

TESIS DOCTORAL

**RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR T
FRENTE A CITOMEGALOVIRUS Y CONTROL DE LA
VIREMIA EN EL PACIENTE RECEPTOR DE TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS**

Doctoranda

Nuria Tormo Palop

Directores de la tesis

Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. David Navarro Ortega

Marzo 2015

**Departamento de
Microbiología y Ecología**



**VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA**

TESIS DOCTORAL:

**RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR
T FRENTE A CITOMEGALOVIRUS Y CONTROL DE
LA VIREMIA EN EL PACIENTE RECEPTOR DE
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES
HEMATOPOYÉTICOS**

Doctoranda:

Nuria Tormo Palop

Directores de la tesis:

Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. David Navarro Ortega

Programa de doctorado de Microbiología y Ecología

Departamento de Microbiología y Ecología

Universidad de Valencia

Marzo 2015



AGRADECIMIENTOS

Cuando se emprende un proyecto importante en la vida hay gente que participa en él de diferentes maneras a lo largo de su recorrido. Cabe aquí agradecer a todas y cada una de las personas sin cuyo apoyo no hubiera podido llegar a terminarlo.

A la Prof. Dra. Concha Gimeno y al Prof. Dr. David Navarro, no sólo por la dirección de esta tesis doctoral, sino por haber sido mis mentores y tutores en mi formación como profesional de la Microbiología Clínica y por compartir conmigo su pasión y sus conocimientos en el campo de la Virología. Desde el inicio de mi carrera microbiológica siempre han estado a mi lado, no sólo a nivel profesional sino personal. Gracias Concha por confiar en mí y seguir dirigiendo mi trayectoria laboral. Gracias David por haberme hecho partícipe de este proyecto y por estimular mi intelecto.

También tengo que agradecer a toda la gente del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico por hacerme fácil el camino de la formación en esta especialidad y por su participación necesaria para la consecución de este proyecto. Quiero dar las gracias especialmente a M^a Ángeles Clari, Beatriz Muñoz-Cobo, Elisa Costa y Dayana Beltrán, compañeras microbiólogas, por su ayuda en el laboratorio para llevar a cabo este estudio, y sobre todo por su amistad. Me considero afortunada por haber compartido con ellas tantas horas en el laboratorio y fuera de él. Igualmente, quiero agradecer a Matilde Pastor que me haya enseñado el trabajo en el laboratorio de Virología, con sus consejos prácticos siempre acompañados de una sonrisa, así como su colaboración con el proyecto en la parte virológica; y a Rosa Mancheño y Julia García por su contribución indispensable en Biología Molecular.

A todo el personal del Servicio de Oncología y Hematología del Hospital Clínico, y en particular al Dr. Carlos Solano y la Dra. Isana Benet, por su colaboración, sin la cual no podría haberse realizado este trabajo.

A mi familia, y en particular a mis padres por su cariño y apoyo incondicional, y por haberme formado como persona y haberme permitido llegar hasta aquí. Sin ellos hubiera sido imposible. A mi hermano, porque sé que siempre está ahí para lo que necesite. Y a mi tía Begoña, por ser mi guía y consejera en mi carrera profesional y haberme infundido el interés por la Microbiología.

Por último, no puedo expresar con palabras lo que ha significado para mí tener a Pau a mi lado, con su inconmensurable apoyo y paciencia, día a día. Gracias por tu aliento para que terminara este proyecto y gracias por haberme aportado serenidad y lucidez en todo este tiempo.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	3
2. PRESENTACIÓN	9
3. PREFACIO	13
4. INTRODUCCIÓN	17
4.1. El Citomegalovirus humano (CMV)	19
4.1.1. Generalidades, estructura y replicación del CMV	19
4.1.2. Patogenia e inmunidad	23
4.2. CMV en el receptor de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH)	29
4.2.1. Aspectos clínicos de la infección por el CMV en el receptor de alo-TPH	29
4.2.2. Factores de riesgo para la infección activa y enfermedad por el CMV en el receptor de alo-TPH	31
4.2.3. Técnicas diagnósticas empleadas en la detección de la infección activa por CMV	34
4.2.4. Estrategias para el tratamiento antiviral frente al CMV	37
4.2.5. Diagnóstico basado en la respuesta inmunitaria frente al CMV	43
5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	47
6. ARTÍCULOS ORIGINALES	53
6.1. Artículo 1	57
6.2. Artículo 2	67
6.3. Artículo 3	79
6.4. Artículo 4	89
6.5. Artículo 5	99

7. RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS	105
8. RESULTADOS.....	129
9. DISCUSIÓN CONJUNTA.....	157
10. LIMITACIONES METODOLÓGICAS.....	179
11. CONCLUSIONES FINALES	189
12. ANEXOS.....	195
12.1. Anexo I.....	197
12.2. Anexo II.....	199
12.3. Anexo III	201
12.4. Anexo IV.....	203
13. BIBLIOGRAFÍA	205

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Aa	aminoácido(s)
ACV	aciclovir
ADN	ácido desoxirribonucleico
AG	antigenemia pp65
alo-TPH	trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos
ATG	globulina antitimocítica
CDs	células dendríticas
CDV	cidofovir
CMH-I	complejo mayor de histocompatibilidad-I
CMH-II	complejo mayor de histocompatibilidad-II
CMV (HHV-5)	citomegalovirus (herpesvirus humano-5)
CPA	célula(s) presentadora(s) de antígenos
CsA	ciclosporina A
CTL	linfocito T CD8 ⁺ citotóxico
D-	donante del injerto/trasplante seronegativo para CMV
D+	donante del injerto/trasplante seropositivo para CMV
DMSO	dimetilsulfóxido
DNAemia	cantidad de ADN viral en sangre (DNA, del inglés <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EIA	enzimoinmunoanálisis
EICH	enfermedad del injerto contra el huésped
EICHa	enfermedad del injerto contra el huésped aguda
ELISPOT	enzimoinmunospot
EOC	enfermedad orgánica por CMV
FOS	foscarnet
GCV	ganciclovir
HHV-6	herpesvirus humano tipo 6

	antígenos leucocitarios humanos (del inglés, <i>human leukocyte antigen</i>)
HLA	<i>leukocyte antigen</i>)
IE-1	<i>immediate-early protein 1</i> o proteína inmediato-precoz 1 de CMV
IE-2	<i>immediate-early protein 2</i> o proteína inmediato-precoz 2 de CMV
IFN-I	interferón tipo I
IFN γ	interferón gamma
IgA	inmunoglobulina(s) A
IgG	inmunoglobulina(s) G
IgM	inmunoglobulina(s) M
IL-1	interleuquina 1
IL-10	interleuquina 10
IV	intravenoso
KDa	kiloDaltons
Kpb	kilopares de bases
LT	linfocitos T
Mabs	anticuerpos monoclonales
MMF	micofenolato de mofetilo
MO	médula ósea
MTX	metotrexato
NK	linfocitos T citolíticos naturales (natural killer)
PBL	leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica
PBS	tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
pp65	<i>phosphoprotein 65</i> o fosfoproteína 65 de CMV
QRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R-	receptor del injerto/trasplante seronegativo para CMV

R+	receptor del injerto/trasplante seropositivo para CMV
SCU	sangre de cordón umbilical
SP	sangre periférica
T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	linfocitos T CD4 ⁺ productores de IFN γ
T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	linfocitos T CD8 ⁺ productores de IFN γ
TGI	tracto gastrointestinal
Th	linfocitos T CD4 ⁺ <i>helper</i> o cooperadores
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
TOS	trasplante de órgano sólido
TPH	trasplante de precursores hematopoyéticos
ValGCV	valganciclovir
VHS-1	virus del herpes simple tipo 1
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo

2. PRESENTACIÓN

2. PRESENTACIÓN

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones en virtud del nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, así como el artículo 136 de los Estatutos de la Universitat de València; y teniendo en cuenta los requisitos expuestos en el artículo 8 de dicho Reglamento, que deben ser satisfechos para llevar a cabo el depósito de una tesis doctoral por compendio de artículos publicados.

Desde hace más de 10 años los Servicios de Microbiología y Parasitología y de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia han investigado conjuntamente distintos aspectos de la inmunobiología de la infección por herpesvirus, especialmente citomegalovirus, en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, financiados por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III de Madrid (Proyectos FIS). Los cinco artículos publicados en revistas internacionales que componen esta tesis doctoral son derivados del trabajo realizado en el contexto de dos proyectos FIS: PI 06/1738, titulado “Reconstitución de la inmunidad celular (T CD4⁺ y T CD8⁺) frente al citomegalovirus en el paciente receptor de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos”; y PS 09/01117, titulado “Marcadores inmunológicos y genotípicos de protección frente al citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Aplicabilidad en el manejo terapéutico de la infección activa virémica”.

3. PREFACIO

3. PREFACIO

La infección por el citomegalovirus humano (CMV) continúa siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH), particularmente en el postrasplante precoz (primeros 100 días) [Hebart y Einsele, 2004]. Con el fin de prevenir el desarrollo de la enfermedad orgánica por CMV (EOC) se utiliza una estrategia denominada tratamiento viral anticipado, por la cual se administra el tratamiento antiviral sólo a aquellos pacientes que presentan viremias mayores a un nivel preestablecido. Esta estrategia es eficaz en la prevención de EOC, pero se asocia a sobretratamiento [Avetisyan *et al.*, 2007].

Existe la convicción de que la monitorización virológica e inmunológica combinada permitiría individualizar los tratamientos anticipados, reduciendo el número de pacientes tratados y probablemente la duración de los tratamientos pautados. No existen hasta el momento estudios clínicos de suficiente tamaño muestral que prueben este extremo.

En este contexto, el presente trabajo se centra en el estudio preliminar de una posible estrategia basada en la utilización conjunta de marcadores virológicos e inmunológicos, monitorizando a una cohorte de pacientes receptores de alo-TPH atendida en nuestro centro y en centros con los que colaboramos, con el fin último de mejorar la recuperación post-trasplante y la supervivencia de estos pacientes. Pretendemos igualmente poner a punto una metodología que pueda ser empleada de forma rutinaria para la determinación, sobre todo, de los marcadores inmunológicos, conscientes de la dificultad que puede conllevar la instauración de una estrategia que incluya su análisis rutinario periódico.

4. INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1. El Citomegalovirus humano (CMV)

4.1.1. Generalidades, estructura y replicación del CMV

El citomegalovirus humano (CMV), denominado Herpesvirus Humano 5 (HHV-5) por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés International Committee on Taxonomy of Viruses), pertenece a la subfamilia Betaherpesvirinae, familia *Herpesviridae* [Davison *et al.*, 2009]. Los miembros de esta subfamilia se caracterizan de forma no exclusiva por presentar un rango de hospedador restringido y un ciclo replicativo relativamente largo [Roizman y Pellet, 2001]. El CMV es capaz de producir infecciones líticas y/o persistentes en diversos tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliales, células dendríticas (CDs) o macrófagos [Sinzger *et al.*, 1995; Fish *et al.*, 1998; Riegler *et al.*, 2000; Jarvis y Nelson, 2002]. El CMV establece una infección latente estricta en precursores mieloides CD34+ y células derivadas (mononucleares) [Sinclair, 2008].

Los viriones de la familia *Herpesviridae* presentan una arquitectura común (Figura 1), que se caracteriza típicamente por incluir las siguientes estructuras (enumeradas del interior al exterior de la partícula: a) el *core*, que contiene el genoma del virus, una molécula lineal de ADN bicatenario

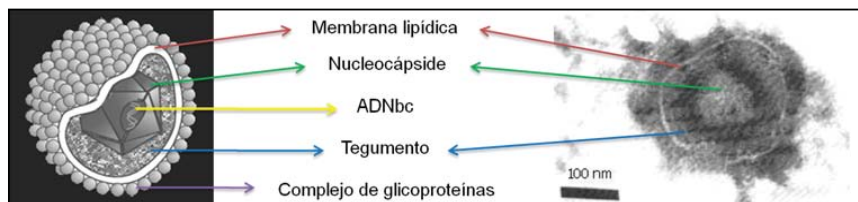


Figura 1. Dibujo (izquierda) e imagen de microscopía electrónica (derecha) en las que se muestran las partes del virión características de la familia *Herpesviridae*. Aquí se ha tomado como ejemplo el virión del CMV.

(~235 kpb); b) la nucleocápside icosaedraédrica de aproximadamente 100-110 nm de diámetro formada por 12 pentámeros y 150 hexámeros; c) el tegumento, de aspecto amorfo y a veces asimétrico, que está compuesto por fosfoproteínas y rodea la cápside; y d) la membrana, una bicapa lipídica polimórfica que contiene insertados múltiples complejos de glicoproteínas del virus que actúan como receptores y mediadores de la entrada del virus en las células que infectan [Roizmann *et al.*, 1992; Liu y Zhou, 2007]. Los viriones maduros del CMV son esféricos y miden entre 150 y 200 nm de diámetro.

La cápside icosaedraédrica de 100-110 nm contiene una molécula lineal de ADN bicatenario de aproximadamente 235 kpb, constituyendo el genoma más grande de todos los herpesvirus humanos –más de un 50% mayor que el del VHS-1-. La estructura del genoma del CMV es de la clase E dentro de la clasificación de los genomas de los herpesvirus (Figura 2), y consiste en dos secuencias únicas larga y corta (UL y US) flanqueadas por repeticiones invertidas (TRL e IRL; TRS e IRS) [Weststrate *et al.*, 1980; Davison *et al.*, 2003].

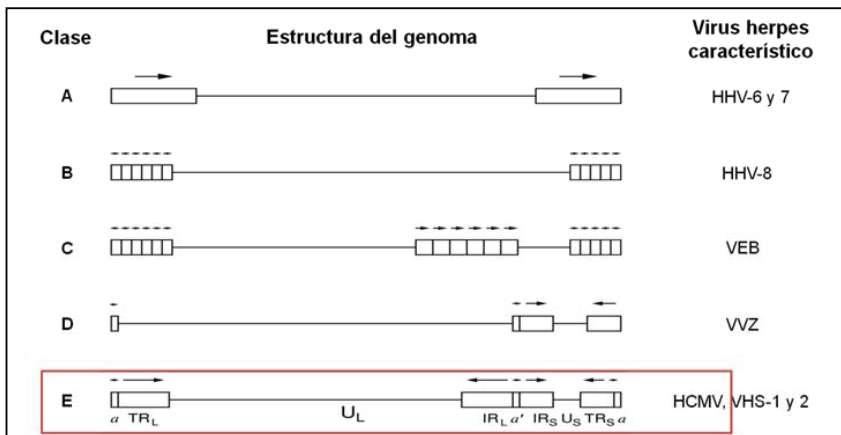


Figura 2. Clases de genomas de los virus herpes humanos (no a escala) [Roizman y Pellet, 2001; Davison y Bhella, 2007]. Las regiones únicas se muestran como líneas horizontales y las repeticiones como rectángulos. Las flechas muestran la orientación de las repeticiones. En el recuadro rojo se resalta la estructura característica del genoma del HCMV y se detallan los distintos segmentos (ver texto para explicación).

Además, se ha descrito una repetición directa terminal denominada "secuencia a", existiendo una copia invertida de la misma "a'" en medio del genoma [Spaete y Mocarski, 1985; Tamashiro y Spector, 1986; Davison *et al.*, 2003] Las repeticiones del genoma facilitan la replicación del genoma y permiten que las secciones U_L y U_S se inviertan independientemente una de la otra dando lugar a 4 posibles isómeros.

En las células permisivas, la transcripción del genoma vírico en el núcleo celular se realiza de forma secuencial en tres fases dando lugar a la producción de tres tipos de proteínas: i) precoces inmediatas (α), implicadas en la regulación de la transcripción genética y el control del crecimiento de la célula [Spector, 1996; Castillo y Kowalik, 2002]; ii) precoces (β), que incluyen factores de transcripción, moléculas que participan en la evasión del sistema inmunitario [Del Val *et al.*, 1989; Mocarski, 2002] y enzimas, como la ADN polimerasa vírica; y iii) tardías (γ), formadas principalmente por proteínas estructurales que aparecen tras el inicio de la replicación del genoma vírico. El ciclo replicativo del CMV se detalla a continuación (Figura 3).

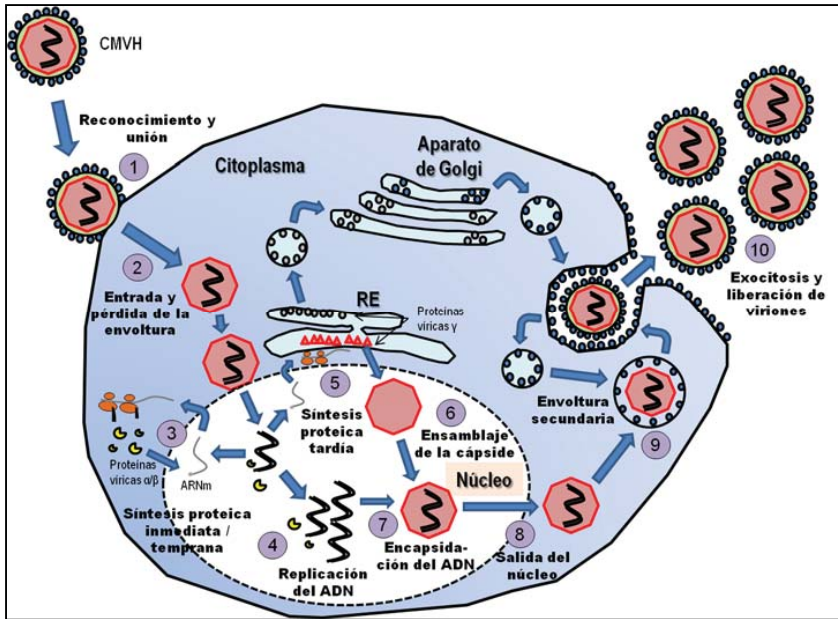


Figura 3. Ciclo replicativo del CMV (adaptado de [Crough y Khanna, 2009]).

Por su utilización tanto en el diagnóstico virológico de la infección por CMV [Gerna *et al.*, 1990; Locatelli *et al.*, 1994; Grossi *et al.*, 1995; Boeckh, 1999; Gerna *et al.*, 2003] como en la monitorización de la respuesta inmunológica celular frente al CMV [Crough y Khanna, 2009], destacan dos proteínas: la fosfoproteína pp65 y la proteína precoz-inmediata 1 o IE-1 (del inglés, Immediate-Early protein 1). La proteína pp65 codificada por el gen UL83 es la más abundante del tegumento y en general de las partículas víricas del CMV [Irmieri y Gibson, 1983; Baldick y Shenk, 1996; Streblow *et al.*, 2006]. Esta proteína presenta inmunogenicidad [Britt y Vugler, 1987] y actúa como diana de la inmunidad humoral [Jahn *et al.*, 1987; Landini *et al.*, 1990; Ohlin *et al.*, 1995] y celular [Beninga *et al.*, 1995; Kern *et al.*, 2002], siendo según algunos trabajos el antígeno más importante para la respuesta de las células T citotóxicas [McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996]. La proteína IE-1 de 72 kDa codificada por el gen UL123 es la proteína

más abundante durante la fase precoz-inmediata de la infección por el CMV y su expresión (junto con la de IE-2) activa el ciclo replicativo vírico tanto en la infección aguda como en la reactivación, mientras que se halla restringida durante la infección latente [Meier y Stinski, 1996]. Se ha demostrado que esta proteína es una de las dianas inmunodominantes del CMV en la respuesta inmunitaria de los linfocitos T (LT) CD8⁺ [Reddehase *et al.*, 1987; Borysiewicz *et al.*, 1988; Gibson *et al.*, 2004; Bunde *et al.*, 2005; Sylwester *et al.*, 2005; Crough y Khanna, 2009].

4.1.2. Patogenia e inmunidad

La infección por el CMV es frecuente en todas las poblaciones humanas, si bien el porcentaje de individuos infectados es cada vez menor en países desarrollados, siendo actualmente del 40-60%, por lo que la población susceptible a la primoinfección se va incrementando [Zhang *et al.*, 1995; Mocarski y Courcelle, 2001; De Ory *et al.*, 2004]. La adquisición del CMV se puede producir a través de la sangre, tejidos y la mayoría de secreciones corporales en las que se excretan las partículas víricas durante meses o años, como saliva, leche materna, secreciones vaginales, orina, lágrimas, etc. Las vías congénita –tanto transplacentaria como peri y postnatal, oral y sexual así como las transfusiones sanguíneas y trasplantes constituyen las principales formas de transmisión del CMV [Mocarski y Courcelle, 2001; Landolfo *et al.*, 2003; Crough y Khanna, 2009]. En primera instancia, el virus se replica productivamente en células epiteliales de los tractos genitourinario, respiratorio o gastrointestinal alto (salvo en el caso de la adquisición por transfusión o trasplante), y posteriormente se disemina por medio de la infección de leucocitos y células endoteliales, que permiten la persistencia del virus en el organismo. Asimismo, el virus establece una fase de latencia en determinados tipos celulares, notablemente en células mieloides no diferenciadas (monocitos y

progenitores de CD8) [Sinclair y Sissons, 2006; Sinclair, 2008]. Además de la infección primaria que se produce en pacientes seronegativos, existen la reinfección por cepas distintas y la reactivación de la misma cepa de CMV en los pacientes seropositivos (infección recurrente) [Ljungman *et al.*, 2002].

Durante la infección primaria por el CMV se ha visto que la inmunidad innata juega un papel importante, sobre todo los linfocitos “natural killer” o NK [Biron *et al.*, 1989; Orange *et al.*, 1995; Kuijpers *et al.*, 2008], como demuestra la creciente descripción de mecanismos que presenta el CMV dirigidos a disminuir su función defensiva frente a la infección [Wilkinson *et al.*, 2008]. Otras células que contribuyen al reconocimiento primario y respuesta inmunitaria del CMV son las CD8 y los monocitos / macrófagos. Las CD8 estimulan por un lado la activación de las células NK [Zitvogel, 2002] y por otro el inicio de la respuesta adaptativa por medio de la presentación del antígeno a los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, además de ser los principales productores de los interferones (IFN) antivirales de tipo I (α/β), que participan en el control efectivo de la infección por el CMV [Orange y Biron, 1996]. Los monocitos permiten la propagación del virus por el organismo [Noda *et al.*, 2006] y una vez en el lugar de infección se pueden diferenciar en CD8 y macrófagos. Estos últimos son responsables de la producción de citoquinas proinflamatorias (como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 1 (IL-1)) que influyen en el desarrollo de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, además de producir también IFN de tipo I (IFN-I) y de sus funciones fagocítica y de presentación de antígeno a los LT [Hengel *et al.*, 2000]. El reconocimiento del CMV por los receptores “Toll-like”, expresados en CD8 y macrófagos entre otras células, tiene un papel fundamental en la activación de todos estos mecanismos inmunitarios innatos [Compton *et al.*, 2003; Boehme y Compton, 2004; Tabeta *et al.*, 2004].

La infección primaria por CMV tiene como resultado de la respuesta inmunitaria adaptativa humoral la producción de IgMs, IgAs e IgGs frente al CMV. Los anticuerpos neutralizantes están dirigidos frente a las glucoproteínas de la envoltura vírica del CMV: gB, indispensable en la penetración de las células por el virus y en la diseminación célula-célula [Britt *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 1993; Navarro *et al.*, 1997]; gH, que participa en la fusión de la envoltura vírica y la membrana celular [Rasmussen *et al.*, 1991; Urban *et al.*, 1996]; y el complejo gM/gN, cuya presencia es requerida para la correcta modificación y transporte de los constituyentes víricos al compartimento de ensamblaje en las células infectadas [Mach *et al.*, 2000; Shimamura *et al.*, 2006]. Sin embargo, su papel protector frente a la infección, reinfección o reactivación es controvertido. Hay evidencia de que la preexistencia de anticuerpos frente al CMV disminuye la aparición de síntomas o la gravedad de los mismos así como la viremia, como en el caso de la infección congénita por CMV en hijos de madres seropositivas [Fowler *et al.*, 1992; Fowler *et al.*, 2003]. No obstante, la presencia de anticuerpos neutralizantes no evita la existencia de infección congénita por el CMV [Fowler *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 2006], probablemente debido a que los anticuerpos no protegen frente a la reinfección por cepas distintas [Ross *et al.*, 2010] o no controlan la reactivación en la mujer embarazada.

Finalmente, la respuesta adaptativa celular, con el protagonismo indiscutible de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), es la que consigue la resolución de la primoinfección por el CMV. El desarrollo y la mejora de las técnicas para el estudio de las poblaciones linfocitarias y su funcionalidad, notablemente de la citometría de flujo multiparamétrica y de la tinción intracelular de citoquinas, ha permitido caracterizar mejor la respuesta inmunitaria celular subsecuente a la infección por CMV. El estudio de la respuesta celular T CD8⁺ y CD4⁺ frente a diversos antígenos de origen vírico concluye en varios estudios que las proteínas virales pp65 e IE-1 suscitan

una respuesta específica en un elevado número de individuos [Reddehase *et al.*, 1987; Borysiewicz *et al.*, 1988; Beninga *et al.*, 1995; Boppana y Britt, 1996; Kern *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2004; Bunde *et al.*, 2005; Sylwester *et al.*, 2005], de ahí que sean las más utilizadas para el estudio de la respuesta inmunitaria frente a este virus (como ya se comentó previamente). La función de los CTL en el control de la infección por CMV ha sido ampliamente demostrada [Borysiewicz *et al.*, 1983; Reddehase *et al.*, 1987], siendo característico el incremento de la enfermedad por CMV en individuos con déficit o depleción de CTLs tanto en modelo animal como en humanos [Mutter *et al.*, 1988; Reusser *et al.*, 1991]. Los CTLs junto con los NKs son los encargados de eliminar las células infectadas por el CMV vía citolisis mediada por granzimas y perforina [Riera *et al.*, 2000]. Una vez superada la infección primaria, se ha visto que la proporción de linfocitos T CD8⁺ de memoria específicos frente al CMV en sangre periférica (SP) permanece elevada en individuos sanos [Gillespie *et al.*, 2000], y que incluso aumenta con la edad [Khan *et al.*, 2002], lo que refleja un estado de portador a largo plazo con posibles reactivaciones periódicas del virus que llevan a una estimulación “mantenida” de la respuesta de células T. La participación de los linfocitos T CD4⁺ en el control de la infección por CMV y su papel fundamental también ha sido ampliamente probado, sobre todo en individuos con una función disminuida de los mismos [Jonjic *et al.*, 1989; Walter *et al.*, 1995; Gamadia *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2004]. En la respuesta primaria, los linfocitos Th CD4⁺ efectores estimulados por el CMV secretan IFN γ y TNF α para dirigir una respuesta inmunitaria tipo Th1 [Rentenaar *et al.*, 2000; Gamadia *et al.*, 2004], aunque hay estudios que también le otorgan un papel efector directo sobre las células infectadas por el CMV [Gamadia *et al.*, 2004]. Al igual que sucede con los linfocitos T CD8⁺, los fenotipos funcionales de linfocitos T CD4⁺ encontrados en SP de adultos sanos son consistentes con una respuesta “mantenida” frente a reactivaciones

periódicas del CMV [Rentenaar *et al.*, 2000]. A continuación, se resume la respuesta inmunitaria frente al CMV (Figura 4).

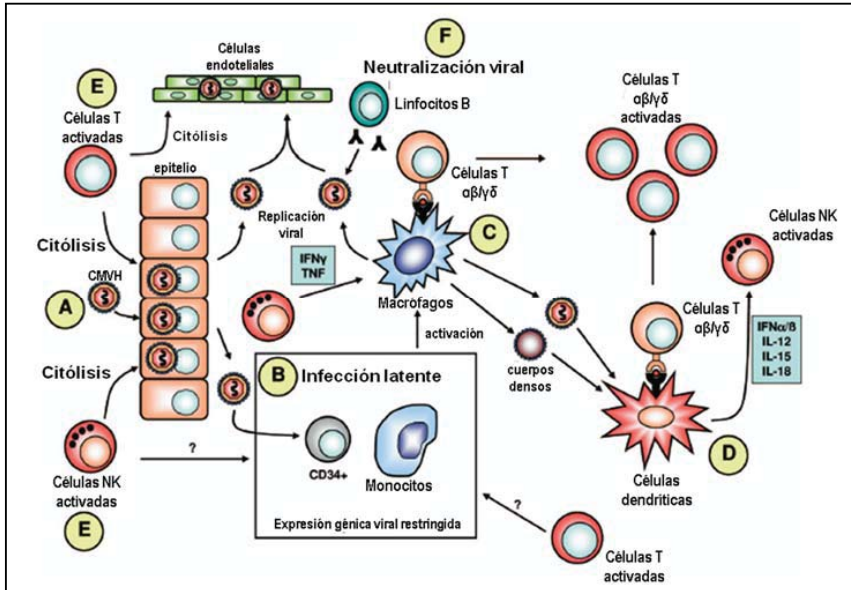


Figura 4. Respuesta inmunitaria frente al CMV (adaptado de [Crough y Khanna, 2009]). A: la primoinfección comienza típicamente por la replicación del virus en el epitelio mucoso. B: desde el foco, el virus se disemina por medio de monocitos, dónde además es capaz de permanecer en estado de latencia. C: las partículas víricas son procesadas por células presentadoras de antígeno (macrófagos / CDs), que estimulan a las células T. D: Además, las CDs secretan IFN- γ e interleuquinas que estimulan la respuesta inmunitaria innata, notablemente a los NKs. E: los linfocitos T (sobre todo CTLs) y los NKs eliminan las células infectadas por citólisis. Los linfocitos Th $CD4^+$ y los NK secretan IFN γ y TNF α entre otros para incrementar la respuesta inflamatoria / inmunitaria. EL IFN γ aumenta la producción de TNF α por los macrófagos. F: los linfocitos B activados por los Th producen anticuerpos neutralizantes que ayudan a controlar las partículas víricas extracelulares.

Una vez controlada la infección primaria, el CMV permanece en un estado latente, especialmente en células mieloides no diferenciadas (monocitos y progenitores de CDs) [Sinclair y Sissons, 2006; Sinclair, 2008]; si bien se ha visto que en estas células los genes IE que inician el ciclo lítico del virus están reprimidos, y que su expresión es dependiente de la diferenciación celular a macrófagos y/o CDs [Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994; Soderberg-Naucler *et al.*, 1997; Riegler *et al.*, 2000; Reeves *et al.*, 2005]. Otro

tipo celular en el que parece que el CMV podría establecer un estado de latencia son las células endoteliales; esto explicaría los diferentes órganos en los que se detecta latencia y recurrencia (Reddehase, 1994). Existen diferentes hipótesis para explicar el estado de portador a largo plazo de CMV en diferentes órganos: por un lado, hay indicios de que puede permanecer en un estado de baja replicación (persistencia), como en glándulas salivares en determinadas condiciones [Jonjic *et al.*, 1989]; y por otro, hay estudios en los que entra en un estado de verdadera latencia, como en pulmón, hígado o bazo, durante el cual se producen reactivaciones intermitentes [Reddehase *et al.*, 1994]. Además, según este último estudio realizado en modelo murino, la reactivación se produce indistintamente e independientemente en diferentes tejidos, y parece que esta localización depende de la carga viral en cada uno de estos órganos en el momento de la primoinfección. No se conocen con exactitud los fenómenos que llevan a la reactivación del virus, pero hay varios factores que parecen estar relacionados, como la inmunosupresión, la inflamación, la infección o el estrés [Prösch *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2001; Hummel y Abecassis, 2002]. En muchos de estos casos -si no en todos-, el incremento de citoquinas proinflamatorias, notablemente TNF α , parece estar relacionado con el inicio de la expresión de los genes IE que darán lugar a la reactivación [Prösch *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2001; Hummel y Abecassis, 2002].

La persistencia del CMV en su hospedador se debe a la inducción del estado de latencia y su replicación en lugares anatómicos privilegiados, como lo son las células epiteliales de las glándulas salivares, pero también a su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria por medio de la expresión de genes que interfieren con su función. Así, se han descrito genes víricos que disminuyen la presentación de antígenos por medio de las moléculas del CMH-I y II, empeorando de esta forma el reconocimiento de las células infectadas por los linfocitos T CD8⁺ y del antígeno viral por los T CD4⁺, respectivamente [Mocarski, 2002; Mocarski, 2004]. También se ha descrito

una proteína codificada por el CMV que aumenta la expresión de antígeno leucocitario humano E (HLA-E) unido a CMH-I, un inhibidor del reconocimiento por los linfocitos NK [Tomasec *et al.*, 2000; Mocarski, 2002; Mocarski, 2004]. Se ha visto que el CMV también es capaz de modular quimiocinas en el foco de infección y de producir homólogos de citoquinas, como la IL-10, para su propio beneficio [Bodaghi *et al.*, 1998; Mocarski, 2002]. Y por último, el CMV codifica proteínas que detienen la apoptosis de las células infectadas [Mocarski, 2002].

4.2. CMV en el receptor de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH)

4.2.1. Aspectos clínicos de la infección por el CMV en el receptor de alo-TPH

En el paciente receptor de alo-TPH, el CMV representa una complicación importante post-trasplante debido a la inmunosupresión a que se somete a estos pacientes. En los pacientes receptores de alo-TPH es más frecuente la infección activa por CMV debida a la reactivación que a la infección primaria (a diferencia de lo que sucede en el receptor de trasplante de órgano sólido (TOS)). Los síndromes clínicos por CMV en el receptor de alo-TPH incluyen el llamado “síndrome por CMV” que se caracteriza por la presencia de fiebre y leucopenia sin hallazgos específicos, además de la afectación de casi cualquier órgano, siendo más frecuentes en estos pacientes la neumonitis y la enfermedad gastrointestinal (esofagitis, enterocolitis), seguidos de retinitis y encefalitis [Sissons y Carmichael, 2002; Boeckh *et al.*, 2003; Boppana y Britt, 2013]. Llegados a este punto, cabe diferenciar entre “infección” y “enfermedad” por el CMV. La infección por CMV se define como el aislamiento del virus o la detección de sus proteínas o ácidos nucleicos en cualquier muestra de tejido o fluido

orgánico; mientras que la enfermedad orgánica por CMV (EOC) implica la presencia de signos clínicos y síntomas junto con la detección del virus en el órgano afectado [Ljungman *et al.*, 2002]. Para el diagnóstico certero de EOC es necesaria la detección vírica por medio de cultivo o técnicas histológicas en una muestra de tejido del órgano afectado, excepto en el caso de retinitis, en que la valoración de las lesiones típicas por un oftalmólogo es suficiente, y en el caso de encefalitis, en que la detección por PCR es válida [Ljungman *et al.*, 2002].

En los primeros 100 días post-trasplante, la neumonía intersticial es la complicación más frecuente y grave por CMV en los pacientes receptores de alo-TPH debido a su alta mortalidad, siendo de 60-80% en pacientes no tratados y del 50-60% en pacientes tratados con antivirales específicos [Sissons y Carmichael, 2002; Gandhi y Khanna, 2004; Seo y Boeckh, 2013]. Esta neumonitis presenta con frecuencia un patrón intersticial más que alveolar, y en raras ocasiones se puede observar la presencia de nódulos en la radiografía de tórax. La infiltración intersticial se acompaña en los casos graves de fiebre, tos improductiva y disnea que progresa a hipoxia y fallo respiratorio. Este cuadro suele tener un inicio rápido con aparición de problemas respiratorios en menos de dos semanas [Sissons y Carmichael, 2002; Gandhi y Khanna, 2004; Crumacker y Wadhwa, 2007]. Su diagnóstico requiere la detección única de CMV en lavado broncoalveolar o biopsia pulmonar por cultivo o histología [Ljungman *et al.*, 2002]. En este mismo periodo post-trasplante (<100 días) es cuando se suelen producir también las complicaciones en el tracto gastrointestinal (TGI) por CMV, que pueden producirse desde el esófago al recto. La esofagitis cursa con odinofagia, gastritis nauseosa y/o dolor epigástrico y la colitis con dolor abdominal, diarrea y hematoquecia. El diagnóstico requiere de la presentación de síntomas junto con la demostración de lesiones en la mucosa por endoscopia y la detección del CMV en una biopsia. Las lesiones endoscópicas son variables [Ljungman *et al.*, 2002].

Antes de la introducción de la terapia antiviral con ganciclovir (GCV), la mayoría de complicaciones por CMV se producía en el periodo entre el prendimiento del injerto y el día 100 post-trasplante con algunos casos esporádicos antes del prendimiento. Si bien, se ha visto que la introducción del tratamiento específico frente al CMV en el periodo inmediato post-trasplante ha hecho disminuir la incidencia de las complicaciones tempranas por CMV a valores entre el 3 y el 6%, pero que ha disparado la aparición de complicaciones tardías (>100 días post-trasplante) hasta casi el 18% [Boeckh *et al.*, 2003]. La enfermedad tardía por CMV normalmente se manifiesta igual que la temprana, pero con mayor ocurrencia de retinitis y encefalitis. La retinitis por CMV en pacientes receptores de alo-TPH es una complicación rara y de aparición tardía. Los síntomas más frecuentes son la pérdida de la agudeza visual y la visión borrosa, que normalmente se producen bilateralmente. Para evitar la ceguera, el diagnóstico debe realizarse rápidamente por un oftalmólogo que confirme la presencia de retinitis necrotizante con o sin hemorragia [Crippa *et al.*, 2001; Seo y Boeckh, 2013]. Por último, la encefalitis por CMV, que también es un fenómeno poco habitual en el receptor de alo-TPH, suele producirse de forma tardía y se relaciona con cepas mutantes resistentes al tratamiento antiviral [Wolf *et al.*, 2003].

4.2.2. Factores de riesgo para la infección activa y enfermedad por el CMV en el receptor de alo-TPH

El estado serológico frente al CMV de donante y receptor parece influir en la probabilidad de desarrollo de infección activa y enfermedad por CMV post-trasplante. Así, se estima que un 30% de los receptores seronegativos antes del trasplante desarrollan una primoinfección cuando el donante es seropositivo (situación D+/R-); mientras que el 80% de receptores seropositivos (D-/R+ y D+/R+) previamente sufrirán una

reactivación post-trasplante [Ljungman, 2007]. De hecho, la seropositividad del receptor parece ser un factor de riesgo de mortalidad en el alo-TPH [Ljungman *et al.*, 1998; Broers *et al.*, 2000; Boeckh *et al.*, 2003; Ljungman *et al.*, 2003; Boeckh y Nichols, 2004; Ljungman, 2007] y se ha sugerido que en estos casos, la seropositividad del donante mejora la evolución del receptor [Ljungman *et al.*, 2003]. Cuando tanto el receptor como el donante son seronegativos (D-/R-) el riesgo de enfermedad por CMV es muy bajo (1-3%) y sólo puede producirse por transfusión sanguínea positiva o contacto con individuos seropositivos que eliminan el virus [Boeckh *et al.*, 2003].

Aparte del estado serológico frente al CMV de donante y receptor, otros factores de riesgo asociados con la infección por CMV en el receptor de alo-TPH son: la edad del paciente, la fuente de precursores hematopoyéticos, el grado de disparidad de HLA entre donante y receptor, la utilización de injertos con depleción de células T o anticuerpos anti-células T, el régimen de acondicionamiento, la inmunosupresión post-trasplante, el tiempo de prendimiento del injerto y la profilaxis para evitar la enfermedad del injerto contra el huésped aguda (EICHa). La edad avanzada es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad por CMV y muerte relacionada con el trasplante [Ljungman *et al.*, 1998]. También se ha visto que los pacientes receptores de alo-TPH con incompatibilidad HLA o de donantes no emparentados presentan un mayor riesgo de infección activa por CMV y muerte que los que presentan identidad de HLA [Ljungman *et al.*, 1998]. En cuanto al origen de los progenitores hematopoyéticos, existen estudios contradictorios sobre si el riesgo es mayor para el trasplante de médula ósea (MO) o para el de sangre periférica (SP), si bien hay coincidencia en que la depleción de células T o la selección positiva de CD31 predispone a la infección activa por CMV [Boeckh *et al.*, 2003]. Asimismo, parece que el trasplante a partir de sangre de cordón umbilical (SCU) también incrementa el riesgo de infección debido al enlentecimiento

en la recuperación de la función de las células T post-trasplante [Komanduri *et al.*, 2007].

En general, los regímenes de acondicionamiento mieloablativos se relacionan con mayores cargas virales de CMV que los no-mieloablativos, pero a largo plazo parece que la incidencia de enfermedad por CMV es similar con ambos regímenes [Boeckh *et al.*, 2003]. Sin embargo, la utilización de ciertos compuestos como alemtuzumab (anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD51+) o rituximab (mAb anti-CD20+) en acondicionamientos no-mieloablativos, como tratamiento inmunosupresor en la profilaxis de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) o como tratamiento quimioterápico en algunos linfomas sí que parece predisponer a la reactivación y enfermedad por CMV [Chakrabarti *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008]. Igualmente, la inmunosupresión post-trasplante para tratar la EICH con altas dosis de corticosteroides, micofenolato de mofetilo (MMF) o globulina antitimocítica (ATG) también se consideran de elevado riesgo para el desarrollo de enfermedad por CMV en este contexto [Boeckh *et al.*, 2003]. Además, se ha determinado que la EICH es el mayor factor de riesgo post-trasplante para la infección activa y enfermedad por CMV [Ljungman *et al.*, 2006]. La EICHa se relaciona con el incremento de la reactivación, de la carga viral y de la enfermedad por CMV [Nichols *et al.*, 2001; Ljungman *et al.*, 2006]. La EICH crónica es un factor de riesgo de la enfermedad tardía por CMV [Einsele *et al.*, 2000]. Todos estos factores contribuyen al empeoramiento de la respuesta inmunitaria en estos pacientes, lo que se correlaciona con el aumento de la carga viral del CMV y esta a su vez parece estar relacionada con el desarrollo de enfermedad por CMV [Emery *et al.*, 2000; Boeckh *et al.*, 2003].

4.2.3. Técnicas diagnósticas empleadas en la detección de la infección activa por CMV

La determinación de anticuerpos específicos frente al CMV suele ser la primera aproximación al diagnóstico de la infección por CMV. De esta forma se puede conocer el estado serológico de los individuos, que, como se ha visto, tiene importancia entre otros en el contexto del alo-TPH. Para ello, se han desarrollado varias pruebas de enzimoimmunoanálisis (EIA) que permiten la detección de IgMs e IgGs frente al CMV, siendo el inmunoensayo quimioluminiscente indirecto el método más extendido actualmente entre las plataformas comerciales de serología, empleando en su mayoría un lisado de células infectadas por el CMV como fase sólida. En la primoinfección por CMV, las IgMs suelen aparecer antes de las IgGs, alcanzando una fase estacionaria o “plateau” en el primer mes tras la adquisición del virus, y posteriormente disminuyen lentamente en los siguientes 3 a 6 meses [Nielsen *et al.*, 1988]. Existe una gran variabilidad individual: se ha visto que hay pacientes en los que las IgMs desaparecen rápidamente mientras que en otros persisten un periodo de tiempo mucho más prolongado [Griffiths *et al.*, 1982; Nielsen *et al.*, 1988; Revello *et al.*, 2002; Revello y Gerna, 2002]. El problema de las IgMs es que pueden dar fallos de especificidad, notablemente debido a falsas reactividades por la presencia del factor reumatoide o IgGs competitivas o por reactividad cruzada o estimulación policlonal durante otras infecciones virales, si bien algunos se han minimizado por el empleo de EIAs de captura, la preadsorción de los sueros con anticuerpos anti-IgG humana o la incorporación de antígeno control [Revello y Gerna, 2002]. Además, las IgMs también pueden aparecer en infecciones recurrentes por el CMV [Nielsen *et al.*, 1988; Kraat *et al.*, 1996], dificultando todavía más el uso de este parámetro para determinar la fase infecciosa frente al CMV en que se encuentra un paciente. Para diagnosticar con precisión la primoinfección, la mejor opción es detectar la seroconversión de IgGs. Las IgGs frente al CMV aparecen después

de las IgMs y perduran toda la vida, por lo que la forma rápida de dilucidar si un individuo es susceptible o no a la primoinfección es determinar la presencia / ausencia de estas IgGs. La avidez de las IgGs también se ha empleado para diferenciar entre primoinfección e infección no reciente [Lazzarotto *et al.*, 1997], aunque la comparación de diferentes kits comerciales muestra una elevada variabilidad en los resultados [Revello *et al.*, 2010].

En el paciente inmunodeprimido, se ha visto que existe una correlación entre la cantidad de virus en sangre con la replicación viral y la probabilidad de desarrollo de enfermedad por CMV [Grossi *et al.*, 1995; Emery *et al.*, 2000]. Varios estudios determinaron que los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica (PBLs, del inglés peripheral blood leukocytes) eran las células más frecuentemente portadoras del virus durante las fases de infección activa por el CMV [Dankner *et al.*, 1990; Gerna *et al.*, 1992], por lo que se inició su utilización para diagnosticar la infección sistémica por CMV. Para la detección del virus existen varias posibilidades. En primer lugar, se empleó el cultivo celular, que, con las mejoras derivadas de la incorporación del shell-vial con líneas de fibroblastos humanos y la tinción con mAbs fluorescentes dirigidos frente a proteínas específicas del virus (p72/IE-1), permitieron realizar la detección de la infección por CMV en 24-48 horas tras la inoculación de una muestra [Gleaves *et al.*, 1984; Gleaves *et al.*, 1985; Shuster *et al.*, 1985; Gerna *et al.*, 1990; Gerna *et al.*, 2003]. Esto dió lugar a la primera aproximación para la cuantificación de CMV en sangre, la viremia, que se realizaba por medio de la inoculación de fibroblastos humanos en shell-vial con un volumen conocido de PBLs obtenidos de muestras de sangre de pacientes, basándose en la premisa de que un PBL infectado, infectaba a su vez un fibroblasto en el cultivo, y el número de células infectadas se obtenía por tinción de la monocapa de

fibroblastos con mAbs fluorescentes frente a p72/IE-1 [Gerna *et al.*, 1990]. Esta técnica está en desuso por su baja sensibilidad, el tiempo requerido para llevarlo a cabo y la pérdida de viabilidad en muestras almacenadas [Boeckh y Boivin, 1998].

