



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y
Odontología**

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

**FACTORES PREDICTIVOS DE DESARROLLO Y
EVOLUCIÓN DE INFECCIÓN ACTIVA POR
CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS**

Doctorando:

Víctor Vinuesa Velasco

Director de la tesis doctoral:

Prof. David Navarro Ortega

Enero 2021



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y
Odontología**

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

**FACTORES PREDICTIVOS DE DESARROLLO Y
EVOLUCIÓN DE INFECCIÓN ACTIVA POR
CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE
ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS**

Doctorando:

Víctor Vinuesa Velasco

Director de la tesis doctoral:

Prof. David Navarro Ortega

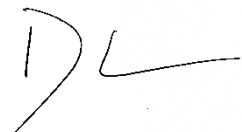
Enero 2021

D. David Navarro Ortega, Catedrático del Dpto. de Microbiología y Ecología de la Universitat de València y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Factores predictivos de desarrollo y evolución de infección activa por citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos”, realizado por el Ldo. Víctor Vinuesa Velasco, se ha llevado a cabo bajo su dirección y ha sido supervisado y aprobado para su presentación como Tesis Doctoral con el objetivo de obtener por parte de éste el grado de Doctor atendiendo a la normativa prevista en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a enero de 2021,



David Navarro Ortega

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a este trabajo. A pesar de que el juicio de una tesis doctoral recaer de forma individual sobre el doctorando, lo cierto es que hay mucha labor de equipo detrás. Esta máxima, que podría ser articulada a pie de campo por cualquier futbolista, por ser obvia no deja de ser cierta ni de merecer ser expresada.

Toda guía extraoficial para el depósito de una tesis doctoral indica como condición *sine qua non* que el primer agradecimiento debe ir dirigido a alabar al director de la tesis. Por suerte para mi conciencia, este agradecimiento es sincero (como supongo que lo será en el del 99,9 % de los doctorandos). Así que allá va. Querría dar las gracias a David por todo el tiempo que ha dedicado a mi formación (microbiológica y no microbiológica) y por mostrarme el tipo de profesional que quiero ser.

Hay dos personas especiales que han participado especialmente en esta tesis doctoral: Estela y Eliseo. Si la figura del “medio doctorado” existiera (y, sobre todo, si puntuase para algún tipo de bolsa, beca, contrato u oposición), lucharía para que se lo convalidaran. Todo agradecimiento es poco. También querría destacar a todo el Servicio de Microbiología Clínica del HCUV, donde he dejado a grandes amigos, compañeros y profesionales. Dixie, Nacho, Rocío, Sandrine, Susana...La lista es extensa y no desearía ofender a nadie por omisión o por aburrimiento.

Querría agradecer al Servicio de Hematología del HCUV, al programa de Control de Calidad de la SEIMC (en concreto a María Ovies) y a la Unidad Mixta “Infección y Salud Pública” de FISABIO por su colaboración en los distintos trabajos de esta tesis doctoral.

Por último, y no por ello menos importante (afirmación también muy manida), reconocer a mi familia el sustento físico y ético. A mi hermano, que me “obligara” a leer el diccionario para que muchos años después ahorrarse tiempo al no tener que buscar (averiguar, explorar, indagar, escudriñar, inquirir) demasiados sinónimos durante la redacción de esta tesis. Y a Sandra, por ser el acicate que me recuerda donde está el camino.

A mi abuelo

A Mateo

Presentación

Esta tesis doctoral se publica como compendio de artículos en virtud del reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral según lo dispuesto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas de doctorado.

Las publicaciones que componen esta tesis doctoral se citan a continuación por orden cronológico:

1. Vinuesa, V., Giménez, E., Solano, C., Gimeno, C., Navarro, D., & Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology Quality Control Study Group (2016). Would Kinetic Analyses of Plasma Cytomegalovirus DNA Load Help to Reach Consensus Criteria for Triggering the Initiation of Preemptive Antiviral Therapy in Transplant Recipients? *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(11), 1533–1535. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw608>
2. Vinuesa, V., Solano, C., Giménez, E., Piñana, J. L., Boluda, J. C., Amat, P., & Navarro, D. (2016). Lack of evidence for a reciprocal interaction between bacterial and cytomegalovirus infection in the allogeneic stem cell transplantation setting. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 29(11), 1196–1204. <https://doi.org/10.1111/tri.12831>
3. Vinuesa, V., Bracho, M. A., Albert, E., Solano, C., Torres-Puente, M., Giménez, E., González-Candelas, F., & Navarro, D. (2017). The impact of virus population diversity on the dynamics of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *The Journal of general virology*, 98(10), 2530–2542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000916>
4. Vinuesa, V., Giménez, E., Solano, C., Albert, E., Torres, I., Pérez, A., Hernández-Boluda, J. C., Piñana, J. L., & Navarro, D. (2019). Factors influencing cytomegalovirus DNA load measurements in whole blood and plasma specimens from allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 94(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.012>

ÍNDICE

Lista de abreviaturas y acrónimos	3
I. Introducción.....	7
1. El citomegalovirus humano (CMV)	
1.1. Estructura y ciclo biológico	
1.2. Transmisión, patogénesis y respuesta inmune	
2. CMV en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos	
2.1. Aspectos clínicos de la infección por CMV en pacientes receptores de alo-TPH	
2.2. Factores de riesgo asociados a la infección y enfermedad orgánica por CMV	
2.3. Manejo y monitorización de la infección activa por CMV	
II. Justificación y objetivos.....	21
III. Resultados.....	27
1. Análisis cinético de la ADNemia de CMV en plasma como criterio de consenso para iniciar el tratamiento antiviral anticipado en los receptores de trasplante	
2. Factores que afectan a la carga de ADN de CMV medida en muestras de SC y PL de receptores de alo-TPH	
3. Interacción entre las infecciones bacterianas y la infección activa por CMV en el alo-TPH	
4. Impacto de la diversidad de la población viral en la dinámica de la infección activa por CMV en el alo-TPH.	
IV. Discusión.....	51
V. Conclusiones.....	63
VI. Bibliografía.....	67
VII. Artículos.....	79
VIII. Anexos.....	113

Lista de abreviaturas y acrónimos

ADNemia: presencia de ADN de CMV en sangre

Alo-TPH: trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

CMV: citomegalovirus humano

D: donante

EICH: enfermedad injerto contra huésped

gB (L, N, O): glicoproteína B (L, N, O)

GT: genotipo

HLA: antígeno leucocitario humano (del inglés “*human leukocyte antigen*”)

IE: proteínas α o inmediatamente precoces (del inglés “*immediate early proteins*”)

LdC: límite de cuantificación

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: marco de lectura abierto (del inglés “*open Reading frame*”)

PL: plasma

pp65: fosfoproteína 65

QRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

R: receptor

SC: sangre completa

Td: tiempo de duplicación

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TOS: trasplante de órgano sólido

TPH: trasplante de precursores hematopoyéticos.

UI: unidades internacionales

UL: región única larga (del inglés “*unique long*”)

US: región única corta (del inglés “*unique short*”)

VEB: virus Epstein-Barr

VPP: valor predictivo positivo

I. Introducción

1. El citomegalovirus humano

1.1. Estructura y ciclo biológico

Citomegalovirus (CMV) o *Human herpesvirus 5* (familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesvirinae*, género *Cytomegalovirus*) es el miembro prototípico de los betaherpesvirus, una subfamilia que también incluye a los herpesvirus humanos 6 y 7 así como otros citomegalovirus animales (Kaletja, 2008).

El virión maduro de CMV posee un tamaño aproximado de 200-300 nanómetros. Su estructura se compone de dentro a fuera de: una molécula de ADN lineal bicatenario contenido en una nucleocápside icosaédrica, una matriz amorfa de composición proteica denominada tegumento y una bicapa lipídica que envuelve todo.

Dentro de los herpesvirus, CMV tiene el genoma más grande con 235 kilobases. Se han descrito alrededor de 200 posibles marcos de lectura abierta (ORF, del inglés *open reading frames*) que codifican para aproximadamente 180 proteínas (Davison et al., 2003). El genoma se divide en dos regiones únicas (**Figura I-1**), una larga (UL, del inglés *“unique long”*) y otra corta (US, del inglés *“unique short”*), cada una de las cuales se encuentra flanqueada por secuencias repetitivas internas (IRL e IRS, respectivamente) y terminales (TRL y TRS, respectivamente). La región central de UL contiene genes conservados, como los que codifican para la ADN polimerasa, y que tienen homólogos en otros herpesvirus. Sin embargo, el resto del genoma contiene genes que solo se encuentran en los betaherpesvirus o en CMV únicamente (Britt & Boppana, 2004; McGeoch et al., 2006). Además, existe una gran variabilidad genética entre cepas de CMV, llegándose a encontrar incluso poblaciones mixtas dentro de un mismo individuo (Pignatelli et al., 2004; Puchhammer-Stöckl & Görzer, 2011; Renzette et al., 2011).



Figura I-1. Esquema del genoma de CMV. IRL, *“internal repeat-short”*; IRS, *“internal repeat-long”*, UL, *“unique long”*; US, *“unique short”*, TLR, *“terminal repeat-long”*; TRS, *“terminal repeat-short”*.

El tegumento contiene la mayoría de proteínas del virión, siendo la fosfoproteína 65 (pp65) la más abundante de todas. Otras fosfoproteínas mayoritarias son pp71, pp150 o pp28. El papel de estas proteínas es diverso y abarca desde funciones estructurales y de formación de nuevos viriones a moduladoras de la respuesta inmune del hospedador (Kaletja, 2008). También van a estar implicadas en el inicio de la cascada de expresión genómica que dará lugar al ciclo lítico de CMV (Jean Beltran & Cristea, 2014).

Rodeando al tegumento, CMV presenta una envuelta lipídica que deriva del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi de la célula hospedadora. En ella se insertan glicoproteínas de origen vírico, como son la glicoproteína B (gB), gL, gN o gO. La interacción de estas proteínas con la membrana celular permite la adhesión de CMV y posterior liberación en el citoplasma de la nucleocápside y de las proteínas del tegumento (Varnum et al., 2004).

Una vez en el interior celular, la nucleocápside alcanza el núcleo y se libera el ADN viral. En células permisivas, la infección productiva va a estar dirigida por la expresión en cascada de tres tipos de proteínas: α , β y γ (**Figura I-2**). En primer lugar se expresan los genes α en las dos primeras horas tras la penetración celular. Estos primeros ARNm van a producir la síntesis de las proteínas α (también conocidas como IE, del inglés *immediate-early*), las cuales van a regular la transcripción de los genes β durante las siguientes 24 horas. Las proteínas β sintetizadas tienen como finalidad la replicación del genoma y la expresión de los genes γ de la tercera fase pasadas las 24 horas del inicio del ciclo replicativo. Estas últimas proteínas γ tienen funciones estructurales y entre ellas podemos encontrar proteínas de la nucleocápside, proteínas del tegumento o glicoproteínas de la envuelta (Stinski, 1978).

Tras la replicación del ADN y la síntesis de los distintos componentes del virión, la encapsidación del nuevo material genético ocurre en el núcleo celular. Estas nucleocápsides, ya en el citoplasma, se asocian con las proteínas del tegumento y, tras interactuar con el sistema retículo endoplásmico-Golgi, adquieren la envuelta lipídica para formar los viriones maduros que finalmente se liberarán tras fusión con la membrana celular (Jean Beltran & Cristea, 2014).

En ciertos tipos celulares los genes α o IE se reprimen abortando el ciclo replicativo. Como consecuencia CMV entra en una fase de latencia (en forma de ADN circular o episoma) en la que no se producen nuevos viriones pero sí existe una persistencia del

virus en el hospedador. Aunque no se ha definido el mecanismo preciso ni donde ocurre esta fase de latencia, se ha visto que las células no diferenciadas de la línea mieloide (principalmente monocitos y células precursoras CD34+) tienen un papel importante (Sinclair & Sissons, 2006). Otro tipo celular que parece estar implicado en la latencia de CMV son las células endoteliales. Este hecho podría explicar la latencia y recurrencia que se ha descrito en diferentes órganos (Reddehase et al., 1994).

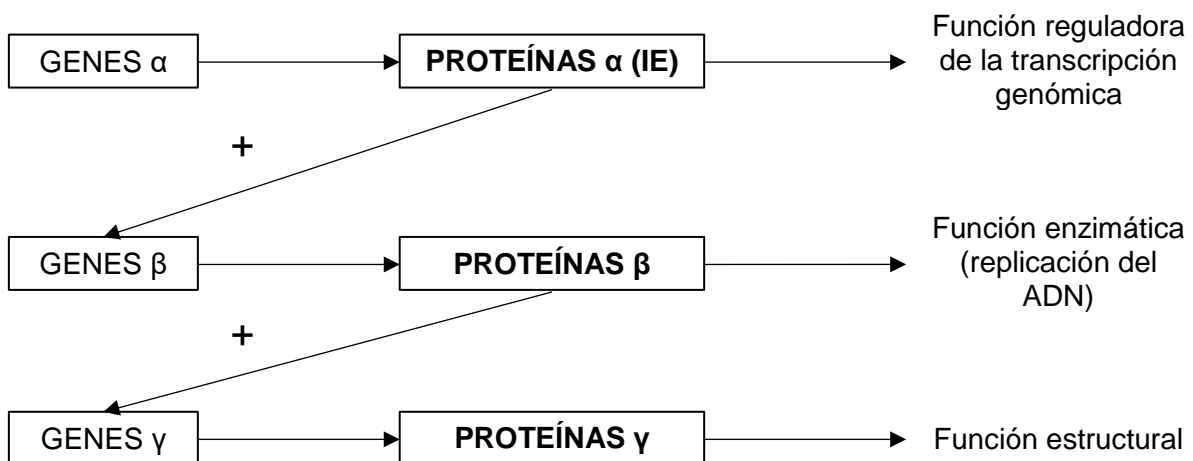


Figura I-2. Cascada de expresión genómica.

Desde este estado de latencia, CMV puede reactivarse originando una nueva fase replicativa. La reactivación ocurre en situaciones de inmunodepresión, inflamación o estrés (Prösch et al., 2000). El proceso tampoco es del todo conocido; sin embargo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) parece tener un rol clave en la inducción de una cascada de reacciones que van a activar la transcripción de los genes IE (que iniciarán un nuevo ciclo replicativo) (Fiezte et al, 1994).

1.2. Transmisión, patogénesis y respuesta inmune

La infección por CMV tiene una altísima seroprevalencia mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde puede llegar al 80-90% (Staras et al., 2006; Fishman, 2013). En los países desarrollados la prevalencia ronda el 60% (Gkrania-Klotsas et al., 2013) y está muy relacionada con las condiciones socioeconómicas y con la edad (es

mayor en ancianos que en jóvenes). La transmisión de CMV se produce por contacto directo con saliva, orina, secreciones vaginales, semen, lágrimas o leche materna de personas infectadas. También puede transmitirse a través de transfusiones de sangre, trasplante de órgano sólido (TOS) y trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH). Por último, CMV se puede transmitir de forma vertical durante el embarazo (Sia & Patel, 2000).

La infección primaria por CMV en personas inmunocompetentes normalmente es asintomática. Puede cursar con un síndrome mononucleósico, similar al provocado por el virus Epstein-Barr (VEB), con fiebre, mialgia, linfadenopatía y hepatomegalia (Sissons & Carmichael, 2002). Las vías de entrada habituales suelen ser el epitelio genitourinario, el tracto digestivo y el tracto respiratorio. Posteriormente alcanza el torrente sanguíneo y se disemina por el organismo infectando distintos tipos celulares como algunos leucocitos, células endoteliales y células del músculo liso (Sinzger et al., 2008). Tras esta primera infección, CMV entra en una fase de latencia (en precursores mieloides no diferenciados y células endoteliales principalmente) desde la que puede producir infecciones recurrentes ante algunos estímulos (generalmente inflamatorios) como hemos descrito en el apartado anterior.

Mientras que las complicaciones por CMV en individuos inmunocompetentes son raras, la infección en personas inmunodeprimidas puede ser perniciosa, bien sea una primoinfección, una reactivación o una reinfección por una cepa distinta. En estos pacientes, la infección por CMV suele ir acompañada de fiebre y puede derivar en una enfermedad orgánica por CMV en la que hay una invasión tisular severa (Ljungman et al., 2002). Los cuadros más habituales son la neumonía intersticial, la enterocolitis, la hepatitis, la retinitis o la encefalitis.

Tras el inicio de la infección, el sistema inmune del hospedador controla la replicación de CMV. El virus puede ser reconocido por receptores tipo Toll, induciendo la secreción de citoquinas inflamatorias que van a reclutar distintas células de la inmunidad innata (Crough & Khanna, 2009). Las células NK ("*natural killers*") parecen tener un papel importante en la aclaración de la infección (Kuijpers et al., 2008). Su deficiencia se ha asociado con enfermedad por CMV (Biron et al., 1989).

El virión maduro de CMV es una partícula muy inmunógena que produce una fuerte activación policlonal del sistema inmune adaptativo. La inmunidad celular constituye el

principal mecanismo para limitar la replicación de CMV, siendo la fosfoproteína pp65 y las proteínas IE-1 e IE-2 las que producen una respuesta inmunodominante (Crough & Khanna, 2009). Tanto la respuesta T CD8+ como la respuesta T CD4+ son necesarias para el control de la infección; la expansión suficiente de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos contra CMV se ha correlacionado con la prevención de la infección por CMV y de su evolución a enfermedad orgánica (Einsele et al., 2002; Solano et al., 2008).

A diferencia de la inmunidad celular, el rol de la inmunidad humoral en la resolución de la infección por CMV no está claro que sea tan determinante. Las principales dianas de los anticuerpos neutralizantes contra CMV son las glicoproteínas de la envuelta gB (responsable de la unión y penetración en la célula hospedadora) y gH (responsable de la fusión de la envuelta de CMV con la membrana celular del hospedador) (Rasmussen et al., 1991). La presencia de estos anticuerpos neutralizantes no parece evitar la infección por CMV aunque sí limitan su diseminación y gravedad (Jonjic et al., 1994).

Además de la capacidad de latencia y recurrencia, el éxito de CMV como patógeno también se debe a su habilidad para evadir la respuesta inmune. Tanto proteínas del tegumento así como otras proteínas sintetizadas en las primeras fases de la infección son capaces de tomar el control de la célula hospedadora e inhibir algunos mecanismos de defensa como la inducción de apoptosis o la producción de interferón (Marshall & Geballe, 2009; McCormick, 2008). A su vez, CMV también interfiere en la respuesta inmune celular al inhibir las funciones de las células NK o impedir la presentación de antígenos necesaria para la activación de los linfocitos T (Boeckh & Geballe, 2011). Por último, CMV puede producir quimiocinas y citoquinas propias que participan en la evasión del sistema inmune; un ejemplo sería una interleuquina 10 vírica (cmvIL-10), que es capaz de unirse al mismo receptor que su homóloga humana y que podría cumplir las mismas funciones inmunosupresoras (Slobedman et al., 2009).

2. CMV en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

2.1. Aspectos clínicos de la infección por CMV en pacientes receptores de alo-TPH

El estado de inmunosupresión que sigue al trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH) hace a estos pacientes susceptibles de contraer todo tipo de

infecciones. En concreto, CMV causa una elevada morbilidad y mortalidad en el contexto del alo-TPH. Estas infecciones por CMV son debidas principalmente a la reactivación del virus latente en receptores seropositivos (R+), aunque, en menor medida, también están relacionadas con primoinfecciones en receptores seronegativos (R-) o con reinfecciones por cepas heterotípicas presentes en el injerto del donante seropositivo (D+) (Boeckh et al., 2003).

Alrededor de dos tercios de los pacientes sometidos a alo-TPH van a presentar una infección activa por CMV, diagnosticada por la presencia del ADN del virus en la sangre (ADNemia). En ausencia de tratamiento antiviral, 25-30% de estos pacientes desarrollaran una enfermedad orgánica por CMV, la cual se manifiesta principalmente en forma de neumonía intersticial, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, retinitis o encefalitis. La mortalidad en estos casos es elevada (Boeckh et al., 2003; Pérez-Romero et al., 2015). Para llegar a un diagnóstico de enfermedad orgánica por CMV es necesaria la confluencia de signos y/o síntomas de patología en un órgano o sistema concreto y la determinación de CMV en muestras tisulares o de otro tipo de dicho órgano. La detección de CMV debe realizarse por aislamiento del virus en cultivo, por técnicas inmunohistoquímicas o histopatológicas o por hibridación *in situ*; no siendo válida la detección únicamente por PCR (salvo en retinitis y encefalitis) dada su alta sensibilidad y bajo valor predictivo positivo en determinadas muestras (Ljungman et al., 2002).

Lo más frecuente es que estas infecciones se den en la fase temprana posterior al TPH (en los primeros 100 días tras TPH), siendo la neumonía y la enterocolitis las manifestaciones clínicas más comunes. Con la introducción del tratamiento antiviral específico la incidencia de la infección temprana ha disminuido de forma significativa y la supervivencia de receptores de alo-TPH de alto riesgo ha aumentado (Goodrich et al., 1991; Schmidt et al., 1991). Sin embargo, la incidencia de enfermedad tardía por CMV (a partir del día 100 tras TPH), caracterizada por retinitis y encefalitis además de las manifestaciones anteriores, ha aumentado en los últimos años en parte como consecuencia de la mielotoxicidad asociada al tratamiento anti CMV que impide la adecuada reconstitución de inmunidad celular. En un estudio se ha cifrado la incidencia de enfermedad orgánica por CMV tardía en un 17,8% de los pacientes, con una tasa de mortalidad del 46%. Factores predictivos de la enfermedad tardía serían la carga viral de CMV en la fase temprana posterior al TPH, la linfopenia y la inmunodeficiencia de respuesta celular T específica frente a CMV (Boeckh et al., 2003).

Además de esta patogenicidad directa, CMV también va a causar en el receptor de alo-TPH ciertos efectos indirectos relacionados con las propiedades pro-inflamatorias o inmunosupresoras de algunas de las proteínas que sintetiza. De hecho, CMV está asociado con la ocurrencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda o crónica, lo que aumenta el riesgo de infecciones bacterianas o fúngicas (Nichols et al. 2002; Pérez-Romero et al., 2015).

2.2. Factores de riesgo asociados a la infección y enfermedad orgánica por CMV

Existen ciertos contextos clínicos dentro del alo-TPH que predisponen al paciente a una infección y enfermedad por CMV con mayor probabilidad: la edad avanzada del paciente, los injertos deplecionados de células T, los injertos de donantes no relacionados o con disparidad en el antígeno humano leucocitario (HLA), el uso de alentuzumab o inmunoglobulinas anti timocitos en el régimen de acondicionamiento, el uso de micofenolato de mofetilo como profilaxis contra la EICH o la administración de altas dosis de corticosteroides en el tratamiento de la EICH (Ljungman et al., 2006).

Uno de los factores más determinantes previos al TPH es el estado serológico del donante y del receptor. Los pacientes seropositivos (R+) tienen mayor riesgo de reactivación de CMV que los pacientes seronegativos (R-) tienen de primoinfección cuando reciben un injerto de un donante seropositivo (80% frente al 30% respectivamente; Ljungman, 2007). Además, el papel del donante también podría tener su relevancia. Los receptores seropositivos que reciben un injerto de un donante seropositivo (D+/R+) tienen una mayor supervivencia que los que reciben un injerto de un donante seronegativo (D-/R+). Esto podría justificarse por el retraso en la reconstitución de inmunidad celular específica frente a CMV que sufren los receptores de injertos seronegativos (Zhou et al., 2009).

El riesgo de infección y enfermedad por CMV en los primeros 100 días tras el trasplante en receptores seropositivos parece ser el mismo independientemente del tipo de régimen de acondicionamiento (mieloablatoivo o no mieloablatoivo). Sin embargo, el riesgo de enfermedad tardía por CMV si parece mayor en acondicionamientos no mieloablatoivos (Junghanss et al., 2002).

Otro factor de riesgo importante en el desarrollo de infección y enfermedad por CMV es la EICH, tanto aguda como crónica. La EICH aguda se ha relacionado con mayor reactivación, carga viral y enfermedad orgánica (Nichols et al., 2002), mientras que la EICH crónica es un factor de riesgo para enfermedad tardía por CMV (Einsele et al., 2000).

2.3. Manejo y monitorización de la infección activa por CMV

La aparición de fármacos activos frente a CMV supuso un descenso drástico de la incidencia de enfermedad orgánica en los pacientes sometidos a todo tipo de trasplantes. Ganciclovir y su derivado oral valganciclovir, inhibidores de la ADN polimerasa viral, son el tratamiento de elección en la infección activa y enfermedad orgánica por CMV (Eid & Razonable, 2010). En el contexto del alo-TPH, el uso de estos fármacos se ajusta preferentemente a una estrategia de tratamiento anticipado como prevención de la enfermedad orgánica por CMV por encima de una profilaxis universal antiviral. El tratamiento anticipado consiste en administrar la terapia antiviral solamente a aquellos pacientes a los que se detecte CMV en sangre por encima de un nivel determinado (Boeckh & Ljungman, 2009). Con ello se consigue limitar el uso de (val)ganciclovir comparado con la estrategia de profilaxis universal y así evitar los efectos adversos de este fármaco, principalmente la mielotoxicidad.

Uno de los inconvenientes del tratamiento anticipado es que requiere una monitorización frecuente y mediante técnicas sensibles para detectar al virus lo antes posible en caso de infección activa. La detección de CMV en sangre no implica necesariamente enfermedad orgánica, pero sí se ha correlacionado la magnitud de esta detección con el riesgo de desarrollar enfermedad orgánica por CMV (Emery et al., 2000). Es por ello, además de por ser una muestra fácil de obtener de forma rutinaria, que la detección de CMV en sangre es el método elegido para monitorizar a los receptores de alo-TPH dentro de una estrategia de tratamiento anticipado. Existen diferentes técnicas para determinar la presencia de CMV en sangre: el aislamiento de partículas víricas en cultivo (viremia), la detección del antígeno pp65 en leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica (antigenemia), la detección de ADN (ADNemia) y la detección de ARN (ARNemia) (Ljungman et al., 2002). Actualmente, la mayoría de los centros usan la detección de ADN por PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) para la

monitorización de CMV por su mayor sensibilidad, por la rapidez de obtención de resultados, porque permite la detección de CMV incluso en situaciones de leucopenia (a diferencia de la antigenemia) y porque se correlaciona mejor con la respuesta tras el inicio del tratamiento anti CMV (Boeckh et al., 1997; Gimeno et al., 2008). Sin embargo, la carga de ADN de CMV usada para guiar el inicio del tratamiento antiviral varía entre centros y suele validarse localmente. Lo más habitual es iniciar el tratamiento anticipado cuando la ADNemia alcanza un punto de corte establecido (entre 1.000 y 10.000 copias/ml en sangre completa y entre 100 y 10.000 copias/ml en plasma; Boeckh & Ljungman, 2009). En algunos centros este punto de corte puede variar en función de factores de riesgo individuales del paciente para el desarrollo de enfermedad orgánica por CMV así como del tiempo en el que se detecta la ADNemia de CMV (Boeckh & Ljungman, 2009). Opcionalmente, el tratamiento anticipado puede iniciarse cuando ocurre un incremento significativo en la ADNemia entre dos muestras consecutivas recogidas con siete días de diferencia como máximo. Se consideran incrementos significativos aquellos que superan el coeficiente de variación inter-ensayo de la técnica usada, que suele ser en torno a $0,5 \log_{10}$ (Boeckh & Ljungman, 2009). Por otro lado, tampoco existe unanimidad en la frecuencia con la que se debe hacer esta monitorización de CMV en sangre. Lo más habitual es realizarla semanalmente durante los primeros 100 días tras el trasplante para luego continuarla en cada revisión programada del paciente, aunque en algunos casos de mayor riesgo la monitorización semanal puede prolongarse más allá de los 100 días hasta confirmar la recuperación de la respuesta inmune específica frente a CMV (Andrews et al., 2011; Boeckh & Ljungman, 2009). En caso de episodio de infección activa, la monitorización de la ADNemia de CMV debería realizarse dos veces por semana, sobre todo en estos pacientes de mayor riesgo de enfermedad orgánica (Pérez-Romero et al., 2015). De ser necesaria la instauración de tratamiento antiviral, este debe mantenerse al menos 15 días e interrumpirlo tras dos resultados negativos de la QRT-PCR (Andrews et al., 2011; Boeckh & Ljungman, 2009).

Existen numerosos ensayos comerciales de QRT-PCR desarrollados y evaluados para la detección de CMV (Solano & Navarro, 2010). Estos ensayos pueden variar tanto en el gen diana amplificado como en el número de ellos que amplifican. Algunos centros han puesto a punto sus propios ensayos QRT-PCR, sin embargo suelen tener menor precisión y reproducibilidad que las pruebas comerciales. Por otro lado, se ha demostrado que el método de extracción de ADN utilizado también tiene un impacto significativo en la carga

viral de CMV dentro de un mismo ensayo QRT-PCR (Bravo et al., 2011). Además, se han descrito grandes diferencias en la determinación de la carga viral de CMV entre laboratorios para una misma muestra (Pang et al., 2009). Todo ello hace que sea complicado la comparación directa entre resultados ADNemia de CMV de diferentes centros. Con el objetivo de equiparar las distintas técnicas de QRT-PCR, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado el primer panel de referencia internacional de cuantificación de la carga de CMV que consiste en un preparado liofilizado del virus completo (cepa Merlin) al que se le ha asignado el valor de 5×10^6 unidades internacionales (UI) cuando se reconstituye en 1 ml de agua libre de nucleasas (Fryer et al., 2010). La calibración de cada técnica de QRT-PCR con el panel de referencia de la OMS debería mejorar la variación inter-ensayo e inter-centro y poder comparar directamente los resultados de ADNemia de CMV en diferentes centros. De esta forma se podrían establecer puntos de corte universales para iniciar y finalizar el tratamiento antiviral.

La monitorización de CMV en sangre suele realizarse mayoritariamente en una de estas dos matrices: plasma (PL) y sangre completa (SC). Las guías actuales para el manejo de la infección por CMV en el alo-TPH señalan ambas matrices como válidas para este propósito (Emery et al., 2013). La carga viral de CMV en SC es mayor que en PL debido a la presencia del virus en el compartimento celular de la sangre. Parte de este CMV “celular” podría corresponder a ADN latente, por lo que el uso de PL en vez de SC podría ser más indicativo de replicación viral. No obstante, los valores de ADNemia de CMV en PL y SC tienen una correlación significativa (Machida et al., 2000). Por último, la evaluación de la respuesta al tratamiento anti-CMV parece ser más predecible en SC que en PL (Gurtler et al., 2014).

Además del valor neto de la carga viral de CMV, se ha demostrado que el análisis de la cinética de replicación del virus también puede aportar información válida para la monitorización de la infección activa por CMV y ayudar a prevenir la enfermedad orgánica por CMV (Emery et al., 2000). El cálculo del tiempo de duplicación (Td) a partir de los datos de DNAemia de CMV por QRT-PCR de las dos primeras cargas virales positivas puede predecir la necesidad de terapia antiviral con antelación a alcanzar un valor umbral de carga viral (Giménez et al., 2014).

A pesar de que la monitorización de la carga viral de CMV en sangre es fundamental en el seguimiento del receptor de alo-TPH bajo una estrategia de tratamiento anticipado,

existen otros valores útiles, como la monitorización de la inmunidad específica para CMV, para complementar la información viral y realizar una terapia más dirigida. La monitorización inmunológica podría seleccionar aquellos pacientes con inmunidad suficiente frente a CMV en el momento en el que se detecta una infección activa y limitar el tratamiento antiviral, ya que podrían controlar el episodio de forma espontánea y no evolucionar a enfermedad orgánica (Avetisyan et al., 2007; Solano et al., 2011). Existen varios métodos disponibles para la cuantificación y caracterización funcional de la respuesta celular T específica frente a CMV, como la citometría de flujo o el QuantiFERON®-CMV. Sin embargo, la falta de estandarización de estos métodos o la ausencia de marcadores validados de protección frente a CMV hacen que la monitorización inmunológica no se emplee de rutina en el manejo del paciente receptor de alo-TPH (Pérez-Romero et al., 2015).

II. Justificación **y objetivos**

Citomegalovirus es una causa frecuente de morbilidad y mortalidad en el receptor de alo-TPH. CMV puede ocasionar enfermedad orgánica o tisular gracias a su citopatogenicidad, pero también incrementar el riesgo de superinfección bacteriana y fúngica y de la EICH a través de mecanismos indirectos relacionados con su capacidad inmunosupresora y pro-inflamatoria. En la actualidad se emplean dos estrategias terapéuticas para prevenir el desarrollo de enfermedad orgánica en el alo-TPH: (i) profilaxis universal con (val)ganciclovir, en la que el agente antiviral se administra a todos los pacientes en el momento del trasplante o cuando se produce el enraizamiento; (ii) tratamiento antiviral anticipado, en el que el antiviral se administra únicamente a los pacientes que alcanzan un determinado nivel de carga viral en sangre. Ambas estrategias se han mostrado eficaces en la prevención de la enfermedad orgánica precoz (aquella que se diagnostica antes del día 100 post-trasplante). La mayoría de centros emplean la estrategia del tratamiento antiviral anticipado guiado por QRT-PCR (monitorización virológica); sin embargo, esta estrategia es potencialmente mejorable. Se estima que un tercio de los pacientes son tratados innecesariamente, puesto que podrían resolver los episodios replicativos de CMV en ausencia de tratamiento antiviral. Asimismo, la duración de los tratamientos es, probablemente en muchos casos, mayor de lo estrictamente necesario. Por otra parte, resulta inherente al uso de esta estrategia una cierta permisividad con la replicación viral, cuya repercusión en la génesis de efectos indirectos es aún desconocida.

En este contexto, la determinación de factores que permitan predecir el desarrollo y la evolución de la infección activa por CMV en el receptor de alo-TPH posibilitaría la optimización del manejo terapéutico de estos pacientes. Con ese propósito, nos planteamos los siguientes objetivos en esta tesis doctoral:

- 1. Determinar si el tiempo de duplicación de la carga viral de CMV en plasma es un parámetro óptimo para comparar resultados entre distintos centros y poder universalizar el criterio para el inicio del tratamiento antiviral anticipado en el contexto alo-TPH.**

A pesar del advenimiento del panel de referencia de cuantificación de la carga de CMV de la OMS, Preiksaitis et al. han descrito como persisten las variaciones inter-ensayo (mediana de $1,5 \log_{10}$ UI/ml) e inter-centro para una misma muestra (Preiksaitis

et al., 2016). El análisis cinético de la carga viral de CMV en sangre, en lugar de una carga umbral para guiar el inicio del tratamiento antiviral anticipado en el alo-TPH, podría permitir la comparación directa de la experiencia de los distintos centros de trasplante y de este modo sentar las bases para la universalización de los criterios de inicio de tratamiento. Eso podría ser así porque la mayoría de los ensayos de QRT-PCR disponibles comercialmente muestran una linealidad exquisita, con coeficientes de pendiente que varían mínimamente entre ellas y que se aproximan a valores de R^2 de 1 (Clari et al., 2013).

2. Comparar la carga de ADN de CMV medida en muestras pareadas de SC y PL de pacientes sometidos a alo-TPH empleando una QRT-PCR validada para ambas matrices y evaluar el impacto en esta comparación de una serie de parámetros: naturaleza del episodio de infección activa (primoinfección contra recurrencia), uso de terapia antiviral y contenido celular de la sangre.

La monitorización frecuente de la ADNemia de CMV es inherente al uso de la estrategia de tratamiento anticipado. Esta monitorización virológica suele realizarse en SC o PL, siendo ambas matrices consideradas igualmente aptas para este cometido según las actuales guías y documentos de consenso para el manejo de la infección por CMV en el alo-TPH (Emery et al., 2013). Sin embargo, varios estudios señalan que las cargas virales de CMV medidas en ambos compartimentos no son iguales (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Garrigue et al., 2008; Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007). Desafortunadamente, pocos de ellos usaron técnicas moleculares aprobadas por agencias regulatorias (CE, FDA o ambas) para la cuantificación de la carga viral de CMV en las dos matrices (Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018), restándole valor al análisis comparativo. Por ello, queremos aportar nuevas evidencias a este tema empleando un ensayo validado para PL y SC. También valorar la influencia de una serie de factores en la cuantificación de la carga de ADN de CMV en ambas matrices y dilucidar si estos pueden ser responsables, al menos en parte, de la discrepancia de resultados entre estudios.

3. Analizar si se produce una actividad sinérgica entre CMV y bacterias en el periodo inmediato posterior al alo-TPH.

La recuperación de la respuesta inmune innata y adaptativa tras el alo-TPH es fundamental para evitar todo tipo de infecciones microbianas. Durante la fase neutropénica, que suele alargarse entre 14 y 30 días post-trasplante (según la fuente de los progenitores hematopoyéticos), las bacterias extracelulares producen cuadros infecciosos complicados (Engels et al., 1999). Además, el uso de altas dosis de corticoides para tratar la EICH aguda puede incrementar este riesgo de infecciones bacterianas (Engels et al., 1999). Por otro lado, la reconstitución de la inmunidad adaptativa T y de las células NK es crucial para el control de las infecciones víricas. Los receptores de alo-TPH son muy susceptibles a este tipo de infecciones durante el periodo post-trasplante inmediato (primeros 100 días), sobre todo a aquellas producidas por virus que producen infecciones crónicas o persistentes como CMV (Solano et al.; 2010). En este escenario, las interacciones entre bacterias y CMV son factibles. La acción de CMV sobre macrófagos (Sinclair, 2008) y células endoteliales (Span et al., 1992) durante una infección podría impedir la fagocitosis de las bacterias y facilitar el paso de las mismas a través de las mucosas. Análogamente, las infecciones bacterianas y fúngicas que ocurren precozmente después del trasplante generan inflamación, y, en consecuencia, podrían ser un factor desencadenante de la reactivación de CMV. Este es un hecho que ha sido acreditado exhaustivamente en el contexto clínico de la sepsis grave o el shock séptico en pacientes críticos sin inmunosupresión canónica; esta posibilidad, sin embargo, no ha sido investigada con suficiente rigor en el marco del alo-TPH. Como ventaja a estudios previos que de forma directa o indirecta evaluaron esta posibilidad, se usará una QRT-PCR ultra sensible.

4. Determinar la complejidad de variantes de CMV presentes en el receptor de alo-TPH durante los episodios de infección activa sistémica a través de la secuenciación masiva de las regiones hipervariables de los genes que codifican para gN y gO.

La demora o el fracaso en la resolución de los episodios de infección activa por CMV tratados con antivirales se han asociado a una expansión insuficiente o nula de linfocitos T CD8+ y T CD4+ frente a pp65 e IE-1 productores de IFN- γ y a la menor susceptibilidad

in vivo a los antivirales (Tormo et al., 2010; Giménez et al., 2014). Datos obtenidos en el marco del trasplante de órgano sólido sugieren que la complejidad de variantes de CMV presentes en el paciente se correlaciona directamente con la dificultad en el control inmunológico del episodio replicativo (Coaquette et al., 2004; Humar et al., 2003; Manuel et al., 2009). Se desconoce si esta situación se produce igualmente en el marco del alo-TPH. Por ello, queremos determinar la complejidad de variantes de CMV en estos pacientes durante episodios de infección activa y si esta condiciona el nivel replicativo del virus y la dinámica de aclaramiento de la ADNemia de CMV tras la instauración de tratamiento antiviral.

III. Resultados

A continuación se expondrán los resultados más relevantes de los cuatro artículos que componen esta tesis doctoral por compendio de publicaciones. El orden de la exposición atenderá al mismo establecido en los objetivos enumerados en el apartado anterior.

1. Análisis cinético de la ADNemia de CMV en plasma como criterio de consenso para iniciar el tratamiento antiviral anticipado en los receptores de trasplante

Para este estudio generamos un panel formado por 4 muestras de plasma humano (CC-1 a CC-4) con niveles crecientes de ADN de CMV hasta un máximo de 1301 UI/ml. Este valor estaría por debajo del umbral a partir del cual iniciamos el tratamiento antiviral anticipado en nuestro centro (1500 UI/ml). Basándonos en un estudio previo de Giménez et al. en el que demostraron que un Td menor o igual a 2 días anticipaba la necesidad de instaurar tratamiento antiviral en el receptor de alo-TPH con un valor predictivo positivo (VPP) del 100% (Giménez et al., 2014), diseñamos el panel de forma que con las 4 muestras pudiéramos reproducir los siguientes escenarios:

- A. CC-1 vs. CC-2: incremento de ADNemia analíticamente irrelevante (inferior a 3 veces).
- B. CC-1 vs. CC-3: incremento de ADNemia significativo con Td mayor a 2 días.
- C. CC-1 vs. CC-4: incremento de ADNemia significativo con Td menor o igual a 2 días.

El panel de muestras se remitió a 9 laboratorios para comparar su experiencia con la obtenida en nuestro propio centro. Con la selección de centros se buscó tener representación de las técnicas comerciales de QRT-PCR para CMV más usadas. En todos los casos se clasificó bien el escenario C, en todos menos uno el escenario A y en todos menos dos el escenario B (**Tabla III-1a**). Para este análisis se excluyeron los resultados obtenidos con el ensayo COBAS AmpliPrep Taqman CMV dado que la mayoría de las muestras reflejaron niveles indetectables de ADN de CMV. La variación entre resultados obtenida para cada muestra del panel fue siempre superior a 0,5 log₁₀ UI/ml (valor arbitrario definido como aceptable para la variación inter-ensayo de una QRT-PCR): mediana de 0,87 (rango: 0,77 a 0,95) log₁₀ UI/ml.

Tabla III-1a. Ensayos QRT-PCR evaluados y resultados de la carga de ADN de CMV del panel de muestras en los centros participantes

Centro	Método Extracción ADN ^a	QRT-PCR/ LdD (UI/ml) ^b	Tamaño de amplicón (nucleótidos) ^c	CC-1 (UI/ml)	CC-2 (UI/ml)	CC-3 (UI/ml)	CC-4 (UI/ml)	R ²	CC-1 vs CC-2 ^d	CC-1 vs CC-3 (Td en días) ^e	CC-1 vs CC-4 (Td en días) ^f
1	m2000sp (Abbott)	New Abbott RealTime CMV/35	95 (UL80.5)/105 (UL34)	301	505	904	1301	0,97	< 3 veces	2,55	1,28
2	m2000sp (Abbott)	New Abbott RealTime CMV/35	95 (UL80.5)/105 (UL34)	487	733	916	1387	0,95	< 3 veces	NC (<3 veces)	1,71
3	EasyMag (Biomérieux)	RealStar CMV PCR Kit 1.0 (Altona)/90	< 100	99	443	714	2231	0,83	> 3 veces	1,33	0,51
4	Nimbus (Werfen)	RealStar CMV PCR Kit 1.0 (Altona)/90	< 100	570	167	2179	2792	0,93	< 3 veces	2,01	1,12
5	COBAS 6800 (Roche)	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34,5	150	82	126	220	413	0,91	< 3 veces	2,67	1,10
6	COBAS 6800 (Roche)	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34,5	150	121	235	372	366	0,88	< 3 veces	2,34	1,60
7	COBAS 6800 (Roche) ^g	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34,5	150	121	230	359	560	0,97	< 3 veces	NC (<3 veces)	1,16
7	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	<137	<137	<137	ND	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)

8	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	156	244	<137	ND	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)
9	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	242	<137	<137	ND	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)	NC (CC-1 inferior a LdD)
10	QIASymphony SP (Qiagen)	CMV-Q Alert Kit (Nanogen)/ABI 7300/236	Desconocido	421	355	863	1269	0,84	< 3 veces	NC (<3 veces)	1,58

Abreviaturas: CMV, citomegalovirus; LdD, límite de detección; NC, no calculado; QRT-PCR, PCR cuantitativa en tiempo real; Td, tiempo de duplicación.

^{a,b} Técnicas realizadas siguiendo las instrucciones del respectivo fabricante: Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois; Altona Diagnostics, Hamburg, Alemania; Biomerieux, L'Etoile, Francia; Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italia; Qiagen, Valencia, California; Roche Diagnostics, Pleasanton, California; Werfen, Barcelona, España. LdD según fabricante.

^c Tamaño de amplicón según Preiksaitis et al., 2016. El tamaño de amplicón para Roche COBAS 6800 fue facilitado por una fuente oficial.

^d Pareja A (CC-1 vs CC-2) fue diseñada para representar un incremento no significativo de la carga de ADN de CMV (<3 veces).

^e Pareja B (CC-1 vs CC-3) fue diseñada para representar un incremento significativo de la carga de ADN de CMV, con un Td > 2 días. El Td de CMV fue calculado usando la función exponencial estándar: $Td = \ln 2 / K$ (constante de crecimiento), siendo $K = \Delta \ln \text{carga de ADN de CMV (CC-3 vs CC-1)} / \Delta \text{ tiempo}$ (arbitrariamente considerado como 7 días). Solo incrementos superiores a 3 veces la carga inicial fueron consideradas para el análisis.

^f Pareja C (CC-1 vs CC-4) fue diseñada para representar un incremento significativo de la carga de ADN de CMV, con un Td ≤ 2 días. Arbitrariamente fue considerado un Δ de tiempo de 3 días.

^g Las muestras del panel fueron reenviadas en hielo seco por petición del centro 7 para analizar de nuevo (COBAS 6800).

2. Factores que afectan a la carga de ADN de CMV medida en muestras de SC y PL de receptores de alo-TPH

Se analizaron 245 muestras pareadas de SC y PL procedentes de 43 episodios de ADNemia de CMV ocurridos tras el enraizamiento del injerto de 33 pacientes receptores de alo-TPH. De estos 43 episodios, 24 fueron iniciales y 19 fueron recurrencias. En global, 19 de los 43 episodios necesitaron de tratamiento antiviral anticipado (12 episodios iniciales y 7 recurrencias).

Tabla III-2a. Concordancia categórica de la detección de ADN de CMV en muestras pareadas de plasma y sangre completa de pacientes receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

ADN de CMV en plasma ^a	ADN de CMV en sangre completa (nro. de especímenes)		
	Cuantificable (>LdC)	Detectable pero no cuantificable (<LdC)	No detectable
Cuantificable (>LdC)	132	28	29
Detectable pero no cuantificable (<LdC)	0	3	4
No detectable	5	15	29

CMV, Citomegalovirus; LdC, límite de cuantificación.

^a Según el fabricante, tanto el límite de detección (LdD) como el LdC son 31.2 UI/ml (95% intervalo de confianza) par plasma y 62.4 IU/ml (95% intervalo de confianza) para sangre completa. No obstante, el ensayo es capaz de detectar niveles de ADN de CMV inferiores a este punto de corte en ambas matrices con un intervalo de confianza inferior (75%). En nuestra experiencia, estas cargas de ADN de CMV tan bajas no suelen ser ruidos de la técnica, ya que habitualmente aumentan en siguientes muestras alcanzando niveles cuantificables (datos no publicados). Por tanto, las muestras que cumplían estas características has sido categorizadas como ADN de CMV detectable pero no cuantificable.

De las 245 parejas de muestras, 192 (78,4%) coincidieron en el resultado categórico (positivo, incluyendo los detectables no cuantificables, o negativo) (índice Kappa, 0,385; $p < 0,001$). Un resultado discordante fue obtenido en 53 parejas de muestras (21,6%) (**Tabla III-2a**). De ellas, 33 fueron positivas en PL pero negativas en SC (mediana 1,71 \log_{10} UI/ml de ADNemia; rango 1,48-2,92 \log_{10} UI/ml). Por el contrario, 20 fueron

positivas en SC pero negativas en PL (mediana 1,79 \log_{10} UI/ml; rango 1,79-2,39 \log_{10} UI/ml). A nivel cuantitativo, la carga de ADN de CMV fue significativamente mayor en PL que en SC (**Figura III-2a**), mostrando un sesgo positivo de 0,115 \log_{10} UI/ml (**Figura III-2b**). Esta tendencia perdió significado estadístico si analizamos solamente aquellas muestras con cargas bajas de ADN (definidas arbitrariamente como igual o menores de 1000 UI/ml) (**Tabla III-2b**). En general, las cargas de ADN medidas en SC y en PL correlacionaron significativamente. Sin embargo, esta correlación fue menor, aunque significativa, para pares de muestras con bajo contenido de ADN de CMV (**Figura III-2c**). Estos resultados se repitieron cuando los episodios iniciales y las recurrencias fueron considerados por separado para el mismo análisis.

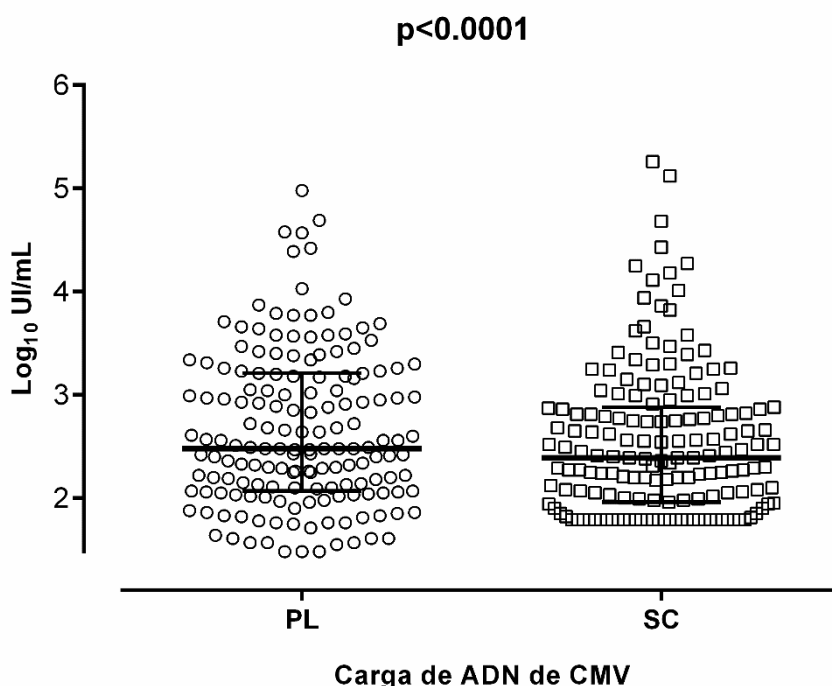


Figura III-2a. Cargas de ADN de CMV (\log_{10} UI/ml) en 163 muestras de PL y SC de pacientes alo-TPH con resultado positivo (detectable) por QRT-PCR en ambas matrices. A las muestras con ADN de CMV detectable pero por debajo del límite de cuantificación (LdC) se les asigno arbitrariamente el valor nominal de 1,48 \log_{10} UI/ml en PL y de 1,79 \log_{10} UI/ml en SC (0,01 \log_{10} UI/ml inferior al LdC en estas matrices).

En este estudio también se evaluó la influencia de ciertos factores sobre la carga de ADN de CMV en PL y SC. Uno de ellos fue el uso de tratamiento antiviral. De los 163

Resultados

pares de muestras con carga viral detectable, 73 (44,8%) fueron obtenidos de pacientes bajo tratamiento para CMV. El contenido de ADN de CMV en las muestras de PL post-tratamiento fueron significativamente mayores que en las muestras de SC (mediana 3,0 \log_{10} UI/ml; rango 1,61-4,98 \log_{10} UI/ml en PL y mediana 2,65 \log_{10} UI/ml; rango 1,79-5,12 \log_{10} UI/ml en SC), mientras que en las muestras pre-tratamiento no existieron diferencias significativas.

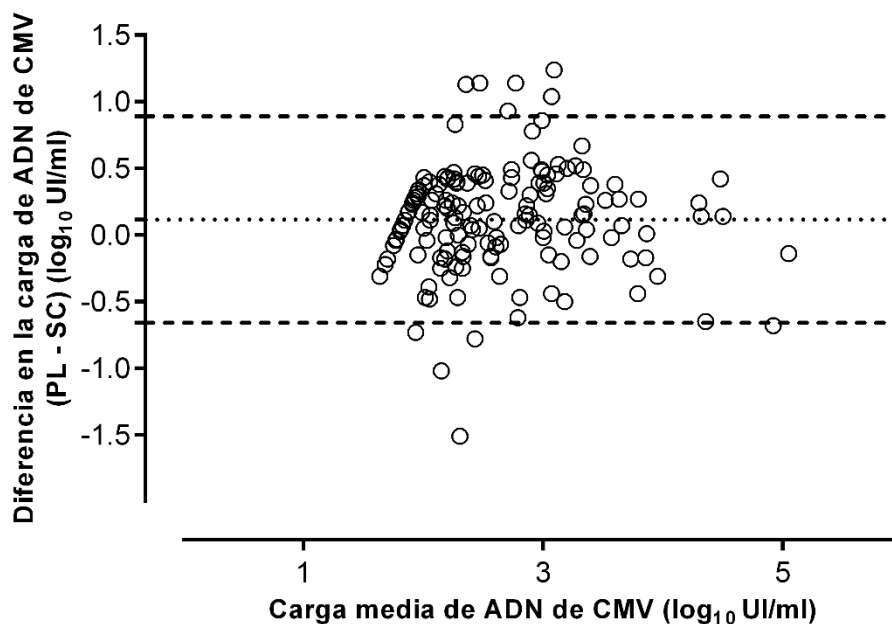


Figura III-2b. Análisis de Bland-Altman de las cargas de ADN de CMV medidas en los 163 pares de PL y SC de receptores alo-TPH.

Tabla III-2b. Cargas de ADN de CMV en muestras pareadas PL y SC de receptores alo-TPH

Categorías (nro. De muestras) ^a	Carga de ADN de CMV en PL (\log_{10} UI/ml) ^b		Carga de ADN de CMV en SC (\log_{10} UI/ml) ^b		P valor
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
Total (163)	2.48	1.48-4.98	2.39	1.79-5.26	<0.0001
≤ 3 \log UI/ml (113)	2.25	1.48-3.0	2.18	1.79-3.43	0.058
> 3 \log UI/ml (50)	3.46	3.02-4.98	3.22	1.9-5.26	<0.0001

^aLas categorías fueron establecidas arbitrariamente según la carga viral medida en PL en el análisis de rutina. En general, estas cifras difieren <0,11 \log_{10} UI/ml del valor medido en las muestras de PL criopreservado.

^bA las muestras con ADN de CMV detectable pero por debajo del límite de cuantificación (LdC) se les asignó arbitrariamente el valor nominal de 1,48 \log_{10} UI/ml en PL y de 1,79 \log_{10} UI/ml en SC (0,01 \log_{10} UI/ml inferior al LdC en estas matrices).

Otro factor analizado fue el contenido celular de la sangre. En 158 de las 163 parejas anteriores se disponía de información contemporánea sobre la celularidad en sangre. El recuento de leucocitos totales fue significativamente mayor en aquellas muestras en las que la carga de ADN de CMV fue superior en SC que en PL ($n = 57$) (**Figura III-2d**). Sin embargo, el número total de linfocitos y de monocitos no fue significativamente diferente independientemente de si la carga viral de CMV fue mayor en SC o en PL (**Figura III-2d**).

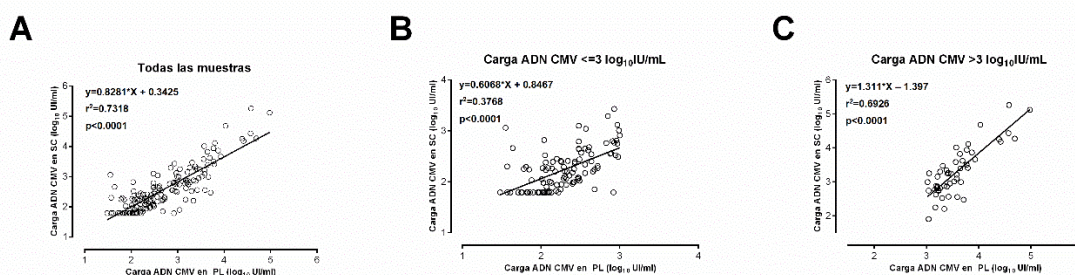


Figura III-2c. Correlación lineal entre las cargas de ADN de CMV cuantificadas en PL y SC. (A) Correlación con todos los pares de muestras incluidos en el análisis. A las muestras con ADN de CMV detectable pero por debajo del límite de cuantificación (LdC) se les asigno arbitrariamente el valor nominal de $1,48 \log_{10}$ UI/ml en PL y de $1,79 \log_{10}$ UI/ml en SC ($0,01 \log_{10}$ UI/ml inferior al LdC en estas matrices). Correlación entre cargas de ADN medidas en PL y SC según el contenido en PL en el análisis de rutina: (B) bajo contenido (cargas de ADN de CMV ≤ 1000 UI/ml) y (C) alto contenido (cargas de ADN de CMV > 1000 UI/ml). Se muestran los coeficientes de Spearman y el p valor.

Por último, se comparó la cinética de la ADNemia de CMV en ambas matrices. El Td se pudo calcular en 28 de los 43 episodios del estudio. Las medianas del Td del ADN de CMV en ambas matrices fueron comparables (mediana 2,01 días; rango 0,93-4,77 días en PL y mediana 2,32 días; rango 0,92-5,28 días en SC; $p = 0,260$) y correlacionaron significativamente. Veinte de los 28 episodios comparados coincidieron en la clasificación categórica del Td (≤ 2 días frente a > 2 días) (índice Kappa 0,429; $p = 0,004$). La cinética de aclaramiento de la ADNemia de CMV tras instauración de tratamiento anticipado, inferida por la vida media, fue más rápida en SC que en PL (mediana 4,93;

rango 1,30-14,81 días en PL y mediana 2,43 días; rango 1,17-13,57 días en SC) aunque la diferencia careció de significación estadística ($p = 0,180$).

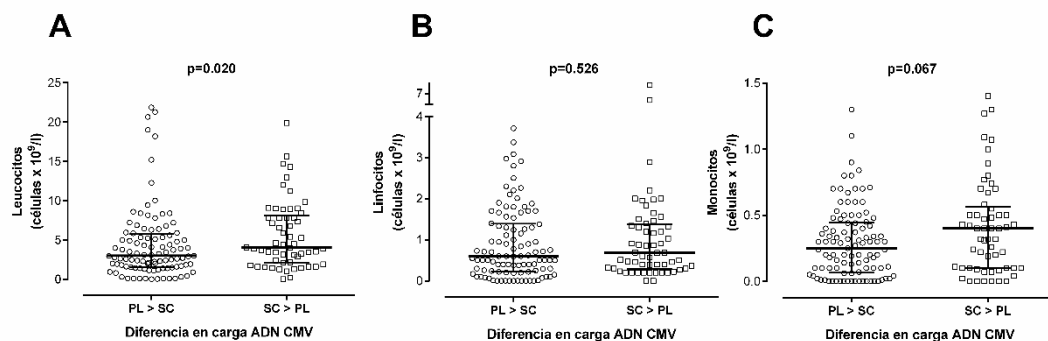


Figura III-2d. Impacto del recuento celular de la sangre en la carga de ADN de CMD medida en muestras pareadas de PL y SC de receptores de alo-TPH. El número de casos en los que la carga viral de CMV fue superior (cualquier incremento) en SC que en PL o viceversa fue enfrentado contra el número total de leucocitos (A), linfocitos (B) y monocitos (B) en muestras de sangre contemporáneas.

3. Interacción entre las infecciones bacterianas y la infección activa por CMV en el alo-TPH

En este estudio retrospectivo se evaluaron las posibles interacciones sinérgicas que podrían suceder entre bacterias patógenas y CMV en el contexto del post-trasplante inmediato. Se analizaron 173 alo-TPH en 170 pacientes durante los 60 primeros días tras el trasplante. En un total de 98 trasplantes (56,6%) se documentaron infecciones bacterianas a una mediana de 8 días (rango 0-59 días). Nueve pacientes tuvieron un segundo episodio durante el periodo de estudio (mediana 43 días; rango 7-58 días), para hacer un total de 107 episodios analizados. La ADNemia de CMV fue detectada en 124 alo-TPH (71,7%) a una mediana de 26 días (rango 6-60), de los cuales 86 necesitaron tratamiento antiviral anticipado. La mediana del pico de ADNemia en estos episodios fue 1715 IU/ml. No hubo episodios recurrentes el periodo de estudio. La detección de ambos sucesos ocurrió en 78 alo-TPH (62,9%) (**Tabla III-3a**).

Tabla III-3a. Ocurrencia de infección bacteriana y CMV ADNemia en la cohorte del estudio

	Nro. de alo-TPH (%)
No ADNemia de CMV	49 (28,3)
No infección bacteriana	29 (59,2)
Infección bacteriana	20 (40,8)
ADNemia de CMV	124 (71,4)
No infección bacteriana	46 (37,1)
Infección bacteriana	78 (62,9)
Anterior a ADNemia de CMV	42 (53,8)
Posterior a ADNemia de CMV	23 (29,4)
Concurrente a ADNemia de CMV	4 (5,1)
Infección bacteriana anterior y posterior a ADNemia de CMV	9 (11,5)

La ADNemia de CMV precedió a una infección bacteriana en 36 alo-TPH, de las cuales un 75% fueron bacteriemias. La mediana de tiempo transcurrido entre estos dos sucesos fue 25,5 días (rango 0-59). La incidencia acumulada de infección bacteriana a lo largo del periodo de estudio fue comparable independientemente de si los pacientes desarrollaron o no una infección activa por CMV previa ($p = 0,552$) (**Figura III-3a**). Lo mismo ocurría si se restringía el análisis a aquellos episodios de infección bacteriana documentados dentro los 15 días posteriores a la primera carga viral de CMV positiva ($n = 26$; $p = 0,271$) del alo-TPH (**Figura III-3a**). La mediana del pico de carga viral de los episodios de infección activa por CMV fue comparable sucediera una infección bacteriana posterior o no ($p = 0,248$). La ADNemia de CMV no resultó ser un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones bacterianas en un estudio de regresión de COX univariante.

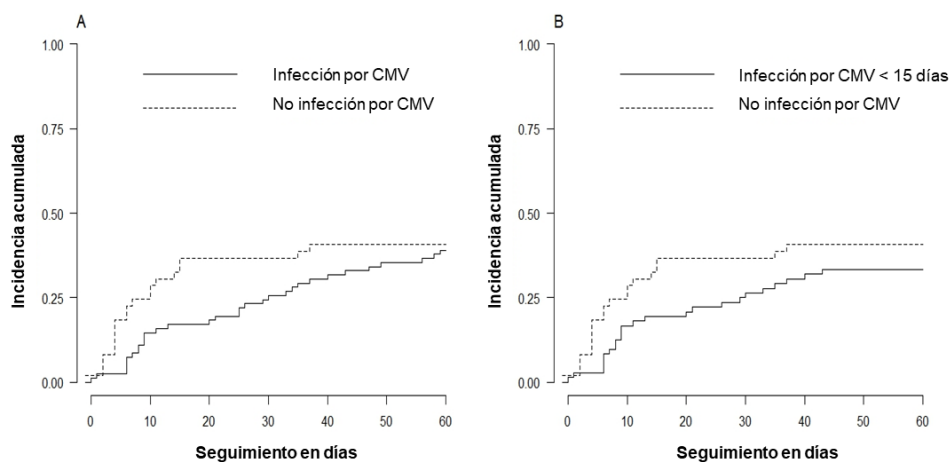


Figura III-3a. Impacto de la ADNemia de CMV en el riesgo de infección bacteriana subsiguiente en receptores de alo-TPH. (A) Incidencia acumulada total de infección bacteriana desde el día de la infusión de precursores hematopoyéticos (día 0) al día +60 después de trasplante en pacientes con o sin un episodio previo de ADNemia de CMV. (B) Incidencia acumulada de infección bacteriana en pacientes con o sin un episodio previo de ADNemia de CMV ocurrido con un máximo de 15 días de antelación.

La situación contraria, en la que una infección bacteriana precedía a un episodio de infección activa por CMV, se registró en 55 alo-TPH (38 causadas por bacterias gram positivas y 17 por gram negativas). La mediana del tiempo de diagnóstico de la infección bacteriana fue 7 días (rango, 0-41 días). De todos los episodios, 40 fueron bacteriemias. La incidencia acumulada de ADNemia de CMV durante el periodo de estudio fue comparable en los pacientes que tuvieron una infección bacteriana previa y en los que no ($p = 0,207$) (**Figura III-3b**). Lo mismo ocurrió cuando analizamos las infecciones por bacterias gram positivas y gram negativas por separado ($p = 0,156$ y $p = 0,319$ respectivamente) o cuando solamente se tuvieron en cuenta las bacteriemias ($p = 0,342$) (**Figura III-3b**). La incidencia acumulada de ADNemia de CMV tampoco fue significativamente diferente cuando se analizaron las infecciones bacterianas que ocurrían dentro de un rango temporal cercano (15 días) al inicio de la infección activa por CMV ($n = 25$; $p = 0,586$) (**Figura III-3b**). La mediana de la carga de ADN de CMV de los distintos episodios fue comparable ($p = 0,407$) independientemente de si fueron

precedidas o no de una infección bacteriana. Una infección bacteriana no resultó ser un factor de riesgo para el desarrollo de infección activa por CMV en un estudio de regresión de COX.

Por último, se analizó si la ocurrencia de una infección bacteriana durante un episodio de infección activa por CMV ($n = 25$) tuvo alguna influencia en la magnitud de la ADNemia de CMV. Tanto el pico de carga de ADN como la duración de la ADNemia de CMV fueron comparables independientemente de si el alo-TPH tuvo o no alguna infección bacteriana durante el episodio de infección activa (**Tabla III-3b**). El número de episodios que necesitaron la instauración de tratamiento antiviral también fue comparable en ambos grupos ($p = 0,324$).

Tabla III-3b. Efecto de la infección bacteriana que ocurre durante episodios de infección activa de CMV en la dinámica de la ADNemia de CMV

Parámetro	Infección bacteriana		P valor*
	Sí ($n = 25$)	No ($n = 48$)	
Necesidad de tratamiento antiviral, nro. (%)			
Sí	18 (72)	30 (62,6)	0,324
No	7 (28)	18 (37,5)	
Duración episodio CMV, mediana en días (rango)	44 (8-155)	49 (4-257)	0,508
Mediana del pico de carga de ADN de CMV en \log_{10} UI/ml (rango)	3,41 (1,47-4,80)	2,84 (0,89-6,15)	0,252

* Las diferencias entre medianas fueron comparadas mediante el *U*-test de Mann-Whitney. La comparación de frecuencias de variables categóricas fue analizada mediante la prueba de chi-cuadrado (prueba exacta de Fisher). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

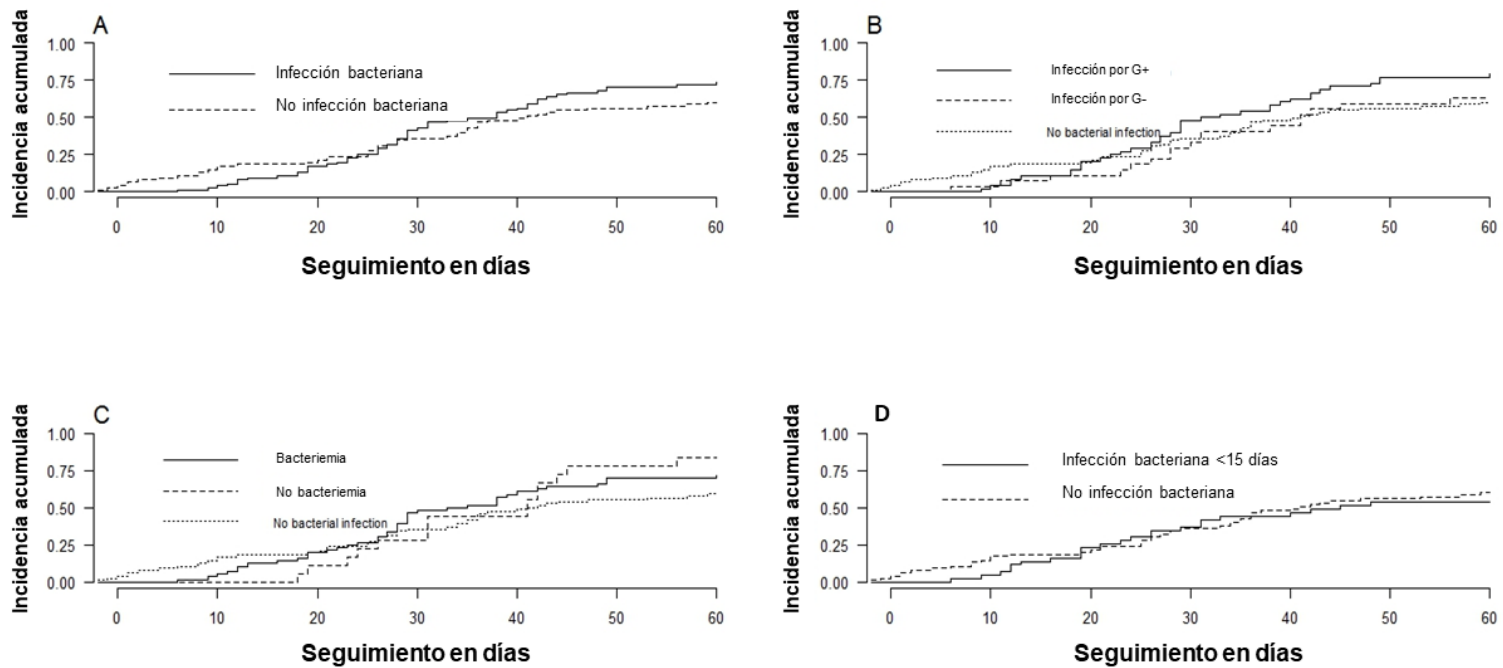


Figura III-3b. Análisis del potencial efecto de una infección bacteriana en el riesgo de ADNemia de CMV subsiguiente en el receptor de alo-TPH. (A) Incidencia acumulada total de ADNemia de CMV en pacientes con o sin un episodio previo de infección bacteriana desde el día del trasplante (día 0) y el día +60 post-trasplante. (B) Incidencia acumulada de ADNemia de CMV en pacientes con o sin un episodio previo de infección bacteriana causado por bacterias grampositivas o gramnegativas. (C) Incidencia acumulada de ADNemia de CMV en pacientes con o sin un episodio previo de bacteriemia. (D) Incidencia acumulada de ADNemia de CMV en pacientes con o sin un episodio previo de infección bacteriana ocurrida con un máximo de 15 días de antelación

4. Impacto de la diversidad de la población viral en la dinámica de la infección activa por CMV en el alo-TPH.

Para este estudio retrospectivo se seleccionaron 53 muestras de PL obtenidas durante 34 episodios de infección activa por CMV ocurridos en 30 pacientes no consecutivos sometidos a alo-TPH. La selección de especímenes se realizó con el objetivo de evaluar la diversidad genética de la población viral en un momento próximo a la instauración de tratamiento antiviral (muestras pre-tratamiento, $n = 34$), después del inicio del tratamiento antiviral (muestras post-tratamiento, $n = 15$) y durante episodios recurrentes ($n = 4$); así como de poder comparar entre los distintos momentos.

En primer lugar se analizaron las muestras obtenidas antes del inicio del tratamiento antiviral anticipado. El genotipado de CMV se realizó por secuenciación masiva de las regiones hipervariables de los genes que codifican para gN (UL73) y gO (UL74). De los 34 plasmas pre-tratamiento, cada uno perteneciente a episodios de ADNemia de CMV diferentes procedentes de 30 pacientes, solo se pudieron amplificar adecuadamente para la secuenciación masiva 29 de ellos; de ellos 21 fueron episodios iniciales desarrollados a una mediana de 33 días (rango 4-66 días) y 8 fueron episodios recurrentes desarrollados a una mediana de 140,5 días (101-368). Las características de estos episodios se pueden revisar en la **Tabla III-4a**.

Tabla III-4a. Características de los episodios de ADNemia de CMV incluidos en el estudio

Episodio	Carga inicial de ADN CMV	Carga pre-tto de ADN CMV	Carga post-tto de ADN CMV	Tiempo tras trasplante (muestras pre/post-tto)	Duración del episodio	Vida media de ADN CMV	Duración del tto
	Copias/ml			Días			
P01E1	31	20000	ND	49	58	2.22	44
P01E2	80	5200	ND	126	12	NC	0
P02	121	1652	1373	138/145	156	1.8	28
P03	27	17270	8538	44/54	137	6.88	126
P04	107	643	2039	94/124	112	6.26	77
P05	27	1521	13165	34/48	42	8.26	35
P06	60	2414	908	153/167	37	3.52	28

Resultados

Episodio	Carga inicial de ADN CMV	Carga pre-tto de ADN CMV	Carga post-tto de ADN CMV	Tiempo tras trasplante (muestras pre/post-tto)	Duración del episodio	Vida media de ADN CMV	Duración del tto
	Copias/ml			Días			
P07	70	991	ND	54	144	2.68	61
P08	41	2842	1323	80/84	37	5.77	23
P09	28	1637	1272	383/189	21	16.48	36
P10	29	2932	ND	47	51	4.57	46
P11	67	4782	967	54/70	51	2.73	46
P12	192	2400	1081	213/229	38	14.81	35
P14	226	1669	ND	106	100	5.41	105
P15E1	28	1154	ND	94	93	1.65	23
P15E2	39	962	ND	203	30	1.12	19
P16E1	497	2896	ND	44	53	11.7	52
P16E2	56	2028	ND	128	103	8.91	100
P17	26	1545	7961	62/76	79	9.38	61
P18	23	3778	8888	55/83	145	1.26	138
P19	262	4771	1161	38/90	110	1.4	112
P20	83	2081	1515	50/60	42	7.46	35
P21	1963	1374	ND	165	51	27.2	66
P22E1	45	1702	ND	45	33	9.06	31
P22E2	316	7039	ND	111	38	3.93	44
P23	116504	116504	1055374	54/63	88	1.03	102
P24	1079	1079	4708	22/27	35	16.67	34
P28	30	132629	ND	64	100	2.02	94
P32	21	6620	ND	286	403	82.3	154

CMV, citomegalovirus; NC, no calculado; ND, muestra no disponible para secuenciación masiva; tto, tratamiento

Se obtuvieron por secuenciación masiva una media de 93904 secuencias por muestra y conjunto de amplicones. La longitud de las variantes de gN y gO varió entre 349 y 361 nucleótidos y 246 y 255 nucleótidos respectivamente. En total se encontraron 15 variantes genéticas de la proteína gN (UL73): tres genotipos (GT) 1, dos GT2, dos GT3 y ocho GT4; seis coincidieron con la secuencia de referencia, siete fueron idénticas a secuencias

de GenBank y dos fueron secuencias nuevas (ambas se diferenciaban de la secuencia registrada más cercana en un solo nucleótido). De igual modo, se detectaron 13 variantes genéticas de la proteína gO (UL74): cinco GT1, cuatro GT2, dos GT3 y dos GT5; diez coincidieron con la secuencia de referencia, cuatro fueron idénticas a secuencias de GenBank y una fue una nueva secuencia (separada de la secuencia registrada más cercana en un nucleótido). Los árboles filogenéticos de las secuencias genéticas de UL73 y UL74 se pueden ver en la **Figura III.4a**. En 11 muestras pre-tratamiento se encontró una única variante de gN o gO, mientras que en las 18 restantes se encontraron más de una. Concretamente, en el caso de UL73 trece muestras contenían 2 variantes, cuatro contenían 3 variantes y una tenía 4 variantes; respecto a UL74 once, seis y una muestra(s) contenía(n) 2, 3 o 4 variantes respectivamente (**Figura III.4b, Tabla III.4b**).

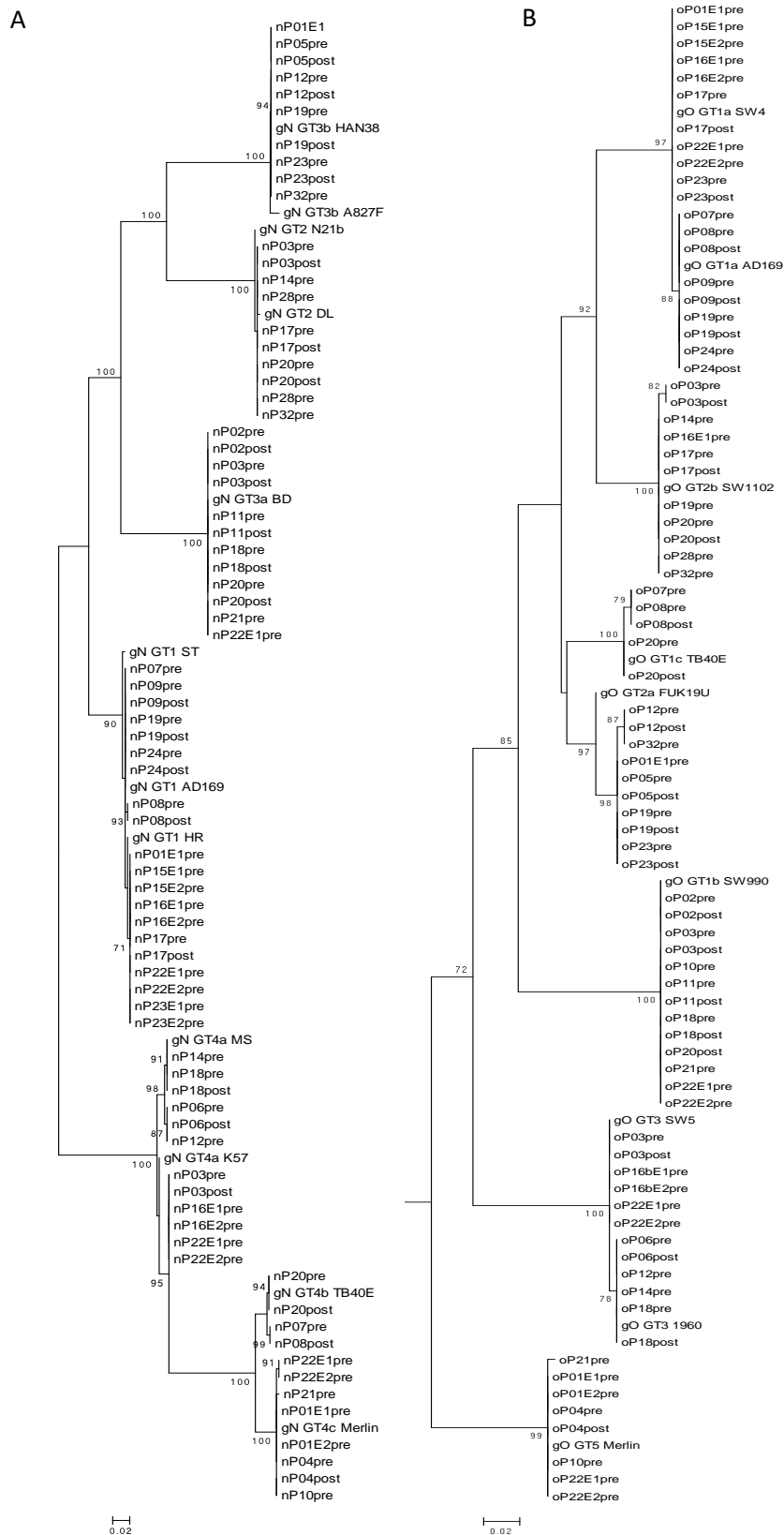


Figura III-4a. Reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud para las variantes genéticas de CMV. (A) Región polimórfica de gN (gen UL73, 366 pb). (B) Región polimórfica de gO (gen UL74, 257 pb). La escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótido.

Tabla III-4b. Variantes genéticas de las glicoproteínas N y O de CMV encontradas antes y después del inicio del tratamiento antiviral anticipado en el receptor de alo-TPH

Episodio/ muestra de plasma	Glicoproteína N (gN)		Glicoproteína O (gO)	
	Variante ^a	Frecuencia (%)	Variante ^a	Frecuencia (%)
P01E1pre ^b	GT4c_Merlin	63.6	GT5_Merlin	69.5
	GT3b_HAN38	22.1	GT2a_PAV24	19.3
	GT1_PAV12	14.2	GT1a_SW4	11.2
P01E2pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P02pre	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P02post	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P03pre	GT3a_BD	48.6	GT1b_SW990	43.0
	GT4a_PAV4	38.2	GT3_SW5	39.7
	GT2_PAV11	13.2	GT2b_new	17.3
P03post	GT3a_BD	37.8	GT1b_SW990	48.9
	GT2_PAV11	32.6	GT3_SW5	27.6
	GT4a_PAV4	29.6	GT2b_new	23.5
P04pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P04post	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P05pre	GT3b_HAN38	100	GT2a_PAV24	100
P05post	GT3b_HAN38	100	GT2a_PAV24	100
P06pre	GT4a_9cCMV	100	GT3_1960	100
P06post	GT4a_9cCMV	100	GT3_1960	100
P07pre	GT1_AD169	59.3	GT1a_AD169	69.5
	GT4b_PAV18	40.7	GT1c_PAV18	30.5
P08pre	GT1_new	60	GT1a_AD169	80.3
	GT4b_PAV18	40	GT1c_PAV18	19.7
P08post	GT1_new	100	GT1a_AD169	78.5
			GT1c_PAV18	21.5
P09pre	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
P09post	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100

Resultados

Episodio/ muestra de plasma	Glicoproteína N (gN)		Glicoproteína O (gO)	
	Variante ^a	Frecuencia (%)	Variante ^a	Frecuencia (%)
P10pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	86.2
			GT1b_SW990	13.8
P11pre	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P11post	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P12pre	GT3b_HAN38	99.1	GT2a_BE/12/2011	97.0
	GT4a_9cCMV	0.9	GT3_1960	3.0
P12post	GT3b_HAN38	100	GT2a_BE/12/2011	100
P14pre	GT2_PAV11	85.8	GT2b_SW1102	85.8
	GT4a_MS	14.2	GT3_1960	14.2
P15E1pre ^b	GT1_PAV12	100	GT1a_SW4	100
P15E2pre	GT1_PAV12	100	GT1a_SW4	100
P16E1pre ^b	GT4a_PAV4	97.4	GT1a_SW4	59.4
	GT1_PAV12	2.6	GT3_SW5	32.6
			GT2b_SW1102	8.0
P16E2pre	GT4a_PAV4	53.3	GT1a_SW4	67.7
	GT1_PAV12	46.7	GT3_SW5	32.3
P17pre	GT1_PAV12	50.3	GT1a_SW4	56.4
	GT2_U8	49.7	GT2b_SW1102	43.6
P17post	GT2_U8	51.0	GT1a_SW4	63.4
	GT1_PAV12	49.0	GT2b_SW1102	36.6
P18pre	GT3a_BD	91.9	GT1b_SW990	82.0
	GT4a_MS	8.1	GT3_1960	18.0
P18post	GT3a_BD	98.5	GT1b_SW990	98.8
	GT4a_MS	1.5	GT3_1960	1.2
P19pre	GT3b_HAN38	68.7	GT2a_PAV24	66.3
	GT1_AD169	31.3	GT1a_AD169	30.1
			GT2b_SW1102	3.6
P19post	GT1_AD169	54.7	GT1a_AD169	56.5
	GT3b_HAN38	45.3	GT2a_PAV24	43.5

Episodio/ muestra de plasma	Glicoproteína N (gN)		Glicoproteína O (gO)	
	Variante ^a	Frecuencia (%)	Variante ^a	Frecuencia (%)
P20pre	GT2_U8	44.1	GT1c_TB40E	42.5
	GT4b_TB40E	39.0	GT2b_SW1102	36.9
	GT3a_BD	16.9	GT1b_SW990	20.5
P20post	GT2_U8	47.9	GT1c_TB40E	46.5
	GT4b_TB40E	41.6	GT2b_SW1102	43.6
	GT3a_BD	10.5	GT1b_SW990	9.9
P21pre	GT4c_PAV16	74.8	GT5_BD	67.1
	GT3a_BD	25.2	GT1b_SW990	32.9
P22E1pre ^b	GT1_PAV12	55.3	GT1a_SW4	52.6
	GT3a_BD	28.6	GT1b_SW990	31.5
	GT4a_PAV4	9.4	GT3_SW5	13.0
	GT4c_new	6.8	GT5_Merlin	2.9
P22E2pre	GT1_PAV12	41.5	GT3_SW5	38.6
	GT4c_new	31.8	GT1a_SW4	35.5
	GT4a_PAV4	26.6	GT5_Merlin	25.9
P23pre	GT1_PAV12	88.1	GT1a_SW4	88.1
	GT3b_HAN38	11.9	GT2a_PAV24	11.9
P23post	GT1_PAV12	78.7	GT1a_SW4	86.1
	GT3b_HAN38	21.3	GT2a_PAV24	13.9
P24pre	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
P24post	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
P28pre	GT2_PAV11	60.1	GT2b_SW1102	100
	GT2_U8	39.9		
P32pre	GT2_U8	68.9	GT2b_SW1102	55.5
	GT3b_HAN38	31.1	GT2a_BE/12/2011	44.5

^a Referencia para las secuencias depositadas.

^b Dos episodios consecutivos de ADNemia de CMV (P01E1pre, P15E1pre, P16E1pre y P22E1pre y las primeras recurrencias P01E2pre, P15E2pre, P16E2pre y P22E2pre) fueron analizados para los pacientes P01, P15, P16, P22.

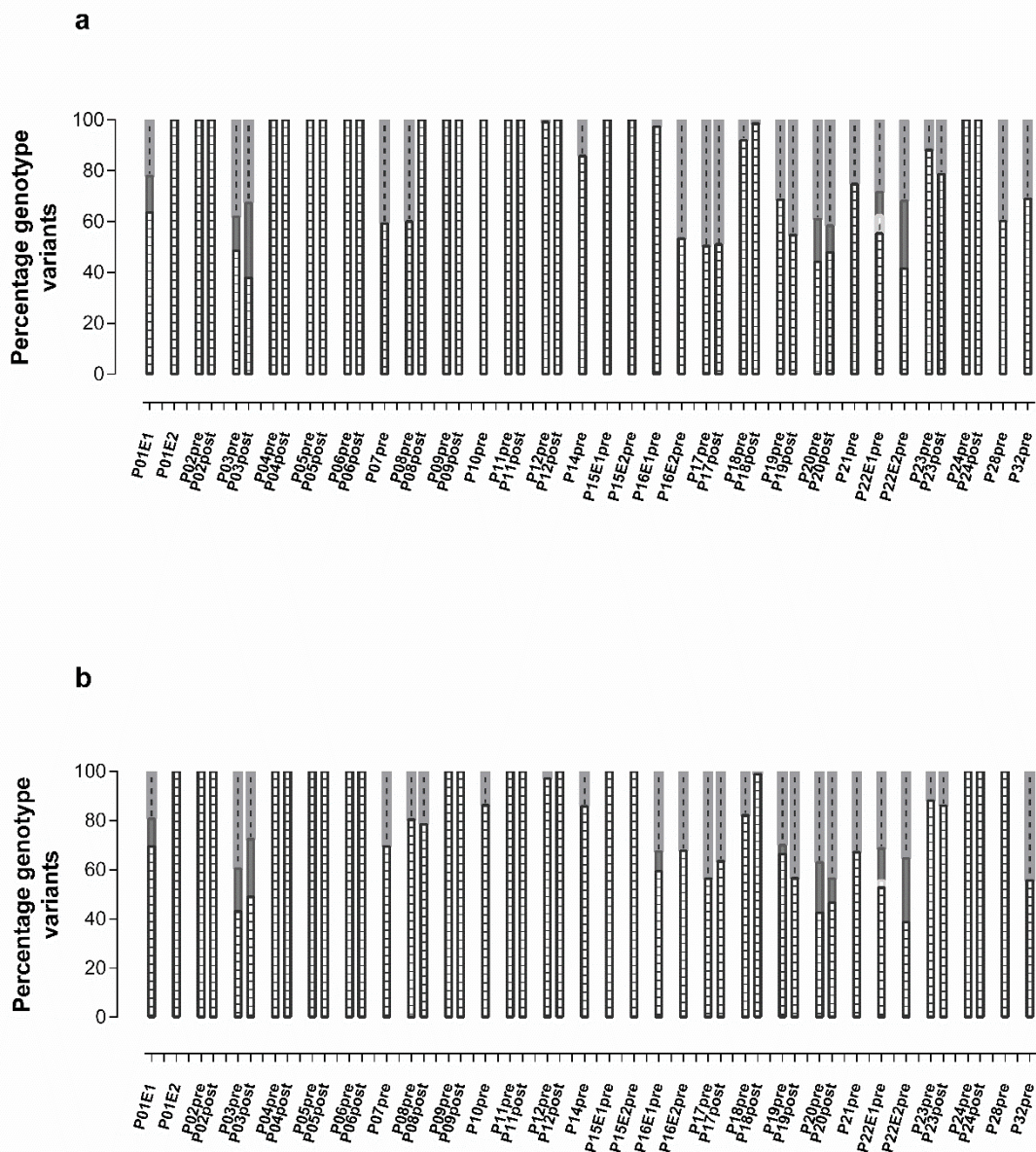


Figura III-4b. Diversidad de genotipos y frecuencias relativas de las variantes de gN (a) y gO (b) de CMV (genes UL73 y UL74 respectivamente) determinadas por secuenciación masiva en muestras de plasma pre- y post-tratamiento de receptores de alo-TPH que han desarrollado un episodio de ADNemia de CMV

Una vez analizada la diversidad genética de las muestras pre-tratamiento en las regiones que codificaban para gN y gO, se evaluó como esta influyó en la dinámica y en la duración de la ADNemia de CMV (**Tabla III4c**). Los episodios en los que se detectaron más de una variante (de gN, de gO, o de ambas) tuvieron un mayor pico de carga viral, una mayor duración de ADNemia y una vida media mayor; aunque estas diferencias no

fueron significativas. Sin embargo, la duración de la terapia antiviral necesaria para alcanzar el aclaramiento de la ADNemia de CMV fue significativamente mayor en aquellos episodios producidos por poblaciones mixtas de CMV (tanto para gN como para gO) en comparación a los episodios provocados por una sola variante genética de CMV.

Tabla III-4c. Características de los episodios de ADNemia de CMV según la diversidad genética del virus en muestras de plasma pre-tratamiento

		gN		gO	
		Una variante	Más de una variante	Una variante	Más de una variante
Nro. de episodios		11	18	11	18
Pico de carga de ADN CMV (copias/ml)	Mediana	4708	6962,5	4708	6962,5
	<i>P</i> -valor*	0,076		0,122	
Duración de la terapia antiviral (días)	Mediana	34	63,5	34	61
	<i>P</i> -valor*	0,002		0,007	
Duración del episodio de ADNemia de CMV(días)	Mediana	42	83,5	42	68,5
	<i>P</i> -valor*	0,076		0,146	
Vida media (días)	Mediana	4,05	6,33	3,12	6,33
	<i>P</i> -valor*	0,588		0,408	

*Las diferencias entre medianas se han comparado mediante la prueba U de Mann-Whitney. Un *P*-valor <0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Ningún factor demográfico ni ninguna característica clínica pre- o post-trasplante fue significativamente diferente entre pacientes con una infección mixta de CMV o con una única variante del virus. En concreto, el uso de dosis altas de corticoides para tratar la EICH aguda (que impide significativamente la expansión de células T funcionales específicas contra CMV; Tormo et al., 2010) fue comparable en ambos grupos. Cabe destacar que no se detectaron células T CD8+ polifuncionales específicas de CMV en la mayoría de los episodios en los que esta información estuvo disponible (11 de 13 episodios; 5 con población mixta de CMV y 6 con una sola variante) antes del inicio del

tratamiento anticipado (mediana 19 días; rango 7-30 días). Esto es relevante ya que el nivel periférico de estas células antes o en el momento del inicio de un episodio de infección activa por CMV influye de forma notoria en el aclarado de la ADNemia en el alo-TPH (Giménez et al., 2014; Tormo et al., 2010).

Posteriormente se evaluó el efecto del tratamiento antiviral en el número o frecuencia de las variantes genéticas de gN y gO de CMV. Se pudo disponer de una muestra post-tratamiento en 15 de los 29 episodios de ADNemia (obtenida a una mediana de 14 días; rango 4-52 días) (**Figura III.4b, Tabla III4b**). El análisis de estas muestras mostró diferencias significativas en el número o en la frecuencia de variantes entre la muestra pre- y la post-tratamiento en 7 episodios en el caso de gN y en 5 episodios en el caso de gO. En la mayoría de casos se produjo un descenso en la complejidad genética (menor número de variantes o menor frecuencia de una o más variantes). No se observó la aparición de nuevas variantes tras el tratamiento anti-CMV y las secuencias de las variantes individuales de UL73 y UL74 permanecieron estables con el paso del tiempo. También quisimos investigar si los cambios en la composición genética de gN y/o gO durante el tratamiento antiviral influyeron sobre la duración de este. Encontramos que el número de días de tratamiento necesarios para el aclaramiento de la ADNemia de CMV fue comparable independientemente de si hubo o no cambios en la población del virus ($p = 0,463$ y $p = 0,090$ para UL73 y UL74 respectivamente).

En último lugar, se examinó la variación en número o frecuencia de las variantes genéticas de gN y gO en episodios recurrentes de CMV. En 4 pacientes de nuestra cohorte tuvimos disponible una muestra del episodio recurrente. Se observaron diferencias significativas en las variantes genéticas entre la muestra del episodio inicial y la muestra del episodio recurrente en 3 de los 4 pacientes. En todos los casos se produjo una reducción en la complejidad de las poblaciones de CMV. Tampoco surgieron nuevas variantes respecto del episodio inicial.

IV. Discusión

El tratamiento antiviral anticipado como estrategia terapéutica frente a CMV en el receptor de alo-TPH ha resultado ser eficaz en la reducción de enfermedad orgánica temprana por CMV tras el trasplante, a la vez que ha permitido reducir los efectos adversos derivados de los fármacos anti-CMV actuales (principalmente mielotoxicidad). Sin embargo, es innegable que aún existe margen de mejorar para esta estrategia.

La monitorización virológica de CMV es la piedra angular que sustenta el tratamiento antiviral anticipado. La necesidad de establecer un criterio óptimo que permita identificar a aquellos pacientes que requieren la instauración de tratamiento para controlar la replicación de CMV convierte en vital la comparación de experiencias entre centros para la optimización de esta estrategia. Este criterio suele ser un valor nominal concreto de carga viral en sangre (generalmente una carga elevada de ADN de CMV en PL o SC determinada por QRT-PCR). Existen diversos factores, tanto propios como independientes de la muestra analizada, que influyen en la determinación de la carga viral en sangre (Bravo et al., 2011). Esto hace que en la práctica, a pesar del primer panel de referencia internacional para la cuantificación de la carga de CMV de la OMS (Fryer et al., 2010), sea difícil la comparación directa de resultados entre centros (Pang et al., 2009; Preiksaitis et al., 2016). Los resultados del primer estudio de esta tesis (Vinuesa, Giménez et al., 2016) sustentaron esta idea. En global, la variación entre centros considerando todas las muestras del panel fue del orden de un \log_{10} , aunque esta diferencia disminuyó cuando comparamos entre centros que empleaban la misma técnica comercial de QRT-PCR (variaciones de $0,18 \log_{10}$ UI/ml para el ensayo de Abbott o de $0,27 \log_{10}$ UI/ml para el ensayo de Roche 6800). Otro hallazgo de nuestro análisis fue la relación indirecta entre el tamaño del amplicón de la prueba realizada y la magnitud de la carga de ADN de CMV medida.

En nuestro estudio hipotetizamos que el análisis de la cinética de la carga viral de CMV sí podría permitir la comparación directa de resultados entre centros que disponen de las mismas o de diferentes técnicas de QRT-PCR. De las tres situaciones que diseñamos en el panel de muestras, todos los centros categorizaron correctamente la pareja C, todos menos uno la pareja A, y todos menos dos la pareja B. Precisamente esta pareja C es la que simulaba la situación en la que, según la estrategia validada en nuestro centro, se iniciaría el tratamiento antiviral anticipado (incremento entre muestras superior a 3 veces con un $T_d \leq 2$ días).

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones como el escaso número de centros participantes o la artificialidad de las muestras enviadas (a pesar de ser elaboradas a partir de muestras clínicas reales de pacientes receptores de alo-TPH en nuestro hospital).

En estudios previos de nuestro grupo se observó que un $T_d \leq 2$ días anticipaba la eventual necesidad de tratamiento antiviral anticipado en el receptor de alo-TPH con un VPP del 100% (Giménez et al., 2014), y que empleando este valor de T_d como criterio para la instauración del tratamiento anticipado se reducía significativamente el tiempo de terapia antiviral (Solano et al., 2016). Todo ello, sumado a los resultados de nuestro estudio, nos permite afirmar que el análisis de la cinética de la carga de ADN de CMV en sangre, concretamente el T_d , podría ser un marcador óptimo para la instauración de tratamiento anticipado frente a CMV y permitir la comparación directa de experiencias entre distintos centros.

Como ya hemos dicho, existen numerosos factores que influyen en la monitorización virológica. Uno de ellos es el tipo de muestra empleada para hacer el seguimiento de CMV. Actualmente, lo más frecuente es la elección de PL o SC para determinar la carga de ADN por QRT-PCR; siendo ambas matrices indistintamente recomendadas para dicho uso por las guías de consenso recientes para el manejo de la infección por CMV en el contexto del alo-TPH (Emery et al., 2013). Son numerosos los estudios que han abordado la comparación de la carga de ADN de CMV en PL y SC (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Garrigue et al., 2008; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007), pero solo dos (Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018) emplearon una QRT-PCR aprobada por agencias internacionales para su uso en las dos matrices al igual que hicimos nosotros en otra publicación de esta tesis doctoral (Vinuesa et al., 2019). En primer lugar, en nuestro estudio quisimos dilucidar si una de las matrices era superior a la otra para documentar la ADNemia de CMV. Según nuestra experiencia con la QRT-PCR de Abbott Molecular (Des Plaines, EEUU) el PL es ligeramente superior a la SC. Estos resultados están en línea con los obtenidos con el ensayo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV de Roche Diagnostics (Indianapolis, EEUU) (Babady et al., 2015; Dioverti et al., 2017; Suganda et al., 2016) y con el ensayo Artus® CMV QSR GQ de QIAGEN (Hamburgo, Alemania) (Lazzarotto et al., 2018). Podemos teorizar que esto se debe, al menos en parte, al mayor volumen de muestra usado en el caso del PL. También hay estudios que muestran resultados opuestos; en uno de ellos (Costa et al., 2016) emplean dos QRT-PCR diferentes

para detectar el ADN de CMV en PL y SC; en el otro (von Müller et al., 2007) usan una QRT-PCR sustancialmente menos sensible (COBAS AMPLICOR CMV MONITOR, Roche Diagnostics).

En segundo lugar, quisimos evaluar cómo de comparables son las cargas de ADN de CMV medidas en PL y SC. Numerosos estudios describen una correlación significativa entre ambas matrices (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Lazzarotto et al., 2018; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007), aunque la magnitud de la misma difiere notablemente entre ellos (R^2 desde 0,489 a 0,9575). En nuestros pares de muestras el grado de correlación global fue bastante bueno ($R^2 = 0,73$), aunque sustancialmente menor ($R^2 = 0,376$) cuando analizamos únicamente los pares de muestras con bajo contenido de ADN de CMV (arbitrariamente definido como ≤ 1000 UI/ml). Además, la carga de ADN de CMV en nuestro estudio ha sido superior en PL que en SC, cumpliéndose en todo el rango de valores de medidos. No obstante, la mayoría de la evidencia publicada a este respecto reflejaba la relación contraria (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Garrigue et al., 2008; Lazzarotto et al., 2018; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007), atribuido en parte a la alta asociación celular de CMV (Pérez-Romero et al., 2016). Existen diversas razones que pueden justificar estas discrepancias. En primer lugar, el grado de conmutabilidad del panel de referencia para la cuantificación de CMV de la OMS en ambas matrices difiere entre los distintos ensayos comerciales disponibles. De hecho, es aconsejable una validación de los factores de conversión de este panel de referencia facilitados por los fabricantes (Schnepf et al., 2013). En segundo lugar, el uso de QRT-PCR con un tamaño de amplicón grande (por ejemplo el ensayo de Roche tiene un tamaño de 340 nucleótidos, mucho mayor que los 95 nucleótidos de UL80.5 y los 105 nucleótidos de UL34 que detecta el ensayo de Abbott empleado en nuestro estudio) puede infraestimar en mayor medida la carga de ADN de CMV en PL que en SC. Esta afirmación se basa en dos hechos: (i) el ADN de CMV presente en PL es en su mayoría ADN libre altamente fragmentado en lugar de ADN asociado a viriones completos (Boom et al., 2002; Tong et al., 2017), mientras que la SC sí contiene estas partículas con el genoma intacto además de ADN libre, y (ii) los ensayos QRT-PCR con tamaños de amplicón pequeños reportan cargas de ADN de CMV mayores en PL comparados con los ensayos con un tamaño de amplicón grande (Preiksaitis et al., 2016; Tong et al., 2017).

En nuestro estudio, también analizamos algunos factores que podrían influir en las cargas de ADN de CMV obtenidas en cada matriz. Observamos que el recuento de leucocitos en sangre tras el enraizamiento del injerto tenía un impacto notable en la carga viral medida en PL y SC, en línea con estudios previos (Bressollette-Bodin et al., 2009). En concreto, el recuento total de leucocitos fue significativamente mayor en aquellos pares de muestras en los que la carga de ADN de CMV fue mayor en SC que en PL. Esto tiene sentido dado el papel de los neutrófilos como principales reservorios de ADN de CMV durante episodios de infección activa. También observamos que la diferencia de carga de ADN de CMV en PL fue significativamente mayor que en SC en aquellos pares de muestras obtenidos durante el tratamiento antiviral, mientras que no se observaron diferencias significativas en los pares pre-tratamiento. Este comportamiento podría explicarse por la declinación más lenta del nivel de ADN que parece ocurrir en PL respecto a SC, reflejada en una mayor vida media (aunque sin significación estadística). Otro estudio (Lazarotto et al., 2018) también reflejaron este comportamiento. A pesar de ello, el primer resultado de QRT-PCR indetectable se obtuvo en ambas matrices con la misma frecuencia, por lo que el uso de PL no llevaría a tratamientos más largos que si se usara SC para la monitorización virológica.

Una vez demostrado en la primera publicación de esta tesis doctoral (Vinuesa, Giménez et al., 2016) que el Td era un marcador que permitía sortear con relativa estabilidad la variabilidad inherente a los resultados de carga de viral de CMV en PL obtenidos con distintos ensayos QRT-PCR, quisimos comparar este parámetro en las dos matrices. Encontramos una concordancia aceptable entre el Td del ADN de CMV calculado en PL y SC, por lo que la validez de este marcador como criterio para iniciar el tratamiento anticipado se podría extender al uso de SC para la monitorización de CMV.

Todos estos datos ayudan a completar toda la experiencia publicada hasta la fecha y a puede que facilite a los distintos laboratorios en la elección de una matriz u otra para la monitorización de la ADNemia de CMV en los receptores de alo-TPH.

Es probable que CMV interactúe con otros patógenos en el contexto del alo-TPH. El estudio de estas conexiones tiene una elevada relevancia ya que podrían ayudar a predecir tanto el desarrollo como la evolución de la infección por CMV en estos pacientes. A su vez, por sus capacidades inflamatorias e inmunomoduladoras, CMV podría favorecer otro tipo de infecciones, afectando, esta vez de forma indirecta, a la supervivencia del receptor de alo-TPH. La posibilidad de que CMV pudiera inducir

superinfecciones bacterianas ha sido sugerida en numerosos estudios, aunque suelen basarse en evidencias indirectas. Por ejemplo, en Broers et al. (2000) se observó que los receptores seropositivos para CMV que recibieron un injerto deplecionado de células T tuvieron mayor riesgo de infección bacteriana en comparación con los pacientes D-/R-. En Nichols et al. (2002), se describió mayor riesgo de muerte por una infección bacteriana en pacientes seronegativos para CMV que recibieron un injerto de un donante seropositivo que no pudo ser vinculado a la neutropenia asociada al uso de ganciclovir como tratamiento de CMV. Sin embargo, estos autores no encontraron relación entre la presencia de antigenemia (pp65) y estas infecciones; a diferencia de Capellano et al. (2007), que sí encontró a la antigenemia como factor de riesgo para una bacteriemia en un modelo multivariante. La detección del antígeno pp65 como marcador de infección por CMV podría infraestimar el número de episodios reales dada su menor sensibilidad respecto a las QRT-PCR, sobre todo aquellos con cargas virales bajas que se controlan sin necesidad de tratamiento antiviral. A pesar de replicarse a niveles bajos, CMV podría tener igualmente efectos inmunomoduladores.

En este contexto, en esta tesis doctoral quisimos evaluar esta posible interacción entre CMV y bacterias en una cohorte retrospectiva de receptores de alo-TPH que fueron monitorizados sistemáticamente por QRT-PCR (Vinuesa, Solano et al., 2016). Nuestros datos no apoyan la idea de que una infección activa por CMV sea promotora de infecciones bacterianas en el post-trasplante inmediato. Por un lado, la incidencia acumulada de infecciones bacterianas fue comparable en pacientes con y sin infección por CMV previa. Tampoco la magnitud de la replicación del virus durante los episodios de infección activa estuvo relacionada con el riesgo de infección bacteriana subsiguiente. Por último, la ADNemia de CMV no fue un factor de riesgo significativo de infección bacteriana en un modelo de regresión de Cox. En línea con nuestros resultados, Boeckh et al. (2015) ha descrito que la profilaxis con valganciclovir, que impide la replicación de CMV, no fue superior reduciendo la incidencia de complicaciones en la infección tardía por CMV (entre ellas las infecciones bacterianas o fúngicas) respecto al tratamiento anticipado guiado por QRT-PCR.

Del mismo modo, analizamos el papel que podrían desempeñar las infecciones bacterianas en la reactivación y en la evolución de una infección activa por CMV. Componentes bacterianos como el lipopolisacárido, al igual que mediadores inflamatorios como TNF α , se han relacionado con la reactivación de CMV en modelos

murinos (Cook et al., 2006). Además, la sepsis de origen bacteriano ha sido identificada como factor de riesgo para la infección activa por CMV en receptores de trasplante de órgano sólido (Paya et al., 1993; Mutimer et al., 1997) y en pacientes críticos (Heininger et al., 2011). Sin embargo, en nuestra cohorte de pacientes no hemos encontrado que una infección bacteriana sea un factor de riesgo para subsecuentes infecciones activas por CMV. Ni la incidencia acumulada ni la dinámica de la ADNemia de CMV parecen estar influidas por la presencia o ausencia previa de una infección bacteriana. Ni siquiera el inicio de esta infección durante un episodio de infección activa por CMV parece afectar a la cinética de la ADNemia. De hecho, el número de episodios que requirieron tratamiento antiviral anticipado fue similar independientemente de si hubo un episodio de infección bacteriana previo o no.

Las principales limitaciones de nuestro estudio fueron el escaso número de pacientes de nuestra cohorte que experimentaron tanto una infección bacteriana como una infección activa por CMV y su naturaleza retrospectiva. Otras limitaciones fueron la heterogeneidad de los pacientes analizados, la inclusión de diferentes tipos de infecciones bacterianas (aunque la mayoría fueron bacteriemias), el hecho de que las interacciones entre bacterias y CMV a nivel local en tejidos y órganos pueden haber pasado desapercibidas si no hubo viremia asociada, y el uso de profilaxis antibacteriana, que podría haber evitado interacciones que se hubieran dado de forma natural.

Nuestros datos no apoyan la idea de que exista un efecto sinérgico bidireccional entre la infección activa por CMV y las infecciones bacterianas. Sin embargo, son necesarios estudios prospectivos y con cohortes más homogéneas para poder llegar a conclusiones más concretas.

La heterogeneidad genética en CMV se describió hace tiempo (Kilpatrick et al., 1976), y es posible que exista correlación entre esta variabilidad y la patogenicidad de una cepa (Pignatelli et al., 2004). De hecho, en el trasplante de órgano sólido se ha reportado que la complejidad de variantes de CMV presentes en el paciente estaría asociada a retrasos en el aclaramiento de episodios de infección activa y a un peor pronóstico clínico (Coaquette et al., 2004; Humar et al., 2003; Manuel et al., 2009). Sin embargo, este hecho no ha podido ser demostrado en el alo-TPH. Recientemente, dos estudios no encontraron asociación entre la infección por genotipos mixtos de la proteína gB (codificada por UL55) y una mayor incidencia de enfermedad orgánica por CMV en receptores de alo-TPH (Wu et al., 2010; Dieamant et al., 2013), aunque en ninguno de

ellos se empleó secuenciación masiva para el genotipado. Por ello, nos propusimos en esta tesis doctoral analizar el impacto de la diversidad genética por secuenciación masiva (en este caso de las proteínas gN (UL73) y gO (UL74)) en la dinámica de aclaramiento de la ADNemia de CMV (Vinuesa et al., 2017).

Nuestros resultados nos permitieron llegar a una serie de conclusiones. En primer lugar, las infecciones mixtas son frecuentes en receptores de alo-TPH, independientemente de su serología previa para CMV o de la serología del donante. Esