneumonia/RD          | 48                            | 23                               | UD                                  | 28.3                    | 5.4                           | NA  | NA  |
|                     |                       | 55                            | 344                              | UD                                  | 96.7                    | 26.1                          | NA  | NA  |
|                     |                       | 65                            | 1,529                            | UD                                  | 361.1                   | 5.8                           | 1.3   | 1.1   |
|                     |                       | 1                             | 38                               | UD                                  | 11.4                    | 12.0                          | NA  | NA  |
| 6/68/M              | Pneumonia/RD          | 7                             | 259                              | UD                                  | 76.0                    | 8.99                          | 1.8   | 0.9   |

F, female; M, male; LRT, lower respiratory tract; NA, not available (insufficient volume for analysis); RD, respiratory distress syndrome; UD, undetectable (<10 CMV DNA copies/ml).

the IL-10 levels and CMV DNA loads were found to be significantly correlated in lower respiratory tract specimens ( $\sigma = 0.62$ ;  $P = 0.014$ , Spearman's correlation test) but not in the plasma specimens ( $\sigma = 0.06$ ;  $P = 0.81$ ). As shown in Table II, high levels of peripheral CMV-specific T cells were found at one or more time points during the episode of active CMV infection. Unfortunately, the blood specimens drawn shortly after intensive care unit admission (baseline) were not available for analysis, so the possibility that suboptimal levels of CMV-specific T cells at that time point might have favored CMV reactivation cannot be ruled out. Nevertheless, previously published data indicated that CMV reactivation occurs in intensive care unit patients in the presence of high frequencies of CMV-specific T cells in the blood, even in those with a presumed "immune paralysis," as a result of strong compensatory anti-inflammatory responses [Von Muller et al., 2007; Chilet et al., 2010].

The presence of dissociated levels of IL-10 in the lower respiratory tract and the systemic compartment may have been the result of strong and locally focused compensatory anti-inflammatory responses [Ward et al., 2008] triggered by lung injury. The possibility that the local production of host IL-10 might have been directly driven by CMV replication is equally feasible. It is also possible that bacterial overgrowth in the lower respiratory tract-linked to mechanical ventilation may have induced the synthesis of IL-10 in the lung environment through bacterial interactions with specific Toll-like receptors [Oberger et al., 2011].

In summary, the data presented herein further reinforce the assumption that the screening of lower respiratory tract specimens for the presence of CMV DNA is imperative for an optimal diagnosis and

monitoring of active CMV infection in intensive care unit patients [Chilet et al., 2010]; in addition, they underscore the fact that recurrent episodes of active CMV infection may occur in intensive care unit patients. The data revealed an association between IL-10 levels and CMV DNA loads in lower respiratory tract specimens, but not in plasma specimens, during episodes of active CMV infection with a dissociation of CMV DNA levels between the lower respiratory tract and the systemic compartment. Further studies are needed to confirm the above finding and to elucidate the pathogenetic mechanisms involved.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest. We thank Julia García and Mónica Reig for their technical assistance.

#### REFERENCES

- Brodeur ND, Spencer JV. 2010. Antibodies to human IL-10 neutralize ebvIL-10-mediated cytokine suppression but have no effect on cmvIL-10 activity. *Virus Res* 153:265–268.
- Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD, Kaufmann DE. 2009. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114:346–356.
- Cervera C, Filella X, Linares L, Pineda M, Esteve C, Antón A, Marcos MA, Cofán F, Navasa M, Pérez-Villa F, Pumarola T, Moreno A. 2007. TH1/TH2 cytokine release pattern during in vivo cytomegalovirus disease in solid organ transplantation. *Transplant Proc* 39:2233–2235.
- Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. 2010. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol* 82:1384–1391.

- Collard HR, Schwarz MI. 2004. Diffuse alveolar hemorrhage. *Clin Chest Med* 25:583–592.
- Cook CH, Zhang Y, McGuinness BJ, Lahm MC, Sedmak DD, Ferguson RM. 2002. Intra-abdominal infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Infect Dis* 185:1395–1400.
- Cook CH, Martin LC, Yenchar JK, Lahm MC, McGuinness B, Davies EA, Ferguson RM. 2003. Occult herpes family viral infections are endemic in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 31:1923–1929.
- Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. 2006. Lypopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1 $\beta$  triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 80:9151–9158.
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (CMV PCR Kit, Abbott) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of pre-emptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 46:3311–3318.
- Griffiths PD. 2010. Cytomegalovirus in intensive care. *Rev Med Virol* 20:1–3.
- Humphreys IR, de Trez C, Kinkade A, Benedict CA, Croft M, Ware CF. 2007. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med* 204:1217–1225.
- Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102:3060–3067.
- Kalil AC, Florescu DF. 2009. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 37:2350–2358.
- Krishnan A, Zhou W, Lacey SF, Limaye AP, Diamond DJ, La Rosa C. 2010. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transpl Infect Dis* 12:363–370.
- Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. 1993. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4<sup>+</sup> T lymphocyte migration. *J Immunol* 151:4545–4551.
- Jones M, Ladell K, Wynn KK, Stacey MA, Quigley MF, Gostick E, Price DA, Humphreys IR. 2010. IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection. *J Immunol* 185:3583–3592.
- Limaye AP, Boeckh M. 2010. CMV in critically ill patients: Pathogen or bystander? *Rev Med Virol* 20:372–379.
- Mosmann TR. 1994. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 56:1–26.
- Nordøy I, Müller F, Nordal KP, Rollag H, Lien E, Aukrust P, Froland SS. 2000. The role of the tumor necrosis factor system and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 181:51–57.
- Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D. 2011. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol* 90:582–592.
- Osawa R, Singh N. 2009. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: A systematic review. *Crit Care* 13:1–10.
- Prosch S, Wendt CE, Reinke P, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Krüger DH. 1995. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF $\alpha$  is mediated via induction of NF- $\kappa$ B. *Virology* 208:197–206.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of CMV-specific IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 5:111–124.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. 2010. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8(+) and CD4(+) T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 45:543–549.
- Von Muller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, Hampl W, Mertens T. 2007. Cellular immunity and active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis* 196:1288–1295.
- Ward NS, Casserly B, Ayala A. 2008. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 29:617–625.
- Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, Sester M. 2008. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* 3:e3634.
- Zedtwitz-Liebenstein K, Schenk P, Apfalter P, Fuhrmann V, Stoiser B, Graninger W, Schuster E, Frass M, Burgmann H. 2005. Ventilator-associated pneumonia: Increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution. *Crit Care Med* 33:756–759.
- Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Wulkersdorfer B, Friehs H, Pempelfort SD, Burgmann H, Frass M. 2007. Usefulness of interleukin-10 detection in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection with respect to virus persistence. *Transplantation* 84:268–271.



---

---

### 8.3. Article tercer

*Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. Núñez J, Chilet M, Sanchis J, Bodí V, Núñez E, Miñana G, Tormo N, Clari MA, Pellicer M, Chorro FJ, Llàcer, Navarro D. Clin Sci (Lond). 2010; 119: 443-52.*



# Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure

Julio NÚÑEZ\*, Marifina CHILET†, Juan SANCHIS\*, Vicent BODÍ\*, Eduardo NÚÑEZ\*, Gema MIÑANA\*, Nuria TORMO‡, Maria A. CLARI†, Mauricio PELLICER\*, Francisco J. CHORRO\*, Angel LLÀCER\* and David NAVARRO†‡

\*Cardiology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA, Blasco Ibañez 17, Valencia 46010, Spain, †Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Blasco Ibañez 17, Valencia 46010, Spain, and ‡Department of Microbiology, School of Medicine, Universitat de Valencia, Blasco Ibañez 15, Valencia 46010, Spain

## A B S T R A C T

AHF (acute heart failure) causes significant morbidity and mortality. Recent studies have postulated that the expression of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines, plays an important role in the development and progression of heart failure. A pro-inflammatory state has been postulated as a key factor in triggering CMV (cytomegalovirus) reactivation. Therefore we sought to determine the prevalence of active CMV infection in immunocompetent patients admitted for AHF and to quantify the association with the risk of the combined end point of death or AHF readmission. A total of 132 consecutive patients admitted for AHF were enrolled in the present study. Plasma CMV DNAemia was assessed by qRT-PCR (quantitative real-time PCR), and cytokine measurements in plasma were performed by ELISA. Clinical data were evaluated by personnel blinded to CMV results. The independent association between active CMV infection and the end point was determined by Cox regression analysis. During a median follow-up of 120 [IQR (interquartile range), 60–240] days, 23 (17.4%) deaths, 34 (24.2%) readmissions for AHF and 45 (34.1%) deaths/readmissions for AHF were identified. Plasma CMV DNAemia occurred in 11 (8.3%) patients, albeit at a low level (<100 copies/ml). The cumulative rate of the composite end point was higher in patients with CMV DNAemia (81.8 compared with 29.8%;  $P < 0.001$ ). After adjusting for established risk factors, the occurrence of CMV DNAemia was strongly associated with the clinical end point [hazard ratio = 4.39 (95% confidence interval, 2.02–9.52);  $P < 0.001$ ]. In conclusion, active CMV infection occurs, although uncommonly, in patients with AHF, and may be a marker of disease severity.

## INTRODUCTION

Despite recent therapeutic innovations, advanced HF (heart failure) remains a serious medical condition with morbidity and mortality rates comparable or even higher

than that for most malignancies [1]. Several studies support the involvement of inflammatory pathways in triggering the initiation and favouring the progression of HF [2–4]. In this context, pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ) and IL

**Key words:** acute heart failure, cytomegalovirus infection, inflammation, mortality, risk stratification.

**Abbreviations:** ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CA125, carbohydrate antigen 125; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; DBP diastolic blood pressure; HF, heart failure; AHF, acute HF; HR, hazard ratio; IL, interleukin; IQR, interquartile range; IRR, incidence rate ratio; LVEF, left ventricular ejection fraction; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association; qRT-PCR, quantitative real-time PCR; SBP, systolic blood pressure; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ .

**Correspondence:** Dr Julio Núñez (email yulnunez@gmail.com).

(interleukin)-6, appear to have detrimental effects on cardiac function [2–4]. Nevertheless, the prognostic implication of the inflammatory responses in HF remains unclear. The role of hyperinflammatory states in promoting CMV (cytomegalovirus) reactivation has been highlighted previously [5]. CMV infection causes significant morbidity and mortality in immunocompromised patients not only as a result of virus cytopathogenicity ('direct effects'), but also by virtue of its immunomodulatory properties ('indirect effects') [6]. The latter effects may account for the reported association between CMV infection and chronic allograft rejection in solid organ transplant recipients, particularly transplant-related vasculopathy, whose histopathology remarkably resembles that of atherosclerosis [7]. In line with this, a role for CMV in the pathogenesis of cardiovascular diseases has been postulated [7,8].

Results obtained in the murine CMV model indicate that a pro-inflammatory state is a critical factor in promoting CMV reactivation [5]. In this mechanistic model, TNF- $\alpha$ , a cytokine known to directly stimulate immediate early CMV gene expression *in vitro* [9], may play a pivotal role [10]. In fact, intraperitoneal administration of well-known inflammatory mediators in HF, such as LPS (lipopolysaccharide) and TNF- $\alpha$ , were capable of reactivating CMV from latency in lungs of previously healthy mice [5]. We thus hypothesized that active CMV infection was likely to occur in patients with AHF (acute HF) and that it may have prognostic implications. In the present study, we sought to determine in a cohort of patients with AHF: (i) the prevalence of CMV infection; (ii) whether active CMV infection was associated with an increased risk for the composite end point of short-term all-cause mortality or readmission for AHF and; (iii) whether those patients with an active CMV infection had higher rates of hospitalized-day/weeks of follow-up.

## MATERIALS AND METHODS

### Study group

We prospectively studied a cohort of 138 patients consecutively admitted to the Cardiology Department of Hospital Clínico Universitario de Valencia from 1 November 2008 to 19 May 2009 with the diagnosis of AHF. Diagnosis of AHF was defined as the rapid onset of symptoms and signs secondary to abnormal cardiac function and the presence of objective evidence of structural or functional abnormality of the heart at rest (cardiomegaly, third heart sound, cardiac murmur, abnormality in the echocardiogram or raised natriuretic peptide levels), following current guidelines [11] and established by a trained cardiologist. Exclusion criteria were known or suspected infections, any systemic inflammatory disease different from HF,

immunodeficiency, end-stage renal disease undergoing dialysis, cancer, blood transfusion within 30 days, and the need for mechanical ventilation before blood sampling. A total of 138 patients were initially selected, but six patients were later excluded because of death before blood sampling ( $n=2$ ), a final diagnosis of acute coronary syndrome ( $n=2$ ), pneumonia ( $n=1$ ) and cancer ( $n=1$ ), leaving the study sample to be 132 patients. Demographic information, medical history, vital signs, 12-lead ECG, laboratory data and drug utilization were routinely determined in the Emergency Department and throughout the hospital course following pre-established registry questionnaires. LVEF (left ventricular ejection fraction) was assessed using two-dimensional echocardiography (Agilent Sonos 5500-Phillips) in all patients during index hospitalization.

All patients received intravenous treatment with furosemide at least during the first 48 h of admission. Treatment with ACEIs (angiotensin-converting enzyme inhibitors), ARBs (angiotensin receptor blockers),  $\beta$ -blockers, an aldosterone antagonist, anticoagulants and other therapeutic strategies was individualized following established guidelines [11].

Patients' follow-up was censored if death occurred or if having undergone cardiac transplantation or cardiac valve replacement surgery. The composite of all-cause mortality and readmission for AHF was selected as the main clinical end point. As secondary end point, the cumulative incidence rate of days hospitalized/week of follow-up was compared between those with and without CMV DNAemia.

The study was approved by an institutional review committee and patients gave written informed consent.

### CMV assays

Following an overnight fast, venous blood samples were drawn from the antecubital vein between 08:30 and 09:30 hours with patients resting in the supine position for at least 15 min prior to sampling. IgG and IgM antibodies against CMV were detected by means of a commercial immunoassay (Architect CMV IgG assay; Abbott Diagnostics). CMV DNA load was measured by qRT-PCR (quantitative real-time PCR) with the Abbott CMV PCR kit (produced by Qiagen for Abbott Diagnostics), performed using the m2000RT system (Abbott Molecular) and following the manufacturer's instructions, as described previously [12]. DNA extractions (from 500  $\mu$ l of plasma) were performed using the Abbott mSample preparation system DNA kit on the m2000 SP instrument (Abbott Molecular). The reported limit of detection of the assay [95% CI (confidence interval)] is 25 CMV DNA copies/ml [12]. The assay is, however, able to reliably quantify lower CMV DNA loads (D. Navarro, unpublished work). Specimens with CMV DNA loads

<25 copies/ml were re-assayed using a different aliquot and were regarded as positive if they yielded a reproducible CMV DNA load value. Measurements were performed by a technician blinded to patient diagnosis and evolution.

### Plasma cytokines analysis

Plasma levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-10 were quantified by ELISA using commercially available kits (human IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 ELISA Ready-SET-Go!; eBioscience). The sensitivity claimed by the manufacturer for the different cytokine assays was: 3.0 pg/ml for TNF- $\alpha$ , 4.0 pg/ml for IL-1 $\beta$ , 2 pg/ml for IL-6, and 2.0 pg/ml for IL-10. High-sensitivity ELISAs were used for cytokine measurements in samples giving values below the detection limit in the respective low-sensitivity assay. The concordance between the values obtained in the low-sensitive assay (for those above the detection limit) and those in the high-sensitive assay approached 100%.

### Statistical analysis

Continuous variables are expressed as medians [IQR (interquartile range)]. Discrete variables are presented as numbers (percentages). Baseline characteristics were compared among those patients with and without CMV DNAemia. Using the standard cut-off points, CMV DNAemia was categorized by the presence of >25 copies/ml,  $\leq$ 25 copies/ml or negative (undetectable CMV DNA) results. The composite of mortality/AHF rehospitalization rates was depicted among the CMV DNAemia status using the Kaplan–Meier method, and their differences were tested using the Peto–Peto Prentice test. The independent association between CMV DNAemia categories and the main outcome was assessed with Cox regression analysis. Candidate covariates for the initial multivariable model included all variables listed in Table 1, including cytokines. Then, a reduced and parsimonious model was derived by using the Royston and Altman model-selection algorithm [13]. The final Cox model included the following covariates: previous admission for AHF, SBP (systolic blood pressure) at admission (in mmHg), Charlson co-morbidity index, serum sodium (mmol/l), serum NT-proBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide) (pg/ml) and serum CA125 (carbohydrate antigen 125). The proportionality assumption for the hazard function over time was tested by means of the Schoenfeld residuals. The model's discriminative ability was assessed using the Harrell's C-statistic while its calibration was tested using the Gronnesby and Borgan test [14]. For the secondary analysis, negative binomial regression was used to determine the IRR (incidence rate ratio) of patient's days hospitalized/week of follow-up according to CMV DNAemia status. Independent predictors included in this model were: age, smoking status, last NYHA

(New York Heart Association) class measured under stable conditions, previous admission for AHF, valvular heart disease, anaemia, lymphocyte relative count, CA125, uric acid, TNF- $\alpha$ , LVEF, and treatment with furosemide, espirolactone, statins and inotropic drug support.

A two-sided *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant for all analyses. All analyses were performed using STATA 11 (StataCorp).

## RESULTS

### Prevalence of active CMV infection

A total of 129 patients (97.7%) were CMV IgG-seropositive. A single analysis for the presence of CMV DNA in plasma was performed [median (IQR) of 3 (1–5) days following admission]. CMV DNA was detected in plasma from 11 (8.3%) patients, four of whom had CMV DNAemia levels of >25 copies/ml [median (IQR), 43 (31–72) copies/ml]. Lower CMV DNAemia levels [median (IQR), 10 (6–12) copies/ml] were consistently detected in the remaining seven patients. Six patients (4.6%) tested positive for CMV IgMs, two of whom tested positive for CMV DNAemia. Time to sampling after admission did not differ significantly (*P*=0.656) between patients with or without CMV DNAemia.

### Characteristics of patients across CMV status

The mean age of patients in the sample was 76  $\pm$  13 years; 64 patients (48.5%) were female, 70 (53%) had been admitted previously for AHF and 78 (59.1%) exhibited an LVEF  $\geq$ 45%. Table 1 shows the clinical characteristics of the study population according to the CMV DNAemia status. Patients with active CMV infection more frequently had an LVEF <45%, lower median SBP and DBP (diastolic blood pressure), and a trend towards a higher median serum NT-proBNP levels. Interestingly, no differences were found in age, gender, cardiovascular risk factors, aetiology, presentation, co-morbidity and treatment between the groups.

### Inflammatory status and active CMV infection

Plasma levels of several pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines were measured in patients with (at the time of CMV DNA detection) and without active CMV infection. Patients exhibiting CMV DNAemia had lower median IL-10 values and higher median TNF- $\alpha$ /IL-10 and TNF- $\alpha$ /IL-6 ratios (Table 1). These differences were particularly evident when patients were stratified on the basis of their CMV DNAemia

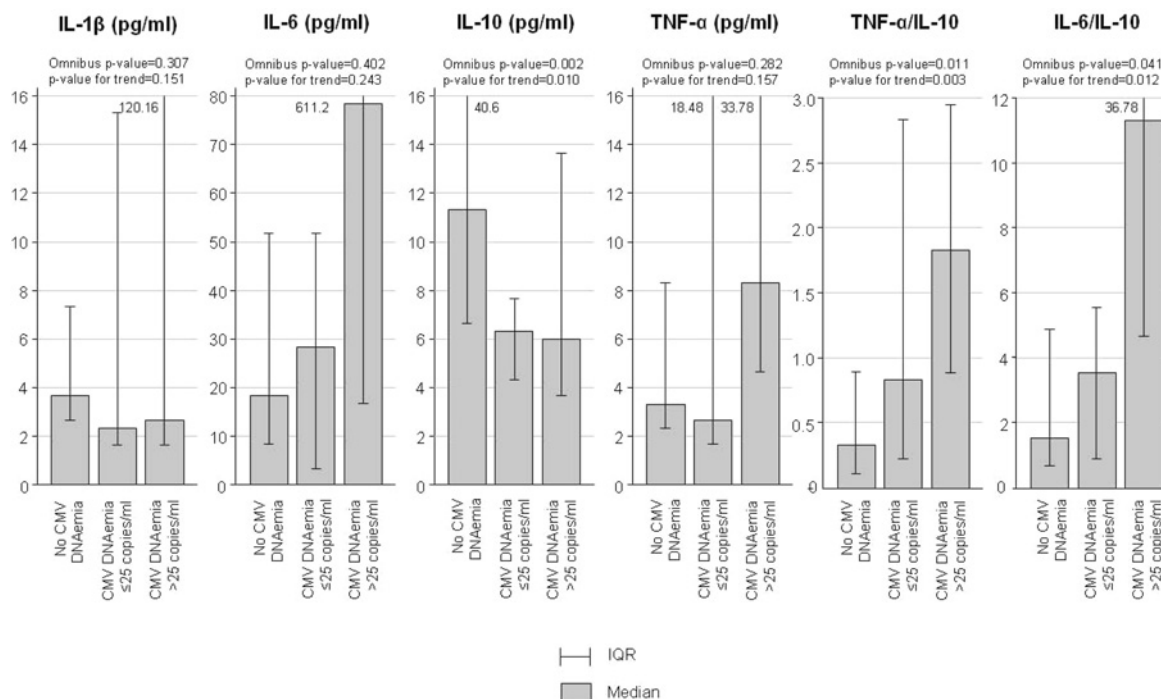
**Table 1** Baseline characteristics stratified by CMV status

Values are expressed as means (IQR), with categorical variables presented as numbers (percentages). \*Last NYHA functional class measured under clinically stable conditions; †NT-proBNP upper quartile; ‡treatment at discharge for patients who survive to index admission or last treatment received for patients who died during the index hospitalization. ADHF, acute decompensate HF; COPD; chronic pulmonary obstructive disease; PAD, peripheral arterial disease; LAD, left atrial diameter; LVDD, left ventricular diastolic diameter; LV mass, left ventricular mass.

|  | CMV DNAemia [ <i>n</i> = 11 (8.3 %)] | No CMV DNAemia [ <i>n</i> = 121 (91.7 %)] | <i>P</i> value |
|--|--------------------------------------|---|----------------|
| <b>Demographic and medical history</b>     |                                      |   |                |
| Age (years)                                | 77 (54–79)                           | 76 (67–81)                                | 0.705          |
| Male gender ( <i>n</i> )                   | 8 (72.7 %)                           | 60 (49.6 %)                               | 0.141          |
| Previous admission for AHF ( <i>n</i> )    | 7 (63.6 %)                           | 63 (52.1 %)                               | 0.462          |
| Hypertension ( <i>n</i> )                  | 8 (72.7 %)                           | 98 (81 %)                                 | 0.509          |
| Dyslipidaemia ( <i>n</i> )                 | 6 (54.5 %)                           | 63 (52.1 %)                               | 0.875          |
| Current smoker ( <i>n</i> )                | 1 (9.1 %)                            | 9 (7.4 %)                                 | 0.843          |
| Diabetes mellitus ( <i>n</i> )             | 8 (72.7 %)                           | 57 (47.1 %)                               | 0.104          |
| Ischaemic heart disease ( <i>n</i> )       | 7 (63.6 %)                           | 45 (37.2 %)                               | 0.086          |
| Valvular heart disease ( <i>n</i> )        | 2 (18.2 %)                           | 40 (33.1 %)                               | 0.310          |
| <i>De novo</i> HF                          | 4 (36.4 %)                           | 51 (42.1 %)                               | 0.709          |
| ADHF ( <i>n</i> )                          | 9 (81.8 %)                           | 88 (72.7 %)                               | 0.513          |
| Acute pulmonary oedema ( <i>n</i> )        | 1 (9.1 %)                            | 24 (19.8 %)                               | 0.384          |
| NYHA class III/IV ( <i>n</i> )*            | 1 (9.1 %)                            | 15 (12.4 %)                               | 0.748          |
| COPD ( <i>n</i> )                          | 1 (9.1 %)                            | 16 (13.2 %)                               | 0.695          |
| Stroke ( <i>n</i> )                        | 0                                    | 14 (11.6 %)                               | 0.233          |
| PAD ( <i>n</i> )                           | 1 (9.1 %)                            | 5 (4.1 %)                                 | 0.450          |
| Radiological pleural effusion ( <i>n</i> ) | 6 (54.5 %)                           | 53 (43.8 %)                               | 0.493          |
| Peripheral oedema ( <i>n</i> )             | 7 (63.6 %)                           | 77 (63.6 %)                               | 1.000          |
| Previous use of                            |                                      |   |                |
| Diuretics ( <i>n</i> )                     | 9 (81.8 %)                           | 74 (61.2 %)                               | 0.174          |
| β-Blockers ( <i>n</i> )                    | 5 (45.5 %)                           | 48 (39.7 %)                               | 0.708          |
| ACEIs/ARBs ( <i>n</i> )                    | 9 (81.8 %)                           | 62 (51.2 %)                               | 0.051          |
| Statins ( <i>n</i> )                       | 4 (36.4 %)                           | 47 (38.8 %)                               | 0.872          |
| <b>Vital signs</b>                         |                                      |   |                |
| Heart rate (beats/min)                     | 90 (90–100)                          | 90 (70–100)                               | 0.504          |
| SBP (mmHg)                                 | 120 (107–154)                        | 140 (120–180)                             | 0.053          |
| DBP (mmHg)                                 | 69 (57–80)                           | 78 (67–90)                                | 0.036          |
| <b>ECG</b>                                 |                                      |   |                |
| Atrial fibrillation ( <i>n</i> )           | 4 (36.4 %)                           | 50 (41.3 %)                               | 0.749          |
| QRS > 120 ms ( <i>n</i> )                  | 3 (27.3 %)                           | 38 (31.4 %)                               | 0.777          |
| <b>Biomarkers</b>                          |                                      |   |                |
| Haemoglobin (g/dl)                         | 11.9 (10.6–12.9)                     | 12 (11.1–13.1)                            | 0.559          |
| Serum creatinine (mg/dl)                   | 1.33 (1–1.64)                        | 1.28 (1.03–1.67)                          | 0.767          |
| Uric acid (mg/dl)                          | 7 (6.3–9.6)                          | 8 (6.5–9.71)                              | 0.249          |
| Sodium (mmol/l)                            | 140 (136–142)                        | 140 (138–142)                             | 0.628          |
| Troponin I (ng/ml)                         | 0.2 (0–1)                            | 0.1 (0–0.3)                               | 0.186          |
| NT-proBNP (pg/ml)                          | 7862 (2040–14996)                    | 3329 (1506–7612)                          | 0.159          |
| NT-proBNP ≥ 8500 pg/ml ( <i>n</i> )†       | 5 (54.4 %)                           | 28 (23.1 %)                               | 0.102          |
| CA125 (units/ml)                           | 104 (22–214)                         | 55.5 (27.7–130.8)                         | 0.294          |
| IL-1β (pg/ml)                              | 2.28 (1.72–15.24)                    | 3.63 (2.51–7.09)                          | 0.124          |
| IL-6 (pg/ml)                               | 27.2 (14.22–141.66)                  | 17.8 (9.41–50.90)                         | 0.390          |
| IL-10 (pg/ml)                              | 6.3 (4.1–7.9)                        | 11.2 (6.4–40.6)                           | 0.005          |
| TNF-α (pg/ml)                              | 6.47 (2.58–18.48)                    | 3.43 (2.34–8.60)                          | 0.281          |
| TNF-α/IL-10                                | 0.83 (0.39–2.85)                     | 0.31 (0.09–0.78)                          | 0.003          |
| IL-6/IL-10                                 | 4.96 (3.29–17.92)                    | 1.4 (0.35–4.88)                           | 0.021          |

**Table 1 Contd.**

|                                  | CMV DNAemia [ <i>n</i> = 11 (8.3%)] | No CMV DNAemia [ <i>n</i> = 121 (91.7%)] | <i>P</i> value |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|----------------|
| <b>Echocardiography</b>          |                                     |  |                |
| LVEF (%)                         | 36 (25–58)                          | 52 (36–61)                               | 0.080          |
| LVEF <45% ( <i>n</i> )           | 8 (72.7%)                           | 46 (38%)                                 | 0.025          |
| LAD (mm)                         | 40 (37–48)                          | 42 (37–49)                               | 0.873          |
| LVDD (mm)                        | 60 (52–64)                          | 53 (49–61)                               | 0.126          |
| Septum (mm)                      | 11 (8–12)                           | 12 (10–13)                               | 0.210          |
| Posterior wall (mm)              | 11 (10–12)                          | 11 (9–12)                                | 0.993          |
| LV mass (g)                      | 255 (209–267)                       | 251 (196–299)                            | 0.869          |
| <b>Medical treatment‡</b>        |                                     |  |                |
| β-Blockers ( <i>n</i> )          | 6 (54.5%)                           | 76 (62.8%)                               | 0.589          |
| Diuretics ( <i>n</i> )           | 9 (81.8%)                           | 114 (94.2%)                              | 0.118          |
| Spironolactone ( <i>n</i> )      | 2 (18.2%)                           | 39 (32.2%)                               | 0.335          |
| ACEIs ( <i>n</i> )               | 4 (36.4%)                           | 47 (38.8%)                               | 0.872          |
| ARBs ( <i>n</i> )                | 2 (18.2%)                           | 35 (28.9%)                               | 0.448          |
| Statins ( <i>n</i> )             | 4 (36.4%)                           | 61 (50.4%)                               | 0.372          |
| Oral anticoagulants ( <i>n</i> ) | 6 (54.5%)                           | 53 (43.8%)                               | 0.493          |
| Nitrates ( <i>n</i> )            | 1 (9.1%)                            | 24 (19.8%)                               | 0.384          |
| Digoxin ( <i>n</i> )             | 0                                   | 25 (20.7%)                               | 0.094          |



**Figure 1 Serum levels of cytokines stratified by CMV DNAemia**

load (i.e. none, ≤25 copies/ml and >25 copies/ml) (Figure 1).

**CMV infection and death/readmission for AHF**

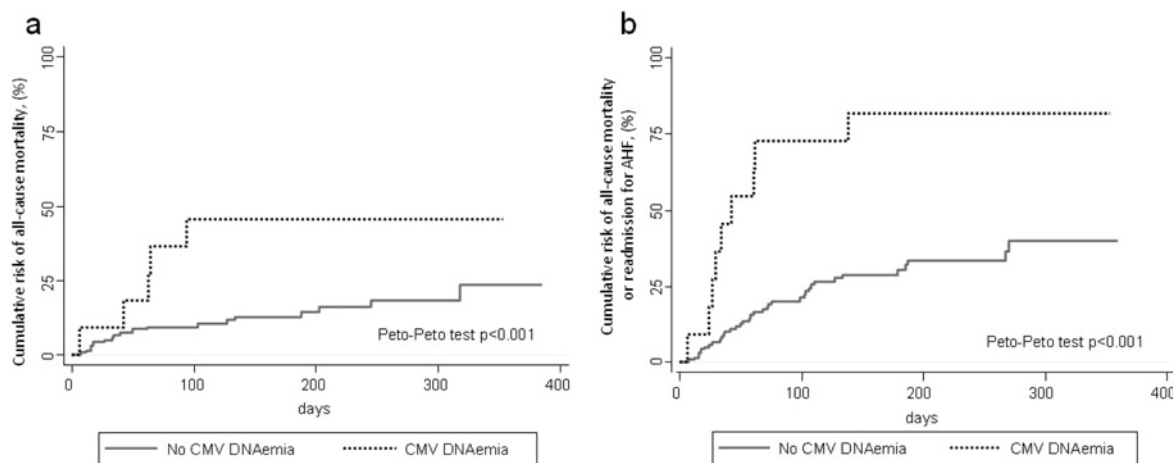
During a median follow-up of 120 days (IQR, 60–240), 23 (17.4%) deaths, 34 (24.2%) readmissions for

AHF and 45 (34.1%) deaths/readmission for AHF were identified. The cumulative rates of death, readmissions for AHF and the composite end point were higher for patients with CMV DNAemia (45.5 compared with 14.9% for rate of death, 63.6 compared with 20.7% for readmissions, and 81.8 compared with 29.8% for the composite end point; *P* < 0.001 for all comparisons)

**Table 2 Characteristics and prognosis of patients with CMV DNAemia**

APE, acute pulmonary embolism; CHD, coronary heart disease; CABG, coronary artery bypass graft surgery; ED, Emergency Department; HMC, hypertensive cardiomyopathy; HR, heart rate.

| Patient number | Age (years) | Gender | Aetiology                           | Clinical features |                |          | NT-proBNP (pg/ml) | CMV DNAemia (copies/ml) | IgM | Evolution  |
|----------------|-------------|--------|-------------------------------------|-------------------|----------------|----------|-------------------|-------------------------|-----|--|
|                |             |        |                                     | SBP/DBP (mmHg)    | HR (beats/min) | LVEF (%) |                   |                         |     |  |
| 1              | 77          | Male   | CHD                                 | 75/40             | 90             | 25       | 14996             | 72                      | +   | In-hospital death for HF on day 6  |
| 2              | 52          | Male   | Severe aortic stenosis; CHD         | 170/80            | 130            | 68       | 648.5             | 10                      | —   | Rehospitalization for AHF on day 24; aortic valve replacement and CABG on day 30; alive on day 281 |
| 3              | 83          | Female | Double mitral severe lesion         | 107/57            | 90             | 74       | 2663              | 50                      | —   | Readmission for AHF on day 23; death from pneumonia on day 93                                      |
| 4              | 42          | Male   | CHD                                 | 120/65            | 100            | 29       | 10291             | 31                      | +   | Readmission for AHF on day 29; HF death on day 64  |
| 5              | 77          | Female | CHD; aortic prosthesis 10 years ago | 120/60            | 90             | 38       | 7862              | 6                       | —   | Readmissions for AHF on days 34 and 298; alive on day 311  |
| 6              | 79          | Male   | CHD                                 | 110/70            | 80             | 18       | 12410             | 36                      | —   | Death from APE in ED on day 42   |
| 7              | 73          | Male   | CHD                                 | 95/50             | 120            | 26       | 4437              | 7                       | —   | Readmission for AHF on day 60; HF death on day 62  |
| 8              | 85          | Male   | HMC                                 | 154/69            | 90             | 58       | 1055              | 6                       | —   | Readmissions for AHF on days 61 and 184; alive on day 284  |
| 9              | 75          | Male   | CHD                                 | 153/85            | 95             | 24       | 21794             | 10                      | —   | Readmissions for AHF on day 138; alive on day 327  |
| 10             | 77          | Male   | CHD                                 | 110/70            | 65             | 41       | 35000             | 11                      | —   | Alive on day 247   |
| 11             | 54          | Female | CHD                                 | 190/100           | 95             | 36       | 2040              | 10                      | —   | CABG on day 21; alive on day 353   |



**Figure 2 Cumulative risk of all-cause mortality stratified by CMV DNAemia (A) and of the composite end point of all-cause mortality and new admission for AHF stratified by CMV DNAemia (B)**

than for those without CMV DNAemia, with tangible differences observed from the first days of follow-up for death (Figure 2a) and the composite end point of all-cause mortality/readmission for AHF (Figures 2b). The detailed medical history and evolution of 11

patients who exhibited CMV DNAemia are shown in Table 2.

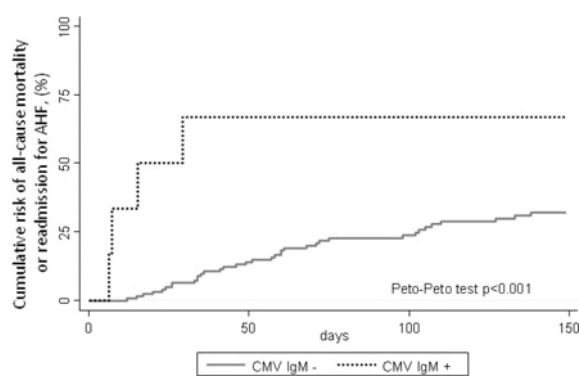
Using a multivariate analysis, after adjusting for established prognostic factors and potential confounders, including previous admission for AHF, SBP, Charlson



**Table 3 HRs for the composite end point (all-cause mortality/readmission for AHF) attributable to the presence of CMV infection**

\*Final multivariate Cox model adjusted by previous admission for AHF, SBP on admission, Charlson co-morbidity index, and serum sodium, NT-proBNP and CA125 levels.

| Model                     | HR (95% CI)       | P value |
|---------------------------|-------------------|---------|
| Unadjusted                |                   |         |
| Detectable CMV DNAemia    | 4.40 (2.11–9.19)  | <0.001  |
| No CMV DNAemia            | 1                 | –       |
| CMV DNAemia ≤25 copies/ml | 2.9 (1.12–7.30)   | 0.028   |
| CMV DNAemia >25 copies/ml | 16.3 (5.26–50.28) | <0.001  |
| Adjusted*                 |                   |         |
| Detectable CMV DNAemia    | 4.39 (2.02–9.52)  | <0.001  |
| No CMV DNAemia            | 1                 | –       |
| CMV DNAemia ≤25 copies/ml | 2.93 (1.11–7.71)  | 0.030   |
| CMV DNAemia >25 copies/ml | 13.6 (3.98–46.6)  | <0.001  |



**Figure 3 Cumulative risk of the composite end point of all-cause mortality and new admission for AHF stratified by presence of CMV IgM**

co-morbidity index, serum sodium, serum NT-proBNP and CA125, the occurrence of CMV DNAemia remained strongly associated with the end point [HR (hazard ratio), 4.39 (95% CI, 2.02–9.52);  $P < 0.001$ ] (Table 3). In a sensitivity analysis, including in the final multivariate model TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 values, independently of their  $P$  value, CMV DNAemia remained associated with the main end point [HR, 4.84 (95% CI, 2.10–11.15);  $P < 0.001$ ].

In addition, a risk gradient was found according to the magnitude of the viral load. Thus, compared with patients with undetectable CMV DNAemia, patients with >25 copies/ml had a prohibitive adjusted increased risk of death or readmission [HR, 13.6 (95% CI, 3.98–46.58);  $P < 0.001$ ], whereas patients with CMV DNAemia of ≤25 copies/ml had an intermediate increased risk [HR, 2.93 (95% CI, 1.11–7.71);  $P < 0.030$ ] (Table 3). It is noteworthy to point out that all patients who displayed CMV DNAemia of >25 copies/ml died within the first

100 days following index admission (one of them died during index admission and in the rest death was preceded by a readmission for AHF) (Table 2).

Likewise, patients with detectable CMV-specific IgMs had an increased risk of the composite end point (Figure 3). This excess of risk attributable to the presence of CMV-specific IgMs remained strongly significant in multivariate analysis, including CMV DNAemia as a variable [HR, 6.91 (95% CI, 1.95–24.5);  $P = 0.003$ ]. As the presence of DNAemia and CMV-specific IgMs yielded similar prognostic and biological importance, combining them into one category led us to identify a subgroup of subjects ( $n = 15$ ) with a very high risk of death/rehospitalization for AHF [HR, 4.70 (95% CI, 2.29–9.61);  $P < 0.001$ ].

Harrell's C-statistics of the multivariate models that included CMV DNAemia either as a binary or three-level variable showed higher discriminative ability (0.787 and 0.789) than the model without it (0.764). The Gronnesby and Borgan test of goodness-of-fit showed a good model calibration ( $P = 0.579$ ).

### CMV and cumulative incidence of hospitalized-day rates

The presence of CMV DNAemia identified a subset of patients with a higher median (IQR) length of stay during the index hospitalization [23 (11) compared with 11 (10) days;  $P < 0.001$ ], cumulative patient's hospitalized-day [42 (24) compared with 15 (18) days;  $P = 0.001$ ] and patient's rates of hospitalized-day/per week of follow-up (1.07 compared with 0.78 days/week of follow-up;  $P = 0.031$ ). Using negative binomial regression, the IRR calculated for the presence of CMV DNAemia was 1.99 (95% CI, 1.04–3.82;  $P = 0.037$ ), an association that remained significant and in the same direction after multivariate adjustment [IRR, 2.40 (95% CI, 1.44–4.02);  $P = 0.001$ ].

### DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study is the first to report that not only active CMV infection occurs in patients with AHF, but also it appears to exert a detrimental effect on prognosis.

It is now widely accepted that activation of the immune system occurs in patients with chronic HF, leading to an inflammatory state that appears to be a determinant in disease progression [2–4,15]. In this sense, serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and soluble TNF-receptors I and II have been shown to correlate with disease stage and progression, and ultimately with a poorer prognosis in chronic HF and AHF [2–4,16,17]. TNF- $\alpha$  has been shown to trigger CMV reactivation from latency at the cellular level [5]. In this context, active CMV infection has been shown to occur frequently in critically

ill patients without canonical immunosuppression [18–20], especially in those with severe sepsis, a biological condition leading to CMV reactivation in a murine CMV model [5]. In this setting, CMV may perpetuate and aggravate the inflammatory state by virtue of its immunomodulatory properties [21,22]. This may account for the reported association between CMV infection and prolonged hospitalization, longer duration of mechanical ventilation, and higher rates of nosocomial infections and overall mortality in this clinical setting [18–20].

On the basis of the above assumptions, we reasoned that active CMV infection was likely to occur in patients with HF, especially during an acute episode. Indeed, we found that CMV DNAemia occurred at a low level (<100 copies/ml) in 8.7% of cases. The above findings are reminiscent of those reported in critically ill patients without canonical immunosuppression experiencing an active CMV infection, in which a rapid expansion of CMV-specific functional T-cells in response to CMV replication keeps systemic CMV load at a low level until complete resolution of the episode [23]. In addition, in our present cohort, the occurrence of CMV DNAemia was independently associated with an increased risk of morbidity and mortality. This association was particularly evident when patients were stratified according to their level of CMV DNAemia, with those displaying CMV DNAemia levels >25 copies/ml being at the highest risk. In fact, the four patients in the upper CMV DNAemia category died during the first 100 days following the index admission. In line with our findings, the magnitude of the CMV DNA load has recently been reported to be independently and quantitatively associated with prolonged hospitalization and death after adjusting for parameters indicative of severity, such as APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) score and other potential confounders, in a cohort of critically ill patients attending different intensive care units [19].

Furthermore, the presence of CMV-specific IgMs, a well-known marker of CMV reactivation in immunocompetent individuals harbouring latent CMV [24], was independently associated with an increased risk of death/readmission for AHF. The possibility exists nevertheless that IgMs detected were not truly CMV-specific [24].

Whether CMV is a direct cause of morbidity and mortality in patients with AHF or is simply a surrogate marker for disease severity could not be elucidated in the present study. CMV may be reactivated in patients with AHF in the setting of a pro-inflammatory state. As an immunomodulatory agent, CMV may enhance inflammation which would result in further myocardial injury [4,15,25–27] or may even increase the risk of secondary infections [22], a well recognized precipitating factor for HF decompensation [11]. The fact that patients with active CMV infection exhibited

an enhanced immunoinflammatory state (higher plasma  $\text{TNF}\alpha$ -/IL-10 and IL-6/IL-10 ratios) when compared with those without active infection provides support to the plausibility of this hypothesis.

Our results, however, must be interpreted with caution. First, this is a preliminary observational study that includes a limited number of patients with AHF. Secondly, despite the strength of the association, the low number of patients with active CMV infection precludes the inference of more precise confidence intervals. Thirdly, as no sequential measurements were performed, peak CMV DNAemia values for some patients may have been missed. Finally, some patients might have been miscategorized due to the intrinsic interassay coefficient of variation of the qRT-PCR used in the present study (estimated to be within 20–30% for low CMV DNA loads).

## Conclusions

The present preliminary study indicates that active CMV infection may occur in immunocompetent patients admitted for AHF, albeit at a low frequency, and that the presence of CMV DNAemia was independently associated with a higher risk of the composite end point of death/readmission for AHF. Further studies are warranted in order to: (i) confirm the presence of active CMV infection in AHF, and (ii) determine whether active CMV infection plays a direct role in the progression of the disease or if it is merely an epiphenomenon linked to the severity of the inflammatory state. Should the results of the present study be confirmed, then patients displaying CMV DNAemia may constitute a subgroup of patients with AHF amenable to be managed aggressively or with specific therapeutic modalities, such as immunomodulation, anti-inflammatory therapies or even antiviral agents.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Julio Núñez conceived and designed the study, collected the data, analysed the database, interpreted the data and prepared the manuscript; Marifina Chilet conceived and designed the study, and interpreted the data and laboratory measurements; Juan Sanchis designed the database, collected the data, analysed the database, interpreted the data and provided a final review of the manuscript; Vicent Bodí analysed the database, interpreted the data, and prepared and provided a final review of the manuscript; Eduardo Núñez analysed the database (statistical expert), interpreted the data and expanded the manuscript; Gema Miñana collected the data (post-discharge follow-up of patients), and prepared and revised the manuscript; Nuria Tormo interpreted the data and laboratory measurements (cytokines and DNA CMV), and reviewed the manuscript; Maria

Clari interpreted the data and laboratory measurements (cytokines and DNA CMV), and revised the manuscript; Mauricio Pellicer collected the data, followed-up the patients, and prepared and reviewed the manuscript; Francisco Chorro collected and interpreted the data, and reviewed the critical issues of the manuscript; Angel Llacer co-ordinated the cardiology group, and prepared and reviewed the manuscript; and David Navarro conceived and designed the study, co-ordinated the microbiology group and reviewed the manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

J.N. had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## FUNDING

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III RED HERACLES (Madrid, Spain) [grant number RD06/0009/1001].

## REFERENCES

- Stewart, S., MacIntyre, K., Hole, D. J., Capewell, S. and McMurray, J. J. (2001) More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur. J. Heart Failure* **3**, 315–322
- von Haehling, S., Schefold, J. C., Lainscak, M., Doehner, W. and Anker, S. D. (2009) Inflammatory biomarkers in heart failure revisited: much more than innocent bystanders. *Heart Failure Clin.* **5**, 549–560
- Yndestad, A., Damås, J. K., Oie, E., Ueland, T., Gullestad, L. and Aukrust, P. (2006) Systemic inflammation in heart failure: the whys and wherefores. *Heart Failure Rev.* **11**, 83–92
- Torre-Amione, G. (2005) Immune activation in chronic heart failure. *Am. J. Cardiol.* **95**, 3C–8C
- Cook, C. H., Trgovcich, J., Zimmerman, P. D., Zhang, Y. and Sedmak, D. D. (2006) Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor  $\alpha$ , or interleukin- $1\beta$  triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J. Virol.* **80**, 9151–9158
- Crough, T. and Khanna, R. (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus infection: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 76–98
- Bruggeman, C. A. (2000) Does cytomegalovirus play a role in atherosclerosis? *Herpes* **7**, 51–54
- Zhu, J., Shearer, G. M., Norman, J. E., Pinto, L. A., Marincola, F. M., Prasad, A., Waclawiw, M. A., Csako, G., Quyyumi, A. A. and Epstein, S. E. (2000) Host response to cytomegalovirus infection as a determinant of susceptibility to coronary artery disease: sex-based differences in inflammation and type of immune response. *Circulation* **102**, 2491–2496
- Prösch, S., Staak, K., Stein, J., Liebenthal, C., Stamminger, T., Volk, H. D. and Krüger, D. H. (1995) Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF- $\alpha$  is mediated via induction of NF- $\kappa$ B. *Virology* **208**, 197–206
- Döcke, W. D., Prösch, S., Fietze, E., Kimel, V., Zuckermann, H., Klug, C., Syrbe, U., Krüger, D. H., von Baehr, R. and Volk, H. D. (1994) Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* **343**, 268–269
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Strömberg, A., van Veldhuisen, D. J., Atar, D., Hoes, A. W. et al. (2008) ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur. J. Heart Failure* **10**, 933–989
- Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernández-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., Furió, S., Calabuig, M., Tormo, N. and Navarro, D. (2008) Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (CMV PCR Kit, Abbott) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of pre-emptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3311–3318
- Royston, P. and Sauerbrei, W. (2008) Multivariable Model-building: a Pragmatic Approach to Regression Analysis Based on Fractional Polynomials for Modelling Continuous Variables, Wiley-Blackwell, Chichester
- May, S. and Hosmer, D. W. (2004) Hosmer and Lemeshow type goodness-of-fit statistics for the Cox proportional hazards model. *Advances in Survival Analysis: Handbook of Statistics*, vol. 23 (Balakrishna, N. and Rao, C. R., eds.), pp. 383–394, Elsevier, Amsterdam
- Fildes, J. E., Shaw, S. M., Yonan, N. and Williams, S. G. (2009) The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1013–1020
- Miettinen, K. H., Lassus, J., Harjola, V. P., Siirilä-Waris, K., Melin, J., Punnonen, K. R., Nieminen, M. S., Laakso, M. and Peuhkurinen, K. J. (2008) Prognostic role of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *Eur. J. Heart Failure* **10**, 396–403
- Chen, D., Assad-Kottner, C., Orrego, C. and Torre-Amione, G. (2008) Cytokines and acute heart failure. *Crit. Care Med.* **36**, S9–S16
- Kalil, A. C. and Florescu, D. F. (2009) Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* **37**, 2350–2358
- Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubenfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., Gibran, N. S., Huang, M. L., Santo Hayes, T. K., Corey, L. and Boeckh, M. (2008) Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **300**, 413–422
- Osawa, R. and Singh, N. (2009) Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Crit. Care* **13**, R68
- Söderberg-Nauclér, C. (2006) Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J. Intern. Med.* **259**, 219–246
- Varani, S., Frascaroli, G., Landini, M. P. and Söderberg-Nauclér, C. (2009) Human cytomegalovirus targets different subsets of antigen-presenting cells with pathological consequences for host immunity: implications for immunosuppression, chronic inflammation and autoimmunity. *Rev. Med. Virol.* **19**, 131–145
- von Müller, L., Klemm, A., Durmus, N., Weiss, M., Suger-Wiedeck, H., Schneider, M., Hampl, W. and Mertens, T. (2007) Cellular immunity and active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J. Infect. Dis.* **196**, 288–295
- Vornhagen, R., Plachter, B., Hinderer, W., The, T. H., Van Zanten, J., Matter, L., Schmidt, C. A., Sonneborn, H. H. and Jahn, G. (1994) Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 981–986
- Lin, L., Kim, S. C., Wang, Y., Gupta, S., Davis, B., Simon, S. I., Torre-Amione, G. and Knowlton, A. A. (2007) HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2238–H2247

- 26 Kim, S. C., Stice, J. P., Chen, L., Jung, J. S., Gupta, S., Wang, Y., Baumgarten, G., Trial, J. and Knowlton, A. A. (2009) Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ. Res.* **105**, 1186–1195
- 27 Bason, C., Corrocher, R., Lunardi, C., Puccetti, P., Olivieri, O., Girelli, D., Navone, R., Beri, R., Millo, E., Margonato, A. et al. (2003) Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* **362**, 1971–1977

Received 15 March 2010/2 June 2010; accepted 24 June 2010  
Published as Immediate Publication 24 June 2010, doi:10.1042/CS20100162

---

---

## 8.4. Article quart

*Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction. Núñez J, Chilet M, Blasco ML, Clari MA, Sanjuan R, Muñoz-Cobo B, Bodí V, Costa E, Bravo D, Sanchis J, Miñana G, Navarro D. Atherosclerosis 2012; 222: 295-7.*





## Letter to the Editor

**Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction**

To the editor,

Inflammation plays a crucial role in the development of cardiovascular diseases. Several lines of clinical, epidemiological and experimental evidences suggest a role for cytomegalovirus (CMV), whose pro-inflammatory properties have been consistently documented [1], in the pathogenesis atherosclerosis, coronary artery restenosis or thrombosis following angioplasty and cardiac allograft vasculopathy [1]. Furthermore, it has been postulated that active CMV infection might be involved in the progression of coronary atherothrombosis and contribute to plaque destabilization, thus precipitating the development of acute myocardial infarction (AMI) [1]. In this context, conflicting data have been published on the incidence of active CMV infection in the clinical setting of acute coronary syndrome [2–5]. To shed light on this issue, we investigated the incidence of plasma CMV DNAemia early following AMI (within 3 days) by means of a highly sensitive real-time PCR assay.

The study population consisted of 86 consecutive CMV-seropositive patients (52 males and 36 females; median age, 66 years; range, 49–75 years) admitted to the coronary unit at the Hospital Clínico Universitario of Valencia between January 14th and July 2nd 2010 with the diagnosis of AMI, following current guidelines [7,8], including both, 38 patients with a non-ST-segment AMI (non-STEMI) and 48 with ST-segment elevation AMI (STEMI). All patients were initially admitted to intensive care unit and pharmacologically treated according to current guidelines [7,8]. The CMV serological testing of the patients was performed using the DiaSorin LIAISON® CMV IgG and IgM assays (DiaSorin, Saluggia, Italy). The plasma CMV DNA load was quantified by real-time PCR (Abbott CMV PCR Kit, Abbott Diagnostics, DesPlaines, Illinois, USA) as previously described [9]. The limit of detection of the assay is approximately 10 copies/mL. CMV DNA load was normalized to IU/mL by using the 1st WHO International Standard for CMV for nucleic acid amplification (NAT)-based assays [10]. Plasma levels of IL-6 were quantified by ELISA using a commercially available kit (ELISA Ready-SET-Go!; eBioscience) as previously described [11]. Active CMV infection was defined by the presence of any level of CMV DNA in plasma. Continuous variables were expressed median [interquartile range (IQR)] and discrete variables were presented as percentages. Baseline characteristics were compared among those patients with and without CMV infection using Fisher exact and Mann-Whitney U-tests. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee. Written informed consent was obtained from all patients.

A single plasma specimen per patient obtained at a median of 1 day (range, 0–3 days) following AMI was tested for the presence of CMV DNA by a real-time PCR assay. Plasma CMV DNAemia was

detected in 5 out of 86 patients (5.81%) at days 0 ( $n=2$ ), 1 ( $n=2$ ) or 3 ( $n=1$ ). CMV DNA loads were of low magnitude in all cases (median 21 IU/mL; range, 20–400 IU/mL). CMV DNAemia was not detected in 68 sera from age and sex-matched immunocompetent individuals (40 males and 28 females; median age, 63 years; range, 46–73 years) with no past or recent history of acute coronary syndrome. There was no significant difference in the prevalence of active CMV infection across the type of AMI (6.2% and 5.3% cases for STEMI and Non-STEMI, respectively). All patients tested negative for CMV IgMs. Univariate analyses revealed (Table 1) that the presence of CMV DNAemia was significantly associated with a higher rate of family history of coronary heart disease, left ventricular ejection fraction (LVEF)  $\leq 40\%$ , and a borderline association with higher incidence of new-onset atrial fibrillation. Involvement of the anterior wall was observed more frequently in patients with active CMV infection than in those without it, although the difference did not reach statistical significance. In addition, the presence of active CMV infection was related to a greater inflammatory response (higher neutrophil and lower lymphocyte counts at admission). Finally, despite the lack of statistical significance, IL-6 level in plasma tended to be of higher magnitude in patients with active CMV (Table 1), particularly when the STEMI patient's group was considered (51.8 pg/mL vs. 13 pg/mL,  $p=0.053$ ).

A possible link between CMV infection and coronary atherothrombosis has been suggested [1,12]. Whether CMV is a contributing factor to initiation and/or progression of coronary arterial disease or simply an innocent by-stander that reactivates locally in the setting of an inflammatory environment [1] remains unknown. Considering the kinetics of CMV replication and clearance during episodes of active CMV infection in immunocompetent individuals [6], we reasoned that had the virus a relevant role in precipitating the occurrence of AMI, then active CMV infection should be consistently detected at the time of myocardial ischemia and shortly thereafter. Plasma CMV DNAemia was found in 5.81% of patients with AMI and in none of the control patients. The latter finding is in accordance with earlier data indicating that CMV DNA is unlikely to be found in cell-free blood specimens from immunocompetent individuals [14]. Our results are in clear contrast to those of Prösch et al. [2] who reported the detection of CMV DNA in PBMCs in 10 out of 10 patients and of CMV antigenemia in PBMCs in 8 out of 10 patients by day 4 following acute MI. It is unclear whether the use of different blood specimens may account for such discrepancy; in this context, it has been shown that CMV DNA can be detected in PBMCs from healthy immunocompetent individuals [13]. The incidence rate of active CMV infection found in the present study is closer to that reported by Gredmark et al. [3], who detected CMV RNA expression in PBMCs by nested RT-PCR assay in 15% of patients with AMI, but again in contrast to those reported by other groups that were unable to detect CMV DNA in monocytes [4] or in PBMCs [5]. The discrepancy between our data and those reported in the latter two studies [4,5] may be

**Table 1**  
Clinical and laboratory characteristics of acute myocardial infarction patients according to the presence or absence of active cytomegalovirus infection.

|   | Active CMV infection (n = 5) | No active CMV infection (n = 81) | p-value |
|---|------------------------------|----------------------------------|---------|
| <b>Baseline characteristics</b>                 |                              |                                  |         |
| Age (years)                                     | 69(62–70)                    | 62(49–75)                        | 0.658   |
| Older than 65 years, n (%)                      | 3(60)                        | 35(43.2)                         | 0.651   |
| Gender (male), n (%)                            | 4(80)                        | 58(71.6)                         | 1       |
| Hypertension, n (%)                             | 5(100)                       | 47(58.7)                         | 0.151   |
| Dyslipidemia, n (%)                             | 4(80)                        | 32(40)                           | 0.158   |
| Current smoker, n (%)                           | 1(20)                        | 44(55)                           | 0.183   |
| Previous smoker, n (%)                          | 1(20)                        | 16(20)                           | 1       |
| Diabetes mellitus, n (%)                        | 3(60)                        | 22(27.2)                         | 0.145   |
| Family CHD, n (%)                               | 2(40)                        | 4(4.9)                           | 0.037   |
| Previous CHD, n (%)                             | 0                            | 16(19.7)                         | 0.579   |
| Chronic renal disease, n (%)                    | 0                            | 11(13.6)                         | 1       |
| Stroke, n (%)                                   | 0                            | 4(5)                             | 1       |
| COPD, n (%)                                     | 0                            | 9(11.1)                          | 1       |
| Peripheral artery disease, n (%)                | 1(20)                        | 6(7.4)                           | 0.353   |
| Previous use of aspirin, n (%)                  | 1(20)                        | 18(22.2)                         | 1       |
| STEMI, n (%)                                    | 3(60)                        | 45(55.6)                         | 1       |
| Non-STEMI, n (%)                                | 2(40)                        | 36(44.4)                         | 1       |
| Killip > 2, n (%)                               | 1(20)                        | 20(24.7)                         | 1       |
| Anterior wall involvement, n (%)                | 4(80%)                       | 43(53.1%)                        | 0.371   |
| Atrial fibrillation, n (%)                      | 2(40)                        | 5(6.2)                           | 0.051   |
| <b>Vital signs</b>                              |                              |                                  |         |
| SBP (mmHg)                                      | 120(75–140)                  | 134(102–164)                     | 0.283   |
| DBP (mmHg)                                      | 70(50–80)                    | 77(62–90)                        | 0.353   |
| Heart rate (bpm)                                | 80(75–81)                    | 75(64–90)                        | 0.735   |
| <b>Echocardiography</b>                         |                              |                                  |         |
| LVEF (%)  | 40(35–57)                    | 56(44–62)                        | 0.240   |
| LVEF ≤ 40%, n (%)                               | 3(60)                        | 9(11.1)                          | 0.018   |
| LVDD (mm)                                       | 52(51–55)                    | 52(46–59)                        | 0.650   |
| Septum (mm)                                     | 10.5(9–11)                   | 12(10–12.5)                      | 0.093   |
| Posterior wall (mm)                             | 9(8.5–10)                    | 11(10–11.5)                      | 0.070   |
| <b>Laboratory</b>                               |                              |                                  |         |
| Creatinine (mg/dL)                              | 1.16(0.99–1.27)              | 1.04(0.87–1.26)                  | 0.346   |
| Hemoglobin (g/dL)                               | 13.5(13.4–14.1)              | 13.5(12.3–14.5)                  | 0.993   |
| Troponin I (ng/mL)                              | 15.8(7.3–73)                 | 28.9(10.1–72)                    | 0.755   |
| WBC count (10 <sup>3</sup> cells/mL)            | 14,000(8900–17,800)          | 9900(8300–12,700)                | 0.112   |
| Neutrophils (10 <sup>3</sup> cells/mL)          | 11,900(7100–15,400)          | 6900(5100–9600)                  | 0.040   |
| Neutrophils (%)                                 | 85(79.8–86.5)                | 71.8(62.2–78.5)                  | 0.009   |
| Lymphocytes (10 <sup>3</sup> cells/mL)          | 1360(1190–1380)              | 1790(1270–2590)                  | 0.048   |
| Lymphocytes (%)                                 | 9.7(7.7–12.4)                | 18(13.6–25.7)                    | 0.006   |
| Monocytes (10 <sup>3</sup> cells/mL)            | 710(480–820)                 | 520(430–650)                     | 0.181   |
| Monocytes (%)                                   | 5.2(4.6–5.4)                 | 5.6(4.4–6.3)                     | 0.678   |
| IL-6 (pg/mL)                                    | 48.2(45–51.8)                | 13.4(6.6–35.1)                   | 0.181   |
| <b>In-hospital revascularization procedures</b> |                              |                                  |         |
| In-hospital coronariography, n (%)              | 5(100)                       | 73(90.1)                         | 1       |
| † Left main artery disease, n (%)               | 1(20)                        | 7(9.6)                           | 0.427   |
| †‡ 3 vessel disease, n (%)                      | 0                            | 8(11)                            | 1       |
| In-hospital PCI, n (%)                          | 4(80)                        | 48(59.3)                         | 0.644   |
| In-hospital CABG, n (%)                         | 0                            | 11(13.6)                         | 1       |
| In-hospital revascularization, n (%)            | 4(80)                        | 58(71.6)                         | 1       |
| <b>Medications prescribed at discharge</b>      |                              |                                  |         |
| Aspirin, n (%)                                  | 5(100)                       | 77(95.1)                         | 1       |
| Beta-blockers, n (%)                            | 3(60)                        | 59(72.8)                         | 0.616   |
| Calcium-channel blockers, n (%)                 | 0                            | 15(20.3)                         | 0.577   |
| ACEI, n (%)                                     | 2(40)                        | 33(44.6)                         | 1       |
| ARB, n (%)                                      | 2(40)                        | 22(29.7)                         | 0.637   |
| Nitrates, n (%)                                 | 0                            | 13(17.6)                         | 0.584   |
| Diuretics, n (%)                                | 3(60)                        | 22(29.7)                         | 0.319   |
| Statins, n (%)                                  | 5(100)                       | 66(89.2)                         | 1       |

CMV: cytomegalovirus; CHD: coronary heart disease; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; STEMI: ST-segment elevation acute myocardial infarction; Non-STEMI: non ST-segment elevation acute myocardial infarction; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; LVEF: left ventricular ejection fraction as assessed with two-dimensional echocardiography in all patients during index hospitalization; LVDD: left ventricular diastolic diameter; WBC: white blood cells; IL-6: interleukin 6; PCI: percutaneous coronary intervention; CABG: coronary artery bypass surgery; ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitors; and ARB: angiotensin II receptor blockers. Values are expressed as median (interquartile range), or n (%).

† Data available in patients in which a coronary angiography was performed. Coronary angiography was performed during the index hospitalization in 90.7% (n = 78) of the sample at a mean of 96 ± 48 h after patient admission.

due to the higher sensitivity of the PCR assay employed in the current study. In the present work we found that the presence of CMV DNAemia was associated with a worse AMI risk profile. In this context, it has been shown that the proinflammatory cytokine

IL-6 can potentiate heart damage during AMI [15]. We found that plasma IL-6 levels were higher in AMI patients with CMV DNAemia than in those without it, although the difference was not statistically significant. Our data are in keeping with those



published by Gredmark et al. [3] and may account for the fact that STEMI patients developing plasma CMV DNAemia had a worse cardiac function following AMI. In summary, our data are against a consistent implication of CMV in precipitating the occurrence of coronary ischemia in a non-selected group of patients with AMI; nevertheless, the data favor the idea that systemic CMV replication may aggravate the clinical prognosis of AMI. The present study has two main limitations; first, the sample size was too scarce to draw significant conclusions and second it lacked an appropriate control group consisting of patients with stable or unstable angina not developing acute myocardial infarction. The data presented herein are preliminary, thus further studies are warranted in order to confirm the above findings and elucidate the pathogenic role of CMV infection in patients with coronary artery diseases.

### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### References

- [1] Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2008;259:219–46.
- [2] Prösch S, Wendt CE, Reinke P, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000;272:357–65.
- [3] Gredmark S, Jonasson L, Van Gosliga D, Ernerudh J, Söderberg-Nauclér C. Active cytomegalovirus replication in patients with coronary disease. *Scand Cardiovasc J* 2007;41:230–4.
- [4] Borgia MC, Mandolini C, Barresi C, et al. Further evidence against the implication of active cytomegalovirus infection in vascular atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2001;157:457–62.
- [5] Schlitt A, Blankenberg S, Weise K, et al. Herpesvirus DNA (Epstein-Barr virus, herpes simplex virus, cytomegalovirus) in circulating monocytes of patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2005;60:605–10.
- [6] Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* 1999;190:177–82.
- [7] Van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29:2909–45.
- [8] Rapezzi C, Biagini E, Branzi A. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the task force for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29:277–8.
- [9] Bravo D, Clari MA, Costa E, et al. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2011;49:2899–904.
- [10] Fryer JF, Heath AB, Anderson R, et al. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.
- [11] Núñez J, Chilet M, Sanchis J, et al. Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:443–52.
- [12] Burnett MS, Gaydos CA, Madico GE, et al. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. *J Infect Dis* 2001;183:226–31.
- [13] Larsson S, Söderberg-Nauclér C, Wang FZ, Möller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 1998;38:271–8.
- [14] Roback JD, Drew L, Laycock M, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion* 2003;43:314–21.
- [15] Debrunner M, Schuiki E, Minder E, et al. Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol* 2008;97:298–305.

Julio Núñez  
Cardiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Marifina Chilet  
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Maria L. Blasco  
Intensive Care Unit, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

María A. Clari  
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Rafael Sanjuan  
Intensive Care Unit, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Beatriz Muñoz-Cobo  
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Vicent Bodí  
Cardiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Elisa Costa  
Dayana Bravo  
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

Juan Sanchis  
Gema Miñana  
Cardiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain

David Navarro<sup>a,b,\*</sup>  
<sup>a</sup> Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario,  
Valencia, Spain  
<sup>b</sup> Department of Microbiology, School of Medicine,  
University of Valencia, Valencia, Spain

\* Corresponding author at: Microbiology Service,  
Hospital Clínico Universitario, and Department of  
Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco  
Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96  
3864657; fax: +34 96 3864173.  
E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro)

17 January 2012  
Available online 21 February 2012



---

---

## 8.5. Article cinquè

*Frequent detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in the lower respiratory tract in CMV-seropositive pediatric patients with underlying chronic bronchopulmonary diseases lacking canonical immunosuppression. Escribano A, Chilet M, Clari MA, Lucas R, Costa E, Bravo D, Muñoz-Cobo B, Borrás R, Navarro D. J Med Virol 2013; 85: 888-92.*



# Frequent Detection of Cytomegalovirus (CMV) DNA in the Lower Respiratory Tract in CMV-Seropositive Pediatric Patients With Underlying Chronic Bronchopulmonary Diseases Lacking Canonical Immunosuppression

Amparo Escribano,<sup>1</sup> Marifina Chilet,<sup>2</sup> María Ángeles Clari,<sup>2</sup> Raquel Lucas,<sup>1</sup> Elisa Costa,<sup>2</sup> Dayana Bravo,<sup>2</sup> Beatriz Muñoz-Cobo,<sup>2</sup> Rafael Borrás,<sup>2,3</sup> and David Navarro<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Cytomegalovirus (CMV) may be a relevant cause of morbidity in patients displaying various inflammatory diseases. In this study, it was investigated whether CMV DNA is detected in the lower respiratory tract and the systemic compartment in pediatric patients with chronic or recurrent bronchopulmonary diseases. A total of 42 lower respiratory tract specimens and 11 paired plasma samples from 42 patients were analyzed for the presence of CMV DNA by real-time PCR. The respiratory specimens were also screened for the presence of respiratory viruses and human herpesvirus 6 (HHV-6) and 7 (HHV-7) by PCR methods. Quantitative bacterial and fungal cultures were performed. IL-6 levels in the respiratory specimens were quantified using ELISA. CMV DNA was detected either in the lower respiratory airways, in plasma, or both in 54.5% of CMV-seropositive patients. The levels of IL-6 were significantly higher in these patients than in those with no detectable levels of CMV DNA. HHV-6 and HHV-7 DNA were detected in three and one patients, respectively. Respiratory viruses were detected in 13 of the 42 patients. Significant growth of one or more bacterial species was observed in 17 patients. No significant association was found between the presence of CMV DNA and the detection of other microorganisms. The data indicated that the presence of CMV DNA in the lower respiratory tract is a frequent finding in children with chronic or recurrent bronchopulmonary diseases. Further, prospective observational studies are needed to assess the impact of this phenomenon, if any, on the clinical course of these patients. **J. Med. Virol.** 85:888–892, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** cytomegalovirus; children; bronchopulmonary diseases; respiratory viruses; IL-6; human herpesvirus-6

## INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is a leading cause of morbidity and mortality in severely immunosuppressed patients, such as those undergoing allogeneic hematopoietic stem cell or solid organ transplantation [Solano and Navarro, 2010]. Nevertheless, recent data suggest that CMV may also be a relevant cause of morbidity in patients lacking canonical immunosuppression and displaying various inflammatory processes, including cardiovascular, autoimmune, and chronic bowel diseases [Söderberg-Nauclér, 2008; Núñez et al., 2010, 2012]. In these patients, active CMV infection is detected frequently in either the inflamed tissues or even the blood compartment. Furthermore, active CMV infection, either restricted to the lower respiratory tract or involving both the lower respiratory airways and the systemic compartment, has been shown to occur frequently during critically illness in adult CMV-seropositive patients

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

\*Correspondence to: David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario Valencia, Spain; Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Accepted 19 November 2012

DOI 10.1002/jmv.23499

Published online 13 February 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

[Chilet et al., 2010; Blanquer et al., 2011], and has been associated with prolonged intensive care unit hospitalization, extended periods of mechanical ventilation, higher rates of nosocomial infection, and overall mortality [for review, see Kalil and Florescu, 2009]. From a pathogenetic perspective, data obtained in the murine CMV model indicate that a pro-inflammatory state is a critical factor in promoting CMV replication [Cook et al., 2002], and that TNF- $\alpha$ , a cytokine known to transactivate the expression of CMV immediate-early genes, plays a critical role in triggering CMV reactivation [Prösch et al., 1995]. In this context, active CMV infection may occur in pediatric patients with chronic or recurrent bronchopulmonary diseases in which inflammation plays potentially a major pathogenic role. The current study was undertaken to investigate this hypothesis.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and Specimens

A total of 42 lower respiratory tract specimens (bronchoaspirate,  $n = 22$ ; bronchoalveolar lavage,  $n = 19$ ; tracheal aspirate,  $n = 1$ ) and 11 paired plasma samples from 42 children (22 females and 20 males; median age, 4 years old; range, 6 months to 18 years old) attended at the Pneumology, Unit of the University Clinic Hospital of Valencia were analyzed. Patients had a previous history of chronic/recurrent lower tract respiratory symptoms and/or persistent/recurrent radiographic abnormalities (infiltrates, a telecystic, or air trapping images). Fibrobronchoscopies were performed between May 2009 and July 2011, either for primary diagnosis, for diagnosis re-evaluation in patients responding unsatisfactorily to conventional therapies or as a complementary diagnostic procedure or for assessing the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with negative sputum cultures after a 1-year-long course of antibiotic therapy, according to local protocols. No patient had acute upper or lower respiratory tract signs or symptoms at the time of the fibrobronchoscopy. The patients had the following underlying bronchopulmonary conditions: atelectasis rounded or middle lobe syndrome ( $n = 14$ ), cystic fibrosis ( $n = 11$ ), bronchiectasis ( $n = 5$ ), chronic asthma not responding to conventional treatments ( $n = 3$ ), tracheomalacia ( $n = 3$ ), bronchiolitis obliterans ( $n = 2$ ), chronic interstitial pneumopathy ( $n = 2$ ), bronchopulmonary dysplasia ( $n = 1$ ), or bronchial hypoplasia ( $n = 1$ ). All patients lacked a known cause of immunosuppression.

The lower respiratory tract specimens were processed using conventional quantitative bacterial and fungal cultures. Growths of  $\geq 10^4$  or  $\geq 10^5$  CFU/ml of bacterial or fungal species in bronchoaspirates or bronchoalveolar lavages respectively were considered significant. Microbial identification was accomplished by conventional procedures. For some patients, molecular detection of respiratory viruses was also performed shortly after fibrobronchoscopy. Bronchoalveolar lavages

and bronchial or tracheal aspirates pre-treated with 0.1% dithiothreitol (in the ratio of 2 ml to 1 g bronchoaspirate) were vortexed and centrifuged at 462g for 5 min at 4°C to pellet the cells. Cell supernatants were stored at -20°C and were retrieved for further molecular analyses and cytokine measurements. Serum specimens for the assessment of CMV-serostatus were available from 26 patients. These specimens were obtained either prior to, or at the time of, fibrobronchoscopy. Sera were frozen at -20°C and retrieved for serological testing.

This study conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee. Written informed consent was obtained from parents.

### Molecular Analyses

CMV DNA load was quantified by real-time PCR with an Abbott CMV PCR kit (produced by Qiagen GmbH, Hilden, Germany, for Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), as previously described [Gimeno et al., 2008; Chilet et al., 2010; Bravo et al., 2011]. This assay is able to reliably quantify CMV DNA loads of  $>10$  copies/ml [Chilet et al., 2010]. DNA extractions were performed from a volume of 500  $\mu$ l (plasma, or lower respiratory tract specimens) using an Abbott mSample preparation system DNA kit on an m24 SP instrument (Abbott Molecular, IL). Detection and quantification of human herpesvirus-6 (HHV-6) and human herpesvirus-7 (HHV-7) was performed in respiratory specimens by real-time PCR (Realquality RS-HHV6 and RS-HHV7; AB Analitica, Padova, Italy). The detection limit of these assays is approximately 25 copies/ml. DNA was extracted from respiratory specimens (400  $\mu$ l) using an EZ1 Virus 2.0 kit (Qiagen, Valencia, CA) on the BioRobot EZ1 extraction platform (Qiagen), following the manufacturers' instructions.

Detection of respiratory viruses was performed by multiplex PCR using an RVP Fast assay (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada), following the manufacturer's instructions. The analysis was performed using an xMAP 100 IS instrument (Luminex Molecular Diagnostics). The RVP Fast assay simultaneously detects: influenza A virus, H1, H3, or H5 subtypes; influenza B virus; RSV-A and -B; PIV-1, -2, -3, and -4; adenovirus; human metapneumovirus; coronaviruses 229E, NL63, OC43, and HKU1; enterovirus/rhinovirus; and human bocavirus. Nucleic acid extractions were performed on 400  $\mu$ l respiratory samples with an EZ-1 virus 2.0 Kit on a BioRobot EZ-1.

### Cytokine Measurements

A commercial capture immunoassay was used to quantify IL-6 in respiratory specimens (Human IL-6 ELISA Ready-set Go; eBioscience, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions. For bronchoalveolar lavage specimens, epithelial lining fluid volume was calculated using urea as a dilution

marker [Zedtwitz-Liebenstein et al., 2005]. The detection limit of this assay is 2 pg/ml.

### CMV Serological Testing

CMV IgGs were detected using a DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> CMV IgG assay (DiaSorin, Saluggia, Italy).

### Statistical Analysis

The data were analyzed with the aid of the SPSS statistical package, version 17.0 (SPSS, North Chicago, IL). Comparisons were undertaken using the  $\chi^2$ -test for categorical variables and the non-parametric Mann-Whitney *U*-test for unpaired continuous data. Two-sided exact *P* values are presented. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Detection of CMV DNA in the Lower Respiratory Tract and in Plasma

Eleven patients were CMV-seropositive at the time of fibrobronchoscopy, 15 were CMV-seronegative, and the CMV-serostatus of 15 was unknown. The presence of CMV DNA in the lower respiratory tract specimens was assessed for all patients. It was detected in six of the 11 (54.5%) CMV-seropositive patients (median, 258 copies/ml; range, 27–815 copies/ml), and in none of the remaining patients. The presence of CMV DNA in the blood compartment (plasma) was investigated exclusively in CMV-seropositive patients. Plasma CMV DNAemia was detected in two patients (18.8%). In both these patients, CMV DNA was also detected in the lower respiratory tract. Clinical and microbiological features of these patients are shown in Table I. It is noteworthy that two of the three patients with cystic fibrosis who were CMV-seropositive at the time of fibrobronchoscopy had CMV DNA detected in their lower respiratory tract. Despite the fact that five of the six patients with CMV DNA detected in the lower respiratory tract were under corticosteroid treatment at the time of fibrobronchoscopy (Fluticasone), no

significant association was found between the use of corticosteroids and the detection of CMV DNA (*P* = 0.435).

### Microbiological Features of Patients With or Without Detectable CMV DNA

A comprehensive microbiological analysis of the lower respiratory tract specimens from the patients was performed. The presence of respiratory viruses was investigated by multiplex PCR, while the occurrence of common bacterial and fungal species was assessed by conventional culture methods. Respiratory viruses were detected in 13 of the 42 patients (rhinovirus, *n* = 6; respiratory syncytial virus, *n* = 2; bocavirus, *n* = 2; metapneumovirus, *n* = 1; coronaviruses HKN1, *n* = 1; and adenovirus, *n* = 1). Two of these 13 patients tested positive for CMV DNA in the lower respiratory tract. Significant growth of one or more bacterial species was observed in 17 of the 42 patients (*Haemophilus influenzae* biotypes VIII or III, *n* = 7; *Staphylococcus aureus*, *n* = 5; *Streptococcus pneumoniae*, *n* = 3; *Moraxella catharralis*, *n* = 2; *Pseudomonas aeruginosa*, *n* = 1; and *Achromobacter xylosoxidans*, *n* = 1). *Candida parapsilosis* was isolated from three patients. Two out of the six patients with detectable CMV DNA had a positive bacterial culture. No significant correlation (*P* = > 0.5) was found between the presence of CMV DNA infection and that of respiratory viruses, or bacterial or fungal species, either when all patients were considered collectively, irrespective of their CMV serostatus, or when the subgroup of CMV-seropositive patients was analyzed separately.

### Detection of Other Beta-Herpesviruses in the Lower Respiratory Tract

The presence of HHV-6 and HHV-7 DNA in the lower respiratory tract was assessed in the 11 CMV-seropositive patients. HHV-6 DNA was detected in three patients (35, 52, and 2,350 copies/ml), two of which had CMV DNA present in the lower respiratory

TABLE I. Clinical and Microbiological Data of Six Cytomegalovirus (CMV)-Seropositive Patients With CMV DNA Detected in the Lower Respiratory Tract

| Underlying disease       | CMV/HHV-6 DNA in LRT copies/ml <sup>a</sup> | CMV DNA in plasma copies/ml | Respiratory viruses <sup>b</sup> | Bacterial and fungal cultures <sup>c</sup> |
|--------------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|--|
| Cystic fibrosis          | 334/2,350                                   | ND <sup>d</sup>             | ND                               | <i>S. aureus</i>                           |
| Atelectasis              | 182/ND                                      | 123                         | ND                               | Negative                                   |
| Cystic fibrosis          | 27/126                                      | ND                          | Rhinovirus                       | <i>S. aureus</i>                           |
| Atelectasis              | 425/ND                                      | 18                          | ND                               | Negative                                   |
| Bronchiolitis obliterans | 69/ND                                       | ND                          | ND                               | Negative                                   |
| Atelectasis              | 1,285/ND                                    | ND                          | Bocavirus                        | Negative                                   |

<sup>a</sup>CMV DNA load was quantitated by real-time PCR with the Abbott CMV PCR kit. Detection and quantitation of human herpesvirus-6 was performed by real-time PCR (Realquality RS-HHV6; AB Analytica, Padova, Italy).

<sup>b</sup>Detection of respiratory viruses was performed by multiplex PCR using the RVP Fast assay (Luminex Molecular Diagnostics Inc., Toronto, Canada).

<sup>c</sup>Growth of  $\geq 10^4$  or  $\geq 10^5$  CFU/ml of bacterial or fungal species in bronchoaspirates or bronchoalveolar lavages respectively was considered significant.

<sup>d</sup>Not detected.

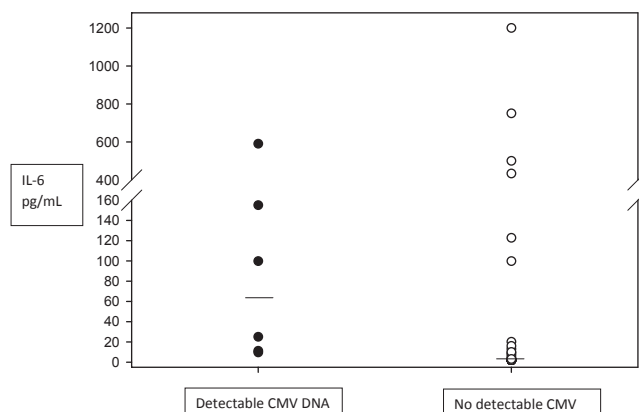


Fig. 1. IL-6 levels (pg/ml) in the lower respiratory tract of patients with or without detectable CMV DNA, as determined by a commercial capture immunoassay. Bars represent median values.

tract. HHV-7 DNA was detected in one patient (408 copies/ml) who had no CMV DNA detected in the lower respiratory tract.

#### IL-6 Levels in the Lower Respiratory Tract in Patients With or Without Detectable CMV DNA

IL-6 has been shown to be a reliable marker of inflammation of the lower respiratory airways. The level of IL-6 in lower respiratory tract specimens was quantified for all 42 patients. As shown in Figure 1, significantly higher levels of IL-6 ( $P = 0.001$ ) were found in patients with detectable CMV DNA (median, 99.8 pg/ml; range, 9.6–590 pg/ml) compared to patients without it (median, <2 pg/ml; range, <2–1,200 pg/ml). No differences in IL-6 levels were found between CMV-seropositive patients with no detectable CMV DNA and patients known to be CMV-seronegative ( $P = 0.34$ ).

#### DISCUSSION

Active CMV infection is known to occur frequently in adult patients lacking canonical immunosuppression with inflammatory diseases, and may lead to increased morbidity [Söderberg-Nauclér, 2008]. The current study investigated whether CMV DNA was detectable in the lower respiratory tract or plasma in children with various underlying bronchopulmonary diseases characterized by the presence of a chronic or recurrent inflammation of the lower respiratory airways.

Overall, CMV DNA was detected in the lower respiratory tract of 14.2% patients. However, this percentage increased to 54.6% when only patients known to be CMV-seropositive at the time of fibrobronchoscopy were considered. As the lungs are a major site of CMV latency [Cook et al., 2002], it would be interesting to know the rate of CMV DNA detection in the lower respiratory tract in healthy CMV-seropositive children; It is highly unlikely though this being as high as that found in this study. Involvement of the systemic compartment was demonstrated in two of the six patients

with detectable CMV DNA in the lower respiratory tract. Low CMV DNA loads were usually observed in both compartments. The above scenario resembles that seen in critically ill patients subjected to mechanical ventilation. In these patients, it was demonstrated that a rapid expansion of CMV-specific functional CD8<sup>+</sup> T cells occurs upon CMV reactivation, keeping viral loads at low levels in both compartments and eventually controlling the episode [Chilet et al., 2010; Blanquer et al., 2011].

Particularly noteworthy, was the discovery that CMV DNA was detectable in the lower respiratory tract in two of three CMV-seropositive cystic fibrosis patients. The levels of IL-6 in the lower respiratory tract were significantly higher in patients with detectable CMV DNA than in those without it, further supporting the possibility of a bidirectional pathogenic relationship between CMV and inflammation [Söderberg-Nauclér, 2008].

HHV-6 replication was also detected in the lower respiratory tract in 50% of patients with active CMV infection. In turn, active HHV-7 infection was detected in 1 out of the 11 CMV-seropositive patients. This is consistent with the assumption that pro-inflammatory states also may trigger reactivation of other beta-herpes viruses which may in turn result in an increase in the net inflammatory state in the lower respiratory tract [Flamand et al., 2010].

As a part of the routine systematic analysis of the lower tract specimens from these patients, PCR analyses were performed to detect respiratory viruses, in addition to conventional bacterial and fungal cultures. Despite the stable clinical condition of the patients at the time of fibrobronchoscopy, respiratory viruses were detected in almost one-third of the patients. Although contamination with viruses present in the upper respiratory tract could not be formally excluded, this feature is consistent with either a delayed clearance of a recent acute viral infection episode or with a persistent viral infection of the lower respiratory airways. The plausibility of the latter explanation is supported by data obtained in experimental animal models, and also in humans for respiratory syncytial virus, rhinovirus, and human metapneumovirus infections [Schwarze et al., 2004; Liu et al., 2009]. Persistent replication of these viruses in the lower respiratory tract induces inflammation [Papadopoulos et al., 2000], and may thereby promote local CMV reactivation. In turn, CMV may also potentiate respiratory virus replication in the lower respiratory tract by virtue of its immunosuppressive capacity [Solano and Navarro, 2010]. Nevertheless, no significant association was found between the presence of CMV DNA in the lower respiratory tract and the occurrence of respiratory viruses. Likewise, the occurrence of active CMV infection in critically ill patients has been related to an increased incidence of bacterial and fungal super infection [Jaber et al., 2005; Chiche et al., 2009]. The current investigation also found no association between the presence of CMV DNA in the lower



respiratory tract and the occurrence of bacterial or fungal species. However, this study was not specifically designed to investigate these potential pathogenic interactions, and so no definitive conclusions may be drawn on this issue.

The current study had several limitations. Firstly, this was a cross-sectional study with a limited sample size. Secondly, it included a highly heterogeneous cohort. Thirdly, given its retrospective nature, the CMV-serostatus was unknown for a large number of patients. Fourthly, although cell supernatants were used for PCR analyses, the possibility that the detection of CMV DNA reflected a latent rather than an active viral infection in some patients, specially those with low CMV DNA loads, could not be formally ruled out, as neither detection of viral mRNA nor inoculation of conventional cell cultures for recovery of live virus were performed. Nevertheless, the data reported warrant further prospective observational studies to confirm the findings presented, explore the possibility of the existence of pathogenetic interactions between CMV, HHV-6, and respiratory viruses, or bacterial and fungal species, colonizing the lower respiratory airways of these patients and assess the potential impact of CMV replication in the lower respiratory tract on the clinical course and outcome of the patients. In light of the data presented, children with cystic fibrosis should be the primary focus of these studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julia García, Matilde Pastor, and Mónica Reig for their technical assistance.

#### REFERENCES

- Blanquer J, Chilet M, Benet I, Aguilar G, Muñoz-Cobo B, Tellez A, Costa E, Bravo D, Navarro D. 2011. Immunological insights into the pathogenesis of active CMV infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Med Virol* 83:1966–1971.
- Bravo D, Clari MA, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, José Remigia M, Navarro D. 2011. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 49:2899–2904.
- Chiche L, Forel JM, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J, Gannier M, Zandotti C, Papazian L. 2009. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* 37:1850–1857.
- Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. 2010. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol* 82:1384–1391.
- Cook CH, Zhang Y, McGuinness BJ, Lahm MC, Sedmak DD, Ferguson RM. 2002. Intra-abdominal infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Infect Dis* 185:1395–1400.
- Flamand L, Komaroff AL, Arbuckle JH, Medveczky PG, Ablashi DV. 2010. Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. *J Med Virol* 82:1560–1568.
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (CMV PCR Kit, Abbott) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of pre-emptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 46:3311–3318.
- Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault PF, Eledjam JJ. 2005. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: Associated factors and consequences. *Chest* 127:233–241.
- Kalil AC, Florescu DF. 2009. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 37:2350–2358.
- Liu Y, Haas DL, Poore S, Isakovic S, Gahan M, Mahalingam S, Fu ZF, Tripp RA. 2009. Human metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment. *J Virol* 83:6837–6848.
- Núñez J, Chilet M, Sanchis J, Bodí V, Núñez E, Miñana G, Tormo N, Clari MA, Pellicer M, Chorro FJ, Llàcer A, Navarro D. 2010. Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. *Clin Sci (Lond)* 119:443–452.
- Núñez J, Chilet M, Blasco ML, Clari MA, Sanjuan R, Muñoz-Cobo B, Bodí V, Costa E, Bravo D, Sanchis J, Miñana G, Navarro D. 2012. Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 222:295–297.
- Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. 2000. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 181:1875–1884.
- Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Krüger DH. 1995. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF alpha is mediated via induction of NF-KappaB. *Virology* 208:197–206.
- Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJ. 2004. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 169:801–805.
- Söderberg-Nauclér C. 2008. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 41:218–223.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 5:111–124.
- Zedtwitz-Liebenstein K, Schenk P, Apfalter P, Fuhrmann V, Stoiser B, Graninger W, Schuster E, Frass M, Burgmann H. 2005. Ventilator-associated pneumonia: Increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution. *Crit Care Med* 33:756–769.



## 9. Resultats

Si atenem a un ordre cronològic dels resultats, s'exposen a continuació les dades obtingudes en els cinc articles presentants.

### Article primer

Van ser examinades un total de 204 mostres de 53 pacients per tal de detectar la presència de DNA de CMV. Dels 53 pacients, 21 (39,7%) van experimentar un episodi d'infecció activa per CMV durant l'estada a l'UCI, 5 dels quals (23%) presentaren una replicació de CMV restringida al tracte respiratori. Les dades clíniques i demogràfiques dels pacients, amb o sense infecció activa per CMV es mostren a la Taula I. En un terç dels casos, la detecció de DNA de CMV en l'AT va precedir a la del PL en una mitjana de 7 dies.

Les dades virològiques dels episodis d'infecció activa per CMV es mostren a la Taula II. La mitjana de temps de la primera detecció de la infecció activa per CMV després de l'ingrés va ser de 12 dies. La resolució de la infecció activa per CMV es va documentar en 10 dels 21 episodis en absència de tractament antiviral (mitjana de durada dels episodis de 22 dies). En la resta dels 11 episodis, el DNA de CMV seguia sent detectable tant en AT, PL, o ambdós, en el moment en que els pacients rebien l'alta en l'UCI (n = 2) o morien (n = 9). L'aclariment de la DNAèmia va precedir a la desaparició del DNA de CMV en l'AT en un 35% dels episodis controlats.

En general, la càrrega viral del CMV en AT i PL es va correlacionar significativament però, en alguns pacients, es va observar durant el seguiment, la presència d'altres càrregues de DNA de CMV en AT (>1.000 còpies/mL) en presència de qualsevol nivell (baix o indetectable) de DNAèmia en plasma. Els nivells inicials i el pic de càrrega de DNA de CMV durant els episodis d'infecció activa per CMV va ser significativament més elevats en AT que en PL. Les càrregues màximes de DNA de CMV en AT o PL dels pacients que van morir no van ser significativament diferents de les mesures en els pacients que van sobreviure.

La mitjana dels nivells de TNF- $\alpha$  en plasma, mesurats poc després de l'ingrés en l'UCI, en els pacients sense infecció activa per CMV no va ser significativament diferent de la

---

---

quantificada en els pacients amb una infecció activa per CMV prèvia a l'ocurrència de l'episodi (mitjana de 3 i 4 dies després de l'ingrés en l'UCI, respectivament). A més, no es van trobar nivells significativament més alts de TNF- $\alpha$  durant els episodis d'infecció activa per CMV que en absència d'ells i tampoc no es va observar un augment significatiu dels nivells de TNF- $\alpha$  en plasma després de la reactivació del CMV en alguns casos. Els resultats es mostren a la Taula III.

La informació immunològica només va estar disponible per a 18 pacients, a causa de problemes logístics: 9 experimentaren un episodi d'infecció activa per CMV i 9 no ho van fer (Taula III i IV). En general, els pacients amb una replicació en curs de CMV tenien nivells significativament més alts, dels dos subconjunts de cèl·lules T, que els pacients sense infecció activa per CMV. Les dades immunològiques seqüencials dels pacients que experimenten un episodi d'infecció activa per CMV es mostren a la Taula IV. La Infecció activa per CMV es va desenvolupar tot i la presència detectable de cèl·lules T CMV-específiques poc després de l'ingrés a l'UCI. De fet, no es va trobar correlació significativa entre els nivells de DNA de CMV (en qualsevol de les mostres) i els nivells perifèrics de cèl·lules T CD8+ o cèl·lules T CD4+ productores d'IFN- $\gamma$ . En tres dels quatre episodis que es van resoldre durant l'estudi es pogué demostrar una notable expansió dels dos subgrups de cèl·lules T CMV-específiques durant el seu seguiment.

La taxa de mortalitat global va ser major en els pacients amb infecció activa per CMV que en aquells sense, encara que la significació estadística no es va assolir. L'estada a l'UCI va ser significativament major per als primers pacients que per als segons.

## Article segon

El primer pacient estudiat ingressa a l'UCI amb un diagnòstic presumptiu d'hemorràgia alveolar difusa i s'inicia teràpia amb corticosteroides durant un període de 5 dies. El pacient va presentar diversos episodis de bacterièmia, fungèmia, pneumònia associada a ventilació mecànica a causa de *Klebsiella pneumoniae* i xoc sèptic, els quals van requerir canvis en la teràpia antimicrobiana. Es va confirmar el diagnòstic durant l'hospitalització a l'UCI i el pacient va morir per fallada orgànica multisistèmica en el dia 202 després de l'ingrés en aquesta Unitat.

La detecció de DNA de CMV per PCR en el TRI i en plasma es va sol·licitar per primera vegada el dia 21 després de l'ingrés. En el dia 27, un augment en la càrrega de DNA de CMV va mostrar un primer episodi d'infecció activa pel CMV. Un episodi recurrent es va desenvolupar el dia 89, el qual va semblar notablement restringit al TRI. Un tercer episodi d'infecció activa per CMV es va detectar en el dia 181. Tots tres, van requerir de teràpia amb ganciclovir. No es va observar una relació evident entre l'aparició d'infeccions nosocomials i la càrrega de DNA de CMV en el TRI i en el PL.

Els nivells d'IL-6 van ser significativament majors en mostres del TRI que en les mostres de PL. No obstant això, no es va trobar una correlació significativa entre les càrregues de DNA de CMV i els nivells d'IL-6 en el TRI i en el PL. Es van trobar nivells significativament més alts d'IL-10 en mostres del TRI en comparació amb el PL en els tres episodis de reactivació del CMV d'aquest pacient. La diferència va ser major durant el segon episodi d'infecció activa per CMV, en el qual les càrregues de DNA de CMV en el TRI i en el PL van ser notablement dissociades. A més, en absència de tractament antiviral, es va trobar una correlació significativa entre els nivells d'IL-10 i la càrrega viral del CMV en les mostres del TRI però no en les mostres de PL.

Les característiques virològiques i immunològiques referents als sis pacients CMV-seropositius sense immunosupressió canònica, estudiats també en aquest treball, es mostren a la Taula II. En 4 dels 6 pacients estudiats, els episodis d'infecció activa pel CMV que es van desenvolupar van ser clarament dissociats, amb els màxims nivells de DNA de CMV en el TRI significativament majors que els trobats en PL. En general, es va trobar una correlació significativa entre els nivells d'IL-10 i les càrregues de DNA de CMV en mostres del TRI però no en les mostres de PL.

## Article tercer

Un total de 129 pacients (97,7%) presentaven seropositivitat per a IgG de CMV. El DNA de CMV es va detectar en el plasma d'11 (8,3%) pacients, quatre d'ells amb nivells de DNAèmia per CMV major de 25 còpies/mL, i sis pacients (4,6%) amb IgM+ de CMV, dos dels quals van presentar DNAèmia per CMV. El temps de mostreig després de l'ingrés no va diferir significativament entre els pacients amb o sense DNAèmia per CMV. La Taula 1 mostra les característiques clíniques de la població d'estudi en funció de l'estat de la DNAèmia per CMV. Els pacients amb infecció activa per CMV presentaren amb més freqüència una FEVE < 45%, una mitjana de PAS i PAD més baixa, i una tendència cap a una major mitjana dels nivells de NT-proBNP en sèrum. Curiosament però, no es van trobar diferències entre els grups relacionades amb l'edat, el sexe, els factors de risc cardiovascular, l' etiologia, la presentació, la comorbiditat i el tractament.

Els pacients que presentaven DNAèmia per CMV tenien menors valors de mitjana d'IL-10 i majors raons de mitjana de TNF- $\alpha$ /IL-10 i TNF- $\alpha$ /IL-6 (Taula 1). Aquestes diferències van ser particularment evidents quan els pacients es van classificar en funció de la seva càrrega de DNAèmia per CMV (Figura 1). Es van identificar 23 (17,4%) morts, 34 (24,2%) reingressos per ICA i 45 (34,1%) morts i/o reingressos per ICA durant una mitjana de 120 dies de seguiment. Les taxes acumulatives de mort, de reingrés per ICA i, en combinació, van ser majors per als pacients amb DNAèmia per CMV que per als que no la presentaven, amb diferències tangibles observades des dels primers dies de seguiment (figura 2a i 2b). La història clínica detallada i l'evolució dels 11 pacients que presentaven DNAèmia per CMV es mostren a la Taula 2.

En l'anàlisi multivariant, després d'ajustar factors de risc, incloent TNF- $\alpha$ , IL-6 i els valors d'IL-10, la DNAèmia per CMV es va mantenir associada amb l'objectiu principal. A més, es va trobar un gradient de risc d'acord amb la magnitud de la càrrega viral. Tots els pacients que mostraren DNAèmia per CMV >25 còpies/mL van morir dins dels primers 100 dies posteriors a l'ingrés inicial (Taula 2). Tant la presència d'IgM de CMV com la DNAèmia per CMV mostren una importància pronòstica i biològica similar, i al combinar-les en una sola categoria vam identificar un subgrup de subjectes amb un risc molt elevat de mort i/o reingrés per ICA. La presència de DNAèmia per CMV va identificar un subgrup de pacients amb una mitjana més alta (IQR) de durada de l'hospitalització inicial (dies d'ingrés) i de les taxes dels dies d'hospitalització per setmana de seguiment dels pacients.

## Article quart

La DNAèmia per CMV en plasma va ser detectada en 5 dels 86 pacients (5,81%) en els dies 0 (n = 2), 1 (n = 2) o 3 (n = 1). Les càrregues de DNA de CMV van ser baixes en tots els casos. No hi va haver diferència significativa en la prevalença de la infecció activa pel CMV entre els tipus d'IAM (6,2% i 5,3% per als casos de STEMI i no-STEMI, respectivament). La determinació d'IgM de CMV va resultar negativa en tots el pacients estudiats. L'anàlisi univariant va revelar que la presència de DNAèmia per CMV es va associar significativament amb uns índex més alts d'història familiar de malaltia cardíaca coronària, amb una FEVE  $\leq$  40%, i una associació *borderline* amb una major incidència de fibril·lació auricular de nova aparició (Taula 1). A més, la presència d'infecció activa pel CMV es va relacionar amb una major resposta inflamatòria a l'ingrés. En general, els nivells d'IL-6 en el plasma tendiren a ser més elevats en els pacients amb infecció activa pel CMV que en els pacients sense però, aquesta diferència no va assolir significació estadística.

---

## Article cinquè

La presència de DNA de CMV en el TRI es va detectar en sis dels 11 (54,5%) pacients CMV-seropositius. La DNAèmia per CMV es va observar en dos pacients (18,8%), el quals també presentaren DNA de CMV en el TRI. Les característiques clíniques i microbiològiques d'aquests pacients es mostren a la Taula I. Cal destacar que dos dels tres pacients amb Fibrosi Quística estudiats, presentaren DNA de CMV en el TRI. En general, no es va trobar associació significativa entre l'ús de corticoides i la presència d'infecció activa pel CMV. Es va realitzar una anàlisi microbiològica completa de les mostres del TRI de tots els pacients. Els virus respiratoris es van detectar en 13 dels 42 pacients, dos dels quals van resultar positius per a DNA de CMV en el TRI. Es va observar un creixement significatiu d'una o més espècies de bacteris en 17 pacients. El DNA de HHV-6 i HHV-7 es va detectar en tres i un pacient respectivament. No es va trobar una correlació significativa entre la presència d'infecció pel CMV i la dels virus respiratoris, espècies bacterianes o fúngiques, quan tots els pacients van ser considerats col·lectivament amb independència del seu estat serològic per a CMV, ni quan el subgrup de pacients seropositius per a CMV es va analitzar per separat.

Finalment, es van trobar nivells significativament majors d'IL-6 en els pacients amb DNA de CMV detectable, en comparació amb els pacients sense. No hi va haver diferències en els nivells d'IL-6 que es van trobar entre els pacients CMV-seropositius sense DNA de CMV detectable i els pacients amb seronegativitat coneguda per a CMV.



## 10. Discussió conjunta

En el primer dels treballs de recerca de la present tesi (Article primer) varem estudiar els aspectes virològics i immunològics durant el curs natural de la infecció activa pel citomegalovirus (CMV) en una cohort de pacients quirúrgics i traumatològics en estat crític atesos en una UCI. Resumidament, obtinguérem la següent informació:

1- La reactivació del CMV va ser diagnosticada en aproximadament un 25% dels pacients únicament basant-nos en la presència de DNA de CMV en AT, la qual cosa indica que el control de la presència del CMV en el compartiment sanguini podria subestimar la incidència real d'infecció activa pel CMV en pacients crítics

2- Les dades van indicar que l'anàlisi de mostres del TRI per detectar la presència de DNA de CMV, pot ser més adient que l'anàlisi del plasma per tal d'aconseguir el diagnòstic precoç d'un episodi d'infecció activa pel CMV i per demostrar la seva resolució

3- En alguns pacients, es van detectar altes càrregues de DNA de CMV en AT davant qualsevol nivell (baix o indetectable) de DNAèmia per CMV, el que suggereix que la cinètica de replicació o aclariment del CMV en els pulmons pot diferir del compartiment de sanguini

4- La presència d'alts nivells perifèrics de cèl·lules T funcionals específiques de CMV podria explicar per què la majoria dels pacients van mostrar baixes càrregues de DNAèmia per CMV i, finalment, aconseguiren el control de la replicació del CMV en absència de teràpia antiviral

5- La necessitat de seguir estudiant amb profunditat, les diferències intercompartimentals en la funcionalitat de les cèl·lules T específiques de CMV observades, per demostrar que el seguiment immunològic dels nivells sanguinis de les cèl·lules T específiques de CMV no sempre proporcionaria una estimació precisa del grau de immunocompetència davant CMV en el microambient pulmonar

6- La reactivació del CMV no va donar lloc a un augment mesurable en els nivells plasmàtics de TNF- $\alpha$ . Aquestes dades però, no descarten la participació patogènica d'aquesta

7- No s'ha pogut trobar una associació entre el pic de càrrega viral del CMV (AT i/o PL) i la mortalitat.

La literatura publicada en els últims anys posa en relleu la incidència i rellevància clínica de la infecció activa pel CMV en els pacients crítics sense immunosupressió canònica [Chiche et al., 2009; Cook et al., 1998; Cook et al., 2003; Domart et al., 1990; Heiningner et al., 2001; Jaber et al., 2005; Kalil i Florescu, 2009; Kutza et al., 1998; Limaye et al., 2008; Osawa i Singh, 2009; Stephan et al., 1996; von Müller et al., 2006; Ziemann et al., 2008]. No obstant això, poc se sap sobre el curs natural de la reactivació del CMV en aquest context clínic.

En el nostre primer treball, els pacients es van examinar de forma seqüencial per detectar la presència del CMV en AT i PL mitjançant una qPCR en temps real d'alta sensibilitat, en base a estudis previs realitzats en el model de CMVM, els quals indiquen que els pulmons són un lloc important de reactivació del CMV sota condicions clíniques anàlogues a les que mostren la majoria dels pacients de la nostra sèrie [Cook et al., 2002, 2006a, 2006b]. Fins on sabem, cap estudi anterior va utilitzar una prova de PCR quantitativa per a la monitorització de la infecció per CMV en el tracte respiratori inferior.

La infecció activa pel CMV s'ha produït a una alta freqüència (al voltant del 40%) en la nostra cohort a diferència d'estudis anteriors on, la taxa global d'infecció sistèmica pel CMV va ser del 20%, utilitzant com a mètode de control una PCR qualitativa o l'assaig d'antigenèmia pp65 [Kalil i Florescu, 2009; Osawa i Singh, 2009], o d'altre, amb una incidència del 38% usant una qPCR [Limaye et al., 2008]. En la nostra sèrie, als pacients sense evidència d'infecció activa per CMV, només se'ls va fer seguiment durant una mitjana d'11 dies per dues raons: els pacients reberen l'alta de l'UCI o moriren. Tenint en compte que en els pacients amb infecció activa pel CMV, el primer resultat positiu de PCR apareix amb una mitjana de 12 dies després de l'ingrés, és probable que aquest percentatge poguera haver sigut encara major si aquests pacients hagueren romangut a l'UCI durant un període de temps més llarg. Al nostre parer, dues raons principals expliquen l'alta taxa d'infecció activa pel CMV que s'observa en la nostra cohort. En primer lloc, l'extrema sensibilitat del mètode de PCR utilitzat, i en segon lloc, l'ús de mostres respiratòries per al control de la infecció. En aquest context, la reactivació de CMV va ser diagnosticada en aproximadament un 25% dels pacients únicament basant-nos en la presència de DNA de CMV en AT, la qual cosa indica que el control de la presència de CMV en el compartiment sanguini podria subestimar la incidència real d'infecció activa per CMV en pacients crítics. En aproximadament un terç dels casos, el DNA de CMV es va detectar primerament en AT que en PL, i la resolució de la infecció activa

per CMV es va produir a les 2-3 setmanes, d'acord amb una estimació anterior [Limaye et al., 2008]. No obstant això, l'aclariment de la DNAèmia per CMV va precedir a la desaparició del DNA de CMV en AT. Així doncs, les dades van indicar que l'anàlisi de mostres del TRI per detectar la presència de DNA de CMV pot ser més adient que l'anàlisi del PL per aconseguir el diagnòstic precoç d'un episodi d'infecció activa pel CMV i demostrar la seva resolució.

Curiosament, en alguns pacients, les altes càrregues de DNA de CMV es van detectar en AT davant qualsevol nivell (baix o indetectable) de DNAèmia per CMV, el que suggereix que la cinètica de replicació del CMV o aclariment per CMV en els pulmons pot diferir del compartiment sanguini. En la majoria dels pacients, es van observar baixos nivells de DNAèmia per CMV, d'acord amb estudis previs [Kalil i Florescu, 2009; Osawa i Singh, 2009].

En un estudi anterior [von Müller et al., 2007], es va demostrar que la infecció activa per CMV pot ocórrer en pacients amb xoc sèptic, tot i la detecció de precursors de cèl·lules T CMV-específiques en sang, el que suggereix que la reactivació per CMV no està desencadenada principalment per la immunosupressió de les cèl·lules T. Les nostres dades n'estan d'acord, i estenen les seves observacions als pacients amb condicions clíniques diferents del xoc sèptic. En efecte, la infecció activa per CMV es va desenvolupar en els pacients amb nivells perifèrics de cèl·lules T CMV-específiques comparables als dels pacients que no van experimentar reactivació durant l'estada a l'UCI. Es trobaren recomptes més alts de cèl·lules dels dos subconjunts de cèl·lules T en pacients amb la replicació del CMV en curs que en pacients sense infecció activa pel CMV, fet que probablement reflecteix la presència d'una expansió clonal de cèl·lules T activades, impulsades per CMV en aquests pacients. En aquest sentit, l'expansió dels dos subconjunts de cèl·lules T sotmesos a anàlisi es va poder demostrar en tres dels quatre episodis. La presència d'alts nivells perifèrics de les cèl·lules T funcionals específiques de CMV pot explicar per què la majoria dels pacients mostraren càrregues baixes de DNAèmia per CMV i, finalment, aconseguiren el control de la replicació del CMV en absència de teràpia antiviral. Curiosament però, es van observar respostes no detectables de cèl·lules T CMV-específiques en dos pacients que mostraren altes càrregues de DNAèmia per CMV (>500 còpies/mL, valors per sobre del llindar per a la iniciació de la teràpia anticipada amb antivirals en els receptors de trasplantament de cèl·lules mare al·logèniques) [Gimeno et al., 2008]. Aquests pacients no van rebre altes dosis d'esteroides i van morir poc després.

Es va observar una clara dissociació dels nivells de DNA de CMV en AT i PL davant elevats nivells de cèl·lules T perifèriques CMV-específiques (Pacients 3 i 8, Taula III). Seria interessant determinar si les diferències intercompartimentals en la funcionalitat de les

cèl·lules T específiques de CMV es produeixen en aquest entorn. Si això fóra veritat, llavors el seguiment immunològic dels nivells sanguinis de les cèl·lules T específiques de CMV no sempre proporcionaria una estimació precisa del grau d'immunocompetència davant CMV en el microambient pulmonar.

La base molecular de la infecció activa per CMV en els pacients seropositius per CMV en estat crític és en gran part desconeguda, encara que les dades obtingudes en el model murí [Cook et al., 2002, 2006] i en humans [Prösch et al., 1995; von Müller et al., 2007] suggereixen que un estat pro-inflamatori impulsat per una malaltia primària condueix a la reactivació del CMV i que el TNF- $\alpha$ , una citocina coneguda per estimular directament l'expressió gènica del IE del CMV *in vitro* [Prösch et al., 1995], pot exercir un paper fonamental [Döcke et al., 1994]. A més, el CMV humà pot causar l'expressió pulmonar anormal de TNF- $\alpha$ , com s'ha mostrat en el model murí [Forster et al., 2009], el que resulta en la lesió pulmonar. En els nostres pacients, hem trobat alts nivells de TNF- $\alpha$  en plasma, independentment de la seva condició clínica però, la predicció del desenvolupament de la infecció activa pel CMV no es podria fer basant-nos en els nivells de TNF- $\alpha$  en plasma, mesurats poc després d'ingressar a l'UCI. En contrast amb una publicació anterior [Kutza et al., 1998], trobem que la reactivació del CMV no va donar lloc a un increment mesurable d'aquesta citocina en el plasma. Aquestes dades però, no descarten la participació patogènica de TNF- $\alpha$ . Altres factors com ara, la càrrega de CMV latent en els pulmons (o d'un altre teixit o de les mucoses) podrien determinar el risc individual de desenvolupar la reactivació del CMV [Cook, 2007].

Davant els resultats obtinguts, en el segon treball de recerca (Article segon), com una extensió del primer, es va caracteritzar la resposta immunològica i virològica específica per a CMV, en pacients crítics atesos en l'UCI en el context d'un estat pro-inflamatori.

Si tenim en compte els aspectes immunològics, el primer pacient estudiat va presentar una hemorràgia alveolar difusa, una condició inflamatòria que com a tal, podria haver provocat la reactivació del CMV en el pacient [Collard i Schwarz, 2004]. Per tal d'avaluar aquesta hipòtesi, es van mesurar els nivells d'IL-6, citocina pleiotròpica implicada en mecanismes d'immunitat innata impulsats per una infecció o inflamació, i com hem comentat als resultats, els nivells d'IL-6 van ser alts durant tot el període d'estudi i significativament majors en mostres del TRI. No obstant això, no es va trobar correlació significativa entre les càrregues de DNA de CMV i la IL-6 en el TRI ni en el PL. Així doncs, les dades indicaren, que els successius episodis d'infecció activa pel CMV que va patir aquest pacient (un total de 3) es

van desenvolupar en el marc d'un estat pro-inflamatori, que va ser clarament major en l'entorn de les vies respiratòries inferiors.

Recordem que amb el primer treball presentat, hem demostrat que la dissociació de càrregues de DNA de CMV entre el TRI i el PL, s'observa sovint en pacients d'UCI que mostren nivells de cèl·lules T CD8+ i CD4+ CMV-específiques, comparables als trobats en individus sans immunocompetents (>1 cèl·lules/mL). Per tant, aquest fenomen pot estar relacionat amb diferències intercompartimentals, tant en els nivells com en la funcionalitat d'aquestes cèl·lules T específiques de CMV.

Seguint aquesta hipòtesi, observarem el que ocorria en el pacient actual:

1- Tots els episodis actius d'infecció pel CMV que va patir aquest pacient es dissociaren i el segon, va resultar el més clarament dissociat.

2- La càrrega màxima de DNA de CMV en el PL durant el primer episodi era notablement alta (29.573 còpies/mL). En la nostra experiència, les càrregues de DNA de CMV en plasma de pacients de l'UCI amb infecció activa pel CMV poques vegades solen estar per damunt de les 500 còpies/mL en presència de >1 cèl·lula/ $\mu$ L de cèl·lules T CD8+ i CD4+ productores de IFN- $\gamma$  CMV-específiques en sang perifèrica.

3- Els recomptes dels dos subconjunts de cèl·lules T en el moment del pic de replicació de CMV van ser molt inferiors als mesurats en individus sans immunocompetents (Taula I). El que més probablement justifique la troballa anterior, és el fet que el pacient estava sent tractat amb altes dosis de corticosteroides abans de l'episodi de CMV, i estava sota teràpia de manteniment amb esteroides en el moment de la infecció activa per CMV, ja que com és ben sabut, la teràpia amb esteroides està associada amb un efecte deleteri dosi-dependent sobre la funcionalitat de les cèl·lules T [Hakki et al., 2003; Widmann et al., 2008].

4- Es va observar una forta expansió dels dos subconjunts de cèl·lules T en associació amb l'aclariment de DNA de CMV tant en el TRI com en el PL. Sorprenentment, els dos episodis recurrents d'infecció activa pel CMV en aquest pacient es van desenvolupar davant elevats nivells dels dos subconjunts de cèl·lules T CMV-específiques.

Si retornem als aspectes immunològics, cal destacar que la IL-10 és una citocina que suprimeix la resposta immune inflamatòria a través d'una àmplia varietat de mecanismes moleculars [Jinquan et al., 1993; Mosmann, 1994], suggestiva d'exercir un efecte directe sobre la replicació del CMV segons publicacions prèvies [Brockman et al., 2009; Cervera et al., 2007; Humphreys et al., 2007; Jones et al., 2010; Krishnan et al., 2010; Nordøy et al., 2000; Zedtwitz-Liebenstein et al., 2007]. En aquest context, sorgeix la hipòtesi que els nivells d'IL-10 en el

nostre pacient podrien haver sigut significativament majors en el TRI que en el plasma durant el curs dels episodis dissociats de la infecció activa pel CMV. La presència d'alts nivells d'IL-10 en el TRI podrien haver conduït a una major atenuació de la resposta de les cèl·lules T CMV-específiques en el microambient pulmonar en comparació amb el compartiment sistèmic. Per tal de comprovar-ho, mesurarem la IL-10 en mostres del TRI i en el PL d'aquest malalt. També es va mesurar IL-10 en mostres d'AT i PL en el curs de una infecció activa pel CMV de sis pacients seropositius per a CMV amb sèpsia severa o xoc sèptic atesos en l'UCI.

En general, es va trobar una correlació significativa entre nivells d'IL-10 i la càrrega viral del CMV en mostres del TRI però no en les de PL.

Per tant, la presència de nivells dissociats d'IL-10 en el TRI i el compartiment sistèmic pot haver estat el resultat de la implicació de diversos factors:

1- fortes respostes anti-inflamatòries compensatòries a nivell local provocades per la lesió pulmonar [Ward et al., 2008]

2- síntesi local impulsada directament per la replicació del CMV o, induïda pel creixement excessiu de bacteris en el TRI lligat a ventilació mecànica a través d'interaccions amb receptors Toll-like [Oberg et al., 2011].

Totes aquestes possibilitats queden pendents d'estudis addicionals.

L'Article tercer, és des del nostre coneixement, el primer estudi en informar que no només la infecció activa pel CMV es presenta en pacients amb insuficiència cardíaca aguda (ICA), sinó també sembla exercir un efecte negatiu en el pronòstic.

Com hem citat anteriorment, l'expressió de mediadors inflamatoris, com és el cas de les citoquines pro-inflamatòries (ex. TNF- $\alpha$  i IL-6), sembla que jugue un paper important en el desenvolupament i la progressió de la ICA i la ICC [Fildes et al., 2009; Torre-Amione, 2005; von Haehling et al., 2009; Yndestad et al., 2006]. A més, les propietats immuno-moduladores del CMV podrien estar relacionades amb la patogènesi de les malalties cardiovasculars. D'acord amb això, amb el tercer treball, hem tractat de determinar la prevalença de la infecció activa pel CMV en pacients immunocompetents ingressats per ICA i quantificar l'associació amb el risc de mort i/o reingrés per ICA en aquests pacients. La interpretació dels resultats és la següent:

1- Sobre la base de supòsits anteriors que argumenten que la infecció activa pel CMV és probable que ocórrega en pacients amb IC, especialment durant un episodi agut, en efecte, hem trobat DNAèmia per CMV en nivells baixos (<100 còpies/mL) en el 8,7% dels casos. Fet que reforça la hipòtesi que una ràpida expansió de cèl·lules T CMV-específiques manté la

---

càrrega viral de CMV baixa en el compartiment sistèmic, fins la resolució completa de l'episodi [von Müller et al., 2007]. Açò també ho hem pogut observar en els pacients presentant als Articles primer i segon.

2- La presència de DNAèmia per CMV es va associar de manera independent amb un major risc de morbiditat i mortalitat, particularment evident quan els pacients van ser classificats d'acord al seu nivell de DNAèmia per CMV, on aquells qui mostraren DNAèmia per CMV >25 còpies/mL presentaven major risc. De fet, els quatre pacients classificats en la categoria més alta de DNAèmia per CMV van morir durant els primers 100 dies següents a l'ingrés inicial. Aquests resultats estan d'acord amb l'informat anteriorment [Limaye et al., 2008] on, la càrrega viral de CMV s'associa de forma independent i quantitativament a l'hospitalització perllongada i la mort, després d'ajustar paràmetres indicatius de gravetat, com la puntuació APACHE II i altres possibles factors de confusió, en una cohort de pacients crítics atesos en l'UCI [Limaye et al., 2008].

3- La presència d'IgM CMV-específica, es va associar independentment amb un major risc de mort i/o reingrés per ICA. Hi ha la possibilitat que, no obstant això, la IgM detectada no fóra veritablement CMV-específica [Vornhagen et al., 1994].

CMV pot reactivar-se en pacients amb ICA i com un agent immunomodulador, augmentar la inflamació que es traduiria en un major perjudici del miocardi o, fins i tot, augmentar el risc d'infeccions secundàries. El fet que els pacients amb infecció activa pel CMV van exhibir un estat immuno-inflamatori augmentat (major en el PL i en les raons TNF- $\alpha$ /IL-10 i IL-6/IL-10) en comparació amb aquells sense, dóna suport a la plausibilitat d'aquesta hipòtesi.

En el següent treball (Article quart) i si prenim en consideració el temps de duplicació i la cinètica d'aclariment del CMV en persones immunocompetents en el desenvolupament d'un episodi d'infecció activa [Emery et al., 1999] podem suggerir que si el virus té un paper rellevant en la precipitació de l'aparició d'un infart agut de miocardi (IAM), consegüentment, la infecció activa pel CMV activa hauria de ser detectada en el moment d'isquèmia miocàrdica i poc temps després. Pocs estudis han abordat aquesta qüestió, i aquests han reportat resultats contradictoris.

En el nostre estudi, varem usar una PCR en temps real amb una alta sensibilitat, per al control precoç de la DNAèmia per CMV en pacients amb IAM dins dels 3 dies següents a la isquèmia de miocardi i usarem mostres de PL per a l'anàlisi. Les nostres dades indiquen que

la DNAèmia per CMV no és una troballa freqüent en els pacients que pateixen un IAM (5,81%) i estan en clar contrast amb les de Prösch [Prösch et al., 2008] que va informar de la detecció de DNA de CMV en PBMCs en 10 dels 10 pacients estudiats i d'antigenèmia per CMV en PBMCs en 8 de cada 10 pacients el dia 4 després de l'IAM. No està clar si l'ús de diferents mostres de sang podria resultar en tal discrepància.

La taxa d'incidència de la infecció activa per CMV que es troba en aquest estudi és més propera a la observada per Gredmark et al. [Gredmark et al., 2007], que detecta l'expressió del RNA del CMV en PBMCs mitjançant una RT-PCR anidada, en el 15% dels pacients amb IAM però, novament en contrast amb altres grups que no van poder detectar el ADN del CMV en monòcits [Borgia et al., 2001] ni en PBMCs [Schlitt et al., 2005]. Les diferències entre les nostres dades i les publicades pels últims estudis citats anteriorment, podrien ser causa de la major sensibilitat de la PCR utilitzada en l'estudi actual.

La presència de DNAèmia per CMV es va associar amb un pitjor perfil de risc d'IAM. En aquest context, s'ha demostrat que la citocina pro-inflamatòria IL-6 pot potenciar el dany cardíac durant l'IAM [Debrunner et al., 2008]. Les nostres anàlisis informaren que:

- 1- Els nivells plasmàtics d'IL-6 varen resultar significativament elevats en els pacients amb IM complicat comparats amb els dels pacients amb IM sense complicacions.
- 2- Els valors d'IL-6 en PL van ser més alts en els pacients amb IAM amb DNAèmia per CMV que en aquells sense, encara que la diferència no va ser estadísticament significativa.

D'acord amb les publicades per Gredmarck et al. [Gredmark et al., 2007], els nostres resultats poden explicar el fet que els pacients amb STEMI que desenvoluparen DNAèmia per CMV en PL tenien una pitjor funció cardíaca després d'un IAM.

Com hem vist, la infecció activa pel CMV esdevé amb freqüència en pacients adults en estat crític sense immunosupressió canònica amb malalties inflamatores, com per exemple les cardíques (Articles tercer i quart), i pot donar lloc a un augment de la morbiditat. Amb els Articles primer i segon, hem pogut demostrar que la infecció activa pel CMV, restringida al TRI o fent partícip al compartiment sistèmic, es produeixen amb freqüència en pacients crítics amb seropositivitat prèvia coneguda per a CMV.



---

---

Amb l'últim treball presentat (Article cinquè), vam investigar si aquest era el cas en nens amb diverses malalties broncopulmonars subjacents caracteritzades per la presència d'una inflamació crònica o recurrent de les vies respiratòries inferiors.

Es va detectar el DNA de CMV en el TRI del 14,2% dels pacients, percentatge que va augmentar a 54,6% quan només es van considerar els pacients seropositius per CMV en el moment de la fibrobroncoscòpia. Com que els pulmons són un lloc important de latència del CMV [Cook et al., 2002], en aquest sentit, seria interessant conèixer la taxa de detecció de DNA de CMV en el TRI en nens sans CMV-seropositius.

La participació del compartiment sistèmic es va demostrar en dos dels sis pacients amb DNA de CMV en el TRI i en general, es van observar càrregues baixes de DNA de CMV en ambdós compartiments. Aquest escenari s'assembla a l'observat en els pacients crítics sotmesos a ventilació mecànica estudiats en els Articles primer i segon on, vàrem demostrar que es produïa una ràpida expansió de limfòcits T funcionals CD8+ CMV-específics després de la reactivació del CMV, es mantenia la càrrega viral a nivells baixos en ambdós compartiments i, eventualment controlaven l'episodi.

Cal assenyalar que, la infecció activa pel CMV restringida al TRI es va detectar en dos dels tres pacients amb Fibrosi Quística seropositius per a CMV.

Els resultats ens revelen que els nivells d'IL-6 en el TRI van ser significativament majors en els pacients amb infecció activa per CMV que en aquells sense, la qual cosa dóna suport a la possibilitat d'una relació patogènica bidireccional entre el CMV i la inflamació [Söderberg-Nauclér, 2008].

La detecció de HHV-6 i HHV-7 en aquests individus és conseqüent amb la suposició que els estats pro-inflamatoris també poden desencadenar la reactivació d'altres beta-herpesvirus que, si més no, podria resultar en un augment de l'estat inflamatori en el TRI [Flamand et al., 2010].

Els virus respiratoris es van detectar en gairebé un terç dels pacients. Tot i que la contaminació amb virus presents en el tracte respiratori superior no es podria excloure formalment, aquesta característica és conseqüent, ja siga amb un retard en l'aclariment d'un episodi agut d'infecció viral recent o d'una infecció viral persistent del TRI. La plausibilitat de l'última explicació està recolzada per dades obtingudes en models animals experimentals i humans per infeccions per VRS, Rhinovirus, i Metapneumovirus humà [Liu et al., 2009; Schwarze et al., 2004].

---

---

La literatura ens diu que la persistència de la replicació d'aquests virus respiratoris en el TRI indueix la inflamació [Papadopoulos et al., 2000], i per tant pot promoure la reactivació local de CMV. Alhora, CMV també pot potenciar la replicació dels virus respiratoris en el TRI en virtut de la seva capacitat immunosupressora [Solano i Navarro, 2010]. No obstant això, no es va trobar relació entre la presència d'infecció activa per CMV en el TRI i l'aparició de virus respiratoris.

De la mateixa manera, la presència d'infecció activa per CMV en pacients crítics s'ha relacionat amb una major incidència de sobreinfecció bacteriana i fúngica [Chiche et al., 2009; Jaber et al., 2004]. Nosaltres, tampoc no hem trobat cap associació entre la presència de DNA de CMV en el TRI i la d'espècies bacterianes o fúngiques.

## 11. Limitacions metodològiques

La present tesi Doctoral està composta per cinc articles, tots ells emmarcats en una mateixa línia d'investigació.

### Limitacions Article primer

Si tenim en compte que en els pacients amb infecció activa pel CMV, el primer resultat positiu de PCR apareix amb una mitjana de 12 dies després de l'ingrés, és probable que aquest percentatge poguera haver sigut encara més gran si aquests pacients hagueren romangut a l'UCI durant un període de temps més llarg.

El limitat nombre de pacients inclosos en la nostra sèrie va impedir una anàlisi estadística sòlida de l'efecte potencial de la infecció activa pel CMV en el pronòstic clínic dels pacients en estat crític. Les nostres dades però, concorden amb les conclusions extretes dels estudis anteriors, incloent un nombre molt més gran de pacients [Chiche et al, 2009; Jaber et al, 2005; Limaye et al, 2008] en què la taxa de mortalitat general i la l'estada a UCI són majors en els pacients amb infecció activa pel CMV que en aquells qui no la desenvolupen. No obstant això, no hem pogut trobar una associació entre el pic de càrrega viral del CMV, ja siga en AT o en PL, i la mortalitat; a diferència de les dades comunicades per Limaye et al. en 2008. Si més no, les nostres dades, s'han d'interpretar amb cautela atès l'escàs nombre de pacients inclosos en l'estudi. Malgrat l'evidència que recolza un paper patogènic del CMV en els pacients crítics, les dades definitives que demostren la causalitat n'és poca. Només un assaig clínic controlat de teràpia antiviral CMV-específica pot fer llum sobre aquesta qüestió.

Amb aquesta perspectiva, les dades sobre la història natural de la reactivació del CMV en pacients crítics ventilats que aquí es presenten s'han de prendre en compte per a un control òptim de la infecció activa per CMV.

## Limitacions Article segon

Amb interès d'esbrinar què passa en el procés observat de dissociació de càrregues de DNA de CMV entre el TRI i el PL, les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica no van poder ser recuperades de la mostra obtinguda (llavat broncoalveolar) en el dia 119 del primer pacient estudiat. Per tant, la possibilitat de deteriorament de les cèl·lules T que transiten els pulmons en pacients amb episodis dissociats de infecció activa pel CMV, ha de ser investigada en estudis futurs.

En el grup de 6 pacients, com es mostra a la Taula II, es van trobar alts nivells de cèl·lules T CMV-específiques en més d'una ocasió durant l'episodi d'infecció activa pel CMV. Per desgràcia, les mostres de sang extretes poc després de l'ingrés a l'UCI (*baseline*) no estaven disponibles per a l'anàlisi, de manera que no es pot descartar la possibilitat que nivells subòptims de cèl·lules T CMV-específiques en eixe moment, pogueren haver afavorit la reactivació del CMV.

## Limitacions Article tercer

Els nostres resultats però, s'han d'interpretar amb cautela:

- 1- Es tracta d'un estudi preliminar d'observació que inclou un nombre limitat de pacients amb ICA
- 2- Tot i la força de l'associació, el baix nombre de pacients amb infecció activa pel CMV s'oposa a la inferència dels intervals de confiança més precisos
- 3- Ja que no es van realitzar mesuraments seqüencials, els valors màxims de DNAèmia per CMV en alguns pacients podrien haver-se'n passat per alt
- 4- Alguns pacients podrien haver estat mal categoritzat a causa del coeficient de variació interassaig intrínsec de la qRT-PCR utilitzat en aquest estudi (estimat a estar dins del 20-30% per a càrregues baixes de DNA de CMV).

---

---

## Limitacions Article quart

En aquest treball:

1- No queda clar si l'ús de diferents mostres de sang podria resultar en les diferències observades entre els nostres resultats en contrast amb els de Prösch [Prösch et al., 2000]. Des del nostre punt de vista calen més estudis que aclarisquen aquest fet

2- El tamany mostral era massa xicotet per poder extraure conclusions definitives

3- No varem disposar d'un adequat grup control format per pacients amb angina estable/inestable que no desenvoluparen IAM.

## Limitacions Article cinquè

Finalment, l'estudi amb pacients pediàtric va presentar les següents limitacions:

1- es tractava d'un estudi transversal amb una mostra limitada

2- es va incloure una cohort de pacients molt heterogènia

3- l'estatus serològic del CMV va ser desconegut per a un gran nombre de pacients

4- la possibilitat que la detecció de DNA de CMV reflectira un estat latent, en lloc d'una infecció viral activa, especialment en aquells pacients amb baixes càrregues de DNA de CMV, no es podria excloure formalment, ja que no es van realitzar cap detecció de mRNA viral ni la inoculació de cultius cel·lulars convencionals per a la recuperació de virus viu.

En resum, els diferents articles presentats posseeixen resultats suficientment clars per a prendre'ls en consideració, per tant, des de el nostre punt de vista pensem, que les limitacions no invaliden els resultats ni les conclusions extretes d'aquests.



## 12. Conclusions i aplicabilitat dels resultats

Les dades presentades en el primer treball reforcen la hipòtesi que els pulmons són un lloc important de la reactivació del CMV i suggereixen que, la cinètica de replicació o l'aclariment per CMV en els pulmons pot diferir de la que esdevé en el compartiment sistèmic. Així doncs, la selecció de mostres del TRI és imprescindible per a un diagnòstic adequat i un seguiment de la infecció activa pel CMV en pacients de l'UCI. A més, hem demostrat que, la reactivació del CMV no està principalment provocada per la immunosupressió de les cèl·lules T CD4+ i CD8+ productores d'INF- $\gamma$  CMV-específiques en pacients crítics i, el seguiment immunològic dels nivells sanguinis d'aquest grup cel·lular no sempre proporciona una estimació precisa del grau d'immunocompetència davant CMV en el microambient pulmonar. Els estudis futurs han de determinar si aquests fenòmens condueixen cap a un major risc de desenvolupar complicacions clíniques relacionades amb el CMV.

Els resultats obtinguts en el segon treball de recerca (Article segon), coincideixen amb els del primer en que, la selecció de mostres del TRI és imprescindible per al diagnòstic i seguiment de la infecció activa pel CMV i a més, posen de relleu el fet que, els episodis recurrents d'infecció activa pel CMV poden ocórrer en pacients de cures intensives. Les dades van revelar una associació entre els nivells d'IL-10 i les càrregues virals de CMV en mostres del TRI durant els episodis d'infecció activa amb una dissociació dels nivells de DNA de CMV entre el TRI i el compartiment sistèmic, que podria haver sigut el resultat d'una forta resposta anti-inflamatòria compensadora. En aquest context clínic, es necessiten més estudis per dilucidar els mecanismes patogènics implicats en aquests processos amb la perspectiva d'un proper judici clínic de la teràpia antiviral, on les dades presentades en aquests treballs puguen ajudar a determinar l'estratègia òptima per al seguiment i control de la infecció activa pel CMV.

Pel que fa als dos treballs amb pacients que presentaven patologia cardíaca (Article tercer i quart), hem observat que la infecció activa per CMV pot ocórrer en pacients immunocompetents ingressats per ICA, encara que a una freqüència baixa, i que la presència de DNAèmia per CMV es va associar amb un major risc combinat de mort i/o reingrés per insuficiència cardíaca aguda. La presència de DNAèmia per CMV no és una troballa freqüent

---

---

en els pacients que pateixen un IAM (5,81%), sin més no, es va associar amb un pitjor perfil de risc d'IAM. A més, la major prevalença de DNAèmia per CMV en els pacients amb història familiar de malalties coronàries ens permet especular que la infecció per CMV podria actuar com un factor desencadenant i agreujant aterotrombòtic en aquest subgrup de pacients. Les dades estan en contra d'una implicació constant de CMV en el desencadenament de l'aparició d'isquèmia coronària en un grup no seleccionat de pacients amb IAM però, a favor de la idea que la replicació sistèmica del CMV pot agreujar el pronòstic clínic de STEMI. Es necessiten més estudis per confirmar els resultats anteriors i aclarir el paper patogènic de la infecció pel CMV en pacients amb malalties coronàries, el quals poden constituir un subgrup de pacients susceptibles de ser gestionats de manera agressiva o amb modalitats terapèutiques específiques.

Quant a l'últim treball presentat (Article cinquè), els nostres resultats justifiquen més estudis observacionals prospectius que confirmen la possibilitat de l'existència d'interaccions patogèniques entre CMV, HHV-6, virus respiratoris, espècies bacterianes i fúngiques que colonitzen el TRI i, avaluen l'impacte potencial de la replicació del CMV al TRI en el curs clínic i pronòstic dels pacients, amb especial atenció en els nens amb Fibrosi Quística.



## 13. Annexos



## Annex I

### Informe raonat del lloc de signatura del doctorand en les publicacions compendiades en la tesi Doctoral

En compliment de l'article 8.1.a del Reglament sobre depòsit, avaluació i defensa de la tesi Doctoral de la Universitat de València, vigent a partir de l'11 de febrer de 2012, redacte aquest informe amb la intenció de que queden clares les circumstàncies que justifiquen que siga primera signant només en una de les publicacions presentades.

Així doncs, els aspectes de la tesi Doctoral relacionats amb les anàlisis, resultats i interpretacions microbiològiques, en la seua totalitat, han sigut dirigides i supervisades, i en determinades ocasions també realitzades per mi; doctoranda d'aquesta tesi. Si més no, s'ha tingut en consideració la gran quantitat d'aspectes clínics, aportats per la resta de Serveis implicats i sense els quals no s'hagueren pogut dur a terme aquest estudi i, per aquesta raó, s'ha atorgat el primer lloc de signatura a l'investigador del Servei Mèdic més adient, en cadascuna de les publicacions compendiades.

Marifina Chilet Sáez  
Doctoranda



València a 20 de Gener de 2014



## Annex II

Escrit del director de la tesi Doctoral sobre el factor d'impacte de les diferents revistes on es publiquen els articles que es recullen en la tesi Doctoral

El factor d'impacte de les revistes on es troben publicats els treballs compendiats per a la redacció d'aquesta tesi Doctoral, segons any de publicació, es mostra en la taula adjunta.

| Revista                           | Any de publicació | Factor d'impacte |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| Journal<br>of<br>Medical Virology | 2013              | 2.82             |
|                                   | 2011              | 2.82             |
|                                   | 2012              | 2.90             |
| Atherosclerosis                   | 2012              | 3.79             |
| Clinical Science                  | 2012              | 4.61             |

Dr David Navarro Ortega  
Catedràtic d'Universitat  
Departament de Microbiologia i Ecologia,  
Universitat de València

VALENCIA a 15 de FEBRER de 2014



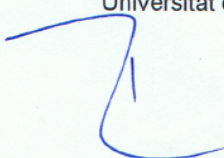
## Annex III

### Informe favorable del director de la tesi Doctoral

Per a la presentació d'aquesta Tesi, la doctoranda ha rebut la formació acadèmica adequada i necessària per poder dur a terme aquesta línia d'investigació, de la qual s'han aconseguit resultats satisfactoris que es demostren amb la publicació de 5 treballs, tots ells compendiats per a la redacció d'aquesta tesi Doctoral. A més, la present tesi atén a un procés d'elaboració i format de presentació segons la normativa vigent que contempla el nou reglament sobre dipòsit, avaluació i defensa de la tesi Doctoral, i en compliment del que disposa el Reial Decret 99/2011, de 29 d'octubre, pel qual es regulen els ensenyaments oficials de doctorat, així com l'article 136 dels Estatuts de la Universitat de València.

Per tot açò, informe que la present tesi Doctoral aconsegueix criteris d'idoneïtat i és apta per a lectura, procés amb el que finalitzen els estudis de tercer cicle de la doctoranda.

Dr David Navarro Ortega  
Catedràtic d'Universitat  
Departament de Microbiologia i Ecologia,  
Universitat de València

  
VALENCIA a 15 de GENER de 2014





---

---

## Annex IV

### Premi d'investigació Mèdica Bancaixa 2013

Anualment, l'Institut Mèdic Valencià atorga el Premi d'investigació Mèdica Bancaixa al millor treball sobre un tema d'investigació mèdica amb repercussió en el nostre àmbit autonòmic. En 2013 el treball premiat ha sigut el següent:

**"Detección de virus en el tracto respiratorio inferior de niños con patología respiratoria crónica no reagudizados: importancia e implicaciones".**

Raquel Lucas Sendra, Amparo Escribano Montaner, Marifina Chilet Sáez, Silvia Castillo Corullón, Teresa Romero Rubio, David Navarro Ortega.



---

---

## Annex V

### Premi al millor pòster en la "XXXIV Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (SENP)"

La comunicació que se cita a continuació ha sigut premiada en la "XXXIV Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica" l'any 2012:

#### **"¿Qué valor damos a la presencia de virus en el tracto respiratorio inferior en pacientes sin reagudización respiratoria?"**

R. Lucas Sendra, D. Navarro Ortega, M. Chilet Sàez, E. Costa, S. Castillo Corullón, T. Romero Rubio y A. Escribano Montaner.

Centre: Pediatria, Microbiologia. Unitat de Neumologia Infantil. Servei de Microbiologia.

Hospital Clínic Universitari de València. Universitat de València.

"XXXIV Reunión de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica".

Sant Sebastià, 2012.

**Premi al millor pòster.**



## 14. Bibliografia

Abgueuen P, Delbos V, Chennebault JM, Payan C, Prichard E. Vascular thrombosis and acute cytomegalovirus infection in immunocompetent patients: report of 2 cases and literature review. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 134-9.

Anguita SM, Crespo Leiro MG, de Teresa GE, Jimenez NM, Alonso-Pulpon L, Muniz GJ. Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61(10): 1041-9.

Anker SD, and von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004; 90(4): 464-70.

Baker DW, Einstadter D, Thomas C, Cebul RD. Mortality trends for 23505 medicare patients hospitalized with heart failure in Northeast Ohio, 1991 to 1997. *Am Heart J* 2003; 146(2): 258-64.

Balthesen M, Dreher L, Lucin P, Reddehase MJ. The establishment of cytomegalovirus latency in organs is not linked to local virus production during primary infection. *J Gen Virol* 1994; 75: 2329-36.

Balthesen M, Messerle M, Reddehase MJ. Lungs are the major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol* 1993; 67: 5360-6.

Bason C, Corrocher R, Lunardi C, Puccetti P, Olivieri O, Girelli D, Navone R, Beri R, Millo E and Margonato A. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* 2003; 362: 1971-7.

Berenci K, Endresz V, Klurfeld D, Kari L, Kritchevsky D, Gonczol E. Early atherosclerotic plaques in the aorta following cytomegalovirus infection of mice. *Cell Adhes Commun* 1998; 5: 39-47.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C et al. Cytomegalovirus infection with interleukin-6 response predicts cardiac mortality in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2915-21.

Blanquer J, Chilet M, Benet I, Aguilar G, Muñoz-Cobo B, Tellez A, Costa E, Bravo D, Navarro D. Immunological insights into the pathogenesis of active CMV infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Med Virol* 2011; 83: 1966-71.

Blum A, Giladi M, Weinberg M et al. High anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis. *Am J Cardiol* 1998; 81: 866-8.

Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-44.

Bolovan-Fritts CA, Trout RN, Spector SA. Human cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell cytokine response induces fractalkine in endothelial cells. *J Virol* 2004; 78: 13173-81.

Borgia MC, Mandolini C, Barresi C, Battisti G, Carletti F, Capobianchi MR. Further evidence against the implication of active cytomegalovirus infection in vascular atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2001; 157: 457-62.

Bravo D, Clari MA, Costa E et al. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma Cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2899-904.

Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 1996; 39: 401-12.

Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD, Kaufmann DE. IL-10 is upregulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 2009; 114: 346-56.

Brodeur ND, Spencer JV. Antibodies to human IL-10 neutralize ebvIL-10-mediated cytokine suppression but have no effect on cmvIL-10 activity. *Virus Res* 2010; 153: 265-8.

Bron D, Lagneaux L, Delforge A, Otte C, Snoeck R, Stryckmans P. Prevention of CMV-induced myelosuppression by anti-CMV antibodies: an in vitro model. *Exp Hematol* 1991; 19: 132-5.

Bruggeman C. Cytomegalovirus is involved in vascular pathology. *Am Heart J* 1999; 138(Pt 2): 473-5.

Bruggeman, CA. Does cytomegalovirus play a role in atherosclerosis? *Herpes* 2000; 7: 51-4.

Burnett MS, Gaydos CA, Madico GE et al. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. *J Infect Dis* 2001; 183: 226-31.

Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD et al. Cytomegalovirus stimulated mRNA accumulation and cell surface expression of the oxidized LDL scavenger receptor, CD36. *Atherosclerosis* 2004; 177: 53-9.

Castillo JP, Kowalik TF. HCMV infection: modulating the cell cycle and cell death. In *Rev Immunol* 2004; 23: 113-39.

Centro Nacional de Epidemiologia. <http://193.146.50.130>. 2011.

Cervera C, Filella X, Linares L, Pineda M, Esteva C, Antón A, Marcos MA, Cofán F, Navasa M, Pérez-Villa F, Pumarola T, Moreno A. TH1/TH2 cytokine release pattern during in vivo cytomegalovirus disease in solid organ transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 2233-5. Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, Torre-Amione G. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 2008; 36: S9-S16.

Chiche L, Forel JM, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J, Gainnier M, Zandotti C, Papazian L. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2009; 37: 1850-7.

Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, Clari MA, Costa E, Navarro D. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol* 2010; 82: 1384-91.

Cohen JI. Cytomegalovirus in the intensive care unit: Pathogen or passenger? *Crit Care Med* 2009; 37: 2095-6.

Collard HR, Schwarz MI. Diffuse alveolar hemorrhage. *Clin Chest Med* 2004; 25: 583-92.

Cook CH, Martin LC, Yenchar JK, Lahm MC, McGuinness B, Davies EA, Ferguson RM. Occult herpes family viral infections are endemic in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 2003; 31: 1923-9.

Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. Lypopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1b triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 2006a; 80: 9151-8.

Cook CH, Yenchar JK, Kraner TO, Davies EA, Ferguson RM. Occult herpes family viruses may increase mortality in critically ill surgical patients. *Am J Surg* 1998; 176: 357-60.

Cook CH, Zhang Y, McGuinness BJ, Lahm MC, Sedmak DD, Ferguson RM. Intra-abdominal infection reactivates latent pulmonary cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Infect Dis* 2002; 185: 1395-400.

Cook CH, Zhang Y, Sedmak DD, Martin LC, Jewell S, Ferguson RM. Pulmonary cytomegalovirus reactivation causes pathology in immunocompetent mice. *Crit Care Med* 2006b; 34: 842-9.

Cook CH. Cytomegalovirus reactivation in "immunocompetent" patients: A call for scientific prophylaxis. *J Infect Dis* 2007; 196: 1273-5.

Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus infection: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76-98.

Debrunner M, Schuiki E, Minder E et al. Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol* 2008; 97: 298-305.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Failure* 2008; 10: 933-89.

Döcke WD, Prösch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, Syrbe U, Krüger DH, von Baehr R, Volk HD. Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* 1994; 343: 268-9.

Domart Y, Trouillet JL, Fagon JY, Chastre J, Brun-Vezinet F, Gilbert C. Incidence and morbidity of cytomegalovirus infection in patients with mediastinitis following cardiac surgery. *Chest* 1990; 97: 18-22.

Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 3916-22.

Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* 1999; 190: 177-82.

Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355: 2032-6.

Escribano A, Chilet M, Clari MA, Lucas R, Costa E, Bravo D, Muñoz-Cobo B, Borrás R, Navarro D. Frequent detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in the lower respiratory tract in CMV-seropositive pediatric patients with underlying chronic bronchopulmonary diseases lacking canonical immunosuppression. *J Med Virol* 2013; 85: 888-92.

Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virusinduced atherosclerosis. *J Exp Med* 1978; 148: 335-40.

Fabricant CG, Fabricant J, Minick CR, Litrenta MM. Herpesvirus- induced atherosclerosis in chickens. *Fed Proc* 1983; 42: 2476-9.

Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 53: 1013-20.

Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Eng J Med* 2007; 357: 2601-14.

Flamand L, Komaroff AL, Arbuckle JH, Medveczky PG, Ablashi DV. Human herpesvirus-6-basic biology, diagnostic testing, and antiviral efficacy. *J Med Virol* 2010; 82: 156-68.

Florescu DF. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2009; 37: 2350-8.

Forster MR, Trgovcich J, Zimmerman P, Chang A, Miller C, Klenerman P, Cook CH. Antiviral prevention of sepsis induced cytomegalovirus reactivation in immunocompetent mice. *Antiviral Res* 2010; 85: 496-503.

Fryer JF, Heath AB, Anderson R et al. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010; WHO/BS/10.2138.

Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (CMV PCR Kit, Abbott) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of pre-emptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3311-8.

Gnann JW Jr, Ahlmen J, Svalander C, Olding L, Oldstone MB, Nelson JA. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol* 1988; 132: 239-48.

Gredmark S, Jonasson L, Van Gosliga D, Ernerudh J, Söderberg-Nauclér C. Active cytomegalovirus replication in patients with coronary disease. *Scand Cardiovasc J* 2007; 41: 230-4.

Griffiths PD. Cytomegalovirus in intensive care. *Rev Med Virol* 2010; 20: 1-3.

Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 2003; 102: 3060-7.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med* 2005; 352: 1685-95.

Heininger A, Jahn G, Engel C, Notheisen T, Unertl K, Hamprecht K. Human cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med* 2001; 29: 541-7.

Hendrix MG, Daemen M, Bruggeman CA. Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. *Am J Pathol* 1991; 138: 563-7.

Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar P, Bosman F, Bruggeman CA. The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am J Pathol* 1989; 134: 1151-7.

Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 1990; 136: 23-8.

Hirsch AJ, Shenk T. Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J Virol* 1999; 73: 404-10.

Ho M. Cytomegalovirus. *Biology and Infection*. New York: Plenum Publishing; 1991.

Hummel M, Abecassis M. A model for reactivation of CMV from latency. *J. Clin. Virol.* 2002; 25: 123-36.

Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, Thomas G, Abecassis MI. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol* 2001; 75: 4814-22.

Humphreys IR, de Trez C, Kinkade A, Benedict CA, Croft M, Ware CF. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med* 2007; 204: 1217-25.

Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 1991; 65: 6581-8.

Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault PF, Eledjam JJ. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: Associated factors and consequences. *Chest* 2005; 127: 233-41.

Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr opin microbiol* 2002; 5: 403-7.

Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003; 348(20): 2007-18.



Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. *J Immunol* 1993; 151: 4545-51.

Jones M, Ladell K, Wynn KK, Stacey MA, Quigley MF, Gostick E, Price DA, Humphreys IR. IL-10 restricts memory T cell inflation during cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2010; 185: 3583-92.

Kalil AC, Florescu DF. Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2009; 37: 2350-8.

Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, Baumgarten G, Trial J, Knowlton AA. Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res* 2009; 105: 1186-95.

Krishnan A, Zhou W, Lacey SF, Limaye AP, Diamond DJ, La Rosa C. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transplant Infect Dis* 2010; 13: 363-70.

Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1076-82.

Larsson S, Söderberg-Nauclér C, Wang FZ, Möller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 1998; 38: 271-8.

Lemstrom KB, Bruning JH, Bruggeman CA, Lautenschlager IT, Hayry PJ. Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts. *J Clin Invest* 1993; 92: 549-58.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-6.

Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: Pathogen or bystander? *Rev Med Virol* 2010; 20: 372-9.

Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Huang ML, Santo TK, Corey L, Boeckh M. Association of cytomegalovirus (CMV) viral load with intensive care unit and hospital length of stay in critically-ill immunocompetent patients. *American Thoracic Society international Conference. 2007; Abstract #406.*

Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, Gibran NS, Huang ML, Santo Hayes TK, Corey L, Boeckh M. Cytomegalovirus reactivation in critically immunocompetent patients. *JAMA* 2008; 300:413-22.

Lin L, Kim SC, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon SI, Torre-Amione G, Knowlton AA. HSP60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2238-H47.

Liu Y, Haas DL, Poore S, Isakovic S, Gahan M, Mahalingam S, Fu ZF, Tripp RA. Human metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment. *J Virol* 2009; 83: 6837-48.

MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JWT, Boyd J, Finlayson A et al. Evidence of improving prognosis in heart failure - Trends in case fatality in 66,547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation* 2000; 102(10): 1126-31.

May S, Hosmer DW. Hosmer and Lemeshow type goodness-of-fit statistics for the Cox proportional hazards model. En: Balakrishna N, Rao CR, editores. In *Advances in Survival Analysis: Handbook of Statistics*. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 383-94.

McDonald K, Rector TS, Braulin EA, Kubo SH, Olivari MT. Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol* 1989; 64: 359-62.

Melnick JL, Adam E, DeBaakey ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl. K): 30-8.

Melnick JL, Adam E, DeBaakey ME. Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *JAMA* 1990; 263: 2204-7.

Michelson S, Dal Monte P, Zipeto D et al. Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J Virol* 1997; 71: 6495-500.

Miettinen KH, Lassus J, Harjola VP, Sürilä-Waris K, Melin J, Punnonen KR, Nieminen MS, Laakso M, Peuhkurinen KJ. Prognostic role of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *Eur J Heart Failure* 2008; 10: 396-403.

Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56: 1-26.

Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF et al. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1917-23.

Murayama T, Ohara Y, Obuchi M et al. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* 1997; 71: 5692-5.

Nieto FJ, Adam E, Sorlie P et al. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 922-7.

Nordøy I, Müller F, Nordal KP, Rollag H, Lien E, Aukrust P, Froland SS. The role of the tumor necrosis factor system and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2000; 181: 51-57.

Núñez J, Chilet M, Blasco ML, Clari MA, Sanjuan R, Muñoz-Cobo B, Bodí V, Costa E, Bravo D, Sanchis J, Miñana G, Navarro D. Low rate of detection of active cytomegalovirus (CMV) infection early following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2012; 222: 295-7.

Núñez J, Chilet M, Sanchis J, Bodí V, Núñez E, Miñana G, Tormo N, Clari MA, Pellicer M, Chorro FJ, Llàcer A, Navarro D. Prevalence and prognostic implications of active cytomegalovirus infection in patients with acute heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 443-52.

Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 582-92.

Osawa R, Singh N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: A systematic review. *Crit Care* 2009; 13: 1-10.

Pampou S, Gnedoy SN, Bystrevskaya VB et al. Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta. *Virchows Arch* 2000; 436: 539-52.

Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 2000; 181: 1875-84.

Papazian L, Fraise A, Garbe L, Zandotti C, Thomas P, Saux P, Pierrin G, Gouin F. Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology* 1996; 84: 280-87.

Prösch S, Wendt CE, Reinke P, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000; 272: 357-65.

Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Krüger DH. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB. *Virology* 1995; 208: 197-206.

Pulliam L, Moore D, West DC. Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity. *J Neurovirol* 1995; 1: 219-27.

Pulliam L. Cytomegalovirus preferentially infects a monocyte derived macrophage/microglial cell in human brain cultures: neuropathology differs between strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 432-40.

Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. *J Virol* 2005; 79: 2211-20.

Rapezzi C, Biagini E, Branzi A. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the task force for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008; 29: 277-8.

Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, Smith TF, Paya CV. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73: 968-73.

Reddehase MJ, Baltesen M, Rapp M, Jonjic S, Pavic I, Koszinowski UH. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* 1994; 179: 185-93.

Rennekampff HO, Hamprecht K. Cytomegalovirus infection in burns: a review. *J Med Microbiol* 2006; 55: 483-87.

Roback JD, Drew L, Laycock M, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion* 2003; 43: 314-21.

Roccaforte R, Demers C, Baldassarre F, Teo KK, Yusuf S. Effectiveness of comprehensive disease management programmes in improving clinical outcomes in heart failure patients. A meta-analysis. *Eur J Heart Fail* 2005; 7(7): 1133-44.

Rodriguez-Artalejo F, Banegas B Jr, Guallar-Castillon P. Epidemiology of heart failure. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(2): 163-70.

Royston, P. and Sauerbrei, W. *Multivariable Model-building: a Pragmatic Approach to Regression Analysis Based on Fractional Polynomials for Modelling Continuous Variables*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2008.

Schlitt A, Blankenberg S, Weise K et al. Herpesvirus DNA (Epstein-Barr virus, herpes simplex virus, cytomegalovirus) in circulating monocytes of patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2005; 60: 605-10.

Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJ. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 801-05.

Senni M, De Maria R, Gregori D, Gonzini L, Gorini M, Cacciatore G et al. Temporal trends in survival and hospitalizations in outpatients with chronic systolic heart failure in 1995 and 1999. *Journal of Cardiac Failure* 2005; 11(4): 270-8.

Sharpe N. Clinical trials and the real world: selection bias and generalisability of trial results. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16(1): 75-7.

Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 4): 741-50.

Sinzger C, Plachter B, Grefte A, The Th, Jahn G. Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* 1996; 173: 240-5.

Söderberg-Nauclér C, Fish KN, and Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogenic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997; 91: 119-26.

Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 2008; 41: 218-23.

Söderberg-Nauclér, C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J. Intern. Med.* 2006; 259: 219-46.

Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. Enumeration of CMV specific IFN $\gamma$  CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 2008; 93: 1434-36.

Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 2010; 5: 111-24.

Speir E, Modali R, Huang ES et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994; 265: 391-4.

Steffens H-P, Kurz S, Holtappels R, Reddehase MJ. Pre-emptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J Virol* 1998; 72: 1797-1804.

Stéphan F, Méharzi D, Ricci S, Fajac A, Clergue F, Bernaudin JF. Evaluation by polymerase chain reaction of cytomegalovirus reactivation in intensive care patients under mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 1996; 22: 1244-9.

Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, McMurray JJ. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur J Heart Fail* 2002; 4(3): 361-71.

Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3(3): 315-22.

Stowe RP, Mehta SK, Ferrando AA, Feedback DL, Pierson DL. Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 2001; 72: 884-91.

Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA. Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr* 2001; 131: S2798-S804.

Tanaka K, Sawamura S, Satoh T, Kobayashi K, and Noda S. Role of the indigenous microbiota in maintaining the virus specific CD8 memory T-cells in the lung of mice infected with murine cytomegalovirus. *J Immunol.* 2007; 178: 5209-16.

Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991; 72 (Pt 9): 2059-64.

Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 1994; 68: 1597-604.

Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 543-9.

Torre-Amione, G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005; 95, 3C-8C.

van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29: 2909-45.

Varani S, Frascaroli G, Homman-Loudiyi M, Feld S, Landini MP, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 219-28.

Varani S, Frascaroli G, Landini MP, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus targets different subsets of antigen-presenting cells with pathological consequences for host immunity: implications for immunosuppression, chronic inflammation and autoimmunity. *Rev Med Virol* 2009; 19: 131-45.

von Haehling S, Schefold JC, Lainscak M, Doehner W, Anker SD. Inflammatory biomarkers in heart failure revisited: much more than innocent bystanders. *Heart Failure Clin* 2009; 5: 549-60.

von Müller L, Hinz J, Bommer M, Hampl W, Kluwick S, Wiedmann M, Bunjes D, Mertens T. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 353-7.

von Müller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, Hampl W, Mertens T. Cellular immunity and active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis* 2007; 196: 1288-95.

von Müller L, Klemm A, Weiss M, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Durmus N, Hampl W, Mertens T. Active cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1517-22.

von Müller L, Mertens T. Human cytomegalovirus infection and antiviral immunity in septic patients without canonical immunosuppression. *Mol Microbiol Immunol* 2008; 197: 75-82.

von Müller L, Schliep C, Storck M, Hampl W, Schmid T, Abendroth D, Mertens T. Severe graft rejection, increased immunosuppression, and active CMV infection in renal transplantation. *J Med Virol* 2006; 78: 394-9.

Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W, The TH, Van Zanten J, Matter L, Schmidt CA, Sonneborn HH, Jahn G. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 981-6.

Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med* 2008; 29: 617-25.

Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, Sester M. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One* 2008; 3: e3634.

www.ine.es. 2011.

Yndestad A, Damås JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure: the whys and wherefores. *Heart Failure Rev* 2006; 11(1): 83-92.

Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Wulkersdorfer B, Friehs H, Pempelfort SD, Burgmann H, Frass M. Usefulness of interleukin-10 detection in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection with respect to virus persistence. *Transplantation* 2007; 84: 268-71.

Zedtwitz-Liebenstein K, Schenk P, Apfalter P, Fuhrmann V, Stoiser B, Graninger W, Schuster E, Frass M, Burgmann H. Ventilator-associated pneumonia: Increased bacterial counts in bronchoalveolar lavage by using urea as an endogenous marker of dilution. *Crit Care Med* 2005; 33: 756-9.

Zhou YF, Guetta E, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; 98: 2129-38.

Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 1996; 335: 624-30.

Zhou YF, Shou M, Guetta E et al. Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. *Circulation* 1999; 100: 1569-75.

Zhu J, Nieto FJ, Horne BD, Anderson JL, Muhlestein JB, Epstein SE. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation* 2001; 103: 45-51.

---

---

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Costello R, Csako G, Epstein SE. The possible role of hepatitis A virus in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Infect Dis* 2000; 182: 1583-7.

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Epstein SE. Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation as reflected by elevated C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1738-43.

Zhu J, Shearer GM, Norman JE, Pinto LA, Marincola FM, Prasad A, Waclawiw MA, Csako G, Quyyumi AA, Epstein SE. Host response to cytomegalovirus infection as a determinant of susceptibility to coronary artery disease: sex-based differences in inflammation and type of immune response. *Circulation* 200; 102: 2491-6.

Ziemann M, Sedemund-Adib B, Reiland P, Schmucker P, Hennig H. Increased mortality in long-term intensive care patients with active cytomegalovirus infection. *Crit Care Med* 2008; 36: 3145-50.