El descubrimiento de que la proteína pp65 del CMV era la más abundante en los núcleos de los PBLs en pacientes inmunodeprimidos virémicos [Revello *et al.*, 1992], junto con la posibilidad de detectar su presencia por medio de mAbs fluorescentes, llevó a la descripción del ensayo de la antigenemia pp65 (AG), que tras su perfeccionamiento y estandarización, ha resultado el método más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la infección activa por CMV [Gerna *et al.*, 1992; Gerna *et al.*, 1998]. Los valores altos de AG se correlacionan con la evolución a enfermedad orgánica por CMV. La AG se ha extendido para la vigilancia y monitorización de la infección activa por el CMV en receptores de trasplante [Locatelli *et al.*, 1994; Grossi *et al.*, 1995; Boeckh, 1999]. Las desventajas de esta técnica son la necesidad de que las muestras se procesen rápidamente, el número limitado de muestras que se pueden procesar simultáneamente y la subjetividad en la lectura del resultado [Boeckh y Boivin, 1998; Razonable *et al.*, 2002]

Por último se encuentran las técnicas basadas en la detección del genoma del virus, notablemente por PCR en tiempo real (QRT-PCR), que permite la cuantificación del ADN del virus en diferentes muestras, como plasma o sangre total (en estos casos, hablaremos de DNAemia) [Boeckh y Boivin, 1998; Humar *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000; Gimeno *et al.*, 2008]. Esta técnica se ha extendido más recientemente y presenta varias ventajas con respecto a la AG para la monitorización de la infección activa, que se comentarán más adelante. La PCR también se ha empleado para la detección del genoma del virus en localizaciones orgánicas, si bien hasta la fecha únicamente se acepta su positividad para el diagnóstico de la encefalitis

[Ljungman *et al.*, 2002]. Su elevada sensibilidad y valor predictivo negativo (VPN), hacen que tenga utilidad para descartar la enfermedad por CMV. Pero son necesarios más estudios para determinar cómo utilizarla para discernir el desarrollo de enfermedad, puesto que a nivel local se producen reactivaciones asintomáticas del CMV tras el trasplante.

Como ya se comentó previamente, para llevar a cabo el diagnóstico de la mayoría de enfermedades orgánicas por CMV, y notablemente de las dos más frecuentes en el receptor de alo-TPH, la neumonitis y la afectación del TGI, se tiene que demostrar la presencia del virus por cultivo de biopsia o muestra del órgano afectado, que actualmente se realiza en shell-vial como se ha descrito ya para la viremia, o por medio de técnicas histológicas. Este último se puede llevar a cabo por medio de la detección de inclusiones nucleares típicas del CMV, denominadas en “ojo de búho” en muestras de tejido, hallazgo muy específico pero poco sensible para el diagnóstico de la enfermedad invasiva por CMV. Por ello, se prefiere emplear tinciones inmunohistoquímicas o hibridación in situ para detectar antígenos de CMV [Ljungman *et al.*, 2002].

4.2.4. Estrategias para el tratamiento antiviral frente al CMV

Actualmente hay tres fármacos comercializados para el tratamiento sistémico de la enfermedad por CMV: ganciclovir (GCV) / valganciclovir (valGCV), cidofovir (CDV) y foscarnet (FOS). Los tres tienen como diana la ADN polimerasa vírica pUL54. El GCV fue el primer fármaco aprobado para este fin, y sigue siendo el fármaco de primera línea para el tratamiento de la infección activa por CMV en el receptor de trasplante [Biron, 2006]. Es un análogo del nucleósido guanosina que para ser funcional debe ser

transformado a GCV trifosfato, para lo cual en primer lugar es monofosforilado por la proteína-kinasa vírica pUL97, seguido de su conversión a la forma trifosforilada por kinasas celulares. Esto explica que su acción se realice preferentemente en células infectadas por el virus. El efecto adverso más relevante de este fármaco es la mielotoxicidad que da lugar a leucopenia, trombocitopenia, anemia o hipoplasia de la MO. El GCV tiene una baja biodisponibilidad oral, por lo que su uso es preferencialmente intravenoso (IV). El valGCV es un profármaco del GCV que puede administrarse de forma oral, y que es transformado en GCV en la pared intestinal e hígado. Se han descrito mutaciones tanto en UL54 como en UL97 que confieren resistencia al GCV [Lurain y Chou, 2010]. El CDV es un análogo del nucleósido citosina que es fosforilado únicamente por kinasas celulares para ser activo. Se trata de un antiviral de amplio espectro, útil frente a otros herpesvirus y otros virus ADN. Está aprobado para su uso en retinitis en pacientes VIH+ y se puede utilizar como tratamiento de segunda línea en paciente trasplantado infectado por cepas resistentes a GCV, FOS o ambos [Ljungman *et al.*, 2001]. Su principal efecto adverso es la nefrotoxicidad grave. El FOS es un análogo del pirofosfonato y ha demostrado una eficacia similar al GCV en el tratamiento anticipado de la infección por CMV [Reusser *et al.*, 2002]; pero su principal efecto adverso, la nefrotoxicidad, hace que se prefiera utilizar GCV. Se considera un fármaco de segunda línea para el tratamiento de la infección por CMV, si bien se prefiere al CDV para el tratamiento de cepas resistentes a GCV o para pacientes que no pueden seguir el tratamiento con GCV por su mielotoxicidad [Biron, 2006]. Dado que CDV y FOS no dependen de la kinasa pUL97, sólo aparece resistencia a estos fármacos en cepas que presentan mutaciones en UL54; se han descrito mutaciones puntuales en este gen que dan lugar a resistencia cruzada entre FOS y GCV, GCV y CDV e incluso mutaciones que disminuyen la actividad de los tres fármacos simultáneamente [Lurain y Chou, 2010].

El aciclovir (ACV) es un análogo de la 2'-desoxiguanosina, que funciona de forma similar al GCV, pero que posee menor potencia frente al CMV que GCV. Así mismo, tanto las mutaciones que afectan a pUL97 y pUL54 pueden conferir resistencia al mismo. También existe un profármaco del ACV, el valaciclovir (valACV), que se puede administrar por vía oral. La utilización de ACV o su profármaco para la profilaxis de la reactivación del VHS en el contexto del trasplante (sobre todo de órgano sólido (TOS)) se ha visto que también es capaz de disminuir la incidencia de infección activa por el CMV [Fiddian *et al.*, 2002]. Aunque no presenta potencia suficiente para ser utilizado en el tratamiento de enfermedad por CMV, el ACV/valACV se ha aprobado en varios países para ser utilizado en la profilaxis de la infección por CMV en el TOS [Biron, 2006].

Para prevenir la infección primaria por CMV en receptores de alo-TPH seronegativos, es preferible que el donante sea también seronegativo (D-/R-). En este caso (D-/R-), para evitar la primoinfección por medio de productos sanguíneos, estos deben provenir preferentemente de pacientes seronegativos, o deben ser sometidos a depleción de leucocitos por aféresis o filtración. Si bien, no suele ser fácil encontrar un donante compatible seronegativo, por lo que en dicho caso (D+/R-), el receptor del trasplante deberá ser monitorizado por presentar alto riesgo de infección por CMV [Boeckh, 1999].

Las dos estrategias que se pueden emplear para prevenir la infección activa por el CMV en pacientes receptores de trasplante son la profilaxis y el tratamiento anticipado (pre-emptive). La primera estrategia, definida como "profilaxis universal", consiste en la administración de un antiviral a todos los pacientes durante aproximadamente los primeros tres meses post-trasplante. Esta profilaxis idealmente debería producir los mínimos efectos adversos posibles, sin embargo, con los fármacos disponibles, esto no es así. Se ha visto que el empleo profiláctico peri- y post-

trasplante de altas dosis de ACV o valACV, cuya seguridad es mayor que la del GCV, reduce el riesgo de infección por CMV en el paciente receptor de alo-TPH [Prentice *et al.*, 1997; Ljungman *et al.*, 2002]. La profilaxis con GCV también ha sido estudiada en el receptor de alo-TPH [Goodrich *et al.*, 1993; Boeckh *et al.*, 1996], pero si bien se demuestra una disminución de la infección y enfermedad por CMV en el periodo post-trasplante, a largo plazo no mejora la mortalidad de los pacientes, seguramente debido a la neutropenia derivada de su uso. Otro tipo de abordaje profiláctico sería la utilización de inmunoglobulina profiláctica específica frente al CMV, pero ésta no ha probado ser de mucha utilidad para prevenir la infección primaria por CMV en el paciente seronegativo y un meta-análisis reciente concluye que su uso profiláctico no aporta ningún beneficio en el contexto del TPH [Bowden *et al.*, 1991; Raanani *et al.*, 2009]. Actualmente parece que la profilaxis antiviral en el alo-TPH no es la opción generalizada para evitar la infección por CMV, aunque en pacientes de alto riesgo por su elevado grado de inmunosupresión sí que se está empleando el régimen profiláctico de ACV/valACV.

Dada la toxicidad de los fármacos existentes para el tratamiento del CMV, la estrategia más extendida para la prevención de la enfermedad por CMV es la terapia anticipada, que consiste en la utilización de ciclos cortos de tratamiento antiviral, basándose en la demostración de replicación viral activa o durante periodos de intensa inmunosupresión. La condición en la que se basa el tratamiento anticipado es en que la carga viral sanguínea del CMV predice la aparición de enfermedad asociada [Emery *et al.*, 2000]. Para que esta estrategia funcione bien, se debe utilizar un marcador sensible y fiable para la detección temprana del CMV, que permita la obtención de resultados rápidamente; además, es importante una monitorización frecuente de los pacientes, de al menos una vez por semana [Boeckh *et al.*, 2003]. Se han empleado como marcadores la viremia, que está en desuso por su baja sensibilidad [Boeckh y Boivin, 1998]; la antigenemia pp65 (AG),

que es la más extendida, y la DNAemia, que está en auge. Para el inicio del tratamiento antiviral en la monitorización por AG, se emplea normalmente la positividad de pocas células, entre 1-2 células pp65+ / 200 000 PBLs, y en diversos estudios se ha probado la utilidad para disminuir la enfermedad orgánica por CMV [Locatelli *et al.*, 1994; Boeckh *et al.*, 1996]. Sin embargo, en algunos casos la AG no se correlaciona con la carga viral en sangre [Gerna *et al.*, 1998] o no puede llevarse a cabo por la falta de PBLs debida a la neutropenia de los pacientes [Razonable *et al.*, 2002]. Otro problema que se ha descrito es el incremento paradójico de los valores de AG al inicio del tratamiento con GCV, que puede suceder independientemente de la replicación viral, pudiendo incitar a un cambio “erróneo” de tratamiento [Gerna *et al.*, 1998].

Por ello, está habiendo un cambio hacia la utilización de la DNAemia en la monitorización de la infección activa por CMV en los pacientes receptores de trasplante. Varios estudios comparativos entre la DNAemia y la AG han sido publicados [Einsele *et al.*, 1995; Boeckh *et al.*, 1997; Lilleri *et al.*, 2007; Gerna *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2008], y se obtienen resultados prometedores para la DNAemia, que cuenta con varias ventajas: permite detectar el virus en periodos de leucopenia, presenta un rango dinámico alto de valores de cuantificación de la carga de CMV y parece que se correlaciona mejor con la respuesta tras el inicio del tratamiento antiviral [Boeckh *et al.*, 1997; Boeckh y Boivin, 1998; Einsele *et al.*, 2000; Ljungman *et al.*, 2006; Gimeno *et al.*, 2008]. Los problemas que han aparecido con la utilización de esta técnica es que todavía no existe una estandarización que permita la generalización de guías basadas en valores consensuados de punto de corte de la DNAemia para el inicio del tratamiento anticipado ni la intercomparación entre centros que utilizan equipos comerciales distintos o tipos de muestra distintos [Harrington *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2009; Gracia-Ahufinger *et al.*, 2010]. De momento, se prefiere emplear los datos locales con los parámetros locales, lo que da lugar a una gran variedad de

puntos de corte sugeridos para el inicio del tratamiento [Gibson *et al.*, 2004; Verkruyse *et al.*, 2005; Lillieri *et al.*, 2007; Gerna *et al.*, 2008; Gimeno *et al.*, 2008]. La descripción de un estándar internacional para la PCR de CMV por la OMS podría ser la clave para mejorar este punto. El periodo de monitorización post-TPH suele ser mínimo hasta los tres meses, si bien dada la aparición de enfermedad tardía cada vez con mayor frecuencia, por el empleo de las terapias antivirales en periodos tempranos post-trasplante, sobretodo en pacientes con alto grado de inmunosupresión, la monitorización se suele prolongar mucho más tiempo [Boeckh *et al.*, 2003].

La aparición de cepas resistentes en el alo-TPH parece ser infrecuente y normalmente se produce en GCV y valGCV, dado que son los fármacos más utilizados [Gilbert y Boivin, 2005]. Los factores de riesgo para el desarrollo de resistencia son el tratamiento prolongado, el uso a dosis subóptimas, y la falta de inmunidad frente al CMV [Lurain y Chou, 2010]. Para llevar a cabo el diagnóstico de la resistencia a GCV/valGCV, se deben secuenciar los genes UL97 y UL54 en busca de mutaciones puntuales descritas que confieren resistencia. Las mutaciones en UL97 que confieren resistencia *in vivo* se localizan en dos regiones altamente conservadas entre los diferentes aislados clínicos, el dominio catalítico de la quinasa (codones 460 a 520) y el sitio de reconocimiento del sustrato (codones 590 y 607) [Gilbert y Boivin, 2005; Lurain y Chou, 2010]. Las mutaciones en el gen UL54 que se relacionan con la resistencia a GCV, FOS y CDV se producen generalmente en el dominio catalítico de la polimerasa, entre los codones 301 (región exonucleasa I) y 989 (dominio V) [Gilbert y Boivin, 2005; Lurain y Chou, 2010]. Normalmente aparecen primero mutaciones en UL97, seguidas por las que afectan a UL54. En función de la mutación, la afectación del fármaco será de mayor o menor grado [Lurain y Chou, 2010]. La estrategia a seguir dado que el estudio de resistencia tarda varios días, es

cambiar el tratamiento antiviral, normalmente a FOS cuyo mecanismo de acción es independiente de pUL97.

4.2.5. Diagnóstico basado en la respuesta inmunitaria frente al CMV

La importancia de la respuesta inmunitaria adaptativa, sobre todo celular, en el contexto de la infección por CMV es incuestionable, y viene dada por el hecho de que la enfermedad por este virus se presenta normalmente en pacientes inmunodeprimidos con una respuesta celular deficiente. Por ello parece que la medición de la respuesta mediada por células T puede ser decisiva. Como se ha visto por medio de la transferencia adoptiva, la respuesta específica mediada por células T CD4⁺ y T CD8⁺ parece tener una función importante en el control de la infección por el CMV [Riddell *et al.*, 1992; Einsele *et al.*, 2002]. El desarrollo de métodos inmunológicos para el estudio de la funcionalidad de los linfocitos, como la citometría de flujo o el ELISPOT (enzyme-linked immunospot), ha permitido la enumeración de células T específicas de antígeno productoras de determinadas citoquinas, como el IFN γ o el TNF α [Waldrop *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 2003; Godard *et al.*, 2004].

Para el estudio de células T CD4⁺ específicas, el empleo de lisados celulares de CMV como antígeno estimulador de la respuesta es suficiente [Waldrop *et al.*, 1997], dado que en estas células la presentación de antígeno se realiza a través del CMH-II, que asocia péptidos procesados a partir de antígenos exógenos y que son de tamaño generalmente mayor a 15 aminoácidos (aa) (entre 13-24 residuos). Sin embargo, esto no suele ser posible para las células T CD8⁺, que suelen responder a péptidos presentados por moléculas CMH-I, que proceden de antígenos endógenos de las células que los presentan y son más pequeños, de entre 8 y 10 aa [Maecker y Maino, 2004]. Para el estudio de células T CD8⁺, se describió

inicialmente la utilización de péptidos correspondientes a los epítomos inmunodominantes del antígeno y que, con una longitud adecuada y una capacidad de unión a moléculas CMH-I, estimulaban la respuesta de estas células. Así se generalizó la utilización de complejos multiméricos (preferentemente tetraméricos) de CMH-I unidos a un péptido para suscitar su unión duradera a las células T CD8⁺, que posteriormente pueden ser detectadas en un citómetro de flujo [Altman *et al.*, 1996]. Estos métodos han sido empleados para el estudio de la respuesta inmunitaria celular frente al CMV en varios contextos clínicos, incluido el alo-TPH [Cwynarski *et al.*, 2001; Gratama *et al.*, 2001; Hebart *et al.*, 2002; Ozdemir *et al.*, 2002]. Recientemente se ha comercializado una técnica basada en la determinación de la producción de IFN γ por linfocitos T CD8⁺ estimulados con epítomos antigénicos de CMV unidos a los tipos HLA más comunes, por medio de un EIA, el QuantiFERON®-CMV [Walker *et al.*, 2007].

La utilización de complejos tetrámero-péptido requiere del conocimiento previo de los epítomos y del tipo de CMH-I del individuo, por lo que es difícil de generalizar dada la variabilidad interindividual, no sólo de HLA, sino de las respuestas frente a unos determinados epítomos. El descubrimiento de que una mezcla de pentadecapéptidos superpuestos en al menos 9 aa abarcando la totalidad de la secuencia de un antígeno permite la medición de la respuesta de estas células, independientemente del HLA del paciente y de los epítomos inmunodominantes, ha facilitado enormemente el estudio de la respuesta T CD8⁺, máxime cuando se ha visto que con éstos también es posible la medición de la respuesta T CD4⁺ [Kern *et al.*, 2000; Maecker *et al.*, 2001; Hoffmeister *et al.*, 2003]. Otra aproximación empleada para evitar los problemas derivados de la utilización de tetrámeros-péptido y llevar a cabo la enumeración simultánea de células T CD4⁺ y T CD8⁺ es la utilización de CDs infectadas previamente con CMV como células presentadoras de antígeno (CPA) para estimular la respuesta específica de CMV de forma “natural” [Lozza *et al.*, 2005]. Si bien

esto requiere la generación de CDs derivadas de PBLs de cada paciente, que en caso de neutropenia grave deberían obtenerse previo trasplante, y de controlar la multiplicidad de infección (MOI, del inglés multiplicity of infection) viral para que la función como CPA de las CDs sea correcta para estimular tanto a células T CD4⁺ como a T CD8⁺ [Lozza *et al.*, 2005].

5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La estrategia terapéutica anticipada basada en la antigenemia (AG) o la determinación cuantitativa por PCR (QRT-PCR) de la DNAemia del virus lleva probablemente a un tratamiento excesivo de los pacientes. De hecho, se ha estimado que aproximadamente el 30-65% de los pacientes receptores de alo-TPH podrían ser tratados innecesariamente [Avetisyan *et al.*, 2007]. Además, las pautas cortas de tratamiento antiviral con ganciclovir (GCV) se han asociado con una alta tasa de infección recurrente o tardía por CMV [Boeckh *et al.*, 1996; Boeckh, 1999]. En este contexto, la determinación de la respuesta inmunitaria secuencial de los pacientes podría proporcionar información útil para el diseño óptimo de las estrategias de tratamiento antiviral. Así, la combinación de la monitorización inmunológica con la virológica podría dar lugar a un uso más dirigido del tratamiento anticipado hacia los pacientes con alto riesgo de desarrollar infecciones activas recurrentes y, sobre todo, enfermedad orgánica por CMV (EOC) [Ljungman, 2006; Baldanti *et al.*, 2008].

El análisis de la inmunidad celular específica frente al CMV, particularmente la cuantificación secuencial de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) anti-CMV, determinado mediante el análisis citofluorométrico de la unión de complejos tetraméricos HLA-péptido a CTLs, se correlaciona inversamente con el riesgo de desarrollar una infección activa por CMV y una subsiguiente EOC [Aubert *et al.*, 2001; Cwynarski *et al.*, 2001; Gratama *et al.*, 2001]. Desde nuestro punto de vista, es necesario contrastar esta correlación, puesto que el número de pacientes incluidos en esos estudios no parece suficiente para extraer conclusiones definitivas; por otra parte, el método de los tetrámeros-CMV marcados sólo permite analizar a los pacientes HLA-A2 y, en menor medida, los HLA-B7, que no representan más de un 50-60% de la población caucásica. Para solventar este problema,

decidimos emplear el método citofluorométrico basado en la detección de citoquinas intracelulares en respuesta al estímulo con pentadecapéptidos solapantes representativos de los antígenos pp65 e IE-1 del CMV para cuantificar la respuesta T CD8⁺ frente al CMV con independencia del HLA del paciente [Kern *et al.*, 2000; Maecker *et al.*, 2001; Maecker y Maino, 2004]. Esta técnica resulta también útil para obtener datos consistentes sobre la cinética de reconstitución precoz de la función inmunitaria mediada por células T CD4⁺, cuya relevancia en el mantenimiento de las respuestas T CD8⁺ frente a CMV parece suficientemente contrastada.

Nuestro grupo dispone de datos preliminares que sugieren que la cuantificación de las células T CD8⁺ y T CD4⁺ totales y de la fracción de células T CD8⁺ y T CD4⁺ activadas, proporciona información útil para guiar el tratamiento anticipado con GCV de manera óptima, y que la adquisición de niveles de ambas células por encima de unos puntos de corte (>1 y >1.2 células/ μ l para T CD8⁺ y T CD4⁺, respectivamente) protege frente a la infección activa por CMV [Solano *et al.*, 2008].

El herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6), otro miembro de la subfamilia de los beta-herpesvirus, ha sido recientemente categorizado como patógeno oportunista clínicamente relevante en los pacientes que reciben un alo-TPH [De Pagter *et al.*, 2008], además de su capacidad de mermar o demorar la reconstitución de la inmunidad específica frente al CMV en estos pacientes [Wang *et al.*, 2002]; esto necesita ser comprobado.

En este trabajo, que se presenta como compendio de 5 artículos, nos propusimos investigar en varias áreas concretas en relación con lo anteriormente expuesto, con la idea de que ello permitiría optimar las estrategias de tratamiento antiviral anticipado vigentes:

- (i) cinética de reconstitución de la inmunidad T específica frente al CMV en las distintas modalidades de alo-TPH;

- (ii) validación de niveles periféricos de LT específicos frente al CMV que confieren protección frente a la infección activa sistémica y la EOC;
- (iii) cinética de expansión de LT específicos frente al CMV durante los episodios de infección activa sistémica;
- (iv) efecto del estatus CMV del donante en la incidencia de infección activa sistémica por el CMV y en la dinámica replicativa viral durante los episodios de infección activa sistémica;
- (v) efecto de la infección replicativa por otros herpesvirus, concretamente el HHV-6, en la reconstitución de la inmunidad T específica frente al CMV.

6. ARTÍCULOS ORIGINALES

6. ARTÍCULOS ORIGINALES

Por orden cronológico, los artículos incluidos en esta tesis doctoral son los siguientes:

Artículo 1

Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during preemptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. 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. Bone Marrow Transplant 2010; 45, 543–549.

Artículo 2

An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. Tormo N, Solano C, de la Cámara R, García-Noblejas A, Cardeñoso L, Clari MA, Nieto J, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Benet I, Navarro D. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16: 653-661.

Artículo 3

Kinetics of Cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-Specific IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T Cells During Episodes of Viral DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Potential Implications for the Management of Active CMV Infection. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A, Clari MA, Chilet MF, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1208-1215.

Artículo 4

Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. Bone Marrow Transplant 2011; 46: 1437-43.

Artículo 5

Effect of cytomegalovirus (CMV) serostatus on the incidence and virological features of active CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients. Solano C, Tormo N, de la Cámara R, Nieto J, López J, Benet I, Muñoz-Cobo B, Costa E, Remigia MJ, García-Noblejas A, Bravo D, Navarro D. Correspondence. Clin Infect Dis 2011; 53; 313-315.

6.1. Artículo 1

Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during preemptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. 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. Bone Marrow Transplant 2010; 45, 543–549.



ORIGINAL ARTICLE

Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ 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

N Tormo¹, C Solano^{2,3}, I Benet², MA Clari¹, J Nieto⁴, R de la Cámara⁵, J López⁶, N López-Aldeguez⁷, JC Hernández-Boluda², MJ Remigia², A García-Noblejas⁵, C Gimeno^{1,7} and D Navarro^{1,7}

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ⁵Hematology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain; ⁶Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain and ⁷Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Rising levels of cytomegalovirus (CMV) DNAemia and/or pp65 antigenemia have been observed during pre-emptive ganciclovir therapy in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT). We assessed the incidence of this event in our series, and investigated whether its occurrence was associated with an impairment in the CMV-specific T-cell response. A total of 36 allo-SCT recipients experienced one or more episodes of active CMV infection ($n = 68$) that were pre-emptively treated with val(ganciclovir). Rising levels of antigenemia and DNAemia, and an isolated increase in antigenemia, were observed in 39.7 and 2.9% of all episodes, respectively. Receipt of corticosteroids was associated with rising levels of antigenemia and DNAemia. Median increases of 12- and 6.8-fold of IFN γ CD8 $^{+}$ T and IFN γ CD4 $^{+}$ T cells, respectively, were observed at a median of 16.5 days after initiation of therapy in episodes with decreasing levels in antigenemia and DNAemia. In contrast, the numbers of both T-cell subsets at a median of 13.5 days after initiation of therapy did not differ significantly from those of pre-treatment samples in episodes with rising levels of antigenemia and DNAemia. Lack of prompt expansion of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels in antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy.

Bone Marrow Transplantation (2010) 45, 543–549; doi:10.1038/bmt.2009.172; published online 20 July 2009

Keywords: cytomegalovirus; IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells rising antigenemia; stem cell transplantation

Introduction

The pp65 antigenemia assay is widely used for guiding and monitoring the efficacy of pre-emptive therapy for active cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-SCT) recipients. Pre-emptive therapy results in most cases in a rapid decline of antigenemia until complete clearance. Nevertheless, increasing levels in antigenemia early after initiation of ganciclovir treatment has been reported to occur with certain frequency in this clinical setting.^{1–3} Two distinct patterns of rising antigenemia have been observed: a simultaneous increase in both antigenemia and DNAemia levels, and an isolated increase in the antigenemia level with decreasing or stable DNAemia levels. The former pattern is seen mainly in patients on treatment with high-dose steroids for graft versus host disease (GVHD),^{2,3} or in those receiving antithymocyte globulin (ATG) in the conditioning regimen.⁴ As both drugs are known to cause immunosuppression, a failure in building up a prompt functional T-cell response to CMV is the most likely explanation accounting for the occurrence of these episodes. This assumption, nevertheless, has not been shown. Rising levels in antigenemia and DNAemia may also be due to the emergence of ganciclovir-resistant strains; this phenomenon, however, does not seem to be frequent in the allo-SCT setting.⁵ The latter pattern was documented earlier in solid-organ transplant recipients experiencing a primary CMV infection and its pathogenetic basis was later elucidated.^{6,7} It was shown that persistence of antigenemia in the absence of DNAemia when on ganciclovir treatment was due to overproduction of pp65.⁷ No risk factors seem to be significantly associated with such episodes of active CMV infection in allo-SCT recipients, the resolution of which does not require modification of ongoing antiviral therapy.³ In an earlier study, we showed that CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells provide protection against CMV viremia

Correspondence: Dr D Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Avenue Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.

E-mail: david.navarro@uv.es

Received 2 March 2009; revised 15 May 2009; accepted 19 May 2009; published online 20 July 2009

infection.⁸ In this study, we report on the frequency of the different antigenemia kinetic patterns observed during pre-emptive antiviral therapy in our setting and investigated whether a lack of expansion of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T in response to virus replication was associated with rising levels of antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy. At present, there are no consensus criteria for the therapeutic management of such episodes of active CMV infection. Immunological data presented in this study may contribute to define the optimal strategy for their treatment.

Patients and methods

Patients

Patients undergoing allo-SCT between January 2006 and July 2008 at the Hospital Clínico Universitario, Valencia; Hospital La Princesa, Madrid; Hospital Ramón y Cajal, Madrid; and Hospital Morales Meseguer, Murcia were eligible for inclusion. The study was approved by the Ethics Committees. All patients gave their informed consent to participate in the study.

Virological monitoring and management of active CMV infection

Patients were monitored for pp65 antigenemia by a commercial immunofluorescence assay (Light Diagnostics CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA, USA) and plasma DNAemia (CMV real-time polymerase chain reaction (PCR), Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA or AMPLICOR CMV Monitor, Roche, Indianapolis, IN USA) once a week until day +100, and every other week thereafter until day +180 as described earlier.^{9,10} Virological monitoring beyond this time point was performed at each routine clinical control, and when clinical signs compatible with CMV end-organ disease were present. During episodes of active CMV infection, both tests were performed two or three times a week. For data analysis, the commencement of a given episode was defined by a simultaneous positive result for both the PCR and the antigenemia assays. The end of a given episode was defined by a simultaneous negative result for both tests. A relapsing episode was defined by the reappearance of antigenemia and/or DNAemia after the end of the preceding episode. Pre-emptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 h) or i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 h) was initiated on a positive antigenemia result (≥ 1 pp65 positive cells/200 000 cells). Pre-emptive therapy was discontinued after two consecutive negative antigenemia results obtained 3 days apart, after a minimum of 2 weeks of treatment. Maintenance doses of valganciclovir (450 mg/12 h) were given to some patients on steroids therapy for GvHD after resolution of the episode of active CMV infection and to a number of patients with persistent DNAemia after antigenemia clearance. Foscarnet (i.v. 60 mg/kg/12 h) was used instead of ganciclovir in patients with severe neutropenia. In some instances, foscarnet was added to the therapy schedule or replaced ganciclovir or valganciclovir after initiation of

pre-emptive therapy when the antigenemia assay continued to be positive beyond the third week of treatment. CMV end-organ disease was diagnosed and treated as reported earlier.^{9,10}

Immunological monitoring

Enumeration of CMV-specific IFN γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes was carried out by flow cytometry for ICS (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA, USA) as described earlier.⁸ Briefly, 0.5 ml of heparinized whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (2 μ g/ml per peptide), obtained from JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of costimulatory mAbs to CD28 and CD49d. Samples mock stimulated with PBS/DMSO and costimulatory antibodies were run in parallel. Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 4 h of incubation. Blood was then lysed and frozen at -80 °C until tested. On the day of testing, stimulated blood was thawed at 37 °C, washed, permeabilized, and stained with a combination of labeled mAbs (anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4 or CD8-PerCP-Cy5.5, and anti-CD3-APC when the IFN γ CD8⁺ kit was used) for 30 min at room temperature. Appropriate isotype controls were used. Cells were then washed, resuspended in 200 μ l of 1% paraformaldehyde in PBS, and analyzed within 2 h on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Data files usually contained at least 1000 positive events for CD4⁺ or CD8⁺ within the lymphocyte gate. CD4⁺ and CD8⁺ events were gated and then analyzed for the CD69 activation marker and IFN γ production. The total number of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells was calculated by multiplying the percentages of CMV-specific T cells producing IFN γ on stimulation (after background subtraction) by the absolute CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts. The specific responses were considered to be those >0.1% for both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Sequence analysis of the UL54 and UL97 genes

CMV DNA extraction from plasma specimens was carried out using the High Pure nucleic acid Kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). The extracted viral DNA was used as a template for amplification of a 975-bp region of the UL97 gene spanning codons 429–753, after an earlier published protocol,¹¹ and two regions of the UL54 gene spanning codons 345–625 and 645–1013, after an earlier reported nested PCR protocol.¹² The PCR products were purified by the QIAquick purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), sequenced by the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and analyzed on an ABI 310 automated DNA sequencer.

Statistical analysis

The statistical significance of differences in medians was assessed by using the Mann-Whitney *U*-test for unpaired data, and the Wilcoxon's test for paired data. The Fisher's

exact test was used to compare dichotomous variables between groups. All tests were two tailed. A P -value = <0.05 was considered statistically significant. The statistical analysis was performed with the aid of the statistical package SPSS (version 14.0).

Results

Kinetic patterns of antigenemia and DNAemia during pre-emptive antiviral therapy

A total of 47 out of 76 allo-SCT recipients experienced one or more episodes of active CMV infection ($n=81$). Eleven patients developed DNAemia positive/antigenemia negative episodes ($n=13$) that were not pre-emptively treated. Thirty-six out of 47 allo-SCT recipients had one or more episodes of active CMV infection ($n=68$) that were treated pre-emptively with valganciclovir or ganciclovir. The relevant data of patients treated pre-emptively are summarized in Table 1. Patients were followed up for a median of 251 days (range, 51–819 days). Forty-three episodes (67.4%) developed within the first 100 days after transplantation.

Seventeen patients (47.2%) experienced episodes of active CMV infection in which declining levels of both antigenemia and DNAemia were observed early after initiation of pre-emptive therapy (type A episodes). Twelve patients (33.3%) developed episodes of active CMV infection in which both the antigenemia and DNAemia levels increased during pre-emptive therapy (type B episodes). Five patients (13.8%) experienced both types of episodes during the follow-up. Episodes of active CMV infection with dissociated antigenemia/DNAemia levels (type C episodes) were seen in two patients (5.5%). In summary, out of the 68 episodes, 39 were type A (57.3%), 27 type B (39.7%), and 2 type C (2.9%).

Features of episodes of active CMV infection with either rising or declining levels of antigenemia

A median of a 10-fold (range, 2–105-fold) increase in the antigenemia level from baseline (initial positive value) was observed in type B episodes, a median of 13 days (range, 3–71 days) after initiation of therapy. The peak antigenemia level was reached more frequently (51.8%) within the second week. The median increase in DNAemia was 15-fold (range, 2–5969-fold), a median of 14 days (range, 3–171 days) after initiation of therapy. The peak DNAemia occurred most frequently (44.4%) within the second week. As shown in Table 2, overall, the duration of type B episodes was significantly longer than that of type A episodes. Likewise, peak levels of antigenemia and DNAemia were significantly higher in type B episodes than in type A episodes (except if only initial episodes were considered for analysis). The first positive values for the antigenemia and DNAemia were nevertheless comparable for type A and type B episodes ($P \geq 0.5$).

Twenty episodes (10 type A and 10 type B) occurred in patients when on maintenance therapy with valganciclovir. These episodes tended to have a longer duration and reached higher peak levels of antigenemia and DNAemia

Table 1 Characteristics of the patients

Parameter	
Patients	36
Median age, years (range)	44.1 (18–70)
Sex, number of male patients/number of female patients	15/21
<i>Diagnosis, number of patients (%)</i>	
Acute myeloid leukemia	12 (33.3)
Non-Hodgkin's lymphoma	7 (19.4)
Acute lymphoblastic leukemia	6 (16.6)
Primary myelofibrosis	2 (5.5)
Myelodysplastic syndrome	2 (5.5)
Multiple myeloma	2 (5.5)
Chronic lymphocytic leukemia	2 (5.5)
Severe aplastic anemia	2 (5.5)
Hodgkin's lymphoma	1 (2.7)
<i>CMV serostatus, number of patients (%)</i>	
D+/R+	22 (61.1)
D-/R+	13 (36.1)
D+/R-	1 (2.7)
<i>Donor type, number of patients (%)</i>	
HLA-identical sibling	9 (25.0)
Mismatched-related donor	2 (5.5)
Matched-unrelated donor	12 (33.3)
Mismatched-unrelated donor	13 (36.1)
<i>Conditioning regimen, number of patients (%)</i>	
Non-myceloablative	19 (52.8)
Fludarabine plus melphalan	7 (19.4)
Fludarabine plus busulphan	7 (19.4)
Others	5 (13.8)
Myeloablative	17 (47.2)
Fludarabine-thiothepa	
Busulphan-cyclophosphamide	8 (22.2)
TBI plus cyclophosphamide	6 (16.6)
Others	3 (8.3)
<i>Stem cell source</i>	
Peripheral blood	24 (66.6)
Umbilical cord blood	8 (22.2)
Bone marrow	4 (11.1)
<i>GvHD prophylaxis</i>	
Cyclosporine A + methotrexate	16 (44.4)
Cyclosporine A + MMF	8 (22.2)
Cyclosporine A + prednisone	8 (22.2)
Cyclosporine A + methotrexate + ATG	3 (8.3)
Other	1 (2.7)
<i>Acute GvHD incidence</i>	
Grades 0–I	22 (61.1)
Grades II–IV	14 (38.9)

Abbreviations: D = donor; GvHD = graft versus host disease; R = recipient; + = CMV seropositive; - = CMV seronegative.

than those developing in its absence. However, these differences did not reach statistical significance, except for duration of DNAemia and peak antigenemia levels in type B episodes (not shown).

Twelve out (9 type B and 3 type A) of the 20 episodes developing when on maintenance therapy occurred in patients under corticosteroid treatment for GvHD. Overall, ongoing treatment with corticosteroids was significantly associated ($P=0.028$) with the occurrence of type B episodes.

Table 2 Characteristics of active CMV infection episodes with decreasing (type A) or rising (type B) levels of antigenemia and DNAemia during pre-emptive antiviral therapy

Parameter	A episodes median (range)	B episodes median (range)	P-value
<i>All episodes</i>			
Duration antigenemia	9.5 (2-39)	28 (7-72)	<0.001
Duration DNAemia	14 (2-48)	39 (10-45)	<0.001
Peak antigenemia	4 (1-210)	30 (4-210)	<0.001
Peak DNAemia	1200 (25-12900)	14219 (544-917791)	<0.001
<i>Initial episode</i>			
Duration antigenemia	9.5 (2-16)	24.5 (6-72)	0.007
Duration DNAemia	11 (2-28)	31 (10-95)	0.005
Peak antigenemia	3 (1-210)	2 (2-50)	0.369
Peak DNAemia	1309 (25-70800)	754 (37-7680)	0.300

Antigenemia (pp65-positive cells/200 000 PMNLs); DNAemia (CMV DNA copies/ml plasma); duration (days).

Relapsing CMV infections developed with comparable frequencies ($P \geq 0.5$) irrespective of whether the initial episode was either type A (38.4%) or type B (40.9%).

CMV-specific T-cell response in episodes of active CMV infection with either decreasing or rising levels in antigenemia and DNAemia

Data on CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cell responses obtained before and after initiation of pre-emptive antiviral therapy were available for 24 episodes of active CMV infection (14 type A and 10 type B). These episodes occurred at a median of 46 days after transplant (range, 24-310 days) and were initial episodes in 18 cases and relapses in the remaining six cases. Two type A and four type B episodes developed in patients when on corticosteroid therapy. Data are depicted in Figure 1. Pre-treatment levels of both T-cell subsets did not differ significantly between type A and type B episodes ($P \geq 0.926$ and $P = 0.862$ for IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T cells, respectively). These samples had been obtained a median of 9 days (range, 0-27 days) and 10.5 days (range, 1-24 days) for type A and type B episodes, respectively ($P \geq 0.5$), before initiation of pre-emptive antiviral therapy. A significant expansion of both IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T cells occurred in type A episodes obtained a median of 16.5 days (range, 6-46 days) after initiation of therapy. The duration of the antigenemia and DNAemia in these episodes was 9.5 and 10.5 days, respectively. A 12-fold median increase of IFN γ CD8 $^{+}$ T cells (median, 1.42 cells/ μ l and range, 0.29-9.46 cells/ μ l) and a 6.8-fold median increase of IFN γ CD4 $^{+}$ T cells (median, 0.68 cells/ μ l and range, 0.17-2.56 cells/ μ l) were observed. In contrast, in type B episodes, the numbers of both T-cell subsets at a median of 13.5 days (range, 6-122 days) after initiation of therapy did not differ significantly from those of pre-treatment samples. In these episodes, the peak levels of antigenemia and DNAemia were reached at a median of 14 days after commencement of pre-emptive therapy. In fact, a modest expansion of the IFN γ CD8 $^{+}$ T-cell subset (median increase of 0.22 cells/ μ l and range, 0.02-1.97 cells/ μ l) and IFN γ CD4 $^{+}$ T-cell subset (median increase of 0.24 cells/ μ l

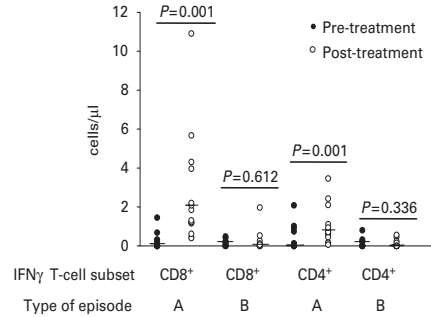


Figure 1 CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells before and after initiation of pre-emptive antiviral therapy in episodes of active CMV infection with decreasing (A) or rising (B) levels of antigenemia and DNAemia. Horizontal bars indicate the medians. The statistical significance of differences between pre-treatment (black symbols) and post-treatment (open symbols) T-cell levels is shown. Pre-treatment samples obtained a median of 9 and 10.5 days for type A and type B episodes, respectively, before initiation of pre-emptive antiviral therapy. Post-treatment samples obtained a median of 16.5 and 13.5 days for type A and type B episodes, respectively, after initiation of pre-emptive therapy.

and range, 0.24-0.46 cells/ μ l), respectively, was showed in only 4 and 3 out of 10 episodes analyzed, respectively.

Follow-up monitoring for CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T-cell levels was available for seven type B episodes in six patients (Table 3). In five of these episodes (patients 1, 2, 4 (first episode), 5, and 6), control of CMV replication seemed to be associated with a significant ($P = 0.01$) increase in both T-cell subsets (except for IFN γ CD4 $^{+}$ T cells in patient 6). In contrast, a failure to expand both T-cell populations was related to the persistence of antigenemia and DNAemia until the end of the follow-up period (patient 3, and patient 4 (second episode)). Relapsing infections developed after 6 episodes (2 type A and 4 type B) out of the 24 episodes for which immunological data were available. Post-treatment levels of IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T were significantly lower ($P = 0.001$) in these 6 episodes (median, 0.59 cells/ μ l and 0.15 cells/ μ l, respectively) than in the 18 episodes not followed by a relapsing infection (median, 1.97 cells/ μ l and 0.71 cells/ μ l, respectively).

Occurrence of CMV-resistant mutations to ganciclovir

PCR sequencing of the CMV UL97 and UL54 genes was retrospectively performed on 12 plasma samples obtained during episodes with rising levels of antigenemia and DNAemia (11 type B episodes and 1 type C episode) at the time peak DNAemia values were reached. Mutations in the UL 97 gene conferring resistance to ganciclovir were found in two samples drawn within two type B episodes in two patients (M460I in one sample and deletions in codons 597, 598, 599 in the other sample). These episodes were still active at the end of follow-up (both patients died) and they were not cleared even after the administration of foscarnet (no mutations conferring resistance to foscarnet were detected). In both patients, emergence of resistant strains

Table 3 Monitoring for CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells before and after initiation of pre-emptive therapy in episodes of active CMV infection with rising levels of antigenemia and DNAemia

Patient	Day PT	Duration (days) AG/DNAemia	Peak AG (cells)/DNAemia (copies/ml)	Time (days) to peak AG/DNAemia	Day/IFN γ CD8 $^{+}$ / CD4 $^{+}$ (cells/ μ l)
1	+87	18/51	200/54076	9/10	+63/0/0 +94/0/0 +121/1.17/0.44
2	+60	17/28	20/8109	3/7	+49/0.17/0 +66/0/0 +89/4.69/3.41
3	+124	Active	210/562218	45/171	+127/0.23/0.48 +169/0.04/0 +182/0.06/0.05 +189/1.24/0.19 +218/0.55/0.18 +228/0/0
4	+43	72/95	210/40749	15/19	+36/0.42/0.24 +59/0/0 +86/2.52/0.80 +183/0/0
4	+155	Active	210/917791	71/138	+272/0.26/0.24 +290/0.59/0 -12/0/0 +41/0/0
5	+34	21/28	12/17047	14/14	+64/0.44/0.34 +29/0.20/0 +49/0.06/0 +59/1.17/0
6	+38	16/16	10/15670	8/8	

Abbreviations: AG=antigenemia (pp65-positive cells/200 000 PMNLs); PT=post-transplant. pp65 and IE-1 peptide mixes were used simultaneously for stimulation.

was detected after 40 and 56 days of maintenance therapy, respectively. An impairment in the CMV-specific T-cell response was observed in both cases during the entire duration of the episode (not shown).

Discussion

In our series, decreasing levels of antigenemia and DNAemia early after initiation of pre-emptive antiviral therapy (type A episodes) was observed in more than half of all episodes of active CMV infection, whereas rising levels of antigenemia and DNAemia were detected in around 40% of cases. These figures are comparable to those reported in earlier studies,^{2,3} in which initial but not relapsing episodes of active CMV infection were taken into consideration. A dissociation between the levels of antigenemia and DNAemia (type C episodes) was only shown in two episodes. Our data are in keeping with those reported by Nichols *et al.*,² and Boeckh,¹³ but are strikingly different from those published by Gerna *et al.*³ In the latter study, 31.4% of episodes (patients) had isolated antigenemia increases. The explanation for this discrepancy is uncertain. It is unlikely that differences in either clinical or demographic characteristics between patients in the two series were responsible. It is also unlikely that the use of a different specimen for CMV DNA quantitation (plasma in our study, whole blood in theirs) accounted for the discrepancy, despite the fact that plasma CMV DNA levels are consistently lower than those found in whole blood.¹⁴

With respect to type B episodes, including those occurring in patients when on maintenance therapy, our observations are in accordance with those reported in

earlier studies.^{2,3} Likewise, the receipt of corticosteroids for treatment of GvHD was found to be significantly associated with the occurrence of type B episodes, as was reported earlier.^{2,3} Interestingly, the initial values of antigenemia and DNAemia were not predictive for the subsequent kinetic pattern of CMV load. In agreement with an earlier study,³ we also found relapsing episodes of active CMV infection to occur with comparable frequencies irrespective of whether the initial episode was either type A or type B.

Rising antigenemia during pre-emptive ganciclovir therapy has been postulated to occur in the face of an impaired CMV-specific T-cell response. However, this extent has not been proven. We defined earlier levels of pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T cells providing protection against the development of viremic CMV infection (>1 IFN γ CD8 $^{+}$ cell/ μ l and >1.2 IFN γ CD4 $^{+}$ T cells/ μ l).⁸ Comparable levels of pp65-specific IFN γ or TNF α -producing CD8 $^{+}$ T cells (range, 1–5 cells/ μ l) and IFN γ /IL-2-producing CD4 $^{+}$ T cells (1 cell/ μ l) conferring protection against CMV antigenemia or DNAemia have been reported earlier.^{15–18} In this study, we enumerated peripheral levels of these T-cell subsets, both before and after the initiation of pre-emptive antiviral treatment, in a number of type A and type B episodes. Our data indicated that an early expansion of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and IFN γ CD4 $^{+}$ T-cell subsets in response to viral replication was associated with declining levels of antigenemia and DNAemia during antiviral therapy. Significant increases in the numbers of both IFN γ subsets were seen at a median of 16.5 days after initiation of therapy. It is likely that this cell expansion might have been detected earlier had immunological monitoring been

conducted with the same periodicity as virological monitoring. Unfortunately, this was not possible in this study. In contrast, a lack of prompt expansion of both T-cell populations, in particular the IFN γ CD8 $^+$ T-cell subset, was related to the occurrence of episodes with rising levels of antigenemia and DNAemia during therapy. In these episodes, an eventual expansion of both T-cell subsets was associated with control of CMV replication, whereas persistence of antigenemia and DNAemia (in two episodes) was related to a failure to do so.

Relapsing infections developed after 6 out of the 24 episodes (two type A and four type B) for which immunological data were available. Post-treatment cell counts of IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T cells in these six episodes were below protective threshold values.⁸ The number of CMV-specific functional cells at that time point might have been sufficient to control CMV replication in the presence of antivirals, but insufficient to protect from subsequent CMV reactivation in the absence of antiviral treatment.

Idiosyncratic variations of antiviral pharmacokinetics as well as the emergence of ganciclovir-resistant mutants may also be the cause of rising viral load during antiviral therapy. The latter phenomenon, however, has been shown to be a rare event in the allo-SCT setting, at least in treatment-naïve patients.^{2,3,5} Our data fully support this assumption. Development of ganciclovir resistance was observed in 2 out of 12 episodes with rising levels of antigenemia subject to analysis. In both cases, patients had received long courses of antiviral therapy and were unable to consistently expand CMV-specific IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T cells in response to viral replication.

Therapeutic interventions based on the assessment of CMV-specific T-cell immunity have been shown to lead to a more targeted use of antiviral therapy,¹⁹ although clinical validation of this strategy requires further studies. In line with this study, our data suggest that frequent monitoring for CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T cells after initiation of pre-emptive antiviral therapy may be ancillary to routine virological surveillance for making optimal therapeutic decisions.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank all the internal fellow staff of the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario for technical assistance. This research was supported by a grant (06/1738) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

References

- Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraft-

- ment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996; **88**: 4063–4071.
- Nichols WG, Corey L, Gooley T, Drew WL, Miner R, Huang M-L et al. Rising p65 antigenemia during pre-emptive anti cytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood* 2001; **97**: 867–874.
- Gerna G, Lilleri D, Zecca M, Alessandrino EP, Baldanti F, Revello MG et al. Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica* 2005; **90**: 526–533.
- Kanda Y, Mineishi S, Nakai K, Saito T, Tanosaki R, Takaue Y. Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing antithymocyte globulin. *Blood* 2001; **97**: 3676–3677.
- Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 873–883.
- Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Grossi P, Torsellini M, Revello MG. Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1113–1116.
- Gerna G, Sarasini A, Lilleri D, Percivalle E, Torsellini M, Baldanti F et al. *In vitro* model for the study of the dissociation of increasing antigenemia and decreasing DNAemia and viremia during treatment of human cytomegalovirus infection with ganciclovir in transplant patients. *J Infect Dis* 2003; **188**: 1639–1647.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J et al. Enumeration of CMV-specific IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 2008; **93**: 1434–1436.
- Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, Farga A, Prósper F, García-Conde J et al. Qualitative plasma assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 3938–3941.
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ et al. 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 preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 3311–3318.
- Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *J Clin Microbiol* 2001; **45**: 2775–2780.
- Scott GM, Isaacs MA, Zeng F, Kesson AM, Rawlinson WD. Cytomegalovirus antiviral resistance associated with treatment induced UL97 (protein kinase) and UL54 (DNA polymerase) mutations. *J Med Virol* 2004; **74**: 85–93.
- Boeckh M. Rising cytomegalovirus pp65 antigenemia and DNA levels during preemptive antiviral therapy. *Haematologica* 2005; **90**: 439–440.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodological aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 533–554.
- Hebart H, Dagninik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; **99**: 3830–3837.

- 16 Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 2008; **93**: 248-256.
- 17 Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y *et al*. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 2005; **131**: 472-479.
- 18 Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E *et al*. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2008; **198**: 818-826.
- 19 Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2007; **40**: 865-869.

6.2. Artículo 2

An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. Tormo N, Solano C, de la Cámara R, García-Noblejas A, Cardeñoso L, Clari MA, Nieto J, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Benet I, Navarro D. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16: 653-661.

An Assessment of the Effect of Human Herpesvirus-6 Replication on Active Cytomegalovirus Infection after Allogeneic Stem Cell Transplantation

Nuria Tormo,¹ Carlos Solano,^{2,3} Rafael de la Cámara,⁴ Ana García-Noblejas,⁴
 Laura Cardeñoso,⁵ María Ángeles Clari,¹ José Nieto,⁶ Javier López,⁷
 Juan Carlos Hernández-Boluda,² María José Remigia,² Isabel Benet,² David Navarro^{1,8}

Human herpesvirus-6 (HHV-6) may enhance cytomegalovirus (CMV) replication in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients either through direct or indirect mechanisms. Definitive evidence supporting this hypothesis are lacking. We investigated the effect of HHV-6 replication on active CMV infection in 68 allo-SCT recipients. Analysis of plasma HHV-6 and CMV DNAemia was performed by real-time PCR. Enumeration of pp65 and IE-1 CMV-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells was performed by intracellular cytokine staining. HHV-6 DNAemia occurred in 39.8% of patients, and was significantly associated with subsequent CMV DNAemia in univariate ($P = .01$), but not in multivariate analysis ($P = .65$). The peak of HHV-6 DNAemia was not predictive of the development of CMV DNAemia. Timing and kinetics of active CMV infection were comparable in patients either with or without a preceding episode of HHV-6 DNAemia. The occurrence of HHV-6 DNAemia had no impact on CMV-specific T cell immunity reconstitution early after transplant. The receipt of a graft from an HLA-mismatched donor was independently associated with HHV-6 ($P = .009$) and CMV reactivation ($P = .04$). The data favor the hypothesis that a state of severe immunosuppression leads to HHV-6 and CMV coactivation, but argue against a role of HHV-6 in predisposing to the development of CMV DNAemia or influencing the course of active CMV infection.

Biol Blood Marrow Transplant 16: 653-661 (2010) © 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS: Human herpesvirus 6 (HHV-6), Cytomegalovirus (CMV), CMV replication, CMV immune response, Interaction, Allo-SCT recipient

INTRODUCTION

Active cytomegalovirus (CMV) infection is a frequent event following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT), which causes significant morbidity and mortality [1]. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a member of the beta herpesvirus subfamily whose reactivation has been increasingly

related to clinical complications, such as delayed neutrophil and platelet engraftment, interstitial pneumonia, skin rash, severe graft-versus-host disease (GVHD), central nervous system disorders, and overall mortality [2]. Depending on the method used for the surveillance of viral replication and the net state of post-transplant immunosuppression, 45% to 85%, and 25% to 80% of allo-SCT recipients experience 1 or more episodes of active CMV or HHV-6 infection, respectively, within the first 100 days after transplantation [1,2]. HHV-6 is considered an immunomodulatory and immunosuppressive agent [3], and thereby might increase the risk of active CMV infection and disease in the transplantation setting. Epidemiologic, clinical, and virologic evidence supporting this assumption has been mainly reported in solid organ transplant recipients. It was shown that occurrence of HHV-6 viremia was associated with an increased risk of subsequent development of either CMV syndrome or CMV end-organ disease [4-9]. The pathophysiologic basis of such viral interaction is largely unknown, but it might be related to the ability of HHV-6 to induce the synthesis of proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 α and tumor necrosis- α , known to trigger CMV reactivation, and to

From the ¹Microbiology Service, ²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴Hematology Service, ⁵Microbiology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain; ⁶Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ⁷Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; and ⁸Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 660.

Correspondence and reprint requests: David Navarro, PD, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Valencia, Spain. Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain (e-mail: david.navarro@uv.es).

Received August 7, 2009; accepted December 2, 2009

© 2010 American Society for Blood and Marrow Transplantation
 1083-8791/10/165-0001\$36.00/0
 doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.003

suppress T-lymphocyte function [3]. The effect of HHV-6 replication on CMV infection in the allo-SCT setting and the clinical consequences of such interaction, if any, remain imprecisely defined. In a recent report, Wang et al. [10] provided data suggesting that HHV-6 reactivation might suppress the reconstitution of CMV-specific lymphoproliferative responses, thereby promoting CMV replication. The present study was undertaken to determine whether active HHV-6 infection predisposes to CMV reactivation and/or has any influence on the kinetics of CMV replication in the allo-SCT setting. The elucidation of the nature of the pathogenetic interaction between both beta herpesviruses may have important implications in the therapeutic management of CMV infection in recipients of allo-SCT.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Patients undergoing allo-SCT between November 2005, and December 2008, at the following hospitals: Hospital Clínico Universitario, Valencia, Hospital La Princesa, Madrid, Hospital Morales Meseguer, Murcia, and Hospital Ramón y Cajal, Madrid, were eligible for inclusion. The study was approved by all ethics committees. All patients gave their informed consent to participate in the study. Sixty-eight allo-SCT recipients were included and followed up until day 100 after transplantation. Relevant demographic and clinical data of these patients are shown in Table 1.

Definitions

Neutrophil and platelet engraftment were defined as: >500 cells/ μL for 3 days, and $>50,000$ platelets/ μL for 1 week in the absence of platelet transfusion, respectively, counting the first day as the day of engraftment [11]. The intensity of acute GVHD (aGVHD) was graded from 0 to IV (0 to I, low grade, and II to IV, high grade), as previously described [11].

Virological Monitoring and Management of Active CMV Infection

Patients were monitored for pp65 antigenemia by a commercial immunofluorescence assay (Light Diagnostics® CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA, USA), and plasma DNAemia (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) once a week, as previously reported [12,13]. The surveillance of HHV-6 DNAemia was not routinely performed in our patients. Thus, cryopreserved specimens were used for analysis. The availability of a sufficient volume of plasma for PCR was a limiting factor that precluded the analysis of a larger number of specimens. Sequential plasma

Table 1. Characteristics of Patients

Parameter	Value
Patients	68
Age, years	45 (18-70)
Sex, male/female	37/31
Underlying disease	
Acute myelogenous leukemia	25 (36.7)
Acute lymphoblastic leukemia	10 (14.7)
Non-Hodgkin lymphoma	8 (11.8)
Hodgkin lymphoma	5 (7.4)
Plasma cell disorders	4 (5.9)
Chronic lymphocytic leukemia	4 (5.9)
Chronic myelogenous leukemia	3 (4.4)
Myelodysplastic syndrome	2 (2.9)
Severe aplastic anemia	1 (1.5)
Others	6 (8.8)
Cytomegalovirus serostatus	
D+/R+	39 (57.3)
D-/R+	21 (30.8)
D-/R-	6 (8.8)
D+/R-	2 (2.9)
Donor type	
HLA-identical sibling	30 (44.1)
Mismatched related donor	6 (8.8)
Matched unrelated donor	19 (27.9)
Mismatched unrelated donor	13 (21.6)
Conditioning regimen	
Nonmyeloablative	40 (58.8)
Myeloablative	28 (41.2)
Stem cell source	
Peripheral blood	53 (77.9)
Umbilical cord blood	13 (19.11)
Bone marrow	2 (2.9)
GVHD prophylaxis	
Cyclosporine A + methotrexate	33 (48.5)
Cyclosporine A + MMF	15 (22.0)
Cyclosporine A + prednisone	14 (20.5)
Others	6 (8.8)
Acute GVHD incidence*	
Grades 0-I	45 (66.1)
Grades II-IV	23 (33.9)

GVHD indicates graft-versus-host disease; MMF, mycophenolate mofetil; D, donor; R, recipient; +, CMV seropositive; -, CMV seronegative; HHV-6, human herpesvirus-6.

Age is given as median (range).

*Incidence of acute GVHD by day +100 posttransplant.

samples from patients had been collected from a median of 7 days (range: 0-26 days) to a median of 58 days (range: 38-75 days) after transplant. A total of 520 samples (a median of 6 samples per patient; range: 3-11 samples) were analyzed. HHV-6 DNA detection was performed by a commercial real-time PCR assay (HHV-6 Q-PCR Alert Amplimix, Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italy) on a Smart Cycler instrument (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). DNA was extracted from a volume of 200 μL of plasma on the BioRobot EZ1 workstation (EZ1 virus Mini Kit v2.0, Qiagen, Hamburg, Germany). This assay amplifies a sequence within ORF 13R common to HHV-6 variants A and B. The lower limit of detection of the assay is 10 copies/mL, and the linear measuring range is $6 \log_{10}$ copies/mL. For data analysis, the commencement and end of a given episode of active viral infection were defined by the first positive (any level of plasma viral load) and first negative results, respectively, in the corresponding PCR assay.

Active HHV-6 or CMV infection was defined by the detection of viral DNA in 1 or more plasma specimens. Preemptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 hours) or i.v. ganciclovir (5 mg/lg/12 hours) was initiated upon a positive antigenemia result (≥ 1 pp65 positive cells/200,000 cells) and discontinued following 2 consecutive negative antigenemia results obtained 3 to 7 days apart, after a minimum of 2 weeks of treatment. Foscarnet (i.v. 60 mg/kg/12 hours) was used instead of ganciclovir in patients with severe neutropenia. All patients with antibodies against herpes simplex virus received oral acyclovir prophylaxis following the institutional protocols.

Viral Doubling Time Calculation

To determine the rate of virus replication, the viral doubling time (dt) of HHV-6 and CMV was estimated following 2 approaches. In the first, we considered for analysis the first 2 PCR-positive results. The dt was given by $dt = (t_2 - t_1) \times \log(2)/\log(q_2/q_1)$, with q_1 and t_1 being the DNAemia level (copies/mL) at the time of the first positive PCR (in days) respectively, and q_2 and t_2 the DNAemia level at the time of the second measurement, respectively. This formula assumes a constant growth rate, which occurs in the early phase of virus replication. When more than 2 positive PCR results were available, the peak DNAemia value was not considered, as the growth rate of a virus slows as the viral load approaches its peak. In the second approach, we included in the analysis all measurements from the last negative PCR result to the peak viral load, and estimated the dt as $dt = \ln(2)/k$, with k being the rate constant for exponential growth, which is given by $V(t) = V(0)e^{kt}$, where V is the viral load and t the time (in days) [14]. For CMV, the dt was calculated on the basis of DNAemia values obtained prior to initiation of preemptive therapy. Thus, only episodes in which the PCR turned positive (at least 2 consecutive samples) earlier than the antigenemia assay and those resolving without the implementation of preemptive therapy (antigenemia negative episodes) were taken into consideration for analysis. Likewise, for calculation of the HHV-6 dt only viral loads measured in the absence of (val)ganciclovir therapy were taken into consideration for analysis.

Immunological Monitoring

Enumeration of pp65 and IE-1 CMV-specific IFN γ -producing CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T lymphocytes was carried out by flow cytometry for ICS (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA, USA) as described previously [15]. Whole blood was simultaneously stimulated with 2 sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (2 μ g/mL/peptide), obtained from JPT peptide

Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/mL of costimulatory monoclonal antibodies (mAbs) to CD28 and CD49d for 6 hours at 37 $^\circ$ C. Brefeldin A (10 μ g/mL) was added for the last 4 hours of incubation. Cells were permeabilized and stained with a combination of labeled mAbs (anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4, or CD8-PerCP-Cy5.5 and anti-CD3-APC when the IFN γ CD8 $^+$ kit was used). Cells were analyzed on a FACS-Calibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems). CD4 $^+$ and CD8 $^+$ events were gated and then analyzed for the CD69 activation marker and IFN γ production. The total number of CMV-specific CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells was calculated by multiplying the percentages of CMV-specific T cells producing IFN γ upon stimulation (after background subtraction) by the absolute CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cell counts. The specific responses were considered those $>0.1\%$ for both CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 15.0). Frequency comparisons were carried out using the χ^2 test for categorical variables (univariate analysis), and the nonparametric Mann-Whitney U test for unpaired continuous data. The Spearman rank test was used for analyzing the correlation between continuous variables. For multivariate analysis, variables associated ($P < .10$) with HHV-6 DNAemia in univariate analysis were included and analyzed using a binary logistic regression model. Variables that were associated with CMV DNAemia in the univariate analysis were included and analyzed using a Cox proportional hazards regression modeling, in which HHV-6 DNAemia was entered as a time-dependent variable. The potential associations between HHV-6 DNAemia and neutrophil and platelet engraftment, and between HHV-6 or CMV DNAemia and the incidence of high grade (II-IV) aGVHD were also evaluated by Cox proportional hazards regression analysis, both virologic events being considered as a time-dependent variables. Results are expressed as relative risk ratios (RRs) or hazard ratios (HRs), and their corresponding 95% confidence interval (CI). A P value $<.05$ was considered significant.

RESULTS

Incidences and Kinetics of Active HHV-6 Infection

Sixty-eight nonconsecutive patients at the Hospital Clínico Universitario, Valencia ($n = 53$), and the Hospital de la Princesa, Madrid ($n = 15$) were finally included in the study. In 62 of the 68 patients, the first

specimen subject to analysis was obtained within the first 10 days after transplant. HHV-6 DNAemia was detected at least once in 27 of 68 patients (39.7%), a median of 20 days (range: 7-44 days) after transplantation. A median of 2 positive samples (range: 1-5 samples) per patient was found. Six patients had a single positive PCR result. To rule out the possibility of DNA contamination, a second aliquot of plasma from these 6 patients was analyzed. All these samples tested positive again and displayed comparable HHV-6 DNA loads (not shown).

The kinetics of HHV-6 DNAemia in our patients is shown in Figure 1. The peak level of HHV-6 DNAemia (median 345 copies/mL, range: 26-13,661 copies/mL) was reached more frequently in the fourth week (52%). Episodes of HHV-6 DNAemia lasted a median of 10 days (range: 3-35 days). Self-clearance of HHV-6 DNAemia was observed in 19 of 27 episodes. Resolution of the remaining 8 episodes of HHV-6 DNAemia occurred while patients were on (val)ganciclovir therapy, which was initiated because of the development of antigenemia-positive active CMV infection. In 3 of these 8 episodes, preemptive therapy was initiated at the time of peak HHV-6 DNAemia. In the remaining 5 episodes, preemptive therapy was implemented once HHV-6 DNAemia had begun to decrease.

Relationship between HHV-6 and CMV DNAemia

Thirty-nine patients (57.3%) experienced an episode of active CMV infection within the first 100 days after transplant (median onset of the episodes 34 days, range: 0-70 days). None of these patients progressed to CMV disease within the study period. Twenty-seven of the 39 episodes were preemptively treated, as the antigenemia assay turned positive. The remaining 12 episodes resolved spontaneously. No PCR negative/antigenemia positive episodes were observed. In all episodes, the plasma PCR assay turned positive earlier than the antigenemia assay.

Twenty-one of the 39 patients had prior or concomitant HHV-6 DNAemia. In 20 of 21 patients, detection of HHV-6 DNAemia preceded that of CMV DNAemia by a median of 15 days (range: 2-50 days). The remaining 18 patients developing CMV DNAemia had no HHV-6 DNA detected in plasma. HHV-6 and CMV DNAemia overlapped in 11 of the 21 patients. In the remaining 10 patients, CMV DNAemia was detected after HHV-6 DNAemia clearance.

The peak level of HHV-6 DNAemia in patients who subsequently experienced an episode of active CMV infection (median 190 copies/mL, range: 26-13,661 copies/mL), and that in patients who did not develop it (median 214 copies/mL, range: 65-478 copies/mL) were not significantly different ($P = .85$). The kinetics profile of CMV DNAemia in patients

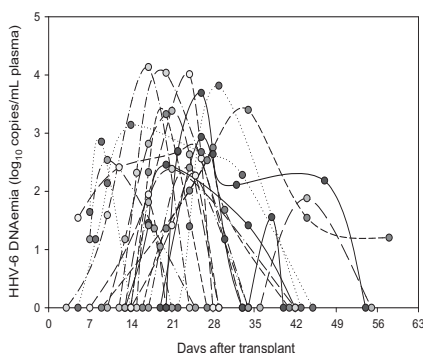


Figure 1. Kinetics of human herpesvirus 6 (HHV-6) plasma DNAemia in 27 allogeneic stem cell transplant recipients who had 1 or more positive results by a real-time PCR (lower detection limit, 10 DNA copies/mL).

with or without a preceding episode of HHV-6 DNAemia was next investigated. As shown in Table 2, we found no significant differences between the groups in terms of the time to the first CMV PCR-positive result, the day of initiation of preemptive treatment and its duration, the initial antigenemia and DNAemia values, the peak viral load, the duration of DNAemia, and the number of preemptively treated or self-resolving episodes. Furthermore, no significant correlation ($P = .43$) was found between the peak levels of HHV-6 and CMV DNAemia.

Doubling Times of HHV-6 and CMV

As a complementary approach to assess the effect of active HHV-6 infection on CMV replication, we estimated the rate of CMV replication in patients with or without a preceding episode of HHV-6 DNAemia. As explained in the methods section, we used 2 different approaches and obtained comparable results (not shown). Data are depicted in Figure 2. The median dt of HHV-6 was 0.90 days, ranging from 0.2 to 1.71 days, which was significantly ($P \leq .001$) shorter than that of CMV (median 1.72 days, range: 0.60-12.8 days). The median dt of CMV in patients with prior HHV-6 DNAemia was 1.72 days (range: 0.90-12.8 days), and did not differ significantly ($P = .64$) from that in patients with no documented HHV-6 DNAemia (median 1.56 days, range: 1.07-8.50 days). The latter 2 subgroups of patients were matched for donor CMV serostatus, donor type (related/unrelated; matched/mismatched), source of stem cells and conditioning, and GVHD prophylaxis regimens (not shown).

Effect of Active HHV-6 Infection on CMV-Specific Immune Reconstitution Early after Transplant

We investigated whether the occurrence of active HHV-6 infection had any measurable effect on the

Table 2. Active CMV Infection Profile in Patients with or without a Preceding Episode of Human Herpesvirus 6 (HHV-6) DNAemia

Virologic Parameter	HHV-6 DNAemia		P Value*
	Yes (n = 21)	No (n = 18)	
First CMV PCR			
Positive, day	29 (6-66)	36 (0-70)	.95
Initial CMV load in copies/mL	41 (25-2300)	45 (25-7276)	.71
Peak CMV load in copies/mL	1207 (25-212,320)	1302 (25-65,945)	.90
Duration CMV DNAemia, days	29 (5-100)	24 (3-98)	.91
Initiation of preemptive therapy, days	36 (24-67)	36.5 (12-96)	.21
Initial antigenemia value (positive cells/200,000 PMNLs)	3 (1-210)	3 (1-50)	.46
Self-resolving episodes†	5	6	.51
Duration of preemptive treatment	22 (14-60)	26.5 (14-90)	.71

CMV indicates cytomegalovirus; PCR, polymerase chain reaction; PMNL, polymorphonuclear leukocytes. Figures are given as median numbers (range).

*Analysis performed by use of Mann-Whitney U-test.

†Episodes of CMV DNAemia resolved without implementation of preemptive therapy.

recovery of pp65 and IE-1-specific IFN γ -CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cell responses early after transplant (median 32 days; range: 26–48 days). As shown in Table 3, overall, peripheral counts of both T cell subsets in patients experiencing HHV-6 DNAemia prior to day 30 were not significantly different from those in patients with no documented HHV-6 DNAemia. We performed a similar analysis on 2 subgroups of patients: 1 including patients not developing active CMV infection during the follow-up period (n = 23), of whom 6 had HHV-6 DNAemia and 17 did not, and the other including patients who developed an active CMV infection beyond day 30 posttransplant (n = 14), of whom 6 had a preceding episode of HHV-6 DNAemia and 8 did not. Again, we found comparable levels of both CMV-specific T cell subsets in both subgroups, irrespective of whether a preceding

episode of HHV-6 DNAemia had been documented or not.

We also assessed whether occurrence of HHV-6 DNAemia had any effect on the magnitude of the CMV-specific immune response elicited by CMV replication. Blood samples drawn at a median of 63 days (range: 56-74 days) after transplant were available from 14 patients developing active CMV infection within 30 to 60 days after transplant. Seven of these patients had an episode of HHV-6 DNAemia preceding that of active CMV infection. Median IFN γ -CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cells in these patients (0.44 cells/ μ L, and 0.34 cells/ μ L, respectively) did not differ significantly (P = .23) from that in patients with no prior episode of HHV-6 DNAemia (0.28 cells/ μ L, and 0.24 cells/ μ L).

Risk Factors for HHV-6 and CMV DNAemia

In our cohort, receipt of a graft from an unrelated or and HLA-mismatched donor, the use of umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells, myeloablative conditioning, and the use of prednisone in GVHD prophylaxis were significantly associated with the occurrence of HHV-6 DNAemia in the univariate analysis (Table 4). Other covariates such as age, sex, underlying disease, and donor CMV serostatus were not associated with HHV-6 DNAemia (not shown). In the multivariate analysis, the source of stem cells and the receipt of a graft from an unrelated or an HLA-mismatched donor were independently associated with HHV-6 DNAemia (Table 4).

The univariate analysis identified several risk factors significantly associated with the occurrence of CMV DNAemia: receipt of a graft from an HLA-mismatched donor (RR = 1.5, 95% CI, 1.1-2.4, P = .04) or an unrelated donor (RR = 1.6, 95% CI, 1.0-2.4, P = .01), use of prednisone in GVHD prophylaxis regimen (RR = 1.8, 95% CI, 0.6-5.0, P = .00), and prior HHV-6 DNAemia (RR = 1.6, 95% CI, 1.1-2.4, P = .01). Nevertheless, in

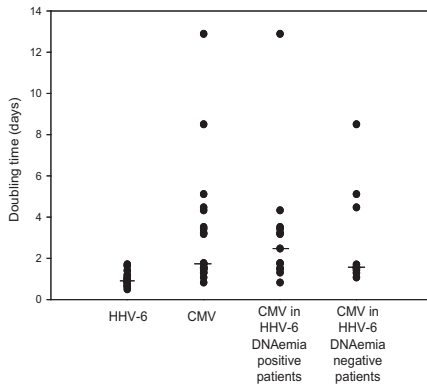


Figure 2. Doubling times (dt) in days of human herpes virus 6 (HHV-6) and cytomegalovirus (CMV). The dts of CMV in patients with a preceding episode of HHV-6 DNAemia and in those with no documented HHV-6 DNAemia are represented separately in the right columns. Horizontal bars represent median values.

Table 3. Early Reconstitution (day +30) of pp65 and IE-1-Specific IFN γ -Producing CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T Cells in Patients Either Experiencing or Not human Herpesvirus 6 (HHV-6) DNAemia

Patient Group	HHV-6 DNAemia	No HHV-6 DNAemia	P Value*
All patients†			
IFN γ CD8 $^+$	0.30 (0-1.54)	0.11 (0-3.11)	.52
IFN γ CD4 $^+$	0.32 (0-1.54)	0.18 (0-7)	.54
No CMV DNAemia prior to day +100‡			
IFN γ CD8 $^+$	0.92 (0-1.54)	0.42 (0-3.11)	.83
IFN γ CD4 $^+$	0.78 (0-3.76)	0.59 (0-7)	.66
CMV DNAemia beyond day +30§			
IFN γ CD8 $^+$	0.26 (0-0.56)	0 (0-0.42)	.18
IFN γ CD4 $^+$	0.20 (0-1.02)	0.04 (0-0.32)	.34

CMV indicates cytomegalovirus.

Figures are cells/ μ L blood, and are given as median numbers (range).

*Analysis performed by use of Mann-Whitney U test.

†All 37 patients either experiencing or not CMV DNAemia.

‡This group included 23 patients, of whom 17 developed HHV-6 DNAemia prior to day 30 posttransplant and 6 did not.

§This group included 14 patients, of whom 6 developed HHV-6 DNAemia prior to day 30 posttransplant and 8 did not.

the multivariate analysis, in which HHV-6 DNAemia was introduced as a time-dependent variable, only the receipt of a graft from an HLA-mismatched donor retained significance (Table 5).

HHV-6 DNAemia, CMV DNAemia, and Clinical End Points

We investigated whether HHV-6 DNAemia had any effect on the time to neutrophil and platelet engraftment. All but 1 patient had achieved neutrophil engraftment by day +30, whereas 80% and 92% of patients had achieved platelet engraftment by days +30 and +50, respectively. Only patients displaying HHV-6 DNAemia before day +30 (25 of 27 patients) were included for analysis. The occurrence of HHV-6 DNAemia had no significant effect on neutrophil engraftment by day +30 (HR, 1.0; 95% CI, 0.8-1.7; $P = .85$), or platelet engraftment by day +30 (HR, 0.9; 95% CI, 0.7-2.1; $P = .36$) or by day +50 (HR, 1.1; 95% CI, 0.6-2.7; $P = .54$).

We also assessed the potential effect of HHV-6 and CMV DNAemia in the development of high grade

Table 4. Analysis of Risk Factors Associated with the Development of Human Herpesvirus 6 (HHV-6) DNAemia

Risk Factor	RR (95% CI) P Value		
	Univariate	Multivariate	
Unrelated donor	4.5 (1.9-10.7)	.00 1.7 (0.4-3.1)	.01
HLA mismatched donor	2.5 (0.8-7.4)	.00 1.8 (0.7-3.8)	.00
Myeloablative conditioning	2.4 (1.3-4.4)	.03 1.2 (0.5-1.4)	.08
Cord blood graft	3.3 (2.1-5.3)	.00 1.8 (0.4-3.3)	.00
Prednisone in GVHD prophylaxis	1.5 (0.5-4.3)	.00 1.2 (0.6-1.9)	.21

RR indicates relative risk ratio (95% confidence interval); GVHD, graft-versus-host disease.

(II to IV) aGVHD by day +100 after transplantation. Both virologic events were considered for analysis only if they preceded the occurrence of the clinical end point. Grades II-IV aGVHD occurred in 7 of 24 patients with no evidence of HHV-6 and CMV DNAemia, and in 16 out of 44 patients who developed either HHV-6 DNAemia, CMV DNAemia, or both. Neither HHV-6 DNAemia (HR, 0.9; 95% CI, 0.3-1.9; $P = .6$) nor CMV DNAemia (HR, 0.8; 95% CI, 0.2-2.1) were significantly associated with subsequent development of high grade aGVHD.

No clinical events potentially associated with HHV-6 reactivation in allo-SCT recipients (CNS dysfunction, idiopathic pneumonia syndrome, or skin rash not because of GVHD) were observed in our cohort. In addition, we sought to determine whether the occurrence of HHV-6 DNAemia, CMV DNAemia, or both had any influence on all-cause mortality during the study period. Eleven patients had died by +100 (5 because of severe aGVHD, 4 because of relapse, and 2 as a result of a systemic infection). Of the 11 patients, 4 had no documented HHV-6 or CMV DNAemia, 5 had only CMV DNAemia, and 2 displayed HHV-6 and CMV DNAemia. The scarce number of clinical events precluded any meaningful statistical analysis.

DISCUSSION

In our cohort of allo-SCT recipients, almost 40% of patients experienced HHV-6 DNAemia, which occurred most frequently around the time of engraftment. This percentage might have been even higher as we could not rule out the occurrence of HHV-6 DNAemia very early after transplant in a couple of patients from whom no plasma samples drawn within the first 4 weeks after transplantation were available for analysis. Incidence rates of active HHV-6 infection ranging from 28% to 78% have been published [11,16-28]. Discrepancies among these studies are likely due to variations in the laboratory method and type of specimen employed for detecting HHV-6, the frequency of virologic monitoring and the clinical characteristics of the patients. We used a highly sensitive real-time PCR assay and plasma instead of leukocytes for quantification of HHV-6 DNAemia. Although it remains a matter of debate [25,29], the level of plasma HHV-6 DNAemia appears to reliably reflect the degree of viral systemic replication. In our cohort, HHV-6 variant B was implicated in all episodes ($n = 16$) analyzed (not shown), and the kinetics of DNAemia was not suggestive of HHV-6 genome integration [30].

In accordance with previous reports [19,21,25,31], the receipt of a graft from an unrelated or HLA-mismatched donor and the use of umbilical cord blood as

Table 5. HHV-6 DNAemia as a Risk Factor for the Development of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia

Risk Factor	HR (95% CI)	P Value
Unrelated donor	1.8 (0.7-4.6)	.18
HLA mismatched donor	4.7 (1.1-21.5)	.04
Prednisone in GVHD prophylaxis	1.2 (0.7-1.9)	.40
HHV-6 DNAemia	1.2 (0.5-2.7)	.65

HR indicates hazard ratio (95% confidence interval [CI]); GVHD, graft-versus-host disease.

Analysis was performed by Cox proportional hazards regression. HHV-6 DNAemia was included as a time-dependent variable.

the source of stem cells were independently associated with the development of HHV-6 DNAemia.

The kinetics of HHV-6 DNAemia in our patients was comparable with that reported in other series [11,19-22,24-27]. That is, peak incidences occurring within the second and third weeks after transplant, peak viral load being reached within 3 to 4 weeks post-transplant, and median duration of episodes <2 weeks. In our setting, most episodes were self-limited, that is, they resolved without the implementation of antivirals with activity against HHV-6, such as (val)ganciclovir. This appears to be the most frequent outcome of active HHV-6 infection in patients with low to intermediate levels of HHV-6 DNAemia [32], as those in our series. The peak plasma levels of HHV-6 DNAemia in our patients were comparable with those reported by Zerr et al. [11], but markedly lower than those published by Ogata et al. [25]. Again, differences in the characteristics of patients and/or in the method used for HHV-6 DNA quantification may account for this discrepancy.

Contradictory data have been reported on the influence of HHV-6 DNAemia on the time to neutrophil and platelet engraftment [11,19,25,26]. In our cohort, we observed no effect of HHV-6 DNAemia in neutrophil engraftment by day +30, and platelet engraftment by days +30 and +50. The limited number of events included in our analysis does not allow us to draw definitive conclusions on this matter. We also found no significant association between the occurrence of HHV-6 or CMV DNAemia and an increased risk of development of high grade (II to IV) aGVHD. This association has been previously documented for HHV-6 [11,33], but not for CMV [33]. Again, the scarce number of clinical events included minimizes the significance of our analysis.

HHV-6 is known to display immunomodulating and immunosuppressive properties, and thereby it may lead to enhanced CMV replication [4]. In this context, HHV-6 replication has been related to an increased risk of active CMV infection and disease in solid organ transplant recipients [4-9]. Nevertheless, little is known about the biologic and clinical consequences of the interaction between both beta

herpesviruses in the allo-SCT setting. Should the role of HHV-6 in promoting CMV replication be proven, then the documentation of HHV-6 DNAemia could become an indication for prophylaxis against CMV infection to prevent or minimize the effects of such an interaction. Previous studies showed that allo-SCT recipients experiencing HHV-6 DNAemia are more prone to subsequently developing an episode of active CMV infection, as determined by blood culture, pp65 antigenemia or leukocytes or plasma CMV DNAemia [10,19,23,24,25,26,28], although this association did not reach significance in all series. Yet, there is no evidence of a relationship between active HHV-6 infection and a higher risk for CMV disease. In our series, an association between HHV-6 DNAemia and the subsequent occurrence of CMV DNAemia was observed, yet most episodes of HHV-6 DNAemia had been cleared spontaneously or were in the process of resolution at the time of CMV DNAemia detection. In fact, overlapping HHV-6 and CMV DNAemia was only observed in around half of patients. Interestingly, the peak level of HHV-6 DNAemia in patients who subsequently developed an episode of CMV DNAemia was comparable with that in patients who did not. Although this observation argues against a direct role of HHV-6 in predisposing to the development of active CMV infection, the possibility that active HHV-6 infection triggered CMV reactivation by a direct interaction independent of the viral load could not be definitely ruled out.

We were interested in determining whether the occurrence of HHV-6 DNAemia had any impact on the pattern of active CMV infection. Our data do not support this hypothesis. First, no correlation was found between the peak levels of HHV-6 and CMV DNAemia. Such a correlation would be expected in a scenario where HHV-6 directly interacts with CMV [9]. Our observation is in keeping with a previous report [19], but in contrast to that of others [26]. In the latter study, however, active CMV infection was monitored by CMV antigenemia assay. Second, the occurrence of HHV-6 DNAemia had no apparent impact on the kinetics of active CMV infection, as assessed by the precocity of onset, initial, and peak levels of CMV DNAemia and the viral doubling time. Furthermore, the duration of CMV DNAemia was comparable in patients with or without a preceding episode of HHV-6 DNAemia. This observation was not biased by a different use of val(ganciclovir) in either group, as the number of episodes preemptively treated and the duration of antiviral courses were not significantly different between groups.

Our data are also against a role of HHV-6 in promoting CMV replication by inhibiting the reconstitution of CMV-specific T cell immunity. In a previous study, a trend for an inverse correlation between HHV-6 viral load and the presence of CMV-specific

lymphoproliferative responses was reported [10]. We previously showed that peripheral blood levels of pp65 and IE-1 CMV-specific IFN γ -producing CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells correlate with protection against CMV DNAemia [15]. We measured peripheral counts of both T cell subsets around day 30 posttransplant in patients either experiencing an episode of HHV-6 DNAemia prior to that time point or not developing it during the study period. We observed no apparent effect of HHV-6 DNAemia on the level of reconstitution of either T cell population, regardless of whether CMV DNAemia subsequently developed or not. As expected on the basis of previous investigations of our group [15], lower levels of CMV-specific T cells were seen in patients experiencing CMV DNAemia than in those who remained free of it. Differences in the type of specimen used for HHV-6 DNA detection, the method for assessing the immune response against CMV, or the timing of immunologic monitoring may account for the discrepancy between our study and that of Wang et al. [10]. We also observed that peripheral levels of both T cell subsets by day +60 in patients developing an episode of active CMV infection within 30 to 60 days after transplant were comparable in patients with or without a preceding episode of HHV-6 DNAemia. Taken together, the data indicated that occurrence of HHV-6 DNAemia had no effect either in the reconstitution of CMV-specific immunity or in the magnitude of the CMV-specific immune response elicited by CMV replication. It remains to be determined whether the occurrence of HHV-6 DNAemia has an effect on recovery of CMV-specific immunity at later times after transplant.

The temporal association between HHV-6 and CMV DNAemia may just be the result of a severe immunosuppressive condition of patients that triggers viral coactivation, and not necessarily because of their interaction. In line with this assumption, we found the receipt of a graft from an HLA-mismatched donor being independently associated with the occurrence of either HHV-6 or CMV DNAemia in our cohort. Moreover, in the multivariate model, including risk factors that were associated significantly with the development of CMV DNAemia in the univariate analysis, HHV-6 DNAemia did not retain significance, although a trend for an association was evident.

The earlier appearance of HHV-6 in the blood compartment with respect to that of CMV does not necessarily imply a different temporal pattern of reactivation. In fact, precise dating of beta herpesvirus reactivations may only be achieved by virologic monitoring at mucosal or tissue sites [34]. The rate of virus replication may be a relevant factor in determining the precocity of the onset of viral DNAemia. In this context, we found the doubling time of HHV-6 was around half that of CMV (0.9 versus 1.7 days), which is in accordance with a previous estimation [35]. Other

pathogenetic factors, such as the ease of access into the blood compartment and the relative stringency of virus-cell association, which may differ between both beta herpesviruses, might also be of relevance.

In conclusion, our data favor the hypothesis that a state of severe immunosuppression leads to HHV-6 and CMV coactivation, but argue against a role of HHV-6 in predisposing the development of CMV DNAemia or influencing the course of active CMV infection. Nevertheless, validation of this assumption requires further studies analyzing larger series of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the internal fellow staff of the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario for their technical assistance.

Financial disclosure: This work was supported by a Grant (06/1738) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

REFERENCES

- Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic transplant recipients: current status, known challenges and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:543-558.
- de Patger PJ, Schuurman R, Meijer E, van Baarle D, Sanders EAM, Boelens JJ. Human herpesvirus type 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol.* 2008;43:361-366.
- Lusso P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol.* 2006;37(Suppl 1): S4-S10.
- DesJardin JA, Cho E, Supran S, Gibbons L, Werner BG, Snyderman DR. Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2001;33:1358-1362.
- DesJardin JA, Gibbons L, Cho E, et al. Human herpesvirus reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 1998;178:1783-1786.
- Dockrell DH, Prada J, Jones MF, et al. Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 1997;176:1135-1140.
- Humar A, Kumar D, Caliendo AM, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation.* 2002;73:599-604.
- Humar A, Kumar D, Raboud J, et al. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2002;2: 461-466.
- Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus 6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis.* 2000;181: 1450-1453.
- Wang F-Z, Larsson K, Linde A, Ljungman P. Human herpesvirus 6 infection and cytomegalovirus-specific lymphoproliferative responses in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:521-526.
- Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang M-L, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:932-940.

12. Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, et al. Qualitative plasma assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3938-3941.
13. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, et al. 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 preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3311-3318.
14. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med.* 1999;177-182.
15. Solano C, Benet I, Clari MA, et al. Enumeration of CMV-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica.* 2008;93:1434-1436.
16. Kadakia MP, Rybka WB, Stewart JA, et al. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1996;87:5341-5344.
17. Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1996;88:3615-3620.
18. Chan PKS, Peiris JSM, Yuen KY, et al. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in bone marrow transplant recipients. *J Med Virol.* 1997;53:295-305.
19. Ljungman P, Wang FZ, Clark D, et al. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leukocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol.* 2000;111:774-781.
20. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, et al. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis.* 2000;31:881-886.
21. Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, et al. High incidence of human herpesvirus infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood.* 2002;100:2005-2011.
22. Boutolleau D, Fernandez C, André E, et al. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: 2 closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis.* 2003;187:179-186.
23. Volin L, Lautenschlager I, Juvonen E, Nihtinen A, Anttila V-J, Ruutu T. Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other herpesviruses. *Br J Haematol.* 2004;126:690-696.
24. Hentrich M, Oruzio D, Jäger D, et al. Impact of human herpesvirus 6 after hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;128:66-72.
25. Ogata M, Kikuchi H, Satou T, et al. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and significance. *J Infect Dis.* 2006;193:68-79.
26. Wang LR, Dong LJ, Zhang MJ, Lu DP. The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:1031-1037.
27. Cone RW, Huang M-LW, Corey L, Zeh J, Ashley R, Bowden R. Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J Infect Dis.* 1999;179:311-318.
28. Gentile G, Capobianchi A, Ferraironi M, et al. Relationship of serum human herpesvirus DNA with cytomegalovirus pp65 antigenemia in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Transplantation.* 2004;77:1907-1908.
29. Achour A, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, Agut H. Is human herpesvirus 6 DNA in plasma the right marker for active infection? *J Infect Dis.* 2006;194:1795-1796.
30. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera and hair follicles. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1571-1574.
31. Yamane A, Mori T, Suzuki T, et al. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:100-106.
32. Ogata M, Satou T, Kawano R, et al. Plasma HHV-6 viral load-guided preemptive therapy against HHV-6 encephalopathy after allogeneic stem cell transplantation: a prospective evaluation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:279-285.
33. Wang LR, Dong LJ, Zhang MJ, Lu DP. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GvHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:673-677.
34. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:217-245.
35. Funk GA, Gosert R, Hirsch H. Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:460-472.

6.3. Artículo 3

Kinetics of Cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-Specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T Cells During Episodes of Viral DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Potential Implications for the Management of Active CMV Infection. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A, Clari MA, Chilet MF, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1208-1215.

Kinetics of Cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-Specific IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T Cells During Episodes of Viral DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Potential Implications for the Management of Active CMV Infection

Nuria Tormo,¹ Carlos Solano,^{2,3} Isabel Benet,² José Nieto,⁴ Rafael de la Cámara,⁵ Ana García-Noblejas,⁵ María Angeles Clari,¹ Marifina Chilet,¹ Javier López,⁶ Juan Carlos Hernández-Boluda,² María José Remigia,² and David Navarro^{1,7*}

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, Valencia, Spain

²Hematology and Medical Oncology Service, Clinic University Hospital, Valencia, Spain

³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

⁴Hematology Service, Morales Meseguer Hospital, Murcia, Spain

⁵Hematology Service, La Princesa Hospital, Madrid, Spain

⁶Hematology Service, Ramón Cajal Hospital, Madrid, Spain

⁷Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

The dynamics of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8 $^+$ (IFN γ CD8 $^+$) and CD4 $^+$ (IFN γ CD4 $^+$) T cells and CMV DNAemia were assessed in 19 pre-emptively treated episodes of active CMV infection. Peripheral counts of IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T cells inversely correlated with CMV DNAemia levels ($P = <0.001$ and $P = 0.003$, respectively). A threshold value of 1.3 cells/ μ l predicting CMV DNAemia clearance was established for IFN γ CD8 $^+$ T cells (PPV, 100%; NPV, 93%) and for IFN γ CD4 $^+$ T cells (PPV, 100%; NPV, 75%). Undetectable T-cell responses were usually observed at the time of initiation of pre-emptive therapy. Either a rapid (within 7 days) or a delayed (median 31 days) expansion of both T-cell populations concomitant with CMV DNAemia clearance was observed in 5 and 8 episodes, respectively. An inconsistent or a lack of expansion of both T-cell subsets was related to a persistent CMV DNAemia. Robust and maintained CMV-specific T-cell responses after CMV DNAemia clearance and cessation of antiviral therapy were associated with a null incidence of relapsing infections at least during the following month. Data obtained in the present study may be helpful in the design of therapeutic strategies for the management of active CMV infections in the allo-SCT recipient. **J. Med. Virol.** 82:1208–1215, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cytomegalovirus; IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T cells; active CMV infection; immunological

monitoring; stem cell transplantation

INTRODUCTION

Pre-emptive antiviral therapy has been adopted by most transplant centers as the first-choice strategy for the prevention of cytomegalovirus (CMV) disease following allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) [Boeckh et al., 2003; Griffiths et al., 2008]. While this strategy has been shown to dramatically reduce the incidence of early CMV disease [Boeckh et al., 2003; Ljungman, 2008], it probably results in over-treatment, as a number of patients who would never progress to CMV disease are treated nevertheless [Ljungman, 2006; Avetisyan et al., 2007]. Hopes have been raised that routine immunological monitoring for CMV-specific T-cell immunity may improve the management of active infection, leading to a more targeted use of antivirals and allowing the identification of patients at high risk for relapsing infections and end-organ disease.

Grant sponsor: FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); Grant number: 06/1738.

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

Accepted 16 February 2010

DOI 10.1002/jmv.21799

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

Nevertheless, to date, assessment of CMV-specific T-cell immunity has not had a major impact on clinical management of active CMV infection. In order to design potential intervention strategies based on immunological monitoring, characterization of the kinetics of functional CMV-specific T cells during episodes of active CMV infection is required. Studies addressing this issue are, however, scarce [Aubert et al., 2001; Foster et al., 2002; Widmann et al., 2008]. Resolution of episodes of active CMV infection in the allo-SCT setting appears to be ultimately dependent on the expansion of functional CMV-specific T cells in response to CMV replication [Quinnan et al., 1982; Reusser et al., 1991; Riddell et al., 1992]. In this regard, we have previously shown that the lack of prompt expansion of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8⁺ (IFN γ CD8⁺) and CD4⁺ (IFN γ CD4⁺) T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy and prolonged duration of antiviral treatment [Tormo et al., 2010]. In the present study, the dynamics of CMV-specific IFN γ CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cells, which we have previously shown to confer protection against CMV infection [Solano et al., 2008], and those of CMV DNAemia were assessed in a number of episodes of active CMV infection. Data obtained in the present study are of potential interest for the therapeutic management of active CMV infections in the allo-SCT recipient.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Patients undergoing allo-SCT between December 2008 and May 2009 at the participating hospitals were eligible for inclusion. The study was approved by the Ethics Committees. All patients gave their informed consent to participate in the study. CMV-seronegative patients receiving a graft from a CMV-seronegative donor were not included in the study. Only episodes of active CMV infection treated pre-emptively were included for analysis. The end of the study period was June 22, 2009. Clinical and demographic data of the patients are shown in Table I.

Management of Active CMV Infection

Virological monitoring of CMV infection was performed by use of the pp65 antigenemia assay (Diagnostics[®] CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA), and/or a plasma real-time PCR assay (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, or LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ) as previously reported [Solano et al., 2001; Gimeno et al., 2008]. Pre-emptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 hr) or i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 hr) was initiated upon a positive antigenemia result (≥ 1 pp65 positive cells/200,000 cells) or detection of $>1,000$ CMV DNA copies/ml in plasma depending on the participant institution, and discontinued following two consecutive negative

TABLE I. Demographic and Clinical Data of the Patients

Parameter	
Patients	18
Median age, years (range)	52.5 (17–67)
Sex, no. male patients/no. female patients	12/6
Diagnosis, no. patients (%)	
Non-Hodgkin's lymphoma	8 (44)
Acute myeloid leukemia	4 (22)
Multiple myeloma	3 (16)
Myelodysplastic syndrome	2 (11)
Chronic lymphocytic leukemia	1 (6)
CMV serostatus, no. patients (%)	
D+/R+	9 (50)
D-/R+	6 (33)
D+/R-	3 (16)
Donor type, no. patients (%)	
HLA-identical sibling	10 (55)
Matched unrelated donor	5 (28)
Mismatched related donor	3 (16)
Conditioning regimen, no. patients (%)	
Non-myeloablative	14 (77)
Myeloablative	4 (22)
Stem cell source	
Peripheral blood	16 (88)
Umbilical cord blood	1 (6)
Bone marrow	1 (6)
Acute or chronic GvHD during episodes of active CMV infection	
Grades 0–I	12 (66)
Grades II–IV	6 (33)

D, donor; R, recipient; +, CMV seropositive; -, CMV seronegative; GvHD, graft versus host disease.

antigenemia or plasma PCR results (also depending on the participant hospital) obtained 3–7 days apart after a minimum of 2 weeks of treatment. Foscarnet (i.v. 60 mg/kg/12 hr) was used instead of ganciclovir in patients with severe neutropenia, and in some patients not responding to ganciclovir therapy after 3 weeks of treatment. For analysis purposes, the duration of a given episode was that comprised between the day of initiation of pre-emptive therapy and the day of the first negative DNAemia result. Diagnosis of CMV disease was achieved as previously reported [Solano et al., 2001; Gimeno et al., 2008]. When clinically indicated, patients received transfusions of leukocyte-depleted and irradiated packed red cells and platelets.

Immunological Monitoring

Enumeration of CMV-specific IFN γ CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T lymphocytes was carried out by flow cytometry for ICS (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA) as described previously [Solano et al., 2008]. Briefly, whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (2 μ g/ml/peptide), obtained from JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of costimulatory mAbs to CD28 and CD49d for 6 hr at 37°C. Brefeldin A (10 μ g/ml) was added for the last 4 hr of incubation. Cells

were permeabilized and stained with a combination of labeled mAbs (anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4 or CD8-PerCP-Cy5.5 and anti-CD3-APC when the IFN γ CD8 $^+$ kit was used). Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA). CD4 $^+$ and CD8 $^+$ events were gated and then analyzed for the CD69 activation marker and IFN γ production. The total number of CMV-specific IFN γ CD4 $^+$ and IFN γ CD8 $^+$ T cells was calculated by multiplying the percentages of CMV-specific T cells producing IFN γ upon stimulation (after background subtraction) by the absolute CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cell counts. The specific responses were considered those >0.1% for both CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells.

Immunological monitoring was performed once or twice a week during episodes of active CMV infection. For some patients, several blood samples drawn after resolution of the episode of active CMV infection were available for immunological analysis. A total of 146 blood samples from the 18 patients (median 7 samples; range, 2–15 samples) were analyzed.

Sequence Analysis of the UL54 and UL97 Genes

CMV DNA extraction from plasma specimens was carried out using the High Pure nucleic acid kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). The extracted viral DNA was used as a template for amplification of a 975 bp region of the UL97 gene spanning codons 429–753, and two regions of the UL54 gene spanning codons 345–625, and 645–1,013, as previously described [Tormo et al., 2009]. The PCR products were purified by the QIAquick purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), sequenced by the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), and analyzed on an ABI 310 automated DNA sequencer.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 15.0). Comparisons were carried out using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test for unpaired continuous data and the Wilcoxon test for paired continuous data. The Spearman rank test was used for analysis of correlation between continuous variables. For calculation purposes undetectable CMV-specific responses were computed as 0 cells/ μ l. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Features of Episodes of Active CMV Infection

Nineteen episodes of active CMV infection (in 18 patients) were included for analysis. The episodes occurred at a median of 56 days post-transplant (range, 14–330 days). Thirteen out of the 19 episodes (in 12 patients) resolved within the study period (Table II). The remaining 6 episodes (in six patients) were still active at the end of the follow-up, after a median of 30 days (range, 14–97 days) of initiation of pre-emptive therapy (Table III). Three out of these six patients died during the study period (the cause of death was bacterial sepsis in one patient and severe GvHD in the other two patients).

CMV-Specific T Cells at the Time of Initiation of Pre-Emptive Therapy

We firstly assessed the CMV-specific T-cell response at the time of initiation of pre-emptive therapy. Blood samples for immunological analysis were available from 14 episodes (9 of them developed before day 100 post-transplant). Undetectable IFN γ CD8 $^+$ and CD4 $^+$ T-cell responses were observed in 13 out of the 14 episodes. In the remaining episode, which was still active at the end of the follow-up, low levels of both CMV-specific T-

TABLE II. Virological and Immunological Data of Episodes of Active CMV Infection, the Resolution of Which Occurred During the Study Period

Episode (day PT)	CMV DNAemia (copies/ml)			CMV-specific T-cell response IFN γ CD8 $^+$ /IFN γ CD4 $^+$ (cells/ μ l)	
	Initial	Peak	Duration (days)	First detected response (day)	At first negative PCR (day)
1 (232)	1,125	1,125	7	15.13/0.12 (7)	— ^a
2 (115)	800	800	3	2.09/1.61 (3)	—
3 (293)	2,460	2,460	7	15.20/5.20 (7)	—
4 (41)	890	890	7	14.01/1.90 (7)	—
5 (40)	1,800	1,800	6	1.31/0.43 (6)	—
6 (59)	560	1,200	15	0.90/0.38 (15)	—
7 (14)	1,100	3,200	16	1.45/0.67 (16)	—
8 (30)	1,100	6,200	94	0.50/0.40 (21)	6.24/0.55 (94)
9 (26)	1,980	1,980	20	0.65/0.19 (7)	0.82/0.56 (20)
10 (53)	3,600	4,560	55	0.21/0.62 (21)	2.46/1.23 (55)
11 (63)	1,270	3,700	61	0.22/0.01 (7)	1.36/0.48 (61)
12 (27)	1,200	3,100	31	0.67/0.06 (5)	4.34/0.70 (31)
13 (65)	7,200	15,110	31	1.28/0.46 (9)	10.62/0.35 (31)

PT, post-transplant.

Day in the column for the first detected CMV-specific T-cell responses refers to days after initiation of pre-emptive therapy. Episodes 2 and 3 developed in the same patient.

^aFirst detected response concomitant with first negative PCR.

TABLE III. Virological and Immunological Data of Episodes of Active CMV Infection That Were Still Active at the End of the Study Period

Episode (day PT)	CMV DNAemia (copies/ml)		CMV-specific T-cell response IFN γ CD8 ⁺ /IFN γ CD4 ⁺ (cells/ μ l)		Treatment
	Initial	Peak (day)	First detectable response (day)	Peak level (day)	
1 (330)	2,390	3,790 (7)	0.96/0.19 (20)	— ^a	FOS/VGCV
2 (62)	2,320	35,450 (12)	1.28/1.27 (8)	—	VGCV
3 (160)	1,350	10,200 (30)	0.03/0.06 (7)	—	VGCV
4 (42)	5,440	5,500 (9)	0.09/0.46 (9)	—	FOS
5 (55)	5,600	23,450 (19)	ND	ND	VGCV
6 (36)	720	1,290 (23)	0.03/0.26 (0)	0.53/0.66 (8)	GAN

FOS, foscarnet; VGCV, valganciclovir; GAN, ganciclovir; ND, not detectable; PT, post-transplant.

Day in columns refers to days after initiation of pre-emptive therapy.

^aThe peak level was the first detected response.

cell subsets were detected (0.03 IFN γ CD8⁺ T cells/ μ l and 0.26 IFN γ CD4⁺ T cells/ μ l). Nine out of the 14 episodes resolved within the study period, with the time to negative conversion of CMV DNAemia varying widely (3–94 days), while no control of CMV replication was achieved in the remaining 5 episodes. These data indicated that peripheral levels of IFN γ CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cells at the time of initiation of pre-emptive therapy were not predictive of the virological outcome of the episode.

Kinetics of CMV-Specific T Cells and CMV DNAemia During Episodes of Active CMV Infection

We investigated the dynamics of both CMV-specific T-cell subsets and CMV DNAemia during 19 pre-emptively treated episodes of active CMV infection. Overall, peripheral counts of IFN γ CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cells inversely correlated with CMV DNAemia levels ($\sigma = -0.806$; $P < 0.001$, and $\sigma = -712$; $P = 0.003$, respectively), yet detectable CMV-specific T-cell responses were observed in the presence of CMV DNAemia at some time points, both in unresolved episodes and in episodes which eventually cleared. We found however, that IFN γ CD8⁺ (median, 0.38 cells/ μ l; range, 0.03–1.28 cells/ μ l) and IFN γ CD4⁺ (median, 0.32 cells/ μ l; range, 0.06–1.27 cells/ μ l) T-cell levels in the presence of CMV DNAemia were significantly lower ($P < 0.000$ for IFN γ CD8⁺ and $P < 0.003$ for IFN γ CD4⁺ T cells) than IFN γ CD8⁺ (median, 2.46 cells/ μ l; range, 0.82–15.02 cells/ μ l) and IFN γ CD4⁺ (median 0.56 cells/ μ l; range, 0.12–5.2 cells/ μ l) T-cell levels at the time of the first negative PCR result. Taking into consideration the peak value for IFN γ CD8⁺ T cells (1.28 cells/ μ l) found in the presence of CMV DNAemia, a threshold value of 1.3 cells/ μ l predicting CMV DNAemia clearance (negative PCR) was established in our cohort (PPV, 100%; NPV, 93%). A certain degree of overlap was found between IFN γ CD4⁺ T cell values in the presence of CMV DNAemia and those at the time of the first negative PCR result. Thus, setting a threshold (1.3 cells/ μ l) above the peak value (1.27 cells/ μ l) found in the presence of CMV DNAemia resulted in a lower NPV

(75%). Therefore, the number of IFN γ CD8⁺ T cells was a more reliable marker for predicting CMV DNAemia clearance in our cohort.

Three different kinetic patterns of IFN γ CD8⁺ and IFN γ CD4⁺ T cells were observed in relation to CMV DNAemia: (i) a rapid expansion within the first week after initiation of pre-emptive therapy (median 7 days; range, 3–7 days) concomitant with CMV DNAemia clearance was observed in 5 episodes (see episodes 1–5 in Table II). An expansion within the third week (days 15 and 16) was observed in two additional episodes (see episodes 6 and 7 in Table II). Overall, median increases of 2.09 IFN γ CD8⁺ T cells/ μ l (range, 0.9–15.13 cells/ μ l) and of 0.67 IFN γ CD4⁺ T cells/ μ l (range, 0.12–5.20 cells/ μ l) from baseline were observed in these episodes. None of these patients was under corticosteroid treatment during the episode of active CMV infection. Figure 1A depicts a representative episode of this kinetics pattern (episode 4 in Table II); (ii) an early expansion (median 8 days; range, 5–21 days) of a lower magnitude (median increase of 0.57 IFN γ CD8⁺ T cells/ μ l; range, 0.21–1.2 cells/ μ l; $P = 0.02$, and of 0.29 IFN γ CD4⁺ T cells/ μ l; range, 0.01–0.62; $P = 0.063$) than that observed in rapidly cleared episodes with delayed resolution of CMV DNAemia (median 31 days, range, 20–94 days), concomitant with a further expansion of both T-cell subsets (median increase of 3.05 IFN γ CD8⁺ T cells/ μ l and of 0.42 IFN γ CD4⁺ T cells/ μ l; $P = 0.001$ and $P = 0.04$, respectively) was observed in 6 episodes (see episodes 8–13 in Table II); Figure 1B illustrates a representative example of this kinetics pattern (data for the episode 8 in Table II). The two longest episodes (episodes 8 and 11) occurred in patients under treatment with corticosteroids for grade III–IV GvHD, and their resolution was coincident with steroid dose tapering; (iii) An inconsistent or a lack of expansion of IFN γ CD8⁺ (median, 0.06 cells/ μ l) and IFN γ CD4⁺ T cells (median, 0.22 cells/ μ l; $P = 0.001$ and $P = 0.03$, respectively), in relation to T-cell increases measured in cleared episodes) with persistent CMV DNAemia that was still detectable at the end of the follow-up period was seen in 6 episodes (Table III). Three out of these 6 episodes developed while patients were under corticosteroid therapy for severe GvHD. Figure 1C shows the data

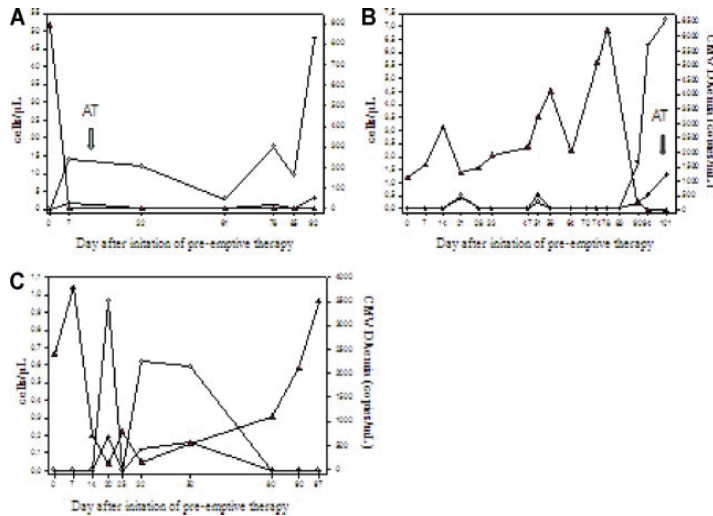


Fig. 1. Representative patterns of kinetics of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ -producing CD8 $^+$ (IFN γ CD8 $^+$ —open circles) and CD4 $^+$ (IFN γ CD4 $^+$) T cells (black diamonds) and CMV DNAemia (triangles) during episodes of active CMV infection. A: Patient displaying an early expansion of CMV-specific T cells (specially involving the IFN γ CD8 $^+$ T-cell subset) concomitant with CMV DNAemia resolution. Fluctuating levels of both T-cell populations were observed after interruption of antiviral therapy in the absence of CMV DNAemia. B: Patient displaying an early expansion of both functional T-cell populations

with delayed clearance of CMV DNAemia concomitant with a further expansion of CMV-specific T cells; Fluctuating levels of both T-cell subsets were observed prior to ultimate expansion leading to CMV DNAemia resolution (C) Patient failing to expand either CMV-specific functional T-cell subset and displaying persistent CMV DNAemia. This patient was under antiviral therapy throughout the observational period. The arrow (AT) points out to the time at which antiviral therapy was interrupted.

for a representative case (episode 1 in Table III). The latest plasma samples available from the longest unresolved episodes (episodes 1 and 2 in Table III) were screened for the presence of mutations known to confer resistance to ganciclovir or foscarnet. No mutations were found in either sample.

CMV-Specific T Cells After CMV DNAemia Clearance and Relapsing Infections

None of the 12 patients in whom the episode of CMV DNAemia resolved during the study period experienced a relapsing episode at least during the following month (only one of these patients received maintenance valganciclovir therapy after CMV DNAemia clearance). Episodes 2 and 3 in Table II developed in the same patient. However, the relapsing episode occurred 6 months after the resolution of the preceding one. Blood samples obtained at the time of interruption of antiviral therapy (second antigenemia test or PCR giving a negative result) were available for 8 episodes. A median of 2.8 IFN γ CD8 $^+$ T cells/ μ l (range, 0.68–19.5 cells/ μ l) and of 0.38 IFN γ CD4 $^+$ T cells/ μ l (range, 0.19–2.28 cells/ μ l) was found. Follow-up samples obtained after cessation of antiviral therapy (range, 3–86 days) were available from 4 episodes. Detectable though fluctuating levels of both IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T cells were observed over time (see the Fig. 1,

panel A for a representative example), with a median of 5.1 IFN γ CD8 $^+$ T cells/ μ l (range, 0.57–47.7 cells/ μ l) and 0.41 IFN γ CD4 $^+$ T cells/ μ l (range, 0.19–3.31 cells/ μ l).

CMV-Specific T Cells in Patients With CMV Disease

CMV enteritis was diagnosed in three patients in the setting of corticosteroid treatment for GvHD (Table II, episode 13, and Table III, episodes 4 and 5). In all cases, undetectable CMV-specific T-cell responses were observed at the onset of the clinical manifestations of the disease. Interestingly, in patient 12 (episode 13 in Table II), CMV DNAemia clearance and a notable improvement in clinical symptoms were related to a marked expansion of IFN γ CD8 $^+$ T cells, which occurred after steroid dose tapering. The remaining two patients failed to expand CMV-specific T cells and had persistent CMV DNAemia. Both patients died during the follow-up period.

DISCUSSION

Several conclusions can be drawn from our data. Firstly, peripheral counts of both IFN γ CD8 $^+$ and IFN γ CD4 $^+$ T-cell subsets inversely correlated with CMV DNAemia levels during episodes of active CMV infection. Similar data were obtained in earlier studies using pp65 peptide-tetramers [Aubert et al., 2001] or

ICS [Widmann et al., 2008] to assess the CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses, respectively. In the latter study, however, levels of CMV peptide-specific CD8⁺ T cells did not correlate with viremia [Widmann et al., 2008]. In another study [Avetisyan et al., 2007], patients who had detectable CMV-specific IFN γ CD3⁺ T-cell responses at week 4 after allo-SCT displayed lower peak mean viral loads compared with patients who lacked a detectable response. Furthermore, the degree of decline in CMV-specific T cells early after transplant has been associated with the development of CMV viremia [Eid et al., 2009]. In our study, the median levels of both CMV-specific functional T-cell subsets were significantly lower in the presence of CMV DNAemia than at the time of the first negative PCR result. A threshold value of 1.3 cells/ μ l for both T-cell populations predicting CMV DNAemia clearance was established in our cohort, the number of IFN γ CD8⁺ T cells being a more reliable marker. These cut-off cell levels are remarkably close to those previously determined by us [Solano et al., 2008] and by other groups [Hebart et al., 2002; Ohnishi et al., 2005; Lilleri et al., 2008; Moins-Teisserenc et al., 2008; Pourgheysari et al., 2009] (different functional T-cell types) providing protection against development of CMV antigenemia or DNAemia.

Secondly, in agreement with a previous report by our group [Solano et al., 2008], we found that ultimate control of CMV replication in the course of antiviral therapy depended on a robust and sustained expansion of IFN γ CD8⁺ T cells, and—to a lesser extent—of IFN γ CD4⁺ T cells. A notable expansion of both T-cell subsets concomitant with CMV DNAemia clearance was seen as soon as one week after initiation of pre-emptive therapy in 5 episodes, although, overall, T-cell expansion controlling CMV replication was observed at a median of 15 days after implementation of therapy. In line with our findings, the peak median level of expanding pp65-specific functional CD8⁺ T cells was reported to occur around 20 days after CMV reactivation [Hakki et al., 2003]. In contrast, failure to expand both functional T-cell populations in response to CMV replication resulted in persistent CMV DNAemia despite antiviral treatment and the fact that the emergence of resistant strains was not documented (in the two longest episodes).

Three out of the 6 episodes that remained active at the end of the follow-up occurred in the setting of corticosteroid therapy for GvHD, supporting the well known fact that corticosteroids impair the reconstitution of the CMV-specific T-cell response in a dose-dependent manner [Hakki et al., 2003; Gratama et al., 2008].

Thirdly, the marked expansion of functional CMV-specific T cells and the maintenance of peripheral pools of these T-cell subsets after CMV DNAemia clearance and cessation of antiviral therapy prevented the occurrence of relapsing episodes of active CMV infection at least during the following month. A similar conclusion was reached in earlier studies [Lilleri et al., 2008; Gratama et al., 2008; Moins-Teisserenc et al., 2008].

Three patients developed CMV enteritis. In accordance with a previous report [Avetisyan et al., 2006], in all cases clinical onset of disease occurred in the face of undetectable IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses. One of these patients recovered from CMV disease, and clinical improvement, as well as CMV DNAemia clearance, was concomitant with a robust expansion of both functional CMV-specific T-cell populations.

Our data may have several implications for the therapeutic management of active CMV infection in the allo-SCT recipient. A strategy of deferred antiviral therapy based on the detection of a CMV-specific immune response by ELISPOT at the time of CMV DNAemia detection was safely applied in a number of patients late (around 3 months) after transplant [Avetisyan et al., 2007]. In our cohort, however, no patient stratification could be established according to the magnitude of the CMV-specific T-cell response at the time of initiation of pre-emptive therapy, as all but one patient displayed undetectable responses. The lack of a detectable CMV-specific T-cell response, however, was not predictive of the outcome of CMV infection in terms of the duration of CMV DNAemia. Thus, no patients from our cohort would have benefited from the abovementioned strategy. Our study and that of Avetisyan et al. [2007], however, differ in the method employed for enumeration of CMV-specific functional T cells, and most importantly, in the time frame in which active CMV infections occurred (early after transplant in most of our patients and late after transplant in theirs). Further studies are required to determine the clinical usefulness of this therapeutic approach.

Early interruption (or dose reduction) of pre-emptive therapy provided that a significant expansion of CMV-specific T cells is documented may be a potential intervention strategy based on immunological monitoring. Our data indicate that peripheral levels of CMV-specific IFN γ CD8⁺ T cells above 1.3 cells/ μ l, which were shown to be associated with CMV DNAemia clearance, might be a reasonable threshold at which to interrupt antiviral therapy. Our data do not allow us to be certain about the virological efficacy and clinical safety of this approach, as the antiviral therapy course was not suspended in our patients until a second negative antigenemia or PCR result. This question can only be answered by means of a controlled clinical trial.

Relapsing episodes of active CMV infection develop at an exceedingly high rate following the implementation of short duration pre-emptive treatment regimens [Gimeno et al., 2008]. We have previously shown that their occurrence is related to the presence of low peripheral levels of CMV-specific functional T cells after resolution of the preceding episode [Tormo et al., 2010]. Data obtained in the present study extend our previous observation. In effect, peripheral levels of both T-cell subsets above the abovementioned cut-off at the time of virological clearance and interruption of antiviral therapy consistently prevented the occurrence of relapsing episodes. In these patients a sustained but rather fluctuating CMV-specific T-cell response was observed.

On the basis of this finding, maintenance antiviral therapy should be administered after CMV DNAemia clearance provided that protective levels of functional CMV-specific T cell are not reached at the end of the antiviral therapy course.

Adoptive transfer of CMV-specific functional T cells is a therapeutic option in episodes of active CMV infections that do not respond to antiviral therapy [Einsele et al., 2008]. According to our data, a lack of consistent expansion of CMV-specific T cells is associated with persistent CMV DNAemia, even in the absence of proven resistance to antivirals. In this sense, it would be reasonable to consider this therapeutic strategy, rather than switching antiviral therapy, in patients failing to respond to antivirals after 4 weeks of treatment (time at which expansion of functional CMV-specific T cells eventually controlling CMV replication was documented in most of cleared episodes in our cohort), provided that corticosteroid therapy is not underway, and that emergence of antiviral-resistant strains is ruled out.

In summary, our data suggest that routine immunological monitoring during episodes of CMV DNAemia may yield useful information for the therapeutic management of active CMV infection in allo-SCT recipients. Larger studies are nevertheless needed in order to verify this assumption.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the staff of the Microbiology Service of the Hospital Clínico Universitario for technical assistance.

REFERENCES

- Aubert G, Hassan-Walker AF, Madrigal AJ, Emery VC, Morte C, Grace S, Koh MB, Potter M, Prentice HG, Dodi IA, Travers PJ. 2001. Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogeneic stem cell transplants. *J Infect Dis* 184: 955–963.
- Avetisyan G, Larsson K, Aschan J, Nilsson C, Hassan M, Ljungman P. 2006. Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 38:687–692.
- Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. 2007. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 40:865–869.
- Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. 2003. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:543–558.
- Eid AJ, Brown RA, Hogan WJ, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Litzow MR, Razonable RR. 2009. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infect Dis* 11:519–528.
- Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU. 2008. CMV-specific T-cell therapy. *Blood Cells Mol Dis* 40:71–75.
- Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. 2002. Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:501–511.
- 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.
- Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B, Sintnicolaas K, van Doornum G, Niesters HG, Löwenberg B, Cornelissen JJ. 2008. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry Part B* 74B:211–220.
- Griffiths P, Whitley R, Snyderman DR, Singh N, Boeckh M. 2008. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: Guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes* 15:1–12.
- 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 stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102:3060–3067.
- Hebart H, Dagninik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, Rauser G, Singzer C, Jahn G, Loeffler J, Kanz L, Rammensee HG, Einsele H. 2002. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99:3830–3837.
- Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. 2008. Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 93:248–256.
- Ljungman P. 2006. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients? *J Clin Virol* 35:493–495.
- Ljungman P. 2008. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 42:S70–S72.
- Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, de Latour RP, Agbalika F, Ribaud P, Robin M, Rocha V, Gluckman E, Charron D, Socié G, Toubert A. 2008. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 198:818–826.
- Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takae Y, Mizoguchi H, Kawakami Y. 2005. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 131:472–479.
- Pourghesari B, Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Cook M, Mahendra P, Craddock C, Moss PAH. 2009. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 43:853–861.
- Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. 1982. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 307:7–13.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78:1373–1380.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257: 238–241.
- Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, Farga A, Prósper F, García-Conde J, Navarro D, Gimeno C. 2001. Qualitative plasma assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding pre-emptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 39:3938–3941.
- 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, Tamariit A, Gimeno C, Navarro D.

2008. Enumeration of CMV-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
- 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 γ 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.
- 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* 3:1–12.

6.4. Artículo 4

Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. Bone Marrow Transplant 2011; 46: 1437-43.



ORIGINAL ARTICLE

Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT

N Tormo¹, C Solano^{2,3}, I Benet^{2,3}, J Nieto⁴, R de la Cámara⁵, J López⁶, A Garcia-Noblejas⁵, B Muñoz-Cobo¹, E Costa¹, MA Clari¹, JC Hernández-Boluda², MJ Remigia² and D Navarro^{1,7}

¹Microbiology Service, Department of Microbiology, Hospital Clínico Universitario, School of Medicine, Valencia, Spain;

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ⁵Hematology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain; ⁶Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain and ⁷Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Threshold levels of CMV-specific T-cell populations presumably affording protection from active CMV infection in allo-SCT recipients have been proposed, but lack extensive validation. We quantified CMV pp65 and immediate-early 1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses at days +30, +60 and +90 after transplantation in 133 patients, and established cutoff cell levels protecting from CMV DNAemia within the first 120 days after transplantation. No patients showing IFN- γ CD8⁺ or IFN- γ CD4⁺ T-cell counts >1.0 and >1.2 cells/ μ L, respectively, developed a subsequent episode of CMV DNAemia. Initial or recurrent episodes of CMV DNAemia occurred in the face of IFN- γ T-cell levels below defined thresholds. Negative predictive values at day +30 for the IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell markers were 68.1 and 61.8%, respectively. Recipients of grafts from CMV seropositive, related or HLA-matched donors, or receiving non-myceloablative conditioning had nonsignificant tendencies to reach more frequently protective levels of both T-cell subsets at early and late (day +365) times after transplantation. The use of anti-thymocyte globulin and umbilical cord blood transplantation were associated with impaired CMV-specific T-cell reconstitution. CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell recovery occurred irrespective of detectable CMV DNAemia.

Bone Marrow Transplantation (2011) 46, 1437–1443; doi:10.1038/bmt.2010.330; published online 17 January 2011

Keywords: CMV; T-cell immunity; CMV DNAemia; IFN- γ -producing T cells; pp65; immediate-early 1

Introduction

Protection from active CMV infection in the allo-SCT setting is critically dependent on reconstitution of functional CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells.^{1–5} Quantification of CMV-specific T cells has been shown to be potentially helpful in identifying patients at higher risk for developing CMV-related clinical complications.⁶ Pre-emptive antiviral therapy, currently the strategy of first choice to prevent the occurrence of CMV end-organ disease in allo-SCT recipients,⁷ leads to significant over-treatment, which may result in toxicity, development of antiviral resistance or late-onset CMV disease.⁸ Hopes have been raised that routine immunological monitoring may lead to a more targeted use of pre-emptive therapy. Several surrogate immunological markers for adaptive immune competence against CMV have been proposed.⁶ Moreover, threshold levels of certain CMV-specific T-cell populations presumably affording protection from active CMV infection and disease have been tentatively established, though their clinical utility awaits further validation.^{9–16} In a pilot study, we showed that quantification of CD8⁺ and CD4⁺ T cells producing IFN- γ on stimulation with two peptide libraries encompassing the entire sequence of pp65, and IE-1 allowed the identification of patients presumably protected from CMV DNAemia early after transplantation.¹⁴ A protective threshold level in the number of both IFN- γ T-cell subsets showing maximum specificity was established (>1.0 cell/ μ L for IFN- γ CD8⁺ T cells and >1.2 cells/ μ L for and IFN- γ CD4⁺ T cells). In this study, we further tested the predictive value of the aforementioned threshold cell levels in a large cohort of allo-SCT recipients, and investigated the effects of pre-transplant, clinical and virological factors on the rate and magnitude of early and long-term reconstitution of both CMV-specific IFN- γ T-cell populations.

Patients and methods

Patients

The study group consisted of 133 patients who had undergone T-cell-replete allo-SCT between January 2007

Correspondence: Dr D Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Department of Microbiology, School of Medicine, Avenue Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain.
 E-mail: david.navarro@uv.es

Received 17 August 2010; revised 29 October 2010; accepted 23 November 2010; published online 17 January 2011

Table 1 Demographic and clinical data of the patients

Parameter	No. of patients (%)
Patients	133
Median age, years (range)	47 (16–70)
Sex, no. of male patients/no. of female patients	86/47
<i>Underlying disease</i>	
Acute myeloid leukaemia	40 (30.1)
Non-Hodgkin's lymphoma	27 (20.3)
Acute lymphocytic leukaemia	16 (12.1)
Plasma cell disorders	14 (9.1)
Myelodysplastic syndrome	9 (6.8)
Hodgkin's lymphoma	8 (6.5)
Chronic lymphocytic leukaemia	6 (4.5)
Myeloproliferative syndrome	5 (3.8)
Chronic lymphocytic leukaemia	3 (2.3)
Aplastic anemia	2 (1.5)
Others	2 (1.5)
<i>CMV serostatus</i>	
D+ /R+	77 (57.9)
D- /R+	46 (34.6)
D+ /R-	10 (7.5)
<i>Donor type</i>	
HLA-identical sibling	81 (60.9)
Matched unrelated	22 (16.5)
Mismatched related	6 (4.5)
Mismatched unrelated	24 (18.1)
<i>Conditioning regimen</i>	
Non-myeloablative	74 (55.6)
Myeloablative	59 (44.4)
<i>Stem cell source</i>	
Peripheral blood	114 (85.7)
Umbilical cord blood	11 (8.3)
Bone marrow	8 (6.0)
<i>GvHD prophylaxis</i>	
CsA + MTX	93 (69.9)
CsA + MMF	22 (16.5)
CsA + MTX + ATG	12 (9.1)
Others	6 (4.5)
<i>Acute GvHD</i>	
Grades 0–I	83 (62.4)
Grades II–IV	40 (37.6)

Abbreviations: ATG = anti-thymocyte globulin; D = donor; MMF = mycophenolate mofetil; R = recipient.

and May 2009 at four Spanish hospitals. Patients were followed up to 1 year after transplantation. The demographic and clinical characteristics of patients are summarized in Table 1. The study was approved by the respective ethics committees, and all patients gave their informed consent to participate.

Virological monitoring and management of active CMV infection

Virological monitoring of active CMV infection was performed by the pp65 antigenemia assay (Diagnostics CMV pp65 Antigenemia Immunofluorescence assay, Chemicon International, Temecula, CA, USA) and/or by a plasma real-time PCR assay (CMV real-time PCR, Abbott

Molecular, Des Plaines, IL, USA or LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ, USA) as previously reported.^{14,17} Pre-emptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 h), i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 h) or i.v. foscarnet (60 mg/kg/12 h) was initiated and discontinued following previously published criteria.¹⁴ CMV end-organ disease was diagnosed and treated as previously reported.¹⁸

Immunological monitoring

Enumeration of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells was carried out by flow cytometry for ICS (BD Fastimmune, BD-Beckton Dickinson and Company-Biosciences, San Jose, CA, USA) as previously described.¹⁴ Two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the entire sequence of CMV pp65 and IE-1 proteins were simultaneously used for stimulation. Immunological monitoring was scheduled to be performed at days +30, +60, +90 and +365 following allo-SCT.

Statistical analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (Chicago, IL, USA, version 17.0). Frequency comparisons were carried out using the χ^2 -test (Fisher's exact test) for categorical variables. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney *U*-test (two independent variables) or the Kruskal-Wallis test (*k* independent variables) for unpaired data. The Spearman's rank test was used for analysis of correlation between continuous variables. Two-sided exact *P*-values are reported. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Incidence of CMV DNAemia and CMV end-organ disease

In all 89 (66.9%) out 133 patients developed one (*n* = 74) or more (*n* = 15) episodes of CMV DNAemia (in total, 106 episodes) within the study period. All these episodes were pre-emptively treated. Univariate analysis revealed a significant association between receipt of grafts from HLA-mismatched or unrelated donors and the development of CMV DNAemia (Table 2). CMV end-organ disease developed in 10 patients (7.5%); two pneumonitis, seven gastrointestinal disease and one retinitis) and was not significantly associated with any pre-transplant or clinical factor subjected to analysis (not shown).

CMV-specific IFN- γ ⁺ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell threshold levels predicting protection from CMV DNAemia

Blood specimens from 116 patients obtained at day +30 (median, 35 days; range, 12–49 days) were available for immunological analysis. In all, 23 of these patients had an episode of CMV DNAemia before or at the time of sample collection and were excluded from analysis. In all, 27 out of the remaining 93 patients developed CMV DNAemia after the time of immunological monitoring. Peripheral levels of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells were significantly lower (*P* < 0.001) in patients who later experienced CMV DNAemia (median, 0 cells/ μ L for both T-cell subsets) than in those who did not (median 1.0 cells/ μ L,

Table 2 Effects of pre-transplant and clinical factors on the incidence of CMV DNAemia within 1 year after transplantation

Factor	No. of patients (%)		P-value ^a
	CMV DNAemia	No CMV DNAemia	
CMV serostatus			
D-	36 (78.2)	10 (21.8)	0.053
D+	53 (60.9)	34 (39.1)	
Type of donor			
Sibling	50 (57.4)	37 (42.6)	0.002
Unrelated	39 (84.7)	7 (15.3)	
HLA match			
Identical	62 (60.2)	41 (39.8)	0.024
Mismatched	27 (90.0)	3 (10.0)	
Stem cells source			
Bone marrow	5 (62.5)	3 (37.5)	0.627
Peripheral blood	75 (65.8)	39 (34.2)	
Cord blood	9 (81.8)	2 (18.2)	
Conditioning			
Myeloablative	41 (69.5)	18 (30.5)	0.585
Non-myeloablative	48 (64.9)	26 (35.1)	
GvHD prophylaxis			
ATG containing			
Yes	11 (91.6)	1 (8.4)	0.103
No	78 (64.4)	43 (45.6)	
CsA + MTX	54 (58.0)	39 (42.0)	0.050
CsA + MMF	18 (81.8)	4 (19.2)	
Acute GvHD^b			
Grades 0-1	43 (56.6)	33 (43.4)	0.093
Grades II-IV	26 (74.2)	9 (25.8)	

Abbreviations: ATG = anti-thymocyte globulin; D = donor; MMF = mycophenolate mofetil; R = recipient
^aFrequency comparisons were carried out using the χ^2 -test (Fisher's exact test). A P-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.
^bOnly those cases in which acute GvHD occurred before detection of CMV DNAemia were considered for analysis.

for IFN- γ CD8⁺ T cells; median 0.84 cells/ μ L, for IFN- γ CD4⁺ T cells). Individual data are shown in Figure 1.

No patients showing either IFN- γ CD8⁺ ($n=24$), IFN- γ CD4⁺ ($n=17$) T-cell counts >1.0 cells/ μ L and >1.2 cells/ μ L, respectively, or both ($n=14$) at day +30 developed CMV DNAemia during the study period (positive predictive value of 100% for both T-cell markers). The negative predictive values for the IFN- γ CD8⁺ T-cell marker, the IFN- γ CD4⁺ T-cell marker, for either one marker, and for the combination of both were 68.1, 61.8, 71.2 and 59.4%, respectively.

Patients showing levels of either IFN- γ T-cell subset above thresholds at day +30 remained protected during the entire study period (not shown).

Immunological data at days +60 and +90 were available from 22 and 40 patients, respectively, who had developed and cleared an episode of CMV DNAemia. No patients exhibiting either CMV-specific IFN- γ CD8⁺ or IFN- γ CD4⁺ T-cell levels above the established thresholds for protection had a recurrent episode of CMV DNAemia, which only occurred ($n=9$) in the face of IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell levels below thresholds.

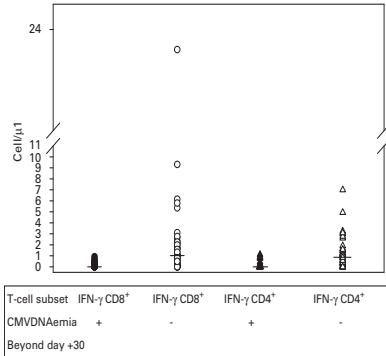


Figure 1 Peripheral levels of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T cells at day +30 in allo-SCT recipients either experiencing or not a subsequent episode of CMV DNAemia. Bars indicate median cell numbers.

Effects of pre-transplant, clinical and virological factors on early and long-term reconstitution of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses

Overall, the percentage of patients presumably protected from CMV DNAemia (either IFN- γ T-cell subset above defined thresholds) at days +30, +90 and +365 (median, +360; range, +304 to +405) were 27.9% (26 out of 93), 67% (52 out of 77) and 89.1% (49 out of 55), respectively.

Among patients with no previous CMV DNAemia, peripheral levels of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T cells at day +30 were significantly higher in patients who had received transplants from CMV seropositive (medians, 0.33 cell/ μ L and 0.22 cell/ μ L, respectively) or related donors (medians, 0.30 and 0.36 cell/ μ L, respectively), compared with patients receiving transplants from CMV seronegative (median 0 cell/ μ L for both T-cell subsets; $P=0.039$, and $P=0.05$, respectively) or unrelated donors (median 0 cell/ μ L for both T-cell subsets; $P=0.020$ and $P=0.023$, respectively). Use of anti-thymocyte globulin (ATG) had a significant impact on the magnitude of IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell responses at this time point ($P=0.025$ and $P=0.024$, respectively), as did the source of stem cells, patients receiving umbilical cord blood transplants showing significantly lower levels of both IFN- γ T-cell subsets than those receiving BM or peripheral stem cell transplants ($P=0.025$ for IFN- γ CD8⁺ T cells, and $P=0.046$ for IFN- γ CD4⁺ T cells). Patients receiving transplants from HLA-matched donors, undergoing non-myeloablative conditioning or receiving MTX showed higher levels (not statistically significant) of both IFN- γ T-cell subsets than patients receiving transplants from HLA-mismatched donors, who had undergone myeloablative conditioning or receiving mycophenolate mofetil (not shown).

Non-significant tendencies to display more frequently IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell responses within the protective range were observed in patients receiving transplants from CMV seropositive, related or HLA-matched donors, BM or peripheral stem cell grafts and in

Table 3 Effects of pre-transplant, clinical and virological factors on the frequency of allo-SCT recipients patients acquiring CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell levels presumably affording protection from CMV DNAemia at days +30 and +90 after transplantation

Variable	No. of patients with protective levels of IFN- γ CD8 ⁺ T cells ^a /total no. of patients (P-value ^b) at day		No. of patients with protective levels of IFN- γ CD4 ⁺ T cells ^a /total no. of patients (P-value ^b) at day	
	+30	+90	+30	+90
CMV serostatus				
D-	3/25	16/27	2/25	9/27
D+	21/68 (0.10)	33/50 (0.62)	15/68 (0.14)	18/50 (1.0)
Type of donor				
Sibling	21/69	38/56	15/69	20/56
Unrelated	3/24 (0.10)	11/21 (0.28)	2/24 (0.22)	7/21 (1.0)
HLA match				
Matched	21/78	46/66	16/78	24/66
Mismatched	3/15 (0.75)	3/11 (0.01)	1/15 (0.29)	3/11 (0.73)
Stem cell source				
Bone marrow	2/7	4/5	2/7	2/5
Peripheral blood	22/80	44/67	15/80	24/67
Cord blood	0/6 (0.45)	1/5 (0.10)	0/6 (0.43)	1/5 (0.54)
Conditioning				
Myeloablative	8/40	17/35	6/40	10/35
Non-myeloablative	16/53 (0.34)	31/42 (0.09)	11/53 (1.0)	17/42 (0.34)
GvHD prophylaxis				
ATG containing				
Yes	0/8	NA	0/8	NA
No	24/85 (0.10)	NA	17/85 (0.34)	NA
CsA + MTX	21/69	40/61	15/69	23/61
CsA + MMF	3/15 (0.53)	6/9 (1.0)	2/15 (0.72)	2/9 (0.47)
Acute GvHD^d				
0-I	NA	33/52	NA	21/52
II-IV	NA	11/18 (1.0)	NA	4/18 (0.25)
CMV DNAemia				
Yes	NA	24/40	NA	10/40
No	NA	25/37 (0.63)	NA	17/37 (0.06)

Abbreviations: D = donor; MMF = mycophenolate mofetil; NA = not analyzed; R = recipient.

^a>1.0 cell/ μ L.

^bFrequency comparisons were carried out using the χ^2 -test (Fisher exact test). A P-value<0.05 was considered statistically significant.

^c>1.2 cell/ μ L.

^dAcute GvHD occurring before the day of immunological monitoring.

patients who had undergone non-myeloablative conditioning, or were not treated with mycophenolate mofetil (Table 3). By day +90, the same tendencies as for the

Table 4 Peripheral levels of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T cells at days +60, +90 and +365 after transplantation in allo-SCT patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia

T-cell subset (day) ^a	CMV DNAemia		P-value ^b
	Yes	No	
IFN- γ CD8 ⁺ (+60)	1.32 (0-20.17)	1.11 (0-74.9)	0.977
IFN- γ CD4 ⁺ (+60)	0.46 (0-3.46)	0.62 (0-46.8)	0.461
IFN- γ CD8 ⁺ (+90)	2.08 (0-166.1)	1.93 (0-82.8)	0.656
IFN- γ CD4 ⁺ (+90)	0.51 (0-11.20)	0.91 (0-9.89)	0.080
IFN- γ CD8 ⁺ (+365)	3.71 (0-130.0)	6.72 (0-103.5)	0.385
IFN- γ CD4 ⁺ (+365)	1.11 (0-12.09)	2.82 (0-16.9)	0.158

Abbreviation: IE-1 = immediate-early 1.

^aIn all, 18, 40 and 30 specimens drawn at a median of 65 (range, 59-73 days), 91 days (range, 80-119 days) and 360 days (range, 304-405) respectively, from patients who had a preceding episode of CMV DNAemia, and 34, 37 and 25 specimens obtained at a median of 62.5 days (range 51-73 days), 93 days (range, 84-102 days) and 360 days (range 343-374 days) respectively, from patients with no prior CMV DNAemia were analyzed.

^bDifferences between medians were compared by using the Mann-Whitney U-test. A P-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Median (range) number of cells/ μ L are shown.

median number of both CMV-specific IFN- γ T-cell subsets (not shown) and the frequency of patients who had achieved protective IFN- γ T-cell levels (Table 3) were observed. Overall, differences between paired groups were less marked in comparison with those seen at day +30 (not shown), yet, the effect of HLA-matching was clearly discernable. By day +360, only HLA-matching, among the abovementioned pre-transplant and clinical factors, had a significant impact ($P=0.010$ for IFN- γ CD8⁺ T cells) on the frequency of acquisition of protective CMV-specific T-cell responses.

The occurrence of acute GvHD grades II-IV (median 40 days after transplantation, range 6-192 days) had no significant influence either on the degree of reconstitution of CMV-specific IFN- γ T-cell responses or the frequency of patients acquiring protective levels of both T-cell subsets at days +90 and +365. The effect of the use of ATG could not be evaluated at these time points because of the limited number of available samples for analysis.

The effect of CMV DNAemia on the reconstitution of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell responses was investigated. As shown in Table 4, levels of IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells in patients who had CMV DNAemia were not significantly different from those in patients with no documented CMV DNAemia at any time point. In fact, T-cell levels above protective thresholds were reached by a comparable number of patients at day +90 (Table 3) or +365 (not shown) irrespective of whether they did or did not have a preceding episode of CMV DNAemia. Neither the duration nor the peak value of CMV DNAemia was significantly correlated with IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell levels at any time point ($P \geq 0.5$). Nevertheless, higher net increments in the median levels of both T-cell subsets by days +60 and +90 (from baseline counts at day +30) were observed in patients who experienced CMV DNAemia than in patients with did not (Table 4).

Discussion

Previous studies performed by our group showed that CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells have a major role in protection from CMV DNAemia and in control of CMV replication during episodes of active CMV infection.^{14,19,20} In a pilot study, we found significantly lower IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell levels at day +30 in patients who later developed an episode of CMV DNAemia than in patients who did not experience it, and defined threshold levels of both T-cell subsets predicting protection from CMV DNAemia with maximum specificity and positive predictive value (>1.0 cell/ μ L for IFN- γ CD8⁺ T cells and >1.2 cells/ μ L for IFN- γ CD4⁺ T cells).¹⁴ In this study, we confirmed our earlier findings in a much larger cohort and proved the reliability of these surrogate markers in identifying patients presumably protected from CMV DNAemia within the first 120 days after transplantation. Unfortunately, both IFN- γ T-cell markers performed rather modestly in their ability to predict the occurrence of CMV DNAemia; in fact, CMV DNAemia was not documented in a relevant fraction of patients displaying levels of both T-cell subsets below the defined thresholds for protection, or even in patients with undetectable T-cell responses. It might be that the levels of CMV-specific T-cells conferring protection from active CMV infection vary among patients, perhaps depending on their latent CMV burden. It is also possible that enumeration of CMV-specific T cells exhibiting multifunctional rather than monofunctional properties provides a more precise estimation of the overall state of immune competence against CMV, as has been suggested in previous studies.^{13,21–25} In addition, T-cell responses against viral proteins other than pp65 and IE-1, or other functional anti-CMV immune responses such as those mediated by NK cells, which may critically contribute to the control of CMV infection, were not examined in this study.^{26,27} Clearly, the IFN- γ CD4⁺ T-cell marker performed worse than the IFN- γ CD8⁺ T-cell marker in predicting the risk of CMV DNAemia. In this sense, it has to be taken into consideration that our analytical method is less suited for assessing CMV-specific CD4⁺ than CD8⁺ T-cell responses (use of overlapping peptide libraries and pp65 and IE-1 as stimulating Ags).⁶

Cutoff cell levels of CMV-specific IFN- γ -producing T cells affording protection from CMV pp65-antigenemia, DNAemia or end-organ disease either coincident or remarkably close to those proposed herein have been previously reported.^{11–13,15} Notably, Ohnishi *et al.*¹² found that CMV antigenemia was not observed in patients who had over 1 cell/ μ L in the enzyme-linked immunosorbent spot assay using individual pp65 peptides as Ags. In another study, levels of IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells above 3 and 1 cell/ μ L, respectively, as enumerated by ICS using CMV VR1814-infected DCs as stimulating Ag, defined immune protection against a high risk of CMV disease.¹³ Likewise, Hebart *et al.*¹¹ found that the presence of more than five pp65-peptide-specific IFN- γ CD8⁺ T cells/ μ L was associated with protection from CMV DNAemia.

In this study, early and long-term reconstitution of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and IFN- γ CD4⁺ T-cell

responses occurred to the same extent in patients with or without previous documented CMV DNAemia. Moreover, no significant correlation was found between either the duration (and by inference, the cumulative ganciclovir dose received) or the peak level of CMV DNAemia with the degree of immune reconstitution. Our data seem to be in conflict with previously published results showing that prophylactic administration of ganciclovir blunted the reconstitution of CMV-specific T cells,³ but are in keeping with recently published data indicating that recovery of functional CMV-specific T-cell populations occurs irrespective of documented active CMV infection.^{28,29} Nonetheless, CMV DNAemia appeared to have a booster effect on the kinetics of reconstitution of both T-cell populations.

In our cohort, recipients of grafts from CMV-seronegative, unrelated or HLA-mismatched donors showed a poorer CMV-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses at day +30 in comparison with that of patients receiving transplants from CMV seropositive, sibling or HLA-matched donors. In fact, the latter patients tended more frequently to display IFN- γ CD8⁺ or IFN- γ CD4⁺ T-cell numbers above the protective cutoff cell levels than the former patients throughout the study period. This may account in part for the differences in the incidence of CMV DNAemia observed between these paired groups. At later times (days +90 and +365), both the magnitude of the CMV-specific IFN- γ T-cell responses and the frequency of patients showing protective levels of both T-cell populations tended to equate, most likely as a result of the booster effect of CMV replication on T-cell reconstitution. Yet, the effect of HLA-matching was clearly discernable at day +90, and even at day +365. Our data support previous findings suggesting that the CMV serostatus of the donor critically influences the rate and magnitude of CMV-specific T-cell reconstitution.^{3,13,21,22,24,30,31} Our data are also in accordance with previously published results indicating that overall, T-cell reconstitution, and specifically CMV-specific T-cell recovery, are notably delayed in recipients of grafts from unrelated or HLA-mismatched donors.^{21,28,32} In line with previous findings,^{12,28} the use of ATG had a profound impact on the magnitude of recovery of CMV-specific T-cell immunity at day +30 (it could not be evaluated later on). Likewise, the use of mycophenolate mofetil instead of MTX in the GVHD prophylaxis regimen was associated with a poorer CMV-specific T-cell response, particularly at day +30. The latter findings may account for the higher incidence of CMV DNAemia observed in patients receiving ATG or mycophenolate mofetil.

We found that recipients of umbilical cord blood transplants had poorer CMV-specific T-cell reconstitution with respect to that of recipients of BM or peripheral stem cells. Contrarily, the frequency and magnitude of reconstitution of both functional T-cell subsets appeared to be comparable for recipients of BM and peripheral stem cell transplants. Conflicting data have been published on this issue.^{13,28,31}

In this study, the conditioning regimen had no significant influence on the rate and magnitude of recovery of CMV-specific IFN- γ T-cell responses, though, patients who had undergone non-myeloablative conditioning had tendencies to reach more frequently protective levels of both T-cell

subsets throughout the study period. A beneficial effect of non-myceloablative conditioning on the reconstitution of CMV-specific T-cell immunity in comparison with myeloablative conditioning has been reported by other groups.^{21,34} Finally, the occurrence of acute GvHD (grades II to IV) had no significant effect on the magnitude of CMV-specific T-cell reconstitution. Our data, nevertheless, should be interpreted with caution given the scarce number of patients with moderate-to-severe acute GvHD for whom immunological data were available. Nonetheless, discrepant data have been published on this subject.^{13,28,31} which may be because of the differences in the timing of immunological monitoring after the implementation or cessation of corticosteroid therapy and the cumulative dose administered prior to sampling. In summary, we have further delineated the effects of pre-transplant and clinical factors as well as the influence of active CMV infection on the magnitude and kinetics of reconstitution of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ or IFN- γ CD4⁺ T-cell responses within 1 year after transplantation. More importantly, the data presented herein suggest that immunological monitoring may help to stratify allo-SCT patients according to their relative risk of developing CMV DNAemia. This may allow for personalization of pre-emptive antiviral therapies, which may translate into tangible benefits for the patients.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgements

We thank the internal fellow staff of the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario for technical assistance. This research was supported by a grant (06/1738) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

References

- Quinnan Jr GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G *et al*. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; **307**: 7–13.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; **78**: 1373–1380.
- Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; **83**: 1971–1979.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; **257**: 238–241.
- Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J *et al*. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; **99**: 3916–3922.
- Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 2010; **5**: 111–124.
- Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P *et al*. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; **42**: 227–240.
- Ljungman P. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients. *J Clin Virol* 2006; **35**: 493–495.
- Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J *et al*. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001; **97**: 1232–1240.
- Aubert G, Hassan-Walker AF, Madrigal JA, Emery VC, Morte C, Grace S *et al*. Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogeneic stem cell transplants. *J Infect Dis* 2001; **184**: 955–963.
- Hebart H, Dagnik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M *et al*. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; **99**: 3830–3837.
- Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y *et al*. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked immunospot and human leukocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 2005; **131**: 472–479.
- Lillier D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 2008; **93**: 248–256.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J *et al*. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 2008; **93**: 1434–1436.
- Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E *et al*. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2008; **198**: 818–826.
- Pastore D, Delia M, Mestice A, Perrone A, Carluccio P, Gaudio F *et al*. Recovery of CMV-specific CD8⁺ T cells and T regs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 (e-pub ahead of print).
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ *et al*. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 3311–3318.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of HCMV infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 1094–1097.

- 19 Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R *et al*. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ 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**: 543–549.
- 20 Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A *et al*. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol* 2010; **82**: 1208–1215.
- 21 Pourghesari B, Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F *et al*. Early reconstitution of effector memory CD4 $^{+}$ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2009; **43**: 853–861.
- 22 Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. Cytomegalovirus-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**: 501–511.
- 23 Lacey S, La Rosa C, Zhou W, Sharma MC, Martinez J, Krishnan A *et al*. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and immediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; **194**: 1410–1421.
- 24 Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L *et al*. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009; **113**: 6465–6476.
- 25 Makedonas G, Hutnick N, Haney D, Amick AC, Gardner J, Cosma G *et al*. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 $^{+}$ T cells. *PLoS Pathogens* 2010; **6**: e1000798.
- 26 Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pette C, Ruchti F *et al*. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; **202**: 673–685.
- 27 Barron MA, Gao D, Springer KL, Patterson JA, Brunvand MW, McSweeney PA *et al*. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1777–1783.
- 28 Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P *et al*. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 2003; **102**: 3060–3067.
- 29 Gallez-Hawkins G, Thao L, Lacey SF, Martinez J, Li X, Franck AE *et al*. Cytomegalovirus immune reconstitution occurs in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplants irrespective of detectable cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; **11**: 890–902.
- 30 Ganepola S, Gentilini C, Hilbers U, Lange T, Rieger K, Hofmann J *et al*. Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8 $^{+}$ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; **39**: 293–299.
- 31 Avetisyan G, Larsson K, Aschan J, Nilsson C, Hassan M, Ljungman P. Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; **38**: 687–692.
- 32 Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; **115**: 3861–3868.

6.5. Artículo 5

Effect of cytomegalovirus (CMV) serostatus on the incidence and virological features of active CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients. Solano C, Tormo N, de la Cámara R, Nieto J, López J, Benet I, Muñoz-Cobo B, Costa E, Remigia MJ, García-Noblejas A, Bravo D, Navarro D. Correspondence. Clin Infect Dis 2011; 53; 313-315.

Effect of Cytomegalovirus (CMV) Serostatus on the Incidence and Virological Features of Active CMV Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

TO THE EDITOR—We read with interest the article by Pietersma et al [1]. It was reported that cytomegalovirus (CMV) DNAemia occurred more frequently ($P \leq .001$) but was less severe (shorter duration and lower median peak value) in allogeneic stem cell transplant (Allo-SCT) recipients receiving a graft from a CMV-seropositive (D+) donor than in those receiving a graft from a CMV-seronegative donor (D-). Unfortunately, the extensive use of antithymocyte globulin in the cohort (60% of patients), which might have been unevenly employed between the D- and D+ groups, may have minimized the well-known impact of receipt of a D+ graft on the early reconstitution of protective CMV-

specific T-cell immunity [2-5]. Moreover, it appeared that almost 50% of the patients were not treated with antivirals. This may have introduced a bias in the estimation of the duration of episodes, as the kinetics of plasma CMV DNAemia clearance in self-resolved episodes may differ from that in treated episodes (D. Navarro, unpublished data). We wish to add our experience on this matter. Our analysis focused on a highly homogenous cohort: CMV-seropositive patients ($n = 80$) undergoing sibling/matched T-cell replete Allo-SCT (D- donors, $n = 21$; D+ donors, $n = 59$) at the participating hospitals from December 2006 through January 2010 [3, 5]. Seventy patients were virologically monitored by both the antigenemia pp65 (AG) test and by a plasma real-time polymerase chain reaction (PCR) assay (Abbott Molecular CMV real-time PCR [$n = 24$]; or Roche LightCycler CMV Quant kit [$n = 43$]) [5, 6]. These patients were pre-emptively treated with antivirals upon detection of ≥ 1 pp65-positive cells per 200 000 Polymorphonuclear leukocytes. Thirteen patients were exclusively monitored by the LightCycler CMV Quant kit and treated upon the detection of >500 CMV DNA copies/mL in plasma. A total of 44 patients experienced 1 or more episodes ($n = 59$) of CMV DNAemia within 6 months after transplantation. All episodes were preemptively treated with antivirals. The CMV DNAemia occurred more frequently in D-/R+ patients than in D+/R+ patients, both within the first 100 days and within 6 months after Allo-SCT, although the differences did not reach statistical significance (Table 1). A trend toward an earlier occurrence of CMV DNAemia was observed in D-/R+ patients. The duration of CMV DNAemia was longer in D-/R+ patients than in D+/R+ patients. The initial and peak CMV DNA loads within the first episode of active CMV infection and the peak value of CMV DNAemia within the study period (considering all episodes) were higher in D-/R+ patients than in D+/

R+ patients. The above differences remained when the patients were grouped according to the monitoring strategy and the type of PCR used (data not shown). Recurrent episodes of CMV DNAemia and CMV end-organ disease occurred more frequently in D-/R+ patients than in D+/R+ patients. Our findings are in keeping with previously published data [2-5, 7, 8] indicating that CMV DNAemia develops more frequently and is more severe in D-/R+ Allo-SCT patients than in D+/R+ Allo-SCT patients, irrespective of the transplant modality (T-cell replete or in vivo T-cell depletion with antithymocyte globulin) [2, 4], which is related to a delayed reconstitution of CMV-specific T-cell immunity [2, 4, 5].

Acknowledgments

Financial support. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (grant 06/1738).

Potential conflicts of interest. Rafael de la Cámara has received payment for advisory boards on cytomegalovirus antivirals for Roche. All other authors: No reported conflicts

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed in the Acknowledgments section.

Carlos Solano,^{1,2} Nuria Tormo,³ Rafael de la Cámara,⁴ José Bartolo Nieto,⁵ Javier López,⁶ Isabel Benet,^{1,2} Beatriz Muñoz-Cobo,³ Elisa Costa,³ María José Remigia,¹ Ana García-Noblejas,⁷ Dayana Bravo,³ and David Navarro^{3,8}

¹Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, ²Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia,

³Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ⁴Hematology Service, Hospital de la Zarzuela, Madrid, Spain; ⁵Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; ⁶Hematology Service,

Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ⁷Hematology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain; and

⁸Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

References

- Pietersma FL, van Dorp S, Minnema MC, et al. Influence of donor cytomegalovirus (CMV) status on severity of viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in CMV-seropositive recipients. *Clin Infect Dis* 2011; 52:e144-8.

Table 1. Demographic and Clinical Data of Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients and Virological Features of Episodes of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia in the Study Groups

Parameter	Donor (D) CMV serostatus		P ^a
	D- (n = 21)	D+ (n = 59)	
Age, years	48 (19–70)	45 (16–70)	.908
Sex, no. (%) of patients			
Male	17 (80.0)	37 (62.7)	
Female	4 (20.0)	22 (37.3)	.177
Disease, no. of patients			
Aplastic anemia	0	2	.369
Acute lymphatic leukemia	5	11	
Acute myeloid leukemia	7	15	
Chronic lymphatic leukemia	1	3	
Chronic myeloid leukemia	1	4	
Hodgkin disease	1	6	
Myelodysplastic syndrome	1	4	
Multiple myeloma	3	5	
Non-Hodgkin lymphoma	2	9	
Source of stem cells, no. (%) of patients			
Peripheral blood	20 (95.2)	56 (94.9)	
Bone marrow	1 (4.8)	3 (5.1)	>.999
Conditioning regimen, no. (%) of patients			
Myeloablative	10 (47.6)	22 (37.2)	
Nonmyeloablative	11 (52.4)	37 (62.8)	.131
Graft versus host disease, no. (%) of patients ^b			
Stage 0–1	12 (63.2)	39 (76.5)	
Stage 2–4	7 (36.8)	12 (23.5)	.365
Early CMV DNAemia, no. (%) of patients ^c	11 (52.3)	28 (47.4)	.801
Cumulative CMV DNAemia, no. (%) of patients ^d	13 (68.4)	31 (54.3)	.422
Day of first positive PCR result	31 (7–187)	42 (2–185)	.260
Peak CMV DNAemia in the first episode, copies/mL	2,890 (25–12,900)	1,254 (33–17,047)	.817
Peak CMV DNAemia in all episodes, copies/mL	2,890 (37–12,900)	1,300 (33–17,047)	.938
Initial CMV DNAemia, copies/mL	500 (25–4,000)	250 (25–3,800)	.327
Duration ^e of first episode of CMV DNAemia, d	19 (11–100)	15 (5–76)	.148
Duration of all episodes of CMV DNAemia, d	35 (14–100)	17 (5–97)	.013
No. of episodes of CMV DNAemia, no. (%) of patients			
1	6 (46.1)	24 (77.4)	
2	6 (46.1)	7 (22.6)	
3	1 (7.8)	0 (0.0)	.035
CMV end-organ disease, no. (%) of patients ^f	3 (14.2)	2 (3.3)	.110

NOTE. Data are median or median (range), unless otherwise indicated.

^a Frequency comparisons were performed using the χ^2 test (Fisher exact test). Differences between medians were compared using the Mann-Whitney *U* test (2 independent variables) or the Kruskal-Wallis test (*k* independent variables). Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 17.0). A *P* value of <.05 was considered to be statistically significant.

^b Only the cases in which acute graft versus host disease occurred prior to the detection of CMV DNAemia were considered for analysis.

^c Episodes that developed within the first 6 months after transplantation.

^d Episodes that developed within the first 6 months after transplantation in patients completing the follow-up period. (Four patients, 2 D–/R+ and 2 D+/R+, who had not experienced early CMV DNAemia, died prior to the end of the follow-up.)

^e Time elapsed between the first positive and the first negative polymerase chain reaction result (for each episode).

^f Four cases were enteritis and 1 was pneumonitis.

2. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive

transplant recipients. *Blood* **2009**; 113: 6465–76.
3. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65

and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hemato-

- poietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **2010**; 45:543–9.
4. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, et al. Donor serostatus has an impact on cytomegalovirus-specific immunity, cytomegalovirus disease incidence, and survival in seropositive hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* **2011**; 17:574–85.
 5. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* **2011**. [Epub ahead of print].
 6. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, et al. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:3311–8.
 7. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* **2006**; 91:78–83.
 8. Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE, et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* **2007**; 40: 125–36.

Correspondence: David Navarro, MD, PhD, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain (david.navarro@uv.es).

Clinical Infectious Diseases 2011;53(3):313–315

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.
1058-4838/2011/533-0024\$14.00
DOI: 10.1093/cid/cir414

7. RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

7. RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

En virtud del artículo 7.2 del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, se presentan a continuación los resúmenes de los 5 artículos compendiados en esta tesis doctoral.

Artículo 1

Título:

Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during preemptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. 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. Bone Marrow Transplant 2010; 45, 543–549.

Introducción:

La prueba de la antigenemia pp65 (AG) se utiliza para guiar y monitorizar la eficacia del tratamiento anticipado de la infección activa por CMV en el alo-TPH. El tratamiento anticipado da lugar en la mayoría de los casos a una rápida disminución de la AG hasta su aclaramiento completo. Sin embargo, se ha publicado la aparición con cierta frecuencia en este contexto clínico de un aumento de los niveles de AG poco después del inicio del tratamiento con ganciclovir (GCV) [Boeckh *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 2001; Gerna *et al.*, 2005]. Se han observado dos patrones distintos de este

fenómeno: (i) un aumento simultáneo de los niveles de AG y DNAemia, y (ii) un aumento aislado de los valores de la AG acompañado de una disminución o una estabilización de los niveles de DNAemia. El primer patrón se observa principalmente en pacientes en tratamiento con dosis altas de esteroides para la EICH [Nichols *et al.*, 2001; Gerna *et al.*, 2005], o en los que reciben globulina antitumoral (ATG) en el régimen de acondicionamiento [Kanda *et al.*, 2001]. Como es conocido que ambos fármacos producen inmunosupresión, un fallo en la respuesta de células T frente a CMV es la explicación más probable para la aparición de estos episodios. Esta suposición, sin embargo, no ha sido demostrada. El incremento de los niveles de AG y DNAemia puede deberse también a la aparición de cepas resistentes a GCV; sin embargo, esto no parece ser frecuente en el contexto del alo-TPH [Gilbert y Boivin, 2005]. El segundo patrón fue inicialmente documentado en receptores de TOS con infección primaria por CMV, y su base patogénica fue posteriormente esclarecida [Gerna *et al.*, 1998; Gerna *et al.*, 2003]: la persistencia de la AG en ausencia de DNAemia durante el tratamiento con GCV era debida a la hiperproducción de pp65 [Gerna *et al.*, 2003]. No se han asociado factores de riesgo significativos con estos episodios de infección activa por CMV en el alo-TPH, por lo que la resolución de los mismos no requiere la modificación del tratamiento antiviral en curso [Gerna *et al.*, 2005]. En un estudio previo, demostramos que los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ productores de IFN γ específicos de pp65 e IE-1 de CMV proporcionan protección frente a la infección virémica por CMV [Solano *et al.*, 2008].

Objetivo:

Determinar la frecuencia de aparición de incrementos de AG o DNAemia plasmática de CMV durante el tratamiento anticipado con GCV en

receptores de alo-TPH e investigar si este fenómeno puede relacionarse con un déficit en la respuesta celular T específica frente a CMV.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyó a 76 pacientes receptores de alo-TPH entre enero de 2006 y julio de 2008, atendidos en los siguientes hospitales: Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital La Princesa de Madrid, Hospital Morales Meseguer de Murcia, y Hospital Ramón y Cajal de Madrid. La infección por el CMV fue monitorizada mediante la prueba de la AG y/o la carga viral plasmática medida mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) una vez a la semana hasta el día +100 post-trasplante, y posteriormente, cada dos semanas hasta el día +180. La monitorización virológica a partir de este punto se realizó en cada control clínico rutinario, y siempre si se presentaban signos clínicos compatibles con infección orgánica por CMV. Durante los episodios de infección activa por CMV ambas pruebas fueron realizadas dos o tres veces a la semana. Para el análisis de los datos, el inicio de un episodio fue definido por un resultado positivo obtenido simultáneamente por AG y QRT-PCR. El final de un episodio fue definido por el primer resultado negativo de la prueba utilizada. Un episodio recurrente fue definido por la reaparición de positividad de la AG y/o la DNAemia al menos 15 días después del final del episodio anterior. El tratamiento anticipado se inició con valGCV oral (900 mg/12 h) ó GCV i.v. (5 mg/kg/12 h) sobre la base de un resultado positivo de la AG (≥ 1 célula positiva para pp65/200 000 células). El tratamiento anticipado se retiró tras dos resultados negativos consecutivos de la AG, obtenidos con una diferencia de 3 días, y después de al menos 2 semanas de tratamiento. Se dio tratamiento de mantenimiento con valGCV (450 mg/12 h) a algunos pacientes en tratamiento con esteroides por EICH tras la resolución de un episodio de

infección activa por CMV y a otros con DNAemia persistente tras la negativización de la AG. En pacientes con neutropenia grave se empleó foscarnet (FOS) i.v. (60 mg/kg/12 h) en lugar de GCV. En determinadas circunstancias, el FOS se añadió al tratamiento o sustituyó al GCV / valGCV tras el inicio del tratamiento anticipado cuando la AG continuó siendo positiva más allá de la tercera semana de tratamiento. La EOC fue diagnosticada y tratada según los protocolos institucionales¹.

La monitorización inmunológica se realizó mediante el conteo de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ específicos de CMV productores de IFN γ por citometría de flujo con un protocolo de tinción de citoquinas intracelulares. Para ello, se estimularon simultáneamente 0.5 ml de sangre entera heparinizada con dos sets de pentadecapéptidos (15-meros) solapados que abarcan las secuencias completas de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV, en presencia de anticuerpos monoclonales co-estimulantes frente a CD28 y CD49d. Se ensayaron en paralelo muestras incubadas con PBS/DMSO y anticuerpos co-estimulantes (blanco). Las últimas 4 h de incubación se realizaron en presencia de brefeldina A. La sangre fue lisada al terminar la incubación y congelada a -80 °C. El día del ensayo, la sangre estimulada fue descongelada a 37 °C, lavada, permeabilizada, y teñida con una combinación de anticuerpos monoclonales marcados (anti-IFN γ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4 o anti-CD8-PerCP-Cy5.5, y anti-CD3-APC cuando se utilizó el kit de T CD8⁺) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se emplearon los controles de isotipo apropiados. Después, las células fueron lavadas, resuspendidas en paraformaldehído al 1%, y analizadas en las 2 horas

¹La colitis y neumonitis por CMV se diagnostican en base a hallazgos clínicos compatibles y la demostración histológica de inclusiones celulares típicas de CMV, así como la detección inmunohistoquímica de proteínas de CMV, en muestras de tejido obtenido por biopsia o necropsia. La enfermedad por CMV fue tratada con GCV iv (5 mg/kg/12 h) durante 21 días, seguido de 5 mg/kg/día (5 días a la semana) hasta el día +90 o hasta la resolución de la condición de inmunosupresión, o con foscarnet iv (60 mg/kg/8 h), siguiendo una pauta similar.

siguientes en un citómetro de flujo. Cada colección de datos contenía normalmente al menos 1000 eventos positivos para CD4⁺ o CD8⁺ dentro de la ventana de análisis de linfocitos. Los eventos CD4⁺ y CD8⁺ se seleccionaron y analizaron para detectar la presencia del marcador de activación CD69 y la producción de IFN γ . El número total de células T CD8⁺ y T CD4⁺ específicas de CMV se calculó multiplicando los porcentajes de células T específicas de CMV productoras de IFN γ (tras sustraer el ruido de fondo) por el recuento absoluto de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Las respuestas fueron consideradas específicas para valores >0.1% en ambos tipos de células.

También se llevó a cabo la secuenciación de los genes UL57 y UL97 del CMV con el fin de descartar la presencia de mutaciones que confieren resistencia a GCV y que pudieran relacionarse con un incremento de la AG y la DNAemia durante el tratamiento anticipado. Se extrajo el ADN de las muestras de plasma y se utilizó como molde para la amplificación de una región de 975-pb del gen UL97 que abarca los codones 429-753 [Lurain *et al.*, 2001], y dos regiones del gen UL54 que abarcan cada una los codones 345-625 y 645-1013 respectivamente, empleando un protocolo de PCR anidada [Scott *et al.*, 2004]. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados.

La significación estadística de las diferencias en las medianas se realizó aplicando el test de la U de Mann-Whitney para datos no apareados, y el test de Wilcoxon para datos apareados. El test exacto de Fisher se utilizó para comparar variables dicotómicas entre grupos. Todos los tests fueron de dos colas. Un valor de P <0.05 fue considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico SPSS (versión 14.0).

Conclusiones:

Los datos obtenidos permiten vincular la falta de una expansión celular T específica del CMV con el incremento de la AG y DNAemia de CMV durante el tratamiento anticipado con GCV. Asimismo, el desarrollo temprano de una respuesta eficaz T frente al CMV se relacionó con el control del episodio de infección activa.

Artículo 2

Título:

An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. Tormo N, Solano C, de la Cámara R, García-Noblejas A, Cardeñoso L, Clari MA, Nieto J, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Benet I, Navarro D. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16: 653-661.

Introducción:

La infección activa por CMV es un evento frecuente tras el alo-TPH con una morbilidad y una mortalidad significativas [Boeckh *et al.*, 2003]. El herpesvirus humano 6 (HHV-6) es un miembro de la subfamilia de los beta-herpesvirus cuya reactivación se ha relacionado cada vez más con complicaciones clínicas, como retraso del prendimiento del injerto de neutrófilos y plaquetas, neumonía intersticial, erupción cutánea, EICH grave, trastornos del sistema nervioso central y mortalidad en general [De Pagter *et al.*, 2008]. Dependiendo del método empleado para la vigilancia de la replicación viral y el estado neto de la inmunosupresión post-trasplante, 45%-85%, y 25%-80% de los receptores de alo-TPH sufren uno o más episodios de infección activa por CMV ó HHV-6, respectivamente, en los primeros 100 días post-trasplante [Boeckh *et al.*, 2003; De Pagter *et al.*, 2008]. Se considera que el HHV-6 posee características inmunomoduladoras e inmunosupresoras [Lusso, 2006], por lo que podría incrementar el riesgo de infección activa y enfermedad por CMV en el contexto del trasplante. Principalmente, se han publicado datos epidemiológicos, clínicos, y virológicos respaldando esta hipótesis en el TOS. Se ha demostrado que la aparición de viremia de HHV-6 se asocia con un incremento del riesgo de desarrollo de síndrome o enfermedad orgánica

por CMV posterior [Dockrell *et al.*, 1997; DesJardin *et al.*, 1998; Humar *et al.*, 2000; DesJardin *et al.*, 2001; Humar *et al.*, 2002a; Humar *et al.*, 2002b]. La base fisiopatológica de dicha interacción viral es desconocida, pero podría estar relacionada con la capacidad de HHV-6 de suprimir el funcionamiento de los LT y de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 α y TNF α , que pueden desencadenar la reactivación de CMV [Lusso, 2006]. El efecto de la replicación de HHV-6 sobre la infección de CMV en el alo-TPH y las consecuencias clínicas de dicha interacción, si existe, no han sido definidas. En su trabajo, Wang *et al.* [Wang *et al.*, 2002] proporcionaron datos que sugieren que la reactivación de HHV-6 podría suprimir la reconstitución de la respuesta linfoproliferativa específica de CMV, permitiendo así su replicación. El conocimiento de la naturaleza de la interacción entre ambos beta-herpesvirus podría tener implicaciones importantes en el manejo terapéutico de la infección por CMV en el alo-TPH.

Objetivo:

Determinar si la infección activa por HHV-6 predispone a la reactivación de CMV y/o tiene alguna influencia sobre la cinética de replicación de CMV en el alo-TPH.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron 68 pacientes receptores de alo-TPH entre noviembre de 2005 y diciembre de 2008, de los siguientes hospitales: Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital La Princesa de Madrid, Hospital Morales Meseguer de Murcia, y Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Estos pacientes fueron monitorizados hasta el día +100 post-trasplante. El prendimiento de

neutrófilos y de plaquetas fueron definidos como >500 células/ μl durante 3 días, y >50.000 plaquetas/ μl durante una semana en ausencia de transfusión de plaquetas, respectivamente, contando el primer día como el día del prendimiento del injerto. La intensidad de la EICH aguda (EICHa) se dividió en grados de 0 a IV: 0 a I, de bajo grado, y II a IV, de alto grado.

Los pacientes fueron monitorizados para la detección de infección activa por CMV por medio de la AG y la DNAemia plasmática, una vez a la semana. La vigilancia de la DNAemia de HHV-6 no se realizó de forma rutinaria en nuestros pacientes, por lo que, para su análisis, se utilizaron muestras criopreservadas. La disponibilidad de un volumen suficiente de plasma para la PCR fue un factor limitante que impidió el análisis de un mayor número de muestras. Se obtuvieron muestras de plasma secuenciales de los pacientes de una mediana de 7 días (rango: 0-26 días) a una mediana de 58 días (rango: 38-75 días) tras el trasplante. Se analizaron un total de 520 muestras (una mediana de 6 muestras por paciente; rango: 3-11 muestras). La detección de ADN de HHV-6 se realizó con un ensayo comercial de PCR en tiempo real que amplifica una secuencia del ORF 13R común a las variantes A y B del HHV-6. El límite de detección del ensayo es de 10 copias/ml, y el rango de medición lineal es de $6 \log_{10}$ copias/ml. Para el análisis de los datos, el inicio y el fin de un episodio dado de infección viral activa se definió como el primer resultado positivo (cualquier nivel de carga viral plasmática) y el primer resultado negativo, respectivamente, en el ensayo de PCR correspondiente. La infección activa por HHV-6 ó CMV fue definida por la detección de ADN vírico en una o más muestras de plasma. Se inició tratamiento anticipado con valGCV oral (900 mg/12 horas) o GCV i.v. (5 mg/kg/12 horas) cuando se obtuvo el primer resultado de AG positiva (≥ 1 célula positiva para pp65/200.000 células) y se retiró tras dos resultados de AG negativos consecutivos obtenidos con un intervalo de 3 a 7 días, tras al menos 2 semanas de tratamiento. En pacientes con neutropenia grave, se utilizó FOS i.v. (60 mg/kg/12 horas) en lugar de GCV.

Todos los pacientes con anticuerpos frente al VHS recibieron profilaxis oral con aciclovir (ACV) según los protocolos institucionales.

Para determinar la tasa de replicación viral se estimó el tiempo de duplicación viral (dt) de HHV-6 y CMV por medio de dos aproximaciones. En la primera, consideramos para el análisis los dos primeros resultados positivos de PCR. El dt viene dado por $dt = (t_2 - t_1) \times \log(2)/\log(q_2/q_1)$, siendo q_1 y t_1 el nivel de DNAemia (copias/ml) y el tiempo (en días) en el momento del primer resultado positivo de PCR, respectivamente, y q_2 y t_2 el nivel de DNAemia y el tiempo en el momento de la segunda PCR positiva, respectivamente. Esta fórmula asume una tasa de crecimiento constante, que ocurre en la fase precoz de la replicación viral. Cuando se disponía de más de dos resultados de PCR positivos, el pico de DNAemia no se consideró, ya que la tasa de crecimiento de un virus se enlentece cuando la carga viral se aproxima al pico. En la segunda aproximación, incluimos en el análisis todas las medidas desde el último resultado negativo de PCR hasta el pico de la carga viral, y estimamos el dt como $dt = \ln(2)/k$, siendo k la constante de la tasa de crecimiento exponencial, que viene dada por $V(t) = V(0)e^{kt}$, donde V es la carga viral y t el tiempo (en días). Para CMV el dt fue calculado sobre la base de los valores de DNAemia obtenidos antes del inicio del tratamiento anticipado. Por ello, sólo se consideraron para el análisis los episodios en que la PCR fue positiva (al menos dos muestras consecutivas) antes que el ensayo de AG y los que se resolvieron sin tratamiento anticipado (episodios con AG negativa). Igualmente, para el cálculo del dt de HHV-6 sólo se consideraron para el análisis las cargas virales medidas en ausencia de tratamiento con (val)GCV.

Para la monitorización inmunitaria, el recuento de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ productores de IFN γ (T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺, respectivamente) específicos de pp65 e IE-1 de CMV se llevó a cabo por

citometría de flujo para citoquinas intracelulares teñidas, de la misma manera que en el artículo anterior de la presente tesis doctoral (artículo 1).

Los datos fueron analizados con ayuda del paquete estadístico SPSS (versión 15.0). La comparación de frecuencias se realizó empleando el test de χ^2 para variables categóricas (análisis univariante), y para los datos continuos no apareados el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney. El coeficiente de Spearman fue utilizado para analizar la correlación entre las variables continuas. Para el análisis multivariante, las variables asociadas ($P < 0.10$) con la DNAemia de HHV-6 en un análisis univariante se incluyeron y se analizaron por medio de un modelo de regresión logística binaria. Las variables que se asociaron con la DNAemia de CMV en un análisis univariante se incluyeron y analizaron empleando el modelo de regresión de los riesgos proporcionales de Cox, en el que la DNAemia de HHV-6 se introdujo como una variable tiempo-dependiente. Las asociaciones potenciales entre la DNAemia de HHV-6 o la DNAemia de CMV y la incidencia de EICHa de alto grado (II-IV) fueron también evaluadas con el modelo de regresión de los riesgos proporcionales de Cox, siendo ambos eventos virológicos considerados como variables tiempo-dependientes. Los resultados se expresan como tasa de riesgo relativo (RR) o cociente de riesgo o hazard ratio (HR), y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

Conclusiones:

Los datos favorecen la hipótesis de que un estado de inmunosupresión grave lleva a una activación simultánea de HHV-6 y CMV, pero ponen en duda que HHV-6 tenga un papel predisponente en el desarrollo de DNAemia de CMV o influya en el curso de la infección activa por CMV.

Artículo 3

Título:

Kinetics of Cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-Specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T Cells During Episodes of Viral DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Potential Implications for the Management of Active CMV Infection. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A, Clari MA, Chilet MF, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. J Med Virol 2010; 82: 1208-1215.

Introducción:

El tratamiento antiviral anticipado ha sido adoptado por la mayoría de centros de trasplante como la estrategia de primera elección para la prevención de la enfermedad por CMV tras el alo-TPH [Boeckh *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2008]. Si bien esta estrategia ha demostrado reducir drásticamente la incidencia de enfermedad temprana por CMV [Boeckh *et al.*, 2003; Ljungman, 2008], resulta probablemente en un exceso de tratamiento, dado que un determinado número de pacientes que nunca progresarán a enfermedad por CMV son tratados [Ljungman, 2006; Avetisyan *et al.*, 2007]. Se espera que la monitorización inmunológica de la respuesta celular T específica de CMV mejore el manejo de la infección activa, llevando a una mejor orientación del uso de antivirales y permitiendo la identificación de pacientes con elevado riesgo de infecciones recurrentes y EOC. Sin embargo, hasta la fecha, la evaluación de la inmunidad celular T específica de CMV no ha tenido un gran impacto en el manejo clínico de la infección activa por CMV. Para poder diseñar estrategias potenciales de intervención basadas en la monitorización inmunológica, se requiere la caracterización de las cinéticas de las células T funcionales específicas de CMV durante los episodios de infección activa por CMV. Los estudios que

abordan esta cuestión son, sin embargo, escasos [Aubert *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2002; Widmann *et al.*, 2008]. La resolución de episodios de infección activa por CMV en el contexto del alo-TPH parece ser en última instancia dependiente de la expansión de células funcionales específicas de CMV en respuesta a la replicación viral [Quinnan Jr *et al.*, 1982; Reusser *et al.*, 1991; Riddell *et al.*, 1992]. En este sentido, hemos mostrado previamente que la ausencia de una expansión precoz de células T CD8⁺ y T CD4⁺ productoras de IFN γ (T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺, respectivamente) específicas de pp65 e IE-1 de CMV se asocia con niveles crecientes de la AG y la DNAemia durante el tratamiento anticipado y con la duración prolongada del tratamiento antiviral (artículo 1 de la presente tesis doctoral).

Objetivo:

Estudiar la cinética de las células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV y de la DNAemia de CMV en una serie de episodios de infección activa por CMV en receptores de alo-TPH.

Metodología:

Se realizó un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron 19 episodios de infección activa por CMV de 18 pacientes receptores de alo-TPH. El periodo de inclusión fue de diciembre de 2008 a mayo de 2009 en los hospitales participantes. Se excluyeron los pacientes seronegativos para CMV receptores de un injerto de un donante también seronegativo. Sólo se incluyeron para el análisis los episodios de infección activa por CMV tratados anticipadamente. El final del periodo de estudio fue el 22 de Junio de 2009. La monitorización virológica de la infección por CMV se llevó a cabo por medio del ensayo de la AG y/o un ensayo en plasma de

QRT-PCR. El tratamiento anticipado con valGCV oral (900 mg/12 h) ó GCV i.v. (5 mg/kg/12 h) se inició al obtener un resultado positivo de la AG (≥ 1 célula positiva para pp65/200 000 células) ó detectar >1000 copias/ml de ADN de CMV en plasma, dependiendo de la institución participante, y se retiró al obtener dos resultados consecutivos negativos de AG o PCR (en función del centro), separados en 3-7 días tras un mínimo de dos semanas de tratamiento. Se empleó FOS i.v. (60 mg/kg/12 h) en lugar de GCV en pacientes con neutropenia grave, y en algunos pacientes que no habían respondido al GCV tras 3 semanas de tratamiento. Para llevar a cabo el análisis, la duración de un episodio dado fue el tiempo comprendido entre el día de inicio del tratamiento anticipado y el día del primer resultado negativo de la DNAemia. El diagnóstico de la enfermedad por CMV se realizó conforme a lo descrito previamente [Solano *et al.*, 2001; Gimeno *et al.*, 2008]. Cuando estuvo indicado clínicamente, los pacientes recibieron transfusiones de glóbulos rojos concentrados y de plaquetas.

La enumeración de linfocitos T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicos de CMV se llevó a cabo por citometría de flujo para detección de citoquinas intracelulares teñidas, como se ha descrito en el artículo 1 de la presente tesis doctoral. La monitorización inmunológica fue realizada una o dos veces a la semana durante los episodios de infección activa por CMV. En algunos pacientes, se dispuso de varias muestras de sangre tomadas tras la resolución del episodio de infección activa por CMV. Se analizaron un total de 146 muestras de sangre de los 18 pacientes (mediana: 7 muestras / paciente; rango, 2-15 muestras).

Se llevó a cabo el análisis de las secuencias de los genes UL54 y UL97 en los dos episodios de mayor duración que no resolvieron para determinar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a (val)GCV y FOS (igual que en el artículo 1 de la tesis).

Los datos fueron analizados con ayuda del paquete estadístico SPSS (versión 15.0). Las comparaciones se llevaron a cabo empleando el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney para los datos continuos desapareados, y el test de Wilcoxon para los datos continuos apareados. El test del coeficiente de Spearman se empleó para el análisis de la correlación entre variables continuas. Para llevar a cabo los cálculos, las respuestas específicas frente a CMV indetectables se computaron como 0 células/ μl . Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Conclusiones:

Los recuentos periféricos de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN γ específicas de CMV se correlacionan inversamente con la DNAemia por CMV. La expansión de ambos tipos celulares -sobre todo de las células T CD8⁺- se asocia con la resolución de los episodios de infección activa tratados anticipadamente. Esta observación podría utilizarse para suspender o continuar el tratamiento antiviral basándose en la monitorización inmunológica de estos pacientes.

Artículo 4

Título:

Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. Bone Marrow Transplant 2011; 46: 1437-43.

Introducción:

La protección frente a la infección activa por CMV en el alo-TPH depende críticamente de la reconstitución de células funcionales T CD8⁺ y T CD4⁺ específicas de CMV [Quinnan Jr *et al.*, 1982; Reusser *et al.*, 1991; Riddell *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1994; Einsele *et al.*, 2002]. Se ha demostrado que la cuantificación de células T específicas de CMV resulta potencialmente útil para identificar pacientes con elevado riesgo de desarrollar complicaciones clínicas relacionadas con CMV [Solano y Navarro, 2010]. El tratamiento antiviral anticipado es actualmente la estrategia de primera elección para prevenir la aparición de EOC en receptores de alo-TPH [Ljungman *et al.*, 2008], pero sin duda lleva a un exceso de tratamiento que puede ser tóxico, favorecer la aparición de resistencia a los antivirales o permitir la instauración tardía de enfermedad por CMV [Ljungman, 2006]. Se espera que la monitorización inmunológica lleve a un uso más preciso del tratamiento anticipado, por lo que se han propuesto diversos marcadores inmunológicos subrogados de la competencia inmunitaria adaptativa frente a CMV [Solano y Navarro, 2010]. Además, se han intentado establecer niveles umbral de determinadas subpoblaciones de células T específicas de CMV que presumiblemente confieren protección frente a la infección activa por CMV, si bien su utilidad clínica no ha sido validada extensamente

[Aubert *et al.*, 2001; Cwynarski *et al.*, 2001; Hebart *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2005; Lilleri *et al.*, 2008; Moins-Teisserenc *et al.*, 2008; Solano *et al.*, 2008; Pastore *et al.*, 2011]. En un estudio piloto, mostramos que la cuantificación de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ estimuladas con dos conjuntos de péptidos que abarcan las secuencias enteras de pp65 e IE-1, permitía la identificación de pacientes presumiblemente protegidos de la DNAemia de CMV poco tiempo después del trasplante [Solano *et al.*, 2008]. Establecimos un punto de corte protector en el recuento de las dos subpoblaciones de células T productoras de IFN γ que mostraba el máximo de especificidad (>1.0 células/ μ l para las células T CD8⁺IFN γ ⁺ y >1.2 células/ μ l para las células T CD4⁺IFN γ ⁺).

Objetivo:

Evaluar los niveles umbral de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV obtenidos previamente en una cohorte amplia de receptores de alo-TPH, e investigar los efectos de varios factores sobre la reconstitución precoz y a largo plazo de ambas subpoblaciones T.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron 133 pacientes receptores de alo-TPH sin depleción de células T atendidos en cuatro hospitales españoles entre enero de 2007 y mayo de 2009. Los pacientes fueron monitorizados al menos hasta un año post-trasplante. El estudio fue aprobado por los respectivos Comités de Ética, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar. La monitorización virológica de la infección activa por CMV fue realizada por medio de la AG y/o un ensayo en plasma de QRT-PCR. El tratamiento

anticipado con valGCV oral (900 mg/12 h), GCV i.v. (5 mg/kg/12 h) ó FOS i.v. (60 mg/kg/12 h) se inició y se retiró según los criterios mencionados anteriormente. La enfermedad orgánica por CMV fue diagnosticada y tratada como se ha indicado previamente. El recuento de células T CD8⁺ y T CD4⁺ productoras de IFN γ específicas de CMV se realizó por citometría de flujo para citoquinas intracelulares teñidas, por medio del empleo simultáneo para la estimulación de dos conjuntos de pentadecapéptidos solapados que abarcan las secuencias enteras de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV (como se ha descrito previamente en el artículo 1 de la tesis). La monitorización inmunológica se planificó para ser realizada los días +30, +60, +90 y +365 post-trasplante. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS (versión 17.0). La comparación de frecuencias se realizó por medio del test de χ^2 (test exacto de Fisher) para las variables categóricas. Las diferencias entre las medianas se compararon con el test de la U de Mann-Whitney (para dos variables independientes) o el test de Kruskal-Wallis (k variables independientes) para datos no apareados. El test de Spearman se utilizó para el análisis de correlación entre variables continuas. Un P-valor <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Conclusiones:

Ningún paciente experimentó episodios de DNAemia por CMV tras presentar niveles por encima de los valores umbrales previamente establecidos para las células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN γ específicas de CMV. Los pacientes receptores de alo-TPH de donantes seropositivos para CMV emparentados y HLA-idénticos, así como acondicionados con regímenes no mieloablativos recuperaron dichos niveles protectores con mayor frecuencia. El conocimiento de los factores que afectan a la recuperación de la respuesta celular T específica frente a CMV en el alo-TPH permite determinar aquellos pacientes con mayor riesgo

de presentar una infección activa por CMV, con el fin de administrar el tratamiento anticipado de forma más precisa.

Artículo 5

Título:

Effect of cytomegalovirus (CMV) serostatus on the incidence and virological features of active CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients. Solano C, Tormo N, de la Cámara R, Nieto J, López J, Benet I, Muñoz-Cobo B, Costa E, Remigia MJ, García-Noblejas A, Bravo D, Navarro D. Correspondence. Clin Infect Dis 2011; 53; 313-315.

Introducción:

En el artículo de Pietersma y cols. [Pietersma *et al.*, 2011], se concluye que la DNAemia ocurre más frecuentemente ($P \leq .001$) pero es menos grave (duración más corta y menor valor pico medio) en receptores de alo-TPH de un donante seropositivo para CMV (D+) que en los receptores de alo-TPH de un donante seronegativo para CMV (D-). Desafortunadamente, el extenso uso de globulina antitimocítica (ATG) en la cohorte (60% de los pacientes), que podría haber sido empleado de forma desigual entre los grupos D- y D+, podría haber minimizado el conocido impacto de recibir un injerto de un D+ sobre la reconstitución de una respuesta inmunitaria protectora específica de CMV [Zhou *et al.*, 2009; Ugarte-Torres *et al.*, 2011], como demostramos en los artículos previos de la presente tesis doctoral (artículos 1 y 4). Por otra parte, parece que casi el 50% de los pacientes no fueron tratados con antivirales. Esto podría haber introducido un sesgo en la estimación de la duración de los episodios, dado que la cinética del aclaramiento de la DNAemia del CMV en plasma en episodios “auto-resueltos” podría diferir de la de episodios tratados.

Objetivo:

Demostrar la influencia del estado serológico frente al CMV del donante en la incidencia y características virológicas de la infección activa por CMV en el receptor seropositivo de alo-TPH.

Metodología:

Para contrastar los resultados del citado artículo [Pietersma *et al.*, 2011], se llevó a cabo el análisis retrospectivo de una cohorte muy homogénea, que incluía a 80 pacientes seropositivos para CMV, receptores de alo-TPH repletos de células T de donante hermano/HLA-idéntico de los hospitales participantes entre diciembre de 2006 y enero de 2010. En 21 casos, el donante era seronegativo para CMV (D-) y en 59 seropositivo (D+). Setenta pacientes fueron monitorizados virológicamente por medio de la AG y por QRT-PCR plasmática. Dichos pacientes fueron tratados anticipadamente con antivirales cuando se detectó una AG de ≥ 1 célula-pp65+ / 200.000 PBLs. Trece pacientes fueron monitorizados exclusivamente por medio de la DNAemia de CMV y tratados cuando se detectó una carga de >500 copias de ADN / ml en plasma. Un total de 44 pacientes experimentaron 1 o más episodios (n=59) de DNAemia de CMV en el transcurso de los 6 meses post-trasplante. Todos los episodios fueron tratados anticipadamente.

Conclusión:

La DNAemia de CMV aparece más frecuentemente y es de mayor gravedad en pacientes receptores de alo-TPH de un donante seronegativo para CMV que de un donante seropositivo, en relación con un retraso en la reconstitución celular T específica de CMV.

8. RESULTADOS

8. RESULTADOS

Los resultados de los 5 artículos incluidos en la tesis doctoral se exponen a continuación en orden cronológico:

Artículo 1

Un total de 47/76 receptores de alo-TPH presentaron ≥ 1 episodios de infección activa por CMV (n=81). Once pacientes desarrollaron episodios de DNAemia positiva / AG negativa (n=13) que no fueron tratados anticipadamente. Treinta y seis de 47 receptores de alo-TPH tuvieron uno o más episodios de infección activa por CMV (n=68) que fueron tratados con (val)GCV. Los pacientes fueron monitorizados una mediana de 251 días. Cuarenta y tres episodios (67.4%) aparecieron en los primeros 100 días post-TPH.

Diecisiete pacientes (47.2%) presentaron episodios de infección activa por CMV en los cuales se observaron niveles decrecientes de AG y DNAemia tras el inicio del tratamiento anticipado (episodios tipo A). Doce pacientes (33.3%) desarrollaron episodios de infección activa por CMV en los que tanto los niveles de AG como de DNAemia aumentaron durante el tratamiento (episodios tipo B). Cinco pacientes (13.8%) experimentaron los dos tipos de episodios durante su seguimiento. Se constataron episodios de infección activa por CMV con niveles disociados de AG y DNAemia (episodios tipo C) en dos pacientes (5.5%). En resumen, de los 68 episodios, 39 fueron tipo A (57.3%), 27 tipo B (39.7%) y 2 tipo C (2.9%).

Se observó un incremento de 10 y 15 veces en los niveles de AG y DNAemia, respectivamente, sobre la línea de base (valor positivo inicial) en

los episodios tipo B, a los 13-14 días tras el inicio del tratamiento. Los niveles pico de AG y DNAemia se alcanzaron más frecuentemente en el transcurso de la segunda semana. En general, la duración de los episodios tipo B fue mayor que la de los episodios tipo A (Tabla 1). Igualmente, los picos de los niveles de AG y DNAemia fueron significativamente mayores en los episodios tipo B que en los tipo A. Los primeros valores positivos de AG y DNAemia de los episodios tipo A y tipo B fueron, sin embargo, comparables.

Parámetro	Episodios A mediana (rango)	Episodios B mediana (rango)	Valor de P
Todos los episodios			
Duración de la antigenemia	9.5 (2-39)	28 (7-72)	<0.001
Duración de la DNAemia	14 (2-48)	39 (10-45)	<0.001
Pico de la antigenemia	4 (1-210)	30 (4-210)	<0.001
Pico de la DNAemia	1200 (25-12 900)	14 219 (544-917 791)	<0.001
Episodio inicial			
Duración de la antigenemia	9.5 (2-16)	24.5 (6-72)	0.007
Duración de la DNAemia	11 (2-28)	31 (10-95)	0.005
Pico de la antigenemia	3 (1-210)	2 (2-50)	0.369
Pico de la DNAemia	1309 (25-70 800)	754 (37-7680)	0.300
Antigenemia (células positivas para pp65/200 000 LPMNs); DNAemia (copias de ADN de CMV/ml de plasma); duración (días).			

Tabla 1. Características de los episodios de infección activa por CMV con disminución (tipo A) o aumento (tipo B) de los niveles de antigenemia y DNAemia durante el tratamiento antiviral anticipado (correspondiente a la Tabla 2, artículo 1).

Veinte episodios (10 tipo A y 10 tipo B) ocurrieron en pacientes en tratamiento de mantenimiento con valGCV. Estos episodios tendieron a ser más prolongados y alcanzaron valores mayores de los niveles pico de AG y DNAemia que los desarrollados en su ausencia. Doce (9 tipo B y 3 tipo A) de estos 20 episodios se produjeron en pacientes en tratamiento con corticosteroides para EICH. En general, el tratamiento corticosteroideo se asoció significativamente con la aparición de episodios tipo B. Los episodios recurrentes se produjeron con frecuencias comparables, independientemente de que el episodio inicial fuera tipo A o tipo B.

En 24 episodios de infección activa por CMV (14 tipo A y 10 tipo B) se disponía de datos de respuesta de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN γ (T CD4⁺IFN γ ⁺ y T CD8⁺IFN γ ⁺) específicos de pp65 e IE-1 de CMV, obtenidos antes y después del inicio del tratamiento antiviral anticipado (Figura 5).

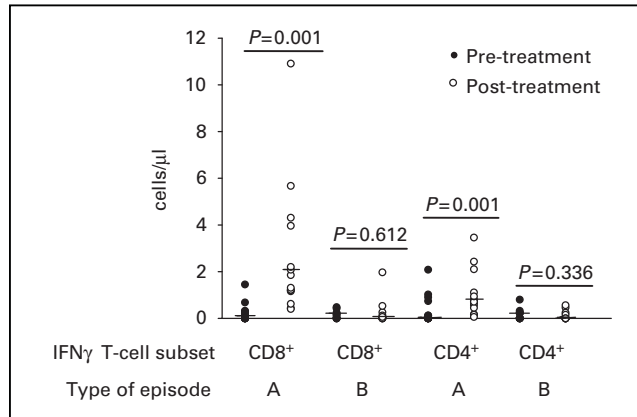


Figura 5. Células T CD8⁺ y T CD4⁺ productoras de IFN γ específicas de pp65 e IE-1 de CMV, antes y después del inicio del tratamiento antiviral anticipado en episodios de infección activa por CMV con niveles decrecientes (A) o crecientes (B) de antigenemia y DNAemia. Las barras horizontales indican las medianas. Se muestra la significación estadística de las diferencias entre los niveles de células T pre-tratamiento (puntos negros) y post-tratamiento (puntos blancos). Las muestras pre-tratamiento se obtuvieron una mediana de 9 y 10.5 días para los episodios tipo A y tipo B, respectivamente, antes del inicio del tratamiento antiviral anticipado. Las muestras post-tratamiento se obtuvieron una mediana de 16.5 y 13.5 días para los episodios tipo A y tipo B, respectivamente, tras el inicio del tratamiento anticipado (Figura 1, artículo 1).

Estos episodios ocurrieron una mediana de 46 días post-TPH y fueron episodios iniciales en 18 casos y recurrentes en los otros 6. Dos episodios tipo A y cuatro de tipo B se produjeron en pacientes en tratamiento corticosteroideo. Los niveles pretratamiento antiviral (obtenidos unos 10 días antes del inicio del tratamiento) de las dos subpoblaciones de células T no fueron significativamente diferentes entre los episodios tipo A y tipo B. Se produjo una expansión significativa de 12 y 6,8 veces de mediana en los niveles de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺,

respectivamente, en los episodios tipo A, a los 16.5 días de mediana tras el inicio del tratamiento. En estos episodios, la duración de la AG y de la DNAemia fue de unos 10 días. Por el contrario, en los episodios tipo B, el número de ambas subpoblaciones celulares a los 13.5 días tras el inicio del tratamiento no fue significativamente diferente al de las muestras pretratamiento. En estos episodios, los picos de los niveles de AG y DNAemia se alcanzaron 14 días tras el comienzo del tratamiento; y se produjo una expansión modesta de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ en sólo 4 y 3 de los 10 episodios analizados, respectivamente.

La monitorización de los niveles de células T IFN γ ⁺ específicas de CMV sólo fue posible en 7 episodios tipo B de 6 pacientes. En 5 de estos episodios, el control de la replicación de CMV pareció estar asociado con un incremento significativo en ambas subpoblaciones celulares. Por el contrario, un fallo en su expansión se relacionó con la persistencia de la AG y la DNAemia hasta el final del periodo de seguimiento (2 episodios restantes).

Las infecciones recurrentes se produjeron tras 6 episodios (2 tipo A y 4 tipo B) de los 24 para los cuales se dispuso de datos inmunológicos. Los niveles post-tratamiento de T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ fueron significativamente menores en estos 6 episodios que en los 18 que no fueron seguidos de una infección recurrente.

La secuenciación de los genes de CMV UL97 y UL54 se realizó retrospectivamente en 12 muestras de plasma de episodios con niveles crecientes de AG y DNAemia (11 tipo B y 1 tipo C). Se encontraron mutaciones en el gen UL97 que confieren resistencia a GCV en 2 muestras de episodios tipo B de dos pacientes diferentes. Estos episodios continuaban siendo activos al final del periodo de seguimiento (ambos pacientes fallecieron) y no fueron aclarados incluso tras la administración de FOS (no había mutaciones que confieren resistencia a FOS). En ambos pacientes, la

emergencia de cepas resistentes se detectó tras 40 y 56 días de tratamiento de mantenimiento, respectivamente. Se observó en ambos casos una respuesta celular T específica frente a CMV deteriorada durante toda la duración del episodio.

Artículo 2

Se incluyeron 68 pacientes no consecutivos del Hospital Clínico Universitario de Valencia (n=53), y del Hospital La Princesa de Madrid (n=15). En 62/68 pacientes, la primera muestra analizada se obtuvo en los primeros 10 días post-TPH. La DNAemia de HHV-6 se detectó al menos una vez en 27 de los 68 pacientes (39.7%), una mediana de 20 días (rango: 7-44 días) post-TPH. Se obtuvo una mediana de 2 muestras positivas por paciente (rango: 1-5 muestras). Seis pacientes presentaron un único resultado positivo.

En cuanto a la cinética de la DNAemia de HHV-6, el nivel pico se alcanzó más frecuentemente en la cuarta semana post-trasplante (52%). Los episodios de DNAemia de HHV-6 duraron una mediana de 10 días. El aclaramiento espontáneo de la DNAemia de HHV-6 se observó en 19/27 episodios; mientras que la resolución de los 8 episodios restantes se produjo durante el tratamiento con (val)GCV, iniciado por el desarrollo de una infección activa por CMV con AG positiva. En 3/8 episodios, el tratamiento anticipado fue iniciado en el momento del pico de DNAemia de HHV-6, mientras que en los otros 5 se inició cuando la DNAemia de HHV-6 había empezado a disminuir.

Treinta y nueve pacientes (57.3%) presentaron un episodio de infección activa por CMV en los primeros 100 días post-trasplante (mediana de inicio: 34 días). Ninguno de estos pacientes progresó a enfermedad por CMV durante el estudio. Veintisiete de los 39 episodios fueron tratados anticipadamente (AG positiva). Los 12 episodios restantes se resolvieron espontáneamente. No hubo episodios PCR-/AG+ y en todos los casos, la PCR plasmática fue positiva antes que la AG. Veintiuno de los 39 pacientes presentaron DNAemia de HHV-6 previa o simultánea. En 20/21 pacientes, la detección de la DNAemia de HHV-6 precedió a la de la DNAemia de CMV

en una mediana de 15 días. En los 18 pacientes restantes que desarrollaron DNAemia de CMV no se detectó ADN de HHV-6 en plasma. Las DNAemias de HHV-6 y CMV se superpusieron en 11/21 pacientes y en los otros 10, la DNAemia de CMV se detectó tras el aclaramiento del HHV-6.

El nivel pico de la DNAemia de HHV-6 en los pacientes que posteriormente desarrollaron un episodio de infección activa por CMV no fue significativamente diferente al de aquellos que no lo desarrollaron. Al analizar la cinética de la DNAemia de CMV en pacientes con o sin episodio de DNAemia de HHV-6 previo, no encontramos diferencias significativas en términos de tiempo de la primera PCR de CMV positiva, día de inicio del tratamiento anticipado y duración del mismo, valores iniciales de AG y DNAemia, pico de carga viral, duración de la DNAemia, y número de episodios tratados anticipadamente o auto-limitados (Tabla 2). Además, no se obtuvo correlación significativa entre los niveles pico de las DNAemias de ambos virus.

Parámetro virológico	DNAemia de HHV-6		P-Valor*
	Sí (n=21)	No (n=18)	
Primera PCR de CMV positiva, día	29 (6-66)	36 (0-70)	.95
Carga inicial de CMV, copias/ml	41 (25-2300)	45 (25-7276)	.71
Pico de carga de CMV, copias/ml	1207 (25-212,320)	1302 (25-65,945)	.90
Duración de CMV			
DNAemia, días	29 (5-100)	24 (3-98)	.91
Inicio del tratamiento anticipado, días	36 (24-67)	36.5 (12-96)	.21
Valor inicial de antigenemia (células positivas/200.000 PBLs)	3 (1-210)	3 (1-50)	.46
Episodios auto-limitados†	5	6	.51
Duración del tratamiento anticipado	22 (14-60)	26.5 (14-90)	.71

Los datos están dados en medianas de números (rango).
 *Análisis realizado con el test U de Mann-Whitney.
 †Episodios de DNAemia de CMV resueltos sin tratamiento anticipado.

Tabla 2. Perfil de infección activa en pacientes con y sin episodio previo de DNAemia de HHV-6 (correspondiente a la Tabla 2, artículo 2).

Como complemento para determinar el efecto de la infección activa por HHV-6 sobre la replicación de CMV, estimamos la tasa de replicación (en términos de tiempo de replicación o doubling time (dt) en inglés) de CMV en pacientes con ó sin episodio previo de DNAemia de HHV-6. Se utilizaron 2 aproximaciones diferentes y los resultados fueron comparables. La mediana del dt de HHV-6 fue de 0.90 días, por lo que fue significativamente más corto que el dt de CMV (mediana de 1.72 días). La mediana de dt de CMV en pacientes con DNAemia previa de HHV-6 no difirió significativamente del obtenido en pacientes sin DNAemia de HHV-6 previa.

Investigamos si la ocurrencia de infección activa por HHV-6 presentó algún efecto medible sobre la recuperación de la respuesta de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de pp65 e IE-1 de CMV poco tiempo después del trasplante (mediana de 32 días). En general, los recuentos periféricos de ambos subtipos de células T en los pacientes con DNAemia de HHV-6 antes del día +30 no fueron significativamente diferentes de los recuentos en los pacientes sin DNAemia de HHV-6 previa (Tabla 3). Realizamos un análisis similar en 2 subgrupos de pacientes: uno incluía pacientes que no desarrollaron infección activa por CMV durante el periodo de estudio (n=23), de los cuales 6 presentaron DNAemia de HHV-6 y 17 no; y el otro incorporaba pacientes que desarrollaron una infección activa por CMV más allá del día +30 post-TPH (n=14), de los cuales 6 tuvieron un episodio previo de DNAemia de HHV-6 y 8 no. En los dos subgrupos encontramos niveles comparables de ambos subtipos de células T, independientemente de si se había producido ó no un episodio previo de DNAemia de HHV-6.

Grupo de pacientes	DNAemia de HHV-6	No DNAemia de HHV-6	P-valor*
Todos los pacientes†			
T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	0.30 (0-1.54)	0.11 (0-3.11)	.52
T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	0.32 (0-1.54)	0.18 (0-7)	.54
No DNAemia de CMV antes del día +100‡			
T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	0.92 (0-1.54)	0.42 (0-3.11)	.83
T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	0.78 (0-3.76)	0.59 (0-7)	.66
DNAemia de CMV pasado el día +30§			
T CD8 ⁺ IFN γ ⁺	0.26 (0-0.56)	0 (0-0.42)	.18
T CD4 ⁺ IFN γ ⁺	0.20 (0-1.02)	0.04 (0-0.32)	.34

Los datos son en células/ μ l de sangre, y vienen dados como medianas de números (rango).
 *Análisis realizado con el test U de Mann-Whitney.
 †Todos los pacientes (n=37) con o sin DNAemia de CMV.
 ‡Este grupo incluyó 23 pacientes, de los cuales 6 desarrollaron DNAemia de HHV-6 antes del día +30 post-transplante y 17 no.
 §Este grupo incluyó 14 pacientes, de los cuales 6 desarrollaron DNAemia de HHV-6 antes del día +30 post-trasplante y 8 no lo hicieron.

Tabla 3. Reconstitución precoz (día +30) de células T CD8⁺ y T CD4⁺ productoras de IFN γ en pacientes con ó sin DNAemia de HHV-6 (correspondiente a la Tabla 3, artículo 2).

También determinamos si la aparición de DNAemia de HHV-6 tuvo algún efecto sobre la magnitud de la respuesta inmunitaria específica de CMV inducida por la replicación de CMV. Se disponía de muestras de sangre tomadas una mediana de 63 días post-TPH de 14 pacientes que desarrollaron infección activa por CMV entre los días +30 y +60. Seis de estos pacientes presentaron un episodio de DNAemia de HHV-6 antes de la reactivación de CMV. Los niveles medianos de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ en estos pacientes no difirieron significativamente de los obtenidos en pacientes sin episodio previo de DNAemia de HHV-6.

La recepción de un injerto de un donante no emparentado o con incompatibilidad HLA, el empleo de SCU, el acondicionamiento mieloablatoivo y el uso de prednisona en la profilaxis de la EICH, se asociaron significativamente con la aparición de DNAemia de HHV-6 (análisis univariante). Otras covariables como edad, sexo, enfermedad de base, y

estado serológico para CMV del donante no se relacionaron con la DNAemia de HHV-6. En el análisis multivariante, el origen de las células madre y el trasplante de donante no emparentado ó con incompatibilidad HLA se asociaron independientemente con la DNAemia de HHV-6.

Los factores de riesgo asociados significativamente con la DNAemia de CMV en el análisis univariante fueron: la recepción de un injerto de un donante HLA-incompatible ó no emparentado, el uso de prednisona como profilaxis de la EICH y una DNAemia de HHV-6 previa. Si bien, en el análisis multivariante, en que la DNAemia de HHV-6 se introdujo como variable tiempo-dependiente, sólo la recepción de un injerto de un donante HLA-incompatible mantuvo la significación.

Analizamos si la DNAemia de HHV-6 tuvo algún efecto sobre el tiempo de prendimiento de neutrófilos y plaquetas. Todos los pacientes salvo uno habían logrado el prendimiento de neutrófilos el día +30, mientras que el 80% y el 92% de los pacientes lograron el prendimiento de plaquetas los días +30 y +50, respectivamente. Sólo se incluyeron en el análisis los pacientes que presentaron DNAemia de HHV-6 antes del día +30 (25/27 pacientes). La aparición de DNAemia de HHV-6 no tuvo ningún efecto significativo sobre estos parámetros.

También evaluamos el efecto potencial de las DNAemias de HHV-6 y CMV sobre el desarrollo de EICHa de grados II-IV el día +100 post-trasplante. Los dos eventos virológicos fueron considerados únicamente si precedieron la aparición del punto clínico final. Ni la DNAemia de HHV-6 ni la DNAemia de CMV se asociaron significativamente con el desarrollo posterior de EICHa de alto grado.

No se observaron eventos clínicos potencialmente asociados con la reactivación de HHV-6 en los receptores de alo-TPH de nuestra cohorte (disfunción del SNC, síndrome de neumonía idiopática ó erupción cutánea

no asociada a EICH). Además, intentamos determinar si la aparición de DNAemia de HHV-6, DNAemia de CMV, o ambas, tenía alguna influencia sobre la mortalidad por cualquier causa durante el periodo de estudio; pero el escaso número de eventos clínicos (n=11) excluyó la realización de un análisis estadístico significativo.

Artículo 3

Se incluyeron para el análisis 19 episodios (de 18 pacientes) de infección activa por CMV, que se produjeron una mediana de 56 días post-trasplante. Trece de los 19 episodios (en 12 pacientes) se resolvieron durante el periodo de estudio (Tabla 4).

Episodio (días PT)	DNAemia de CMV (copias/ml)			Respuesta celular T específica de CMV CD8 ⁺ IFN γ ⁺ /CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (células/ μ L)	
	Inicial	Pico	Duración (días)	Primera respuesta detectada (día)	Primera PCR negativa (día)
1 (232)	1125	1125	7	15.13/0.12 (7)	- ^a
2 (115)	800	800	3	2.09/1.61 (3)	-
3 (293)	2460	2460	7	15.20/5.20 (7)	-
4 (41)	890	890	7	14.01/1.90 (7)	-
5 (40)	1800	1800	6	1.31/0.43 (6)	-
6 (59)	560	1200	15	0.90/0.38 (15)	-
7 (14)	1100	3200	16	1.45/0.67 (16)	-
8 (30)	1100	6200	94	0.50/0.40 (21)	6.24/0.55 (94)
9 (26)	1980	1980	20	0.65/0.19 (7)	0.82/0.56 (20)
10 (53)	3600	4560	55	0.21/0.62 (21)	2.46/1.23 (55)
11 (63)	1270	3700	61	0.22/0.01 (7)	1.36/0.48 (61)
12 (27)	1200	3100	31	0.67/0.06 (5)	4.34/0.70 (31)
13 (65)	7200	15110	31	1.28/0.46 (9)	10.62/0.35 (31)

PT, post-trasplante.
El día en la columna de la primera respuesta celular T específica de CMV se refiere al primer día tras el inicio del tratamiento anticipado. Los episodios 2 y 3 se produjeron en el mismo paciente.
^a Primera respuesta detectada concomitante con la primera PCR negativa

Tabla 4. Datos virológicos e inmunológicos de los episodios de infección activa por CMV, cuya resolución se produjo durante el periodo de estudio (correspondiente a la Tabla II, artículo 3).

Los 6 episodios restantes (6 pacientes) permanecían activos al final del periodo de seguimiento, tras una mediana de 30 días del inicio del tratamiento anticipado (Tabla 5). Tres de estos 6 pacientes fallecieron durante el periodo de estudio (sepsis bacteriana en un paciente y EICH grave en los otros dos).

Episodio (día PT)	DNAemia de CMV (Copias/mL)		Respuesta celular T específica de CMV CD8 ⁺ IFN γ ⁺ / CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (células/ μ L)		Tratamiento
	Inicial	Pico (día)	1 ^a respuesta detectable (día)	Nivel del pico (día)	
1 (330)	2390	3790 (7)	0.96/0.19 (20)	- ^a	FOS/(val)GCV
2 (62)	2320	35,450 (12)	1.28/1.27 (8)	-	(val)GCV
3 (160)	1350	10,200 (30)	0.03/0.06 (7)	-	(val)GCV
4 (42)	5440	5500 (9)	0.09/0.46 (9)	-	FOS
5 (55)	5600	23,450 (19)	ND	ND	(val)GCV
6 (36)	720	1290 (23)	0.03/0.26 (0)	0.53/0.66 (8)	GCV

ND, No detectable; PT, Post-transplante.
 Los días en las columnas se refieren a días tras el inicio del tratamiento anticipado.
^aEl nivel del pico es la primera respuesta detectada.

Tabla 5. Datos virológicos e inmunológicos de los episodios de infección activa por CMV que permanecían activos al final del periodo de estudio (correspondiente a la Tabla III, artículo 3).

Evaluamos en primer lugar la respuesta celular T específica de CMV en el momento del inicio del tratamiento anticipado. Se dispuso de muestras de sangre para el análisis inmunológico en 14 episodios (9 desarrollados antes del día 100 post-trasplante). Se observaron respuestas indetectables de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ en 13/14 pacientes. En el episodio restante, que permanecía activo al final del periodo de seguimiento, se detectaron niveles bajos de ambas subpoblaciones de células T. Nueve de estos 14 episodios se resolvieron durante el periodo de estudio, con el tiempo de conversión de la DNAemia de CMV a negativa ampliamente

variable (3-94 días), mientras que en los 5 episodios restantes no se logró el control de la replicación de CMV. Estos datos indican que los niveles periféricos de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ en el momento del inicio del tratamiento anticipado no permitieron predecir el desenlace virológico del episodio.

En segundo lugar, investigamos la dinámica de las dos subpoblaciones celulares T y de la DNAemia de CMV durante los 19 episodios de infección activa por CMV tratados anticipadamente. En general, los recuentos periféricos de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ se correlacionaron inversamente con los niveles de DNAemia de CMV, aunque se observaron respuestas detectables de células T específicas de CMV en presencia de DNAemia de CMV en determinados momentos puntuales, tanto en episodios que no se resolvieron como en episodios que sí lo hicieron. Sin embargo, los niveles de T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ en presencia de DNAemia de CMV eran significativamente menores que dichos niveles en el momento del primer resultado negativo de PCR. Considerando el valor pico de células T CD8+IFN γ ⁺ (1.28 cél./ μ l) obtenido en presencia de DNAemia de CMV, se estableció en nuestra cohorte un valor umbral de 1.3 cél./ μ l como predictor del aclaramiento de la DNAemia de CMV (PCR negativa) con un valor predictivo positivo (VPP) del 100% y un VPN del 93%. Se obtuvo un cierto grado de solapamiento entre los valores de células T CD4+IFN γ ⁺ en presencia de DNAemia de CMV y en el momento de la primera PCR negativa. Por ello, el establecimiento de un valor umbral (1.3 cél./ μ l) por encima del valor pico (1.27 cél./ μ l) obtenido en presencia de DNAemia de CMV resultó en un VPN menor (75%). Por lo tanto, el número de células T CD8+IFN γ ⁺ fue un marcador más fiable para predecir el aclaramiento de la DNAemia de CMV en nuestra cohorte.

Se observaron tres patrones cinéticos de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ en relación con la DNAemia de CMV: (i) una expansión rápida

durante la primera semana tras el inicio del tratamiento anticipado (mediana, 7 días) concomitante con el aclaramiento de la DNAemia de CMV, que se produjo en 5 episodios (episodios 1-5 de la Tabla 4). Una expansión durante la tercera semana (días 15 y 16) fue observada en dos episodios adicionales (episodios 6 y 7 de la Tabla 4). En general, en estos episodios se obtuvo incrementos de 2.09 y de 0.67 células T CD8⁺IFN γ ⁺/ μ l y T CD4⁺IFN γ ⁺/ μ l de mediana sobre el nivel basal, respectivamente. Ninguno de estos pacientes estaba en tratamiento con corticosteroides durante el episodio de infección activa por CMV; (ii) una expansión precoz (mediana, 8 días) de una magnitud menor que la observada en los episodios aclarados rápidamente (incremento de 0.57 (P=0.02) y 0.29 (P=0.063) células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺/ μ l de mediana, respectivamente), acompañada de una resolución retardada de la DNAemia de CMV (31 días de mediana) concomitante con una expansión secundaria de ambas subpoblaciones de células T (incremento de 3.05 (P=0.001) y 0.42 (P=0.04) células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺/ μ l de mediana, respectivamente), que se produjo en 6 episodios (episodios 8-13 de la Tabla 4). Los dos episodios más prolongados sucedieron en pacientes en tratamiento con corticosteroides para EICH de grados III-IV, y la resolución coincidió con la disminución de la dosis de esteroides; (iii) una ausencia de expansión o una expansión inconsistente de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ (medianas, 0.06 y 0.22 cél./ μ l; P=0.001 y P=0.03, respectivamente, en relación a los incrementos de células T medidos en los episodios aclarados) acompañada de una DNAemia de CMV persistente, que todavía era detectable al final del periodo de seguimiento, que se observó en 6 episodios (Tabla 5). Tres de estos 6 episodios se desarrollaron en pacientes en tratamiento con corticosteroides por EICH grave. Se estudió la presencia de mutaciones conocidas que confieren resistencia a GCV ó FOS en las últimas muestras de plasma disponibles de los episodios no resueltos más prolongados pero no se encontró ninguna mutación en ninguna muestra.

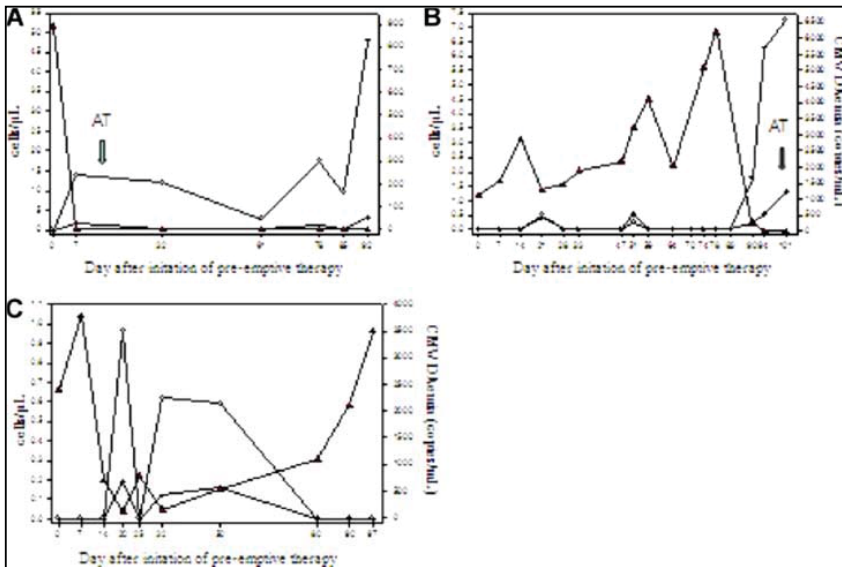


Figura 6. Modelos representativos de la cinética de células T CD8+IFN γ ⁺ (círculos) y T CD4+IFN γ ⁺ (rombos negros) específicas de pp65 e IE-1 de CMV, y DNAemia de CMV (triángulos) durante los episodios de infección activa por CMV. A: paciente que presenta una expansión precoz de células T específicas de CMV (especialmente de T CD8+IFN γ ⁺) concomitante con la resolución de la DNAemia de CMV. Se observaron valores fluctuantes de las dos subpoblaciones T tras la interrupción del tratamiento antiviral en ausencia de DNAemia de CMV. B: Paciente que presenta una expansión precoz de las dos subpoblaciones de células T funcionales con aclaramiento retrasado de la DNAemia de CMV junto con una expansión secundaria tardía de las células T específicas de CMV. Se observaron niveles fluctuantes de ambas subpoblaciones T antes de la expansión final que condujo a la resolución de la DNAemia de CMV. C: Paciente que no logró una expansión de células T funcionales específicas de CMV y que presentó una DNAemia de CMV persistente. Este paciente estuvo en tratamiento antiviral a lo largo de todo el periodo observacional. La flecha (AT) indica el momento en que se retiró el tratamiento antiviral (correspondiente a la Figura 1, artículo 3).

Ninguno de los 12 pacientes en los cuales el episodio de DNAemia de CMV se resolvió durante el periodo de estudio experimentó un episodio de recurrencia al menos durante el siguiente mes (sólo uno de estos pacientes recibió tratamiento de mantenimiento con valGCV tras el aclaramiento de la DNAemia de CMV). Los episodios 2 y 3 de la Tabla 4 se produjeron en el mismo paciente, si bien, el episodio recurrente ocurrió 6 meses tras la resolución del primero. Se disponía de muestras de sangre obtenidas en el momento de la retirada del tratamiento antiviral en 8 de los episodios; en los que se obtuvo una mediana de 2.8 células T CD8+IFN γ ⁺/μL

y de 0.38 células T CD4⁺IFN γ ⁺/ μ l. También se dispuso de muestras de seguimiento posteriores a la finalización del tratamiento antiviral en 4 episodios. Se observaron a lo largo de todo el tiempo niveles detectables aunque fluctuantes de ambas subpoblaciones celulares (mediana, 5.1 y 0.41 células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺/ μ l, respectivamente).

Se diagnosticó enteritis por CMV en tres pacientes en tratamiento corticosteroideo por EICH. En los tres casos, se observaron niveles indetectables de células T específicas de CMV en el momento de la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Resultó interesante que en un paciente (episodio 13 de la Tabla 4), el aclaramiento de la DNAemia de CMV y una mejoría en los síntomas clínicos se relacionaron con una expansión notable de células T CD8⁺IFN γ ⁺, que se produjo tras la disminución de la dosis de corticosteroides. Los dos pacientes restantes no consiguieron expandir la respuesta de células T específicas de CMV y presentaron DNAemia persistente. Ambos pacientes fallecieron durante el estudio.

Artículo 4

Durante el periodo de estudio, 89 (66.9%) de los 133 pacientes desarrollaron uno (n=74) ó más (n=15) episodios de DNAemia de CMV (en total, 106 episodios). Todos estos episodios fueron tratados de forma anticipada. El análisis univariante reveló una asociación significativa entre la recepción de injertos de donantes con incompatibilidad HLA o no emparentados y el desarrollo de DNAemia de CMV (Tabla 6).

Factor	Núm. de pacientes (%)		P-valor ^a
	DNAemia de CMV	No DNAemia de CMV	
Estado serológico de CMV			
D-	36 (78.2)	10 (21.8)	0.053
D+	53 (60.9)	34 (39.1)	
Tipo de donante			
Hermano	50 (57.4)	37 (42.6)	0.002
No emparentado	39 (84.7)	7 (15.3)	
Compatibilidad HLA			
Idéntica	62 (60.2)	41 (39.8)	0.024
No compatible	27 (90.0)	3 (10.0)	
Origen de las células madre			
Médula ósea	5 (62.5)	3 (37.5)	0.627
Sangre periférica	75 (65.8)	39 (34.2)	
Sangre de cordón	9 (81.8)	2 (18.2)	
Acondicionamiento			
Mieloablatoivo	41 (69.5)	18 (30.5)	0.585
No mieloablatoivo	48 (64.9)	26 (35.1)	
Profilaxis para EICH			
Contiene ATG			
Sí	11 (91.6)	1 (8.4)	0.103
No	78 (64.4)	43 (45.6)	
CsA+MTX	54 (58.0)	39 (42.0)	0.050
CsA+MMF	18 (81.8)	4 (19.2)	
EICH aguda^b			
Grados 0-I	43 (56.6)	33 (43.4)	0.093
Grados II-IV	26 (74.2)	9 (25.8)	

Abreviaturas: ATG: globulina antitímocítica; CsA: ciclosporina A; MTX: metotrexato; MMF: micofenolato de mofetilo

^a Las comparaciones de frecuencias se llevaron a cabo con el test de χ^2 (test exacto de Fisher). Un P-valor de ≤ 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

^b Sólo se consideraron para el análisis los casos en que se produjo EICH aguda antes de la detección de DNAemia de CMV.

Tabla 6. Efecto de los factores pretrasplante y clínicos sobre la incidencia de DNAemia de CMV durante el primer año post-trasplante (correspondiente a la Tabla 2, artículo 4).

Se produjo enfermedad orgánica por CMV en 10 pacientes (7.5%; dos pacientes presentaron neumonitis, siete enfermedad gastrointestinal y uno retinitis) y su aparición no se asoció significativamente con ninguno de los factores pre-trasplante o clínicos analizados.

Se dispuso para análisis inmunológico de muestras de sangre de 116 pacientes obtenidas sobre el día +30. De estos pacientes, 23 presentaron un episodio de DNAemia de CMV antes o en el momento de la toma de muestra y fueron excluidos del análisis. De los 97 pacientes restantes, 27 desarrollaron DNAemia de CMV después del momento de la toma de muestra para monitorización inmunológica. Los niveles periféricos de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV fueron significativamente menores en los pacientes que posteriormente desarrollaron DNAemia de CMV que en los que no lo hicieron.

Ningún paciente con niveles de células T CD8⁺IFN γ ⁺ >1.0 cél./ μ l (n=24), ó T CD4⁺IFN γ ⁺ >1.2 cél./ μ l (n=17), o de ambos (n=14) en el día +30, desarrolló DNAemia de CMV durante el periodo de estudio (VPP del 100% para ambos marcadores de células T). Los VPN para el marcador de células T CD8⁺IFN γ ⁺, para el marcador de células T CD4⁺IFN γ ⁺, para un sólo marcador o para la combinación de ambos fueron 68.1, 61.8, 71.2 y 59.4%, respectivamente. Por lo tanto, los pacientes con estos niveles en al menos una de las dos subpoblaciones celulares T en el día +30 permanecieron protegidos durante todo el periodo de estudio.

Se dispuso de datos inmunológicos en los días +60 y +90 de 22 y 40 pacientes, respectivamente, que habían desarrollado y aclarado un episodio de DNAemia de CMV. Ningún paciente con niveles de células T CD8⁺IFN γ ⁺ ó T CD4⁺IFN γ ⁺ por encima de los valores umbral protectores establecidos previamente, presentó un episodio recurrente de DNAemia de CMV, que sólo se produjeron (n=9) con valores para ambas subpoblaciones menores a los puntos de corte.

En general, el porcentaje de pacientes presumiblemente protegidos de la DNAemia de CMV (por alcanzar niveles suficientes de células T) en los días +30, +90 y +365 fueron 27.9% (26 de 93), 67% (52 de 77) y 89.1% (49 de 55), respectivamente. Entre los pacientes sin DNAemia previa, los niveles periféricos de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ en el día +30 fueron significativamente mayores en pacientes que habían recibido trasplantes de donantes seropositivos para CMV ó donantes emparentados, en comparación con receptores de trasplantes de donantes seronegativos para CMV ó no emparentados. El uso de ATG tuvo un impacto significativo en la magnitud de las respuestas T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ del día +30, al igual que sucedió con el origen de las células madre: los pacientes que recibieron trasplantes de SCU presentaron niveles menores significativamente de ambos subtipos celulares que aquellos que recibieron trasplantes de MO o SP. Los pacientes receptores de trasplante de donantes HLA-idénticos, con regímenes de acondicionamiento no mieloablativos o tratados con MTX mostraron niveles más altos (no estadísticamente significativos) de ambos subtipos de células T que los pacientes receptores de trasplantes de donantes HLA-incompatibles, con regímenes de acondicionamiento mieloablativos o tratados con MMF.

Se observaron tendencias no significativas a presentar respuestas celulares T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ más frecuentemente dentro del rango protector en los pacientes receptores de trasplantes de donantes positivos para CMV, emparentados ó HLA-idénticos, con injertos de MO ó células madre de SP y en los pacientes con régimen de acondicionamiento no mieloablativo o no tratados con MMF (Tabla 3). En el día +90, se observaron las mismas tendencias tanto para la mediana del número de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ específicas de CMV como para la frecuencia de pacientes que habían alcanzado niveles protectores de dichas células (Tabla 3). En general, las diferencias entre grupos apareados fue menos marcada

con respecto a las obtenidas en el día +30, aunque el efecto de la identidad HLA era discernible claramente, al igual que sucedió en el día +60.

La aparición de EICH aguda de grados II-IV (mediana de 40 días post-TPH) no tuvo una influencia significativa ni en el grado de reconstitución de la respuesta de células T productoras de IFN γ específicas de CMV ni en la frecuencia de pacientes que adquirieron niveles protectores de ambas subpoblaciones celular en los días +90 y +365. El efecto de la utilización de ATG en estos momentos temporales no pudo ser evaluado por el bajo número de muestras disponibles para análisis.

El efecto de la DNAemia de CMV sobre la reconstitución de la respuesta de células T CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} y T CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} específicas de CMV fue investigado. Los niveles de ambos tipos celulares en pacientes que presentaron DNAemia de CMV no fueron significativamente diferentes de aquellos que no tuvieron DNAemia en ningún momento. De hecho, los niveles de células T por encima de los puntos de corte protectores fueron alcanzados por un número comparable de pacientes en el día +90 (Tabla 7) ó +365 independientemente de si sufrieron un episodio previo de DNAemia de CMV. Ni la duración ni el valor pico de la DNAemia se correlacionó significativamente con los niveles de ambos tipos celulares en ningún momento.

Variable	Nº de pacientes con niveles protectores de T CD8 ⁺ IFN γ ^{aa} /Nº total de pacientes (P-valor ^b) en el día		Nº de pacientes con niveles protectores de T CD4 ⁺ IFN γ ^{cc} /Nº total de pacientes (P-valor ^b) en el día	
	+30	+90	+30	+90
Estado serológico de CMV				
D-	3/25	16/27	2/25	9/27
D+	21/68 (0.10)	33/50 (0.62)	15/68 (0.14)	18/50 (1.0)
Tipo de donante				
Hermano	21/69	38/56	15/69	20/56
No emparentado	3/24 (0.10)	11/21 (0.28)	2/24 (0.22)	7/21 (1.0)
Compatibilidad HLA				
Idéntica	21/78	46/66	16/78	24/66
No compatible	3/15 (0.75)	3/11 (0.01)	1/15 (0.29)	3/11 (0.73)
Origen de las células madre				
Médula ósea	2/7	4/5	2/7	2/5
Sangre periférica	22/80	44/67	15/80	24/67
Sangre de cordón	0/6 (0.45)	1/5 (0.10)	0/6 (0.43)	1/5 (0.54)
Acondicionamiento				
Mieloablativo	8/40	17/35	6/40	10/35
No mieloablativo	16/53 (0.34)	31/42 (0.09)	11/53 (1.0)	17/42 (0.34)
Profilaxis para EICH				
Contiene ATG				
Sí	0/8	NA	0/8	NA
No	24/85 (0.10)	NA	17/85 (0.34)	NA
CSA+MTX	21/69	40/61	15/69	23/61
CSA+MMF	3/15 (0.53)	6/9 (1.0)	2/15 (0.72)	2/9 (0.47)
EICH aguda ^b				
Grados 0-I	NA	33/52	NA	21/52
Grados II-IV	NA	11/18 (1.0)	NA	4/18 (0.25)
DNAemia de CMV				
Sí	NA	24/40	NA	10/40
No	NA	25/37 (0.63)	NA	17/37 (0.06)

NA: no analizado.

^a>1.0 células/ μ L.

^bLa comparación de frecuencias fue llevada a cabo con el test de χ^2 (test exacto de Fisher). Un P-valor ≤ 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

^c>1.2 cell/mL

^dEICH aguda ocurrida antes del día de la monitorización inmunológica.

Tabla 7. Efecto de los factores pretrasplante, clínicos y virológicos sobre la frecuencia de adquisición de niveles de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ presumiblemente protectores frente a la DNAemia de CMV en los días +30 y +90 post-trasplante (correspondiente a la Tabla 3, artículo 4).

No obstante, se observaron incrementos netos mayores en los niveles medianos de ambos subtipos de células T en los días +60 y +90 (a partir de los niveles de base del día +30) en pacientes que presentaron una DNAemia de CMV previa que en los que no (Tabla 8).

Subtipo de célula T (día) ^a	DNAemia CMV		P-valor ^b
	Sí	No	
CD8 ⁺ IFN γ ⁺ (+60)	1.32 (0–20.17)	1.11 (0–74.9)	0.977
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (+60)	0.46 (0–3.46)	0.62 (0–46.8)	0.461
CD8 ⁺ IFN γ ⁺ (+90)	2.08 (0–166.1)	1.93 (0–82.8)	0.656
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (+90)	0.51 (0–11.20)	0.91 (0–9.89)	0.080
CD8 ⁺ IFN γ ⁺ (+365)	3.71 (0–130.0)	6.72 (0–103.5)	0.385
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (+365)	1.11 (0–12.09)	2.82 (0–16.9)	0.158

^a En general, se analizaron 18, 40 y 30 muestras tomadas a los 65 días de mediana (rango, 59–73 días), 91 días de mediana (rango, 80–119 días) y 360 días de mediana (rango, 304–405 días), respectivamente, de pacientes con un episodio previo de DNAemia de CMV, y 34, 37 y 25 muestras obtenidas a los 62.5 días de mediana (rango, 51–73 días), 93 días de mediana (rango, 84–102 días) y 360 días de mediana (rango, 343–374 días) respectivamente, de pacientes sin episodio previo de DNAemia de CMV.

^b Las diferencias entre las medianas se compararon con el test U de Mann-Whitney. Un P-valor ≤ 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Se muestran las medianas de los números de células/ μ l (rango).

Tabla 8. Niveles periféricos de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de pp65 e IE-1 de CMV los días +60, +90 y +365 post-trasplante en pacientes alo-TPH con o sin episodio previo de DNAemia de CMV (correspondiente a la Tabla 4, artículo 4).

Artículo 5

Un total de 44 pacientes experimentaron 1 o más episodios (n=59) de DNAemia de CMV en el transcurso de los 6 meses post-trasplante. Todos los episodios fueron tratados anticipadamente con antivirales. La DNAemia de CMV ocurrió con mayor frecuencia en los pacientes D-/R+ que en los D+/R+, tanto en los primeros 100 días como en los 6 meses post-trasplante, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 9).

Se observó una tendencia hacia la aparición más temprana de la DNAemia de CMV en los receptores D-/R+. La duración de la DNAemia de CMV fue más larga en los receptores D-/R+ que en los D+/R+. Las cargas inicial y pico de la DNAemia de CMV del primer episodio de infección activa por CMV durante el periodo de estudio (considerando todos los episodios) fueron mayores en los pacientes D-/R+ que en los pacientes D+/R+. Las mismas diferencias permanecieron cuando los pacientes fueron agrupados en función a la estrategia de monitorización y al tipo de PCR utilizada (datos no mostrados). Los episodios recurrentes de DNAemia de CMV y la enfermedad orgánica por CMV ocurrieron más frecuentemente en los pacientes D-/R+ que en los D+/R+.

Parámetro	Estado serológico del donante (D)		p ^a
	D- (n=21)	D+ (n=59)	
Edad, años	48 (19-70)	45 (16-70)	.908
Sexo, n ^o (%) de pacientes			
Varón	17 (80.0)	37 (62.7)	.177
Mujer	4 (20.0)	22 (37.3)	.369
Enfermedad, n ^o de pacientes			
Anemia aplásica	0	2	
Leucemia linfática aguda	5	11	
Leucemia mieloide aguda	7	15	
Leucemia linfática crónica	1	3	
Leucemia mieloide crónica	1	4	
Enfermedad de Hodgkin	1	6	
Síndrome mielodisplásico	1	4	
Mieloma múltiple	3	5	
Linfoma no-Hodgkin	2	9	
Origen de las células madre, n ^o (%) de pacientes			
Sangre periférica	20 (95.2)	56 (94.9)	
Médula ósea	1 (4.8)	3 (5.1)	>.999
Régimen de acondicionamiento, n ^o (%) de pacientes			
Mieloablativo	10 (47.6)	22 (37.2)	
No mioablativo	11 (52.4)	37 (62.8)	.131
Enfermedad del injerto contra el huésped, n ^o (%) de pacientes ^b			
Estado 0-1	12 (63.2)	39 (76.5)	
Estado 2-4	7 (36.8)	12 (23.5)	.365
DNAemia de CMV temprana, n ^o (%) de pacientes ^c	11 (52.3)	28 (47.4)	.801
DNAemia de CMV acumulada, n ^o (%) de pacientes ^d	13 (68.4)	31 (54.3)	.422
Día del primer resultado positivo de PCR	31 (7-187)	42 (2-185)	.260
Pico de DNAemia de CMV en el primer episodio, copias/ml	2890 (25-12900)	1254 (33-17047)	.817
Pico de DNAemia de CMV en todos los episodios, copias/ml	2890 (25-12900)	1300 (33-17047)	.938
DNAemia de CMV inicial, copias/ml	500 (25-4000)	250 (25-3800)	.327
Duración ^e del primer episodio de DNAemia de CMV, d	19 (11-100)	15 (5-76)	.148
Duración de todos los episodios de DNAemia de CMV, d	35 (14-100)	17 (5-97)	.013
N ^o de episodios de DNAemia, n ^o (%) de pacientes			
1	6 (46.1)	24 (77.4)	
2	6 (46.1)	7 (22.6)	
3	1 (7.8)	0 (0.0)	.035
Enfermedad orgánica por CMV, n ^o (%) de pacientes ^f	3 (14.2)	2 (3.3)	.110

NOTA: los datos son medianas o medianas (rango), si no se indica otra cosa.

^a La comparación de frecuencias se realizó por medio del test de χ^2 (test exacto de Fisher). Las diferencias entre las medianas fueron comparadas con el test U de Mann-Whitney (para 2 variables independientes) o el test de Kruskal-Wallis (k variables independientes). Los datos fueron calculados con ayuda del paquete estadístico SPSS (versión 17.0). Un valor de P<.05 fue considerado estadísticamente significativo.

^b Sólo los casos en que la EICH ocurrió antes de la detección de DNAemia de CMV se consideraron en el análisis.

^c Episodios desarrollados en los primeros 6 meses tras el trasplante.

^d Episodios desarrollados en los primeros 6 meses tras el trasplante en pacientes que completaron el periodo de seguimiento (4 pacientes, 2 D-/R+ y 2 D+/R+, que no experimentaron DNAemia de CMV temprana, murieron antes del final del periodo de seguimiento).

^e Tiempo transcurrido entre el primer resultado positivo y el primer resultado negativo de la PCR (para cada episodio).

^f Cuatro casos de enteritis y uno de neumonitis.

Tabla 9. Datos demográficos y clínicos de receptores de alo-TPH y características virológicas de los episodios de DNAemia de CMV en los grupos de estudio (correspondiente a la Tabla 1, artículo 5).

9. DISCUSIÓN CONJUNTA

9. DISCUSIÓN CONJUNTA

En el primer artículo (**artículo 1**) de esta tesis doctoral se estudió los niveles de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN γ específicas de CMV en una serie de episodios de infección activa por CMV tratados anticipadamente con GCV (GCV) en una cohorte de pacientes receptores de alo-TPH. La información obtenida en este trabajo se puede resumir en los siguientes puntos:

- Más del 50% de los episodios de infección activa por CMV tratados anticipadamente con GCV presentaron niveles decrecientes tanto de AG como de DNAemia de CMV tras el inicio del tratamiento (episodios tipo A); mientras que en un 40% aproximadamente ambos parámetros sufrieron un incremento (episodios tipo B). La disociación de los niveles de AG y DNAemia fue poco frecuente (episodios tipo C).
- Los episodios tipo B presentaron mayores niveles pico de AG y DNAemia y mayor duración que los de tipo A, si bien los valores iniciales de ambos parámetros fueron similares para los dos tipos de episodios, por lo que en base al primer resultado positivo de un episodio no se puede predecir la cinética de la carga viral de CMV del mismo.
- Igualmente, los episodios recurrentes de infección activa por CMV sucedieron con frecuencias similares independientemente de si el episodio inicial era tipo A o B; por lo tanto, la ocurrencia de un episodio inicial dado no permite tampoco predecir la aparición posterior de un episodio recurrente.
- Los episodios tipo B se relacionaron significativamente con el tratamiento con corticosteroides administrado para la EICH.

- Los niveles periféricos de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de CMV antes del inicio del tratamiento anticipado fueron prácticamente indetectables y similares, independientemente del tipo de episodio de infección activa por CMV que siguió después (A o B).
- En los episodios tipo A se observó una expansión significativa de 12 y 6.8 veces de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de CMV, respectivamente, a los 16.5 días del inicio del tratamiento antiviral. Sin embargo, en los episodios tipo B, los niveles de ambas subpoblaciones celulares T a los 13.5 días del inicio del tratamiento con GCV permanecieron comparables a los del momento pretratamiento. En algunos casos, se detectó una modesta expansión de una o ambas subpoblaciones.
- La monitorización inmunitaria de algunos episodios tipo B permitió determinar que el control de la replicación del CMV se relacionó con la expansión de las dos subpoblaciones de células T; y que, por el contrario, un fallo en dicha expansión se observó en los episodios persistentes.
- En nuestra cohorte, la persistencia de los episodios de infección activa por CMV no se correlacionó con la aparición de mutantes resistentes al tratamiento, puesto que únicamente se detectaron cepas mutantes en dos casos.

La ocurrencia de la infección activa por CMV en el receptor de alo-TPH requiere de una monitorización de los niveles de carga vírica por medio de la AG y/o la DNAemia, cuya cinética presenta una serie de eventos que todavía no han sido del todo esclarecidos y que pueden influir en el manejo de la infección. En nuestra cohorte el inicio del tratamiento anticipado con GCV da lugar principalmente a dos tipos de cinéticas de la carga viral de CMV: aquella en la que los niveles de AG y DNAemia disminuyen, que sería la esperable lógicamente al inicio de un tratamiento activo frente al virus, y

aquella en la que ambos parámetros aumentan, que resulta paradójica, si bien este fenómeno ha sido ya descrito en otros trabajos con frecuencias no desdeñables y comparables a las nuestras [Nichols *et al.*, 2001; Boeckh, 2005; Gerna *et al.*, 2005]. En el segundo estudio [Gerna *et al.*, 2005], no obstante, la aparición de un tercer tipo de cinética, correspondiente a la disociación AG – DNAemia, aumentando la primera al tiempo que disminuye la segunda, presenta una frecuencia mayor a la que encontramos nosotros (31.4% frente a 2.9%). La explicación de esta diferencia es complicada, puesto que es poco probable que sea debida a las distintas características clínicas ó demográficas de ambos estudios, o al diferente tipo de muestra empleado (sangre entera frente a plasma).

Al igual que en los trabajos publicados previamente [Nichols *et al.*, 2001; Gerna *et al.*, 2005], la aparición de episodios en los que AG y DNAemia aumentan simultáneamente tras iniciar el tratamiento con GCV se asocia significativamente con el tratamiento inmunosupresor con corticosteroides empleado en el tratamiento de la EICH. Sin embargo, hemos demostrado en nuestro estudio que los valores de AG / DNAemia al inicio de los episodios de infección activa por CMV no permiten predecir la cinética de dicho episodio tras el inicio del tratamiento anticipado. Asimismo, nuestros datos muestran, como un estudio previo [Gerna *et al.*, 2005], que los episodios recurrentes de infección por CMV presentan frecuencias comparables independientemente del tipo de episodio que lo precede.

El incremento de los niveles de AG y DNAemia durante el tratamiento anticipado con GCV se ha relacionado con un déficit en la respuesta inmunitaria celular T específica del CMV, si bien dicha hipótesis no ha sido probada hasta el momento. En un estudio previo, definimos unos niveles de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IFN γ específicas de pp65 e IE-1 de CMV que conferirían protección frente al desarrollo de viremia de CMV (>1 y >1.2 células/ μ l para T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺,

respectivamente) [Solano *et al.*, 2008]. En el presente estudio, analizamos los niveles periféricos de ambas subpoblaciones de células T antes y después del inicio del tratamiento anticipado de algunos de los episodios correspondientes a los dos modelos cinéticos comentados previamente. Nuestros datos indican que una expansión temprana de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ en respuesta a la replicación viral se asoció con la disminución de los niveles de AG y DNAemia durante el tratamiento con GCV. El incremento se detectó en este caso 16.5 días tras el inicio del tratamiento, pero seguramente se hubiera podido detectar antes si se hubiera realizado el ensayo con igual frecuencia que la determinación de la carga viral de CMV. Por el contrario, la falta de una expansión precoz en ambas subpoblaciones celulares T se asoció con la aparición de episodios con aumento de los niveles de AG y DNAemia durante el tratamiento. En dichos episodios, la expansión de éstas células T se relacionó con el control de la replicación viral, mientras que la persistencia de AG y DNAemia (en dos episodios) sucedió en relación a un fracaso de dicha respuesta celular.

Se produjo una infección recurrente en 6 (2 con descenso y 4 con aumento simultáneo de AG y DNAemia) de 24 episodios para los cuales disponíamos de datos de respuesta inmunológica celular T. Los niveles post-tratamiento antiviral de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ en los 6 episodios se encontraban por debajo de los niveles protectores definidos por nuestro grupo previamente. Probablemente el número de células funcionales específicas de CMV era suficiente para controlar la replicación del virus en presencia del tratamiento antiviral pero insuficiente para proteger de una reactivación posterior en ausencia del mismo.

La variación idiosincrásica en la farmacocinética del fármaco antiviral así como la aparición de resistencia al mismo también podrían explicar el incremento de los niveles de carga viral observados. No obstante, se ha demostrado que la ocurrencia de cepas mutantes al GCV es un evento

excepcional, al menos en pacientes que no han recibido tratamiento previo [Nichols *et al.*, 2001; Gerna *et al.*, 2005; Gilbert y Boivin, 2005], hecho que también sucede en nuestra cohorte. Únicamente detectamos mutantes resistentes al GCV en dos pacientes tras recibir tratamiento antiviral durante un largo periodo y en ambos pacientes se detectó que los niveles de células T específicas de CMV no aumentaron sustancialmente para alcanzar niveles protectores.

Se ha mostrado previamente que las intervenciones terapéuticas para el control de la infección activa por CMV basadas en la monitorización de la respuesta inmunológica celular T específica del CMV permiten determinar mejor qué pacientes requieren tratamiento antiviral [Avetisyan *et al.*, 2007], si bien la validación clínica de esta estrategia requiere de un mayor número de estudios. Al igual que el estudio anterior, los datos obtenidos en el artículo 1 de la presente tesis doctoral sugieren que la frecuente monitorización de los niveles de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ específicas de CMV puede ayudar a la determinación de la carga viral de CMV rutinaria en la toma de decisiones terapéuticas óptimas.

Dada la conclusión del artículo 1 de esta tesis doctoral, y con el fin de diseñar una estrategia terapéutica de la infección activa por CMV basada en la monitorización inmunológica de los pacientes receptores de alo-TPH, decidimos que para ello era necesario caracterizar la cinética de las células T funcionales específicas de CMV durante los episodios de infección activa por CMV. Así, realizamos el estudio presentado en el artículo 3 de esta tesis doctoral, en el que analizamos tanto virológica como inmunológicamente 19 episodios de infección activa por CMV tratados anticipadamente, ocurridos en 18 pacientes receptores de alo-TPH. En este caso, y a diferencia del artículo 1, la respuesta celular T específica de CMV fue determinada con una frecuencia de una o dos veces por semana durante el episodio de infección

activa. De los resultados obtenidos en el **artículo 3** podemos concluir lo expuesto a continuación:

- Los recuentos periféricos de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de CMV se correlacionaron inversamente con los niveles de DNAemia de CMV durante los episodios de infección activa por CMV. Esto se había mostrado previamente en otros estudios [Aubert *et al.*, 2001; Widmann *et al.*, 2008]. En otro trabajo [Avetisyan *et al.*, 2006], los pacientes con niveles detectables de células T CD3+IFN γ + a las 4 semanas post-trasplante presentaron picos de carga viral menores comparados con pacientes sin respuesta detectable. Y además, el grado de disminución de las células T específicas de CMV tras el trasplante también se ha relacionado con el desarrollo de viremia de CMV [Eid *et al.*, 2009]. En nuestro estudio, los valores de ambas subpoblaciones celulares T funcionales fueron significativamente menores en presencia de DNAemia de CMV que en el momento de la primera PCR negativa. Establecimos un punto de corte de 1.3 células/ μ l para ambas subpoblaciones como valor predictivo del aclaramiento de la DNAemia de CMV, si bien resultó ser un mejor marcador el recuento de células T CD8+IFN γ +.
- El control de la replicación de CMV durante el tratamiento antiviral depende de una expansión robusta y mantenida de células T CD8+IFN γ +, y en menor medida de células T CD4+IFN γ +, como ya habíamos descrito previamente [Solano *et al.*, 2008]. En 5 episodios se detectó una expansión notable de ambas subpoblaciones celulares T junto al aclaramiento de la DNAemia tras una semana del inicio del tratamiento, aunque en general, la expansión de células T que controló la replicación de CMV fue observada a los 15 días. De forma similar, un estudio previo determinó que el nivel pico de células T CD8+ funcionales específicas de CMV ocurría 20 días tras la reactivación del virus [Hakki *et al.*, 2003]. Por

el contrario, un fallo en la expansión de ambas poblaciones celulares T funcionales se correlacionó con DNAemia de CMV persistente pese al tratamiento antiviral y teniendo en cuenta que no se detectó la aparición de cepas resistentes al mismo (en los dos episodios más largos). Tres de los 6 episodios que permanecieron activos hasta el final del periodo de estudio ocurrieron en pacientes en tratamiento corticosteroideo para EICH, respaldando la idea de que los corticosteroides empeoran la reconstitución de la respuesta celular T específica de CMV de una forma dosis-dependiente [Hakki *et al.*, 2003; Gratama *et al.*, 2008].

- Una marcada expansión de ambas subpoblaciones T específicas de CMV así como el mantenimiento de algunas de estas células en SP tras el aclaramiento de la DNAemia y de la retirada del tratamiento previene de la aparición de episodios recurrentes de infección activa por CMV, al menos durante el mes siguiente, como exponen también otros autores [Gratama *et al.*, 2008; Lilleri *et al.*, 2008; Moins-Teisserenc *et al.*, 2008]. En nuestro estudio, tres pacientes desarrollaron enteritis por CMV; de acuerdo con un trabajo previo [Avetisyan *et al.*, 2006], todos los casos de enfermedad orgánica por CMV ocurrieron en presencia de niveles indetectables de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ +. Uno de los tres pacientes se recuperó de la enfermedad y la mejoría clínica coincidió con el aclaramiento de la DNAemia de CMV y la expansión robusta de estas subpoblaciones celulares T funcionales específicas de CMV.

Nuestros datos tienen una serie de implicaciones en el manejo terapéutico de los episodios de infección activa por CMV en los pacientes receptores de alo-TPH:

- Se ha descrito una estrategia de aplazamiento del tratamiento antiviral en base a la detección de una respuesta inmunitaria específica de CMV en el momento de la detección de la DNAemia en una serie de pacientes con infección activa tardía por CMV, que resultó ser segura para los

pacientes no tratados [Avetisyan et al., 2007]. Sin embargo, en nuestra cohorte la aplicación de dicha estrategia resulta imposible, al no poderse estratificar a los pacientes en función de la respuesta inmunitaria T funcional específica de CMV antes del inicio del tratamiento anticipado, puesto que todos salvo uno presentaron niveles indetectables. Además, el hecho de presentar niveles indetectables de células T específicas de CMV no se relacionó con el desenlace del episodio de infección activa por CMV. La diferencia más significativa entre ambos estudios es que en nuestro caso la mayoría de episodios de infección activa por CMV fueron tempranos y en su caso se trataba únicamente de episodios tardíos post-trasplante.

- Una estrategia potencial basada en la monitorización inmunológica de los pacientes podría ser la interrupción temprana (o la reducción de la dosis) del tratamiento anticipado en presencia de una expansión significativa de células T específicas de CMV. En base a nuestros datos, podríamos sugerir como punto para la retirada del tratamiento antiviral la obtención de recuentos de células T CD8+IFN γ + >1.3 células/ μ l.
- Los episodios recurrentes de infección activa por CMV aparecen con una frecuencia bastante elevada tras la administración de tratamientos anticipados antivirales de corta duración [Gimeno et al., 2008]. Como hemos demostrado en el artículo 1 de la presente tesis doctoral, su aparición se relaciona con niveles periféricos bajos de células T funcionales específicas de CMV después de la resolución del episodio anterior. Los datos obtenidos en el presente artículo corroboran este hallazgo. La obtención de recuentos por encima de los puntos de corte mencionados en el momento de la retirada del tratamiento antiviral se relacionó con la prevención de episodios recurrentes. Por ello, se propone que en base a este hecho, se debería administrar tratamiento de mantenimiento tras el aclaramiento de la DNAemia de CMV si al final del

tratamiento antiviral no se han alcanzado niveles protectores de células T funcionales específicas de CMV.

- Según los datos obtenidos en este artículo, la ausencia de una respuesta celular T específica de CMV se relaciona con la persistencia de la DNAemia de CMV, en ausencia de resistencia al tratamiento. En este sentido, sería razonable plantear el empleo como abordaje terapéutico de la transferencia adoptiva de células T funcionales específicas de CMV propuesto por algunos autores [Einsele et al., 2008], en lugar del cambio de tratamiento antiviral en aquellos pacientes que tras 4 semanas de tratamiento no presentan respuesta frente al CMV (tiempo en el que se produjo la expansión celular que controló la replicación viral en la mayoría de los episodios aclarados de nuestra cohorte).

Por lo tanto, como resumen del artículo 3 de esta tesis doctoral, se puede decir que la monitorización inmunológica rutinaria durante los episodios de DNAemia de CMV es útil para el manejo terapéutico de la infección activa por CMV en los receptores de alo-TPH.

Con el fin de validar la monitorización rutinaria de los niveles de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV, analizamos un conjunto de pacientes mayor en el **artículo 4** incluido en esta tesis. Además, investigamos los efectos de los diferentes factores pre-trasplante, clínicos y virológicos sobre la tasa y magnitud de la reconstitución a corto y largo plazo de ambas subpoblaciones celulares T específicas de CMV.

El análisis de los datos obtenidos en el artículo 4, nos permite confirmar la validez de los puntos de corte de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV (>1.0 y >1.2 células/ μ l, respectivamente) obtenidos en el estudio piloto previo [Solano *et al.*, 2008], por encima de los cuales los pacientes están protegidos de la DNAemia de CMV en los primeros

tres meses post-trasplante. Estos puntos de corte se asemejan mucho a los que previamente han sido determinados por otros [Hebart *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2005; Lilleri *et al.*, 2008; Moins-Teisserenc *et al.*, 2008; Pourgheysari *et al.*, 2008] para diferentes tipos de células T funcionales, como valores que proporcionan protección frente al desarrollo de DNAemia o AG de CMV. Sin embargo, ambos marcadores en nuestra cohorte no fueron suficientemente buenos en la predicción de la ocurrencia de DNAemia de CMV, puesto que una fracción relevante de los pacientes con valores indetectables o por debajo de los puntos de corte de ambas subpoblaciones celulares no presentó DNAemia de CMV. Esto podría ser debido a que los niveles protectores de dichas células varían entre los diferentes pacientes. El estudio de otros marcadores de funcionalidad celular o de otro tipo de células podría mejorar estos datos, como sugieren otros autores [Foster *et al.*, 2002; Sylwester *et al.*, 2005; Lacey *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008; Pourgheysari *et al.*, 2008; Barron *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Makedonas *et al.*, 2010]. Además, cabe resaltar que el marcador T CD8⁺IFN γ ⁺ funcionó mejor en nuestro caso que el T CD4⁺IFN γ ⁺, probablemente debido al tipo de método analítico empleado.

En cuanto al análisis de los factores con posible influencia sobre la reconstitución inmunitaria celular T específica de CMV, podemos comentar lo siguiente:

- La ocurrencia de DNAemia de CMV previa no presentó influencia sobre la reconstitución temprana ni tardía de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV. Ni la duración (y por tanto la dosis acumulativa recibida de GCV) ni el nivel pico de DNAemia de CMV de un episodio de infección activa presentaron correlación con la reconstitución inmunitaria posterior. Este hallazgo contradice resultados previos que indicaban que la administración profiláctica de GCV empeoraba la reconstitución celular T específica de CMV [Li *et al.*,

1994]; pero coinciden con trabajos más recientes que indican que la recuperación inmunitaria celular T específica de CMV ocurre independientemente de una infección activa por CMV [Hakki *et al.*, 2003; Gallez-Hawkins *et al.*, 2005]. No obstante, la DNAemia de CMV pareció tener un efecto estimulador sobre la cinética de reconstitución de ambas subpoblaciones celulares T.

- Los receptores de trasplante de donante seronegativo para CMV, no emparentado o con incompatibilidad HLA presentaron respuestas peores de células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de CMV en el día +30, en comparación con los receptores de donante seropositivo para CMV, hermano o HLA-idéntico, que en general presentaron mayor tendencia a adquirir niveles protectores durante todo el periodo de estudio. A medida que aumentaba el tiempo post-trasplante, tanto la magnitud de la respuesta como la frecuencia de pacientes con niveles protectores se igualaron entre ambos grupos poblacionales, si bien el efecto de la identidad del HLA siguió siendo constatable. Nuestros datos avalan estudios previos que sugieren que el estado serológico del donante influye sobre la velocidad y magnitud de la reconstitución de células T específicas de CMV [Li *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2005; Avetisyan *et al.*, 2006; Ganepola *et al.*, 2007; Pourgheysari *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009]. Igualmente, nuestros datos coinciden con resultados publicados previamente que indican que la reconstitución celular T general y específica de CMV sufre un retraso notable en receptores de trasplante de donantes no emparentados o con incompatibilidad HLA [Hakki *et al.*, 2003; Pourgheysari *et al.*, 2008; Seggewiss y Einsele, 2010].
- La utilización de ATG también tuvo un impacto sobre la magnitud de la recuperación de la respuesta celular T específica en el día +30, como ya se había publicado previamente [Hakki *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2005].

Igualmente, el uso de MMF en lugar de MTX como profilaxis para la EICH también se relacionó con una peor reconstitución inmunitaria celular T en el día +30. Esto podría explicar porqué se producen más episodios de DNAemia de CMV en los pacientes en tratamiento con ATG o MMF.

- Los pacientes receptores de un trasplante de SCU presentaron también una peor reconstitución de la respuesta celular T específica de CMV, con respecto a receptores de trasplante de MO o SP. No hubo diferencias significativas ni en la magnitud ni en la frecuencia de reconstitución celular T entre los otros dos subgrupos (MO, SP). Se han publicado datos contradictorios al respecto [Hakki *et al.*, 2003; Avetisyan *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008].
- El régimen de acondicionamiento en nuestro estudio no ha influenciado significativamente ni la velocidad ni la magnitud de la recuperación de la inmunidad celular T específica de CMV, si bien los pacientes acondicionados con regímenes no mieloablativos presentaron una mayor tendencia a adquirir niveles protectores de ambas subpoblaciones celulares T. Otros grupos han comunicado un efecto beneficioso de los regímenes no mieloablativos sobre la reconstitución de la inmunidad celular T específica de CMV en comparación con el acondicionamiento mieloablativo [Avetisyan *et al.*, 2006; Pourgheysari *et al.*, 2008].
- La aparición de EICHa de grados II-IV no tuvo un efecto significativo sobre la magnitud de la reconstitución de la respuesta celular T específica de CMV. Se encuentran datos discrepantes al respecto en la literatura [Hakki *et al.*, 2003; Avetisyan *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008].

Por lo tanto, en el artículo 4 de la presente tesis doctoral hemos determinado los factores clínicos, virológicos (infección activa por CMV) y pre-trasplante que afectan a la magnitud y cinética de reconstitución de las

células T CD8+IFN γ + y T CD4+IFN γ + específicas de CMV hasta un año post-trasplante. Estos datos pueden ayudar a estratificar a los pacientes receptores de alo-TPH en función del riesgo relativo de desarrollar DNAemia de CMV, permitiendo la individualización de los tratamientos anticipados antivirales con el fin de beneficiar a los pacientes.

El **artículo 5** de la tesis doctoral, como extensión del artículo 4, consiste en la ratificación de la influencia que ejerce el estado serológico frente al CMV del donante, contrastando los resultados de otro artículo [Pietersma *et al.*, 2011]. La conclusión del citado artículo era que la aparición de infección activa por CMV sucede más frecuentemente en pacientes receptores de alo-TPH de donante seropositivo para CMV (D+) pero resulta menos grave que en aquellos que reciben un trasplante de donante seronegativo para CMV (D-). El elevado uso de ATG con el régimen de acondicionamiento² podría haber enmascarado el impacto de la reconstitución temprana de la respuesta celular T específica de CMV asociada al injerto de D+ [Zhou *et al.*, 2009; Ugarte-Torres *et al.*, 2011]. Además, según el protocolo de tratamiento empleado en dicho estudio³, la mitad de los pacientes no fueron tratados con antivirales, lo que podría haber introducido un sesgo en la estimación de la duración de los episodios, puesto que la cinética de aclaramiento en los episodios tratados podría diferir de la de los no tratados. Por medio de la selección de una población de receptores seropositivos para CMV (R+) de alo-TPH de hermano / compatible repleto de células T, es decir, más homogénea que la estudiada

² En el artículo de Pietersma *et al.* se administró ATG junto con el régimen de acondicionamiento para la depleción *in vivo* de células T en pacientes receptores de trasplante de donantes no emparentados o con incompatibilidad HLA (n=65), correspondiente al 60% de la población estudiada. Además, no se indica cuántos de estos pacientes pertenecían a cada grupo (D-/D+).

³ En el artículo de Pietersma *et al.* se inició tratamiento anticipado con valgCV (900 mg / 12h) cuando la DNAemia de CMV fue >500 copias/ml. Sin embargo, el 46.7% de los pacientes que presentaron una reactivación por CMV presentaron valores de DNAemia <500 copias/ml y por lo tanto no fueron tratados.

en el artículo de Pietersma y cols. [Pietersma *et al.*, 2011], en la que además todos los pacientes recibieron tratamiento anticipado, demostramos que la DNAemia de CMV ocurre más frecuentemente en los receptores de trasplante de D- que en los receptores de trasplante de D+, con episodios de DNAemia de CMV más duraderos, con una tendencia a aparecer de manera más temprana, con picos de DNAemia mayores y mayor frecuencia de episodios recurrentes y enfermedad orgánica por CMV. Al igual que otros autores [Ljungman *et al.*, 2006; Ozdemir *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009; Ugarte-Torres *et al.*, 2011], concluimos en el artículo 5 de esta tesis doctoral que la DNAemia de CMV ocurre con mayor frecuencia y es más grave en los receptores de alo-TPH D-/R+ que en los D+/R+, independientemente de la modalidad de trasplante (repleto de células T o deplecionado de células T con ATG) + [Zhou *et al.*, 2009; Ugarte-Torres *et al.*, 2011], porque se relaciona con un retraso en la reconstitución inmunitaria celular T específica de CMV.

Para acabar, en el **artículo 2** de esta tesis investigamos si la reactivación de otro beta-herpesvirus, el HHV-6, tenía alguna influencia sobre la reactivación del CMV ó la reconstitución inmunitaria celular T específica de CMV en los pacientes receptores de alo-TPH. En primer lugar, caracterizamos la aparición de la infección activa por HHV-6 en nuestra cohorte, llegando a las siguientes conclusiones:

- El 40% de los pacientes receptores de alo-TPH de nuestra cohorte experimentó al menos un episodio de DNAemia de HHV-6, que ocurrió sobre el periodo del prendimiento del injerto. Se han publicado incidencias de 28-78% de infección activa por HHV-6 en este contexto [Kadokia *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997; Cone *et al.*, 1999; Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Ljungman *et al.*, 2000; Sashihara *et al.*, 2002; Boutolleau *et al.*, 2003; Gentile *et al.*, 2004; Volin *et al.*, 2004;

Hentrich *et al.*, 2005; Zerr *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006]. La discrepancia entre estos artículos se debe probablemente a variaciones en el método y el tipo de muestra empleados para la detección de HHV-6, la frecuencia de la monitorización viral y las características clínicas de los pacientes. Empleamos un ensayo de QRT-PCR muy sensible y plasma en lugar de leucocitos para la cuantificación de la DNAemia de HHV-6. Aunque sigue siendo un tema debatido [Achour *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2006], parece que el nivel plasmático de DNAemia de HHV-6 refleja el grado de replicación viral sistémica. En nuestra cohorte la variante B del virus fue implicada en todos los episodios en los que se analizó (n=16), y la cinética de la DNAemia no sugirió la integración cromosómica del genoma del HHV-6 [Ward *et al.*, 2006].

- La recepción de un trasplante de un donante no emparentado o HLA-incompatible, y el uso de SCU como fuente de células madre, se asociaron independientemente con el desarrollo de DNAemia de HHV-6, al igual que sucede en otros estudios [Ljungman *et al.*, 2000; Sashihara *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2007].
- La cinética de la DNAemia de HHV-6 en nuestros pacientes se caracterizó por picos de incidencia en la segunda-tercera semana post-trasplante, y una duración de los episodios menor de 2 semanas. Esta cinética fue comparable a la observada en otras series [Imbert-Marcille *et al.*, 2000; Ljungman *et al.*, 2000; Sashihara *et al.*, 2002; Boutolleau *et al.*, 2003; Hentrich *et al.*, 2005; Zerr *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2007]. La mayoría de los episodios fueron autolimitados. Este parece ser el resultado más frecuente de la infección activa por HHV-6 en pacientes con niveles de DNAemia de HHV-6 bajos-intermedios [Ogata *et al.*, 2007], como fue el caso de nuestra serie. Los niveles pico plasmáticos de DNAemia de HHV-6 fueron muy similares a

los de Zerr *et al.* [Zerr *et al.*, 2005], pero notablemente menores que los de Ogata *et al.* [Ogata *et al.*, 2006]. De nuevo, las diferencias pueden ser debidas a las características clínicas de los pacientes o al método empleado para la cuantificación de la DNAemia.

- En nuestra cohorte, no observamos ningún efecto de la DNAemia de HHV-6 sobre el tiempo de prendimiento de los neutrófilos en el día +30 post-trasplante, ni de las plaquetas en los días +30 y +50. Se han publicado datos contradictorios al respecto [Ljungman *et al.*, 2000; Zerr *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006].
- Igualmente, no observamos en nuestra cohorte una asociación significativa entre la aparición de DNAemia de HHV-6 o CMV y el riesgo de desarrollo de EICHa de grados II-IV. Dicha relación ha sido documentada previamente para el HHV-6 pero no para el CMV [Zerr *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008].

El HHV-6 presenta propiedades inmunomoduladoras e inmunosupresoras, por lo que podría llevar a un incremento de la replicación de CMV [DesJardin *et al.*, 2001]. La replicación de HHV-6 se ha relacionado con el incremento del riesgo de infección activa por CMV en el contexto del TOS [Dockrell *et al.*, 1997; DesJardin *et al.*, 1998; Humar *et al.*, 2000; DesJardin *et al.*, 2001; Humar *et al.*, 2002a; Humar *et al.*, 2002b]. Sin embargo, no hay muchos datos sobre la interacción de ambos beta-herpesvirus en el contexto del alo-TPH. En caso de que se demostrara el papel inductor del HHV-6 sobre la infección activa por CMV, la detección de DNAemia de HHV-6 podría ser una indicación de profilaxis frente a la infección por CMV. Estudios previos muestran que los receptores de alo-TPH que presentan DNAemia de HHV-6 son más propensos a desarrollar un episodio posterior de infección activa por CMV [Ljungman *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Gentile *et al.*, 2004; Volin *et al.*, 2004; Hentrich *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006], si bien esta asociación no alcanza niveles

significativos en todas las series. Todavía no se ha demostrado una relación entre la infección activa por HHV-6 y un mayor riesgo de enfermedad por CMV. En nuestro estudio, se observó una relación entre la DNAemia de HHV-6 y la posterior aparición de DNAemia de CMV; en la mayoría de episodios, la DNAemia de HHV-6 se había resuelto espontáneamente o estaba en proceso de resolución en el momento de la detección de la DNAemia de CMV. De hecho, la coincidencia temporal de ambas DNAemias sólo ocurrió en aproximadamente la mitad de los pacientes. Además, el nivel pico de DNAemia de HHV-6 en los pacientes que posteriormente desarrollaron DNAemia de CMV no fue diferente del de aquellos que no la presentaron. Aunque esta observación está en contra de la existencia de un papel directo del HHV-6 en la predisposición al desarrollo de infección activa por CMV, la posibilidad de que el HHV-6 desencadene la reactivación de CMV por medio de una interacción directa distinta de la carga viral no puede descartarse.

Estudiamos también si la DNAemia de HHV-6 tuvo algún impacto sobre el patrón de aparición de la infección activa por CMV. Nuestros datos no corroboran esta hipótesis por varias razones. En primer lugar, no se obtuvo correlación entre los picos de DNAemia de ambos virus, lo que hubiera sido esperable en caso de que el HHV-6 interaccionara directamente con el CMV [Humar *et al.*, 2000]. Nuestras observaciones son similares a las de algunos autores [Ljungman *et al.*, 2000] y contrarias a las de otros [Wang *et al.*, 2006]. Si bien, en este último estudio la infección activa por CMV se monitorizó por medio de la AG. En segundo lugar, la DNAemia de HHV-6 no tuvo impacto sobre la cinética de la infección activa por CMV, como se mostró por la precocidad del comienzo y los niveles pico e iniciales de la DNAemia de CMV, y el tiempo de replicación viral. Además, la duración de la DNAemia de CMV fue comparable en los pacientes con y sin episodio previo de DNAemia de HHV-6.

Nuestros resultados también refutan la hipótesis de que el HHV-6 promueve la reactivación del CMV por medio de la inhibición de la reconstitución inmunitaria celular T específica de CMV. En un estudio previo se mostró una correlación inversa no significativa entre la carga viral de HHV-6 y la presencia de respuestas linfoproliferativas específicas de CMV [Wang *et al.*, 2002]. En nuestra cohorte, obtuvimos los recuentos periféricos de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV en el día +30 post-trasplante tanto en pacientes que presentaron un episodio previo de DNAemia de HHV-6 como en pacientes que no lo presentaron a lo largo de todo el periodo estudio. No encontramos un efecto aparente de la DNAemia de HHV-6 sobre el nivel de reconstitución de ninguna de las dos subpoblaciones celulares T, independientemente de si luego sucedió un episodio de infección activa por CMV o no. Como ya hemos comentado previamente, niveles bajos de células T específicas de CMV se relacionan con una mayor probabilidad de aparición de infección activa por CMV que niveles mayores de las mismas. La discrepancia con el estudio citado [Wang *et al.*, 2002] podría deberse a diferencias en el tipo de muestra empleado para la detección de la DNAemia de HHV-6 (sangre total vs. plasma), al método utilizado para la detección de la respuesta celular específica de CMV (estudio de linfoproliferación vs. recuento de células periféricas funcionales T CD4⁺ y T CD8⁺) o a la frecuencia de la monitorización inmunológica (semanal (3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 semanas post-trasplante) vs. mensual (días +30 y +60 post-trasplante)). También observamos q los niveles periféricos de ambas subpoblaciones celulares T en el día +60 en los pacientes que desarrollaron un episodio de infección activa por CMV entre los días +30 y +60 eran comparables en los pacientes con y sin episodio previo de DNAemia de HHV-6. Por lo tanto, nuestros datos indican que la ocurrencia de DNAemia de HHV-6 no tiene efecto ni sobre la reconstitución inmunitaria celular frente al CMV ni sobre la magnitud de la respuesta inmunitaria específica originada en respuesta a la replicación activa del CMV.

La asociación temporal de las DNAemias de HHV-6 y CMV podría ser el resultado de una condición de inmunosupresión grave de los pacientes que desencadena la co-activación de ambos virus, y no necesariamente el resultado de una interacción entre ellos. De acuerdo con esta hipótesis, encontramos que la recepción de un trasplante de donante no emparentado o con incompatibilidad HLA se asociaba de forma independiente con la aparición de DNAemia de CMV y HHV-6 en nuestra cohorte. Además, en el análisis multivariante de los factores de riesgo asociados significativamente con la ocurrencia de DNAemia de CMV en el análisis univariante, la DNAemia de HHV-6 perdió la significación, si bien mantuvo cierta relación. La aparición más temprana del HHV-6 en compartimento sanguíneo con respecto a la del CMV no implica necesariamente un patrón de reactivación temporal distinto. De hecho, la forma de determinar de manera certera el momento de reactivación viral de los beta-herpesvirus es la monitorización virológica en tejido o mucosa [De Bolle *et al.*, 2005]. La tasa de replicación viral parece ser un factor relevante en la precocidad de la aparición de la DNAemia viral. En este sentido, determinamos en nuestro estudio que el tiempo de replicación viral del HHV-6 era aproximadamente la mitad del tiempo de replicación del CMV (0.9 vs. 1.7 días), que además se asemeja a una estimación realizada previamente [Funk *et al.*, 2007]. Otros factores patogénicos con potencial relevancia en este contexto serían la facilidad de acceso al compartimento sanguíneo o la fuerza de la asociación célula-virus, que podrían diferir en ambos virus.

Para concluir, podemos decir que los datos obtenidos en el artículo 2 de esta tesis doctoral apoyan la hipótesis de que un estado de profunda inmunosupresión lleva a la co-activación de HHV-6 y CMV, y refuta la idea de que el HHV-6 juega un papel predisponente en el desarrollo de DNAemia de CMV o influye en el curso de la infección activa por CMV.

10. LIMITACIONES METODOLÓGICAS

10. LIMITACIONES METODOLÓGICAS

Los cinco artículos que componen esta tesis doctoral presentan una serie de limitaciones a tener en cuenta.

Limitaciones del artículo 1

En este artículo, se expone que una expansión temprana de células T CD8⁺IFN γ ⁺ y T CD4⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV en respuesta a la replicación activa del virus se asocia con la disminución de los niveles de AG y DNAemia de CMV durante el tratamiento antiviral. En nuestro estudio el incremento significativo de ambas subpoblaciones celulares se detectó a los 16.5 días de mediana (rango, 6-46 días) tras el inicio del tratamiento. Si la monitorización inmunológica se hubiera llevado a cabo con la misma periodicidad que la monitorización virológica, seguramente la detección de la expansión celular frente al CMV hubiera sido más temprana, si bien esto no pudo realizarse en este estudio. Con el fin de plantearse la interrupción del tratamiento antiviral en base a una detección temprana de la reconstitución de células T funcionales frente al CMV, la monitorización inmunológica debería realizarse con mayor frecuencia a la practicada en este estudio, y ser validada previamente con estudios prospectivos más extensos.

La baja ocurrencia de episodios tipo C (aumento de AG y disminución de DNAemia) en nuestro estudio (2 casos) hace imposible el análisis de los mismos, y la determinación de su posible impacto sobre las decisiones terapéuticas, en caso de existir. Hay estudios en los que estos episodios aparecen con una frecuencia marcadamente mayor (31.4%) [Gerna *et al.*, 2005], y la explicación de esta discrepancia resulta difícil, puesto que es poco probable que la diferencia en las características

demográficas o clínicas o en el tipo de muestra empleado tengan algo que ver. Seguramente el estudio de una cohorte más numerosa aumentaría el número de estos episodios y permitiría sacar alguna conclusión al respecto.

Asimismo, nuestra experiencia en este estudio requiere de una validación clínica con más datos para poder extraer conclusiones de mayor peso que puedan ser aplicadas con una seguridad suficiente para los pacientes.

Limitaciones del artículo 2

En el artículo 2, la determinación de la DNAemia de HHV-6 se realizó de forma retrospectiva a partir de muestras criopreservadas. El porcentaje de pacientes con DNAemia de HHV-6 (casi 40%) podría haberse subestimado en nuestra cohorte, dado que no se pudo obtener muestras de plasma de las primeras 4 semanas post-trasplante en algunos pacientes, pudiendo no haberse detectado la reactivación temprana por HHV-6 en esos casos.

En nuestra cohorte, el limitado número de eventos incluidos en el análisis podría explicar que no se haya encontrado un efecto de la DNAemia de HHV-6 en el tiempo de prendimiento de neutrófilos y plaquetas, como indicaban estudios previos [Ljungman *et al.*, 2000; Zerr *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006]. Igualmente, la baja ocurrencia de EICHa de grados II-IV en nuestra cohorte (23 pacientes) podría explicar que no se encontrara una relación significativa entre la DNAemia de HHV-6 y la aparición de EICHa de alto grado, como se había publicado previamente [Zerr *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008]. Además, no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico significativo que relacionara la DNAemia de HHV-6, de CMV o de ambos con la mortalidad por cualquier causa debido al escaso número de eventos clínicos (11 pacientes).

En nuestro estudio, los datos avalan la hipótesis de que el HHV-6 no tiene un papel directo sobre la infección activa por CMV, basándose en la observación de que las DNAemias de ambos virus son coincidentes temporalmente sólo en la mitad de los casos y que los picos de DNAemia de HHV-6 son comparables entre pacientes que posteriormente presentan una infección activa por CMV y los que no lo hacen. Si bien, podría producirse una interacción entre ambos virus no detectable por medio de la carga viral sanguínea, quizás a nivel de tejido o mucosa, o incluso intracelular, que podría estudiarse, por ejemplo, por medio de modelos de coinfección animal o in vitro. Por lo tanto, no se puede descartar definitivamente una interacción directa entre ambos virus.

Para descartar definitivamente que la DNAemia de HHV-6 no influye sobre la reconstitución inmunitaria específica de CMV, nos faltaría determinar si la DNAemia de HHV-6 tiene algún efecto sobre esta recuperación inmunitaria en periodos tardíos post-trasplante, puesto que nuestro estudio se limita a determinar el recuento de células T específicas de CMV en los momentos +30 y +60 post-trasplante.

Por último, en el trabajo concluimos que nuestros datos avalan la hipótesis de que un estado de inmunosupresión profunda favorece la co-activación de HHV-6 y CMV y refutan el supuesto de que la reactivación de HHV-6 predispone a la infección activa por CMV o influye sobre el curso de la misma. No obstante, se requieren estudios con series de pacientes mayores para validar estas presunciones.

Limitaciones del artículo 3

En la búsqueda de estrategias para el mejor manejo terapéutico de la infección activa por CMV en los pacientes receptores de alo-TPH, se publicó un estudio basado en el aplazamiento del tratamiento antiviral en base a la detección de una respuesta inmunitaria específica de CMV en el momento de la detección de la DNAemia de CMV [Avetisyan *et al.*, 2007]. Esta estrategia no podía aplicarse a nuestra cohorte dado que en casi todos los casos independientemente de la evolución del episodio de infección activa por CMV, la respuesta inmunitaria específica de CMV era indetectable. La mayor diferencia entre ambos estudios es que la aplicación de dicha estrategia por el otro grupo se realizaba en episodios de infección tardía (>3 meses post-trasplante), mientras que en nuestro caso la mayoría de episodios se produjeron en el periodo temprano post-trasplante. Esto no nos permite determinar la invalidez de dicha estrategia, puesto que podría resultar útil como aproximación a los episodios de infección tardía por CMV, por lo que deberían realizarse estudios con más pacientes monitorizados de forma prolongada para determinar la aplicabilidad de la estrategia en ese contexto. Otra diferencia existente entre ambos estudios es el método empleado para la enumeración de células T funcionales específicas de CMV: ELISPOT frente a tinción de citoquinas intracelulares. Hay que tener en cuenta que el ELISPOT presenta límites de detección menores que la tinción de citoquinas intracelulares, aunque no permite la diferenciación de las subpoblaciones funcionales de células T.

En este estudio, proponemos como potencial intervención la interrupción temprana o la disminución de la dosis de tratamiento antiviral cuando se detecte una expansión significativa de células T específicas de CMV. Nuestros datos indican que un valor de células T CD8⁺IFN γ ⁺ por encima de 1.3 células / μ l predice el aclaramiento viral y podría emplearse como punto de corte para interrumpir el tratamiento antiviral. Sin embargo, en base a este estudio no podemos estar seguros sobre la eficacia virológica

y la seguridad clínica porque en nuestra cohorte no se suspendió el tratamiento antiviral hasta la obtención en los pacientes de un segundo resultado negativo de AG o PCR. Por lo tanto, esta proposición debe ser validada antes de su generalización por medio de un ensayo clínico controlado.

De nuevo, la conclusión del artículo 3 de que la monitorización inmunológica rutinaria durante los episodios de DNAemia de CMV es útil para el manejo terapéutico de la infección activa por CMV en los receptores de alo-TPH requiere de estudios más amplios para su verificación.

Limitaciones del artículo 4

En el artículo 4, los datos permitieron validar los puntos de corte de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ protectores de la aparición de DNAemia de CMV (>1.0 y >1.2 células/ μ l, respectivamente) que habíamos determinado previamente [Solano *et al.*, 2008]. Sin embargo, ambos marcadores no resultaron suficientemente buenos en la predicción de la ocurrencia de DNAemia de CMV, puesto que una fracción relevante de los pacientes con valores indetectables o por debajo de los puntos de corte de ambas subpoblaciones celulares no presentó DNAemia de CMV. Esto podría ser debido a que los niveles protectores de dichas células varían entre los diferentes pacientes. El estudio de células T específicas de CMV multifuncionales en lugar de monofuncionales podría estimar de forma más precisa el estado inmunológico frente al CMV, como se ha sugerido en otros estudios [Foster *et al.*, 2002; Lacey *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008; Pourgheysari *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Makedonas *et al.*, 2010]. Además, podrían contribuir también células T específicas de otras proteínas de CMV distintas de las estudiadas (pp65 e IE-1) u otros tipos de células, como las células NK (natural killer), que no se han analizado en nuestra cohorte [Sylwester *et al.*, 2005; Barron *et al.*, 2009].

Además, el marcador de células T CD4⁺IFN γ ⁺ funcionó peor que el de células T CD8⁺IFN γ ⁺ en la predicción del riesgo de DNAemia de CMV. Hay que tener en cuenta que el método analítico que empleamos es menos adecuado para el estudio de respuestas celulares T CD4⁺ (interaccionan con moléculas del CMH-II) que T CD8⁺ (interaccionan con moléculas del CMH-I) debido a la naturaleza del antígeno estimulante utilizado: librerías de péptidos superpuestos de pp-65 e IE-1 de un tamaño de 15 aminoácidos (aa). Generalmente, las moléculas del CMH-I presentan péptidos de 8-10 aa de origen endógeno y las moléculas del CMH-II se unen a péptidos de 13-24 aa de origen exógeno (generalmente >15 residuos). Estas últimas (y con ello la respuesta de las células T CD4⁺) funcionan mejor cuando se emplean antígenos derivados de lisados de cultivos celulares de CMV que son endocitados y procesados posteriormente por las CPA.

Por último, cabe señalar que en el análisis de los factores clínicos que afectan a la reconstitución de la respuesta inmunitaria celular T frente al CMV, la aparición de EICHa de alto grado no presentó un efecto significativo. Nuestros datos deben de interpretarse con cautela debido al escaso número de pacientes con EICHa de grados II-IV para los cuales obtuvimos datos inmunológicos. Hay datos discrepantes en la literatura respecto a este tema [Hakki *et al.*, 2003; Avetisyan *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008], que podrían deberse a las diferencias en los tiempos de monitorización inmunológica tras el inicio o el cese de la terapia con corticosteroides y la dosis acumulada administrada previa a la toma de muestras.

Limitaciones del artículo 5

En el artículo 5, algunos de los datos expuestos entre los dos grupos de pacientes comparados (D-/R+ y D+/R+) no alcanzan significación estadística y nuestras conclusiones se basan en las frecuencias obtenidas

(%), como el tiempo de aparición de la DNAemia de CMV (más temprana en el grupo D-/R+) y el número de episodios de DNAemia de CMV (mayor en los pacientes D-/R+). Si se hubieran incluido más pacientes en el análisis, quizás las tendencias observadas entre los dos grupos se hubieran transformado en datos diferentes significativos.

11. CONCLUSIONES FINALES

11. CONCLUSIONES FINALES

Los cinco artículos que componen esta tesis doctoral permiten extraer una serie de conclusiones de utilidad para el manejo clínico-terapéutico de la infección activa por CMV en el paciente receptor de alo-TPH:

1- Los episodios de infección activa por CMV en los que DNAemia y AG aumentan al ser tratados con GCV se asocian con la ausencia de una respuesta inmunológica celular T específica de CMV, lo que explica que aparezcan en el contexto de la inmunosupresión producida por la administración de corticosteroides.

2.- La aparición de mutaciones que confieren resistencia a los fármacos antivirales empleados en el tratamiento de la infección activa por CMV en el contexto del alo-TPH es rara, y el fallo de una respuesta virológica al tratamiento se debe -salvo en casos de exposición prolongada y repetida al antiviral- a la incapacidad de controlar la replicación por medio de una respuesta inmunitaria celular protectora. Esto permite abogar por la incorporación de una terapia basada en la transferencia adoptiva de células T funcionales específicas de CMV en caso de fallo terapéutico, más que en el cambio de tratamiento.

3.- Los recuentos periféricos de células T CD8⁺ y T CD4⁺ productoras de IFN γ en respuesta al estímulo con péptidos representativos de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV se correlaciona inversamente con los niveles de DNAemia de CMV. De esta forma, se obtienen niveles indetectables o bajos de dichas células al inicio de episodios de infección activa y se relacionan con la persistencia viral, mientras que la expansión de ambas subpoblaciones celulares por encima de un nivel umbral (>1.3 células/ μ l) durante el

tratamiento anticipado coincide con la resolución de un episodio de reactivación y protege frente a episodios recurrentes. Esta aproximación podría tener utilidad en la interrupción temprana del tratamiento antiviral a la vista de resultados por encima de los valores umbral, por lo que la monitorización inmunológica durante los episodios de infección activa podría aportar un beneficio añadido al manejo de estos pacientes.

4.- El recuento periférico de células T CD8+IFN γ ⁺ y T CD4+IFN γ ⁺ específicas de CMV por encima de 1 y 1.2 células/ μ l, respectivamente, permite predecir la ausencia de reactivación de CMV al menos en los primeros tres meses post-trasplante con una especificidad y VPP máximos. Sin embargo, niveles por debajo de dichos valores no permiten determinar con sensibilidad suficiente los pacientes que van a desarrollar un episodio de infección activa por CMV. La monitorización inmunológica celular permitiría a este nivel diferenciar pacientes con riesgo de presentar una infección activa por CMV de los que no lo tienen.

5.- Las características clínicas y del trasplante que dan lugar a una peor reconstitución de la inmunidad celular específica de CMV se asocian con un mayor riesgo de reactivación vírica. Así, según nuestros datos, los pacientes receptores de alo-TPH de donante seronegativo para CMV, no emparentado y con incompatibilidades HLA, la inclusión de ATG, el uso de MMF en lugar del MTX en la profilaxis de la EICHa, la SCU como fuente de progenitores en comparación con la MO o la SP, y los regímenes de acondicionamiento mieloablativos, que se asocian con peores respuestas inmunitarias, pueden considerarse factores de riesgo de aparición de infección activa por CMV. De esta forma, se puede estratificar a los pacientes con mayor riesgo de sufrir un episodio de infección activa por CMV, intensificando en ellos la monitorización inmunológica y virológica para llevar un control más estrecho de la posible reactivación del virus.

6.- En el contexto del alo-TPH, la frecuente reactivación de otros beta-herpesvirus, como el HHV-6, concomitante a la del CMV, puede explicarse por la profunda inmunosupresión a la que son sometidos estos pacientes. En relación con nuestros datos, esta afirmación parece tener más sentido que la hipótesis de que el HHV-6 juegue un papel predisponente en el desarrollo subsiguiente de un episodio de infección activa por CMV.

12. ANEXOS

12.1. Anexo I

INFORME RAZONADO DEL LUGAR DE FIRMA DEL DOCTORANDO EN LAS PUBLICACIONES COMPENDIADAS EN LA TESIS DOCTORAL

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, redacto el siguiente informe con el fin de justificar la situación como segunda firmante en el artículo 5 de la presente tesis doctoral.

La serie de estudios presentados en esta tesis doctoral son fruto de una estrecha colaboración entre los Servicios de Microbiología y de Onco-Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los aspectos microbiológicos de este trabajo, incluyendo la realización de las técnicas para la obtención de los datos, el análisis y la interpretación de los mismos, han sido llevados en su mayor parte por personal del Servicio de Microbiología, y en los artículos aquí compendiados, por mi, doctoranda de esta tesis. Si bien, el manejo y los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes son realizados por personal de Onco-Hematología, por lo que en algunas de las publicaciones, como en el caso del artículo 5 incluido en este trabajo, se les otorga el primer lugar de firma.



Núria Tormo Palop

Doctoranda

VALENCIA a 12 de FEBRERO de 2015.

12.2. Anexo II

ESCRITO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL

Los factores de impacto de las revistas en que se han publicado los trabajos compendiados en esta tesis doctoral se presentan en la siguiente tabla por orden cronológico:

Artículo	Revista	Año de publicación	Factor de impacto
1	Bone Marrow Transplantation	2010	3,66
2	Biology of Blood and Marrow Transplantation	2010	3,275
3	Journal of Medical Virology	2010	2,896
4	Bone Marrow Transplantation	2011	3,746
5	Clinical Infectious Diseases	2011	9,154



Dra. Concepción Gimeno Cardona
Profesora Titular, Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología y
Ecología,
Universidad de Valencia.



Dr. David Navarro Ortega
Catedrático, Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología y
Ecología,
Universidad de Valencia.

Valencia, a 26 de Enero de 2015

12.3. Anexo III

INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

La **Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona**, jefa de Servicio del Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y Profesora titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y el **Prof. Dr. David Navarro Ortega**, facultativo adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada **Nuria Tormo Palop** con el título: **“RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR T FRENTE A CITOMEGALOVIRUS Y CONTROL DE LA VIREMIA EN EL PACIENTE RECEPTOR DE TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS”** ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Valencia, febrero de 2014



Fdo. David Navarro Ortega



Fdo. Concepción Gimeno Cardona

12.4. Anexo IV

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE LA COAUTORÍA DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS

En cumplimiento del artículo 8.2.b del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, redactamos el siguiente informe con el fin de justificar la situación de la doctoranda como segunda firmante en el artículo 5 de la presente tesis doctoral y la existencia de coautorías.

La serie de estudios presentados en esta tesis doctoral son fruto de una estrecha colaboración entre los Servicios de Microbiología y de Onco-Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los aspectos microbiológicos de este trabajo, incluyendo la realización de las técnicas para la obtención de los datos, el análisis y la interpretación de los mismos, han sido llevados en su mayor parte por personal del Servicio de Microbiología, y en los artículos aquí compendiados por la doctoranda de esta tesis. Si bien, el manejo y los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes son realizados por personal de Onco-Hematología, por lo que en algunas de las publicaciones, como en el caso del artículo 5 incluido en este trabajo, se les otorga el primer lugar de firma.

Además, ninguno de los coautores ha utilizado ni implícita ni explícitamente ninguno de estos trabajos para la realización de otra tesis doctoral.



Fdo. David Navarro Ortega



Fdo. Concepción Gimeno Cardona

Valencia, a 23 de febrero de 2015.

13. BIBLIOGRAFÍA

13. BIBLIOGRAFÍA

Achour A, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, Agut H. Is human herpesvirus-6 DNA in plasma the right marker for active infection? *J Infect Dis* 2006; 194: 1795,6; author reply 1796-7.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274: 94-6.

Aubert G, Hassan-Walker AF, Madrigal JA, Emery VC, Morte C, Grace S, Koh MB, Potter M, Prentice HG, Dodi IA, Travers PJ. Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogeneic stem cell transplants. *J Infect Dis* 2001; 184: 955-63.

Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringden O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 865-9.

Avetisyan G, Larsson K, Aschan J, Nilsson C, Hassan M, Ljungman P. Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 687-92.

Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol* 2008; 41: 237-41.

Baldick CJ, Jr, Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* 1996; 70: 6097-105.

Barron MA, Gao D, Springer KL, Patterson JA, Brunvand MW, McSweeney PA, Zeng C, Baron AE, Weinberg A. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1777-83.

Beninga J, Kropff B, Mach M. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J Gen Virol* 1995; 76: 153-60.

Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* 2006; 71: 154-63.

Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989; 320: 1731-5.

Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Michelson S. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med* 1998; 188: 855-66.

Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 543-58.

Boeckh M. Rising CMV PP65 antigenemia and DNA levels during preemptive antiviral therapy. *Haematologica* 2005; 90: 439.

Boeckh M. Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl Infect Dis* 1999; 1: 165-78.

Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 533-54.

Boeckh M, Gallez-Hawkins GM, Myerson D, Zaia JA, Bowden RA. Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with polymerase chain reaction using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplantation* 1997; 64: 108-13.

Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996; 88: 4063-71.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003; 101: 407-14.

Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004; 103: 2003-8.

Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol* 2004; 78: 7867-73.

Boppana SB, Britt WJ. Synopsis of clinical aspects of human cytomegalovirus disease. En: Reddehase MJ, Lemmermann NAW (Ed). *Cytomegaloviruses*.

From molecular pathogenesis to intervention. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2013; II: 1-25.

Boppa SB, Britt WJ. Recognition of human cytomegalovirus gene products by CMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* 1996; 222: 293-6.

Borysiewicz LK, Morris S, Page JD, Patrick Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirements for in vitro generation and specificity. *Eur J Immunol* 1983; 13: 804-9.

Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL, Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med* 1988; 168: 919-31.

Boutolleau D, Fernández C, André E, Imbert-Marcille B, Milpied N, Agut H, Gautheret-Dejean A. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 2003; 187: 179-86.

Bowden RA, Fisher LD, Rogers K, Cays M, Meyers JD. Cytomegalovirus (CMV)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary CMV infection and disease after marrow transplant. *J Infect Dis* 1991; 164: 483-7.

Britt WJ, Vugler L. Structural and immunological characterization of the intracellular forms of an abundant 68,000 Mr human cytomegalovirus protein. *J Gen Virol* 1987; 68: 1897-907.

Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (CMV) gp55-116 (gB): use of CMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990; 64: 1079-85.

Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Lowenberg B, Cornelissen JJ. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95: 2240-5.

Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, Proesch S, Reinke P, Volk HD, Lehmkuhl H, Kern F. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1031-6.

Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 2002; 290: 19-34.

Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, Kottaridis PD, Peggs K, O'Gorman P, Chakraverty R, Marshall T, Osman H, Mahendra P, Craddock C, Waldmann H, Hale G, Fegan CD, Yong K, Goldstone AH, Linch DC, Milligan DW. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002; 99: 4357-63.

Chan P, Peiris J, Yuen K, Liang R, Lau Y, Chen F, Lo S, Cheung C, Chan T, Ng M. Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 1997; 53: 295-305.

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77: 4588-96.

Cone RW, Huang ML, Corey L, Zeh J, Ashley R, Bowden R. Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations. *J Infect Dis* 1999; 179: 311-8.

Crippa F, Corey L, Chuang EL, Sale G, Boeckh M. Virological, clinical, and ophthalmologic features of cytomegalovirus retinitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 214-9.

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

Crumpacker CS, Wadhwa S. Cytomegalovirus. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Ed). *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. Elsevier, Madrid, España. 2007; 2: 1786-800.

Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, Goldman J, Craddock C, Moss PA. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 1232-40.

Dankner WM, McCutchan JA, Richman DD, Hirata K, Spector SA. Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J Infect Dis* 1990; 161: 31-6.

Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 2003; 84: 17-28.

Davison AJ, Bhella D. Comparative genome and virion structure. En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R,

Yamanishi K (Ed). Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2007; capítulo 14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47392/>

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order Herpesvirales. Arch Virol 2009; 154: 171-7.

De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 217-45.

De Ory F, Ramírez R, Comas LG, León P, Sagües M, Sanz J. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? Eur J Epidemiol 2004; 19: 85-9.

De Pagter P, Schuurman R, Meijer E, Van Baarle D, Sanders EA, Boelens JJ. Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. J Clin Virol 2008; 43: 361-6.

Del Val M, Münch K, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. Cell 1989; 58: 305-15.

DesJardin JA, Cho E, Supran S, Gibbons L, Werner BG, Snyderman DR. Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. Clin Infect Dis 2001; 33: 1358-62.

DesJardin JA, Gibbons L, Cho E, Supran SE, Falagas ME, Werner BG, Snyderman DR. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. J Infect Dis 1998; 178: 1783-6.

Dockrell DH, Prada J, Jones MF, Patel R, Badley AD, Harmsen WS, Ilstrup DM, Wiesner RH, Krom RA, Smith TF, Paya CV. Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. J Infect Dis 1997; 176: 1135-40.

Eid A, Brown R, Hogan W, Lahr B, Eckel-Passow J, Litzow M, Razonable R. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4 and CD8 T lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis 2009; 11: 519-28.

Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU. CMV-specific T cell therapy. Blood Cells Mol Dis 2008; 40: 71-5.

Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U, Jahn G, Mackes P, Herter M, Klingebiel T, Loffler J, Wagner S, Muller CA. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86: 2815-20.

Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C, Sinzger C, Jahn G, Bader P, Klingebiel T, Dietz K, Loffler J, Bokemeyer C, Muller CA, Kanz L. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 757-63.

Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Loffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H. 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, 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.

Fiddian P, Sabin CA, Griffiths PD. Valacyclovir provides optimum acyclovir exposure for prevention of cytomegalovirus and related outcomes after organ transplantation. *J Infect Dis* 2002; 186 Suppl 1: S110-5.

Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol* 1998; 72: 5661-8.

Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. Cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 501-11.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 2003; 289: 1008-11.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326: 663-7.

Funk GA, Gosert R, Hirsch HH. Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 460-72.

Gallez-Hawkins G, Thao L, Lacey SF, Martínez J, Li X, Franck AE, Lomeli NA, Longmate J, Diamond DJ, Spielberger R. Cytomegalovirus immune reconstitution occurs in recipients of allogeneic hematopoietic cell

transplants irrespective of detectable cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 890-902.

Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 2003; 101: 2686-92.

Gamadia LE, Rentenaar RJ, van Lier RAW, ten Berge IJM. Properties of CD4⁺ T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol* 2004; 65: 486-92.

Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 725-38.

Ganepola S, Gentilini C, Hilbers U, Lange T, Rieger K, Hofmann J, Maier M, Liebert U, Niederwieser D, Engelmann E. Patients at high risk for CMV infection and disease show delayed CD8⁺ T-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 293-9.

Gentile G, Capobianchi A, Ferraironi M, Greco E, Martino P. Relationship of serum human herpesvirus 6 DNA with cytomegalovirus pp65 antigenemia in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 2004; 77: 1907,8; author reply 1980-9.

Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Bragotti LZ, Alessandrino E. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 873-9.

Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Chezzi L, Grossi P, Revello MG. Human Cytomegalovirus (CMV) Leukodnaemia Correlates More Closely With Clinical Symptoms Than Antigenemia and Viremia in Heart and Heart-Lung Transplant Recipients With Primary CMV Infection¹. *Transplantation* 1998; 65: 1378-85.

Gerna G, Baldanti F, Percivalle E, Zavattoni M, Campanini G, Revello MG. Early identification of human cytomegalovirus strains by the shell vial assay is prevented by a novel amino acid substitution in UL123 IE1 gene product. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4494-5.

Gerna G, Lilleri D, Zecca M, Alessandrino EP, Baldanti F, Revello MG, Locatelli F. Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica* 2005; 90: 526-33.

Gerna G, Percivalle E, Torsellini M, Revello MG. Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3585-9.

Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1232-7.

Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2681-8.

Gerna G, Sarasini A, Lilleri D, Percivalle E, Torsellini M, Baldanti F, Revello MG. In vitro model for the study of the dissociation of increasing antigenemia and decreasing DNAemia and viremia during treatment of human cytomegalovirus infection with ganciclovir in transplant recipients. *J Infect Dis* 2003; 188: 1639-47.

Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Grossi P, Torsellini M, Revello MG. Rising levels of human cytomegalovirus (CMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary CMV infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1113-6.

Gerna G, Zipeto D, Percivalle E, Parea M, Revello MG, Maccario R, Peri G, Milanesi G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1236-44.

Gibson L, Piccinini G, Lilleri D, Revello MG, Wang Z, Markel S, Diamond DJ, Luzuriaga K. Human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early protein 1 are common targets for CD8⁺ T cell responses in children with congenital or postnatal human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2004; 172: 2256-64.

Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 873-83.

Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 2000; 74: 8140-50.

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 (Cytomegalovirus PCR Kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3311-8.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 217-21.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 917-9.

Godard B, Gazagne A, Gey A, Baptiste M, Vingert B, Pegaz-Fiornet B, Strompf L, Fridman WH, Glotz D, Tartour E. Optimization of an elispot assay to detect cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes. *Hum Immunol* 2004; 65: 1307-18.

Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 1993; 118: 173-8.

Gracia-Ahufinger I, Tormo N, Espigado I, Solano C, Urbano-Ispizua A, Clari MA, de la Cruz-Vicente F, Navarro D, Pérez-Romero P. Differences in cytomegalovirus plasma viral loads measured in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients using two commercial real-time PCR assays. *J Clin Virol* 2010; 48: 142-6.

Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B, Sintnicolaas K, van Doornum G, Niesters HG, Löwenberg B, Cornelissen JJ. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4 and CD8 T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 211-20.

Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, Tournay C, Lowenberg B, Bolhuis RL, Cornelissen JJ. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 2001; 98: 1358-64.

Griffiths P, Whitley R, Snyderman DR, Singh N, Boeckh M, International Herpes Management Forum. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes* 2008; 15: 4-12.

Griffiths PD, Stagno S, Pass RF, Smith RJ, Alford CA, Jr. Infection with cytomegalovirus during pregnancy: specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection. *J Infect Dis* 1982; 145: 647-53.

Grossi P, Minoli L, Percivalle E, Irish W, Vigano M, Gerna G. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation* 1995; 59: 847-51.

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.

Harrington S, Buller R, Storch G, Li L, Fischer S, Murray P, Gea-Banacloche J. The effect of quantification standards used in real-time CMV PCR assays on guidelines for initiation of therapy in allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 237-8.

Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65: 432-6.

Hebart H, Deginik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, Rauser G, Sinzger C, Jahn G, Loeffler J, Kanz L, Rammensee HG, Einsele H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 3830-7.

Hengel H, Reusch U, Geginat G, Holtappels R, Ruppert T, Hellebrand E, Koszinowski UH. Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J Virol* 2000; 74: 7861-8.

Hentrich M, Oruzio D, Jäger G, Schlemmer M, Schleuning M, Schiel X, Hiddemann W, Kolb H. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 66-72.

Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk H, Picker LJ, Kern F. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods* 2003; 29: 270-81.

Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, Corey P, Greig P, Walmsley S, Levy G. Clinical Utility of Quantitative Cytomegalovirus Viral Load Determination for Predicting Cytomegalovirus Disease in Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1305-11.

Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, Mazzulli T. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 2002a; 73: 599-604.

Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G, Mazzulli T. Interactions Between Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, and the Recurrence of Hepatitis C After Liver Transplantation. *2002b*; 2: 461-6.

Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis* 2000; 181: 1450-3.

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.

Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol* 2002; 25, Suppl 2: 123-36.

Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, Besse B, Moreau P, Billaudel S, Milpied N. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 881-6.

Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 1983; 130: 118-33.

Jahn G, Scholl BC, Traupe B, Fleckenstein B. The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* 1987; 68: 1327-37.

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

Jonjic S, Mutter W, Weiland F, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4⁺ T lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 169: 1199-212.

Kadakia MP, Rybka WB, Stewart JA, Patton JL, Stamey FR, Elsayy M, Pellett PE, Armstrong JA. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 5341-54.

Kanda Y, Mineishi S, Nakai K, Saito T, Tanosaki R, Takaue Y. Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing antithymocyte globulin. *Blood* 2001; 97: 3676-7.

Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, Bredt BM, Epling L, Ronquillo R, Varma A, Deeks SG, McCune JM, Nixon DF. Comparison of the ELISPOT and cytokine

flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 2003; 283: 141-53.

Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, Khatamzas E, Prösch S, Schönemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk H, Reinke P. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1676-82.

Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski IM, Pruss A, Gratama JW, Volkmer-Engert R, Ewert R, Reinke P, Volk HD, Picker LJ. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 2002; 185: 1709-16.

Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002; 169: 1984-92.

Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, Bryan SG, Kaur I, Martin S, Wieder ED, Worth L, Cooper LJ, Petropoulos D, Molldrem JJ, Champlin RE, Shpall EJ. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007; 110: 4543-51.

Kraat Y, Stals F, Christiaans M, Lazzarotto T, Landini M, Bruggeman C. IgM antibody detection of ppUL80a and ppUL32 by immunoblotting: an early parameter for recurrent cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1996; 48: 289-94.

Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 2008; 112: 914-5.

Lacey SF, La Rosa C, Zhou W, Sharma MC, Martínez J, Krishnan A, Gallez-Hawkins G, Thao L, Longmate J, Spielberger R, Forman SJ, Limaye A, Zaia JA, Diamond DJ. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and intermediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; 194: 1410-21.

Landini MP, Guan MX, Jahn G, Lindenmaier W, Mach M, Ripalti A, Necker A, Lazzarotto T, Plachter B. Large-scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1375-9.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 269-97.

Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 469-73.

Lee M, Chiou T, Hsiao L, Yang M, Lin P, Poh S, Yen C, Liu J, Teng H, Chao T. Rituximab therapy increased post-transplant cytomegalovirus complications in Non-Hodgkin's lymphoma patients receiving autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2008; 87: 285-9.

Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; 83: 1971-9.

Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 2008; 93: 248-56.

Lilleri D, Gerna G, Furione M, Bernardo ME, Giorgiani G, Telli S, Baldanti F, Locatelli F. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving hematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65 antigenemia. *Blood* 2007; 110: 2757-60.

Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesviruses. En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (Ed). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2007; capítulo 3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47399/>.

Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: S70-2.

Ljungman P, de la Cámara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, Styczynski J, Ward K. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 227-40.

Ljungman P, Wang F, Clark D, Emery V, Remberger M, Ringden O, Linde A. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol* 2000; 111: 774-81.

Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 209-17.

Ljungman P, Aschan J, Lewensohn-Fuchs I, Carlens S, Larsson K, Lönnqvist B, Mattsson J, Sparrelid E, Winiarski J, Ringdén O. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation* 1998; 66: 1330-4.

Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003; 102: 4255-60.

Ljungman P, de la Cámara R, Milpied N, Volin L, Russell CA, Crisp A, Webster A, Valacyclovir International Bone Marrow Transplant Study Group. Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood* 2002; 99: 3050-6.

Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U, Matthes-Martin S, Bacigalupo A, Einsele H, Ullmann J, Musso M, Trensche R, Ribaud P, Bornhauser M, Cesaro S, Crooks B, Dekker A, Gratecos N, Klingebiel T, Tagliaferri E, Ullmann AJ, Wacker P, Cordonnier C. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2001; 97: 388-92.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-7.

Ljungman P, Pérez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringden O. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91: 78-83.

Ljungman P. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients. *J Clin Virol* 2006; 35: 493-5.

Locatelli F, Percivalle E, Comoli P, Maccario R, Zecca M, Giorgiani G, De Stefano P, Gerna G. Human cytomegalovirus (CMV) infection in paediatric patients given allogeneic bone marrow transplantation: role of early antiviral treatment for CMV antigenaemia on patients' outcome. *Br J Haematol* 1994; 88: 64-71.

Lozza L, Lilleri D, Percivalle E, Fornara C, Comolli G, Revello MG, Gerna G. Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (CMV)-specific CD4

and CD8 T cells by a novel method using monocyte-derived CMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1795-804.

Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 689-712.

Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S, Adult AIDS Clinical Trials Group-CMV Laboratories. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2775-80.

Lusso P. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* 2006; 37: S4-S10.

Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* 2000; 74: 11881-92.

Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, Persaud N, Trigona W, Fu T, Sinclair E. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001; 255: 27-40.

Maecker HT, Maino VC. Analyzing T-cell responses to cytomegalovirus by cytokine flow cytometry. *Hum Immunol* 2004; 65: 493-9.

Makedonas G, Hutnick N, Haney D, Amick AC, Gardner J, Cosma G, Hersperger AR, Dolfi D, Wherry EJ, Ferrari G. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. 2010; 6: e1000798.

McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 1994; 43: 103-10.

Meier J, Stinski M. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* 1996; 39: 331-42.

Mocarski ES. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 2002; 10: 332-9.

Mocarski ES. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 2004; 6: 707-17.

Mocarski E, Courcelle C. Cytomegalovirus and their replication. En: Fields B, Knipe D, Howley P (Ed). *Fields Virology*. 4th Ed. Raven Press, New York. 2001; 2626-73.

Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, de Latour RP, Agbalika F, Ribaud P, Robin M, Rocha V, Gluckman E, Charron D, Socie G, Toubert A. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2008; 198: 818-26.

Mutter W, Reddehase MJ, Busch FW, Buhring HJ, Koszinowski UH. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J Exp Med* 1988; 167: 1645-58.

Navarro D, Lennette E, Tugizov S, Pereira L. Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Med Virol* 1997; 52: 451-9.

Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 1993; 197: 143-58.

Nichols WG, Corey L, Gooley T, Drew WL, Miner R, Huang M, Davis C, Boeckh M. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood* 2001; 97: 867-74.

Nielsen SL, Sorensen I, Andersen HK. Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 654-61.

Noda S, Aguirre SA, Bitmansour A, Brown JM, Sparer TE, Huang J, Mocarski ES. Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood* 2006; 107: 30-8.

Ogata M, Satou T, Kawano R, Goto K, Ikewaki J, Kohno K, Ando T, Miyazaki Y, Ohtsuka E, Saburi Y. Plasma HHV-6 viral load-guided preemptive therapy against HHV-6 encephalopathy after allogeneic stem cell transplantation: a prospective evaluation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 41: 279-85.

Ogata M, Kikuchi H, Satou T, Kawano R, Ikewaki J, Kohno K, Kashima K, Ohtsuka E, Kadota J. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J Infect Dis* 2006; 193: 68-79.

Ohlin M, Plachter B, Sundqvist VA, Steenbakkers PG, Middeldorp JM, Borrebaeck CA. Human antibody reactivity against the lower matrix protein

(pp65) produced by cytomegalovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 325-9.

Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon- γ -enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 2005; 131: 472-9.

Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996; 156: 4746-56.

Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 1995; 182: 1045-56.

Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE, Couriel DR, Giralt SA, de Lima M, Khouri IF, Hosing C, Kornblau SM, Anderlini P, Shpall EJ, Qazilbash MH, Molldrem JJ, Chemaly RF, Komanduri KV. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 125-36.

Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, Rowland-Jones S, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 2002; 100: 3690-7.

Pang X, Fox J, Fenton J, Miller G, Caliendo A, Preiksaitis J. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9: 258-68.

Pastore D, Delia M, Mestice A, Perrone T, Carluccio P, Gaudio F, Giordano A, Rossi AR, Ricco A, Leo M. Recovery of CMV-specific CD8⁺ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 550-7.

Pietersma FL, van Dorp S, Minnema MC, Kuball J, Meijer E, Schuurman R, van Baarle D. Influence of donor cytomegalovirus (CMV) status on severity of viral reactivation after allogeneic stem cell transplantation in CMV-seropositive recipients. *Clin Infect Dis* 2011; 52: e144-8.

Pourgheysari B, Piper K, McLarnon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, Cook M, Mahendra P, Craddock C, Moss P. Early reconstitution of effector memory

CD4⁺ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 43: 853-61.

Prentice HG, Gluckman E, Powles RL, Ljungman P, Milpied NJ, Cámara R, Mandelli F, Kho P, Kennedy L, Bell AR. Long-term survival in allogeneic bone marrow transplant recipients following acyclovir prophylaxis for CMV infection. The European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 129-33.

Prösch S, Wendt CEC, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Krüger DH, Volk H, Döcke W. A novel link between stress and human cytomegalovirus (CMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates CMV activation. *Virology* 2000; 272: 357-65.

Quinnan Jr GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 307: 7-13.

Raanani P, Gafer-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2009; 27: 770-81.

Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pacht C, Merigan TC. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis* 1991; 164: 835-42.

Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 746-52.

Reddehase MJ, Balthesen 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.

Reddehase MJ, Mutter W, Munch K, Buhring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 1987; 61: 3102-8.

Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4140-5.

Rentenaar RJ, Gamadia LE, van DerHoek N, van Diepen FN, Boom R, Weel JF, Wertheim-van Dillen PM, van Lier RA, ten Berge IJ. Development of virus-

specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest* 2000; 105: 541-8.

Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, Finke J, Cordonnier C, Link H, Ljungman P, Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 1159-64.

Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78: 1373-80.

Revello MG, Genini E, Gorini G, Klersy C, Piralla A, Gerna G. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010; 48: 255-9.

Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 680-715.

Revello MG, Percivalle E, Di Matteo A, Morini F, Gerna G. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J Gen Virol* 1992; 73: 437-42.

Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Gerna G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 2002; 186: 553-7.

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; 257: 238-41.

Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2000; 81: 393-9.

Riera L, Gariglio M, Valente G, Müllbacher A, Museteanu C, Landolfo S, Simon MM. Murine cytomegalovirus replication in salivary glands is controlled by both perforin and granzymes during acute infection. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1350-5.

Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, López C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of

the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1992; 123: 425-49.

Roizman B, Pellett P. The family Herpesviridae: a brief introduction. En: Knipe D, Howley P (Ed). *Fields Virology*, 4th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA. 2001; 2: 2381-97.

Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, Boppana SB. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr* 2006; 148: 332-6.

Ross SA, Arora N, Novak Z, Fowler KB, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *J Infect Dis* 2010; 201: 386-9.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 100: 2005-11.

Scott G, Isaacs M, Zeng F, Kesson A, Rawlinson W. Cytomegalovirus antiviral resistance associated with treatment induced UL97 (protein kinase) and UL54 (DNA polymerase) mutations. *J Med Virol* 2004; 74: 85-93.

Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; 115: 3861-8.

Seo S, Boeckh M. Clinical cytomegalovirus research: haematopoietic cell transplantation. En: Reddehase MJ, Lemmermann NAW (Ed). *Cytomegaloviruses. From molecular pathogenesis to intervention*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2013; II: 337-53.

Shimamura M, Mach M, Britt WJ. Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J Virol* 2006; 80: 4591-600.

Shuster EA, Beneke JS, Tegtmeier GE, Pearson GR, Gleaves CA, Wold AD, Smith TF. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 577-85.

Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006; 87: 1763-79.

Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* 2008; 41: 180-5.

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: 741-50.

Sissons JGP, Carmichael AJ. Clinical Aspects and Management of Cytomegalovirus Infection. *J Infect* 2002; 44: 78-83.

Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 1997; 100: 3154-63.

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

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 cytomegalovirus-specific interferongamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 2008; 93: 1434-6.

Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, Farga A, Prosper F, García-Conde J, Navarro D, Gimeno C. Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3938-41.

Spaete RR, Mocarski ES. The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J Virol* 1985; 54: 817-24.

Spector D. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 1996; 39: 361-77.

Streblow DN, Varnum SM, Smith RD, Nelson JA. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles. En: Reddehase MJ (Ed). *Cytomegaloviruses. Molecular biology and immunology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2006; 91-110.

Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202: 673-85.

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516-21.

Tamashiro JC, Spector DH. Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* 1986; 59: 591-604.

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.

Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000; 287: 1031.

Tu W, Chen S, Sharp M, Dekker C, Manganello AM, Tongson EC, Maecker HT, Holmes TH, Wang Z, Kemble G, Adler S, Arvin A, Lewis DB. Persistent and selective deficiency of CD4⁺ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 2004; 172: 3260-7.

Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, Sy S, Roa L, Khan F, Fonseca K, Russell JA, Storek J. Donor serostatus has an impact on cytomegalovirus-specific immunity, cytomegaloviral disease incidence, and survival in seropositive hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 574-85.

Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurther E, Mach M. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* 1996; 77: 1537-47.

Verkruyse L, Storch G, Devine S, Dipersio J, Vij R. Once daily ganciclovir as initial pre-emptive therapy delayed until threshold CMV load ≥ 10000 copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 2005; 37: 51-6.

Volin L, Lautenschlager I, Juvonen E, Nihtinen A, Anttila V, Ruutu T. Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses. *Br J Haematol* 2004; 126: 690-6.

Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997; 99: 1739-50.

Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, Bell S, Gailbraith A, McNeil K, Jones S. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8 T-cell responses using QuantiFERON®-CMV. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 165-70.

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333: 1038-44.

Wang L, Dong L, Zhang M, Lu D. The impact of human herpesvirus 6B reactivation on early complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 1031-7.

Wang L, Dong L, Zhang M, Lu D. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 673-7.

Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 3615-20.

Wang FZ, Larsson K, Linde A, Ljungman P. Human herpesvirus 6 infection and cytomegalovirus-specific lymphoproliferative responses in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 521-6.

Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, Griffiths PD, Clark DA. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1571-4.

Weststrate MW, Geelen JL, van der Noordaa J. Human cytomegalovirus DNA: physical maps for restriction endonucleases BglII, HindIII and XbaI. *J Gen Virol* 1980; 49: 1-21.

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.

Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R, McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 2008; 41: 206-12.

Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is

dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996; 70: 7569-79.

Wolf DG, Lurain NS, Zuckerman T, Hoffman R, Satinger J, Honigman A, Saleh N, Robert ES, Rowe JM, Kra-Oz Z. Emergence of late cytomegalovirus central nervous system disease in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2003; 101: 463-5.

Yamane A, Mori T, Suzuki S, Mihara A, Yamazaki R, Aisa Y, Nakazato T, Shimizu T, Ikeda Y, Okamoto S. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 100-6.

Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 932-40.

Zhang LJ, Hanff P, Rutherford C, Churchill WH, Crumpacker CS. Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis* 1995; 171: 1002-6.

Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, Spielberger R, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA, Diamond DJ. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009; 113: 6465-76.

Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 2002; 195: F9-14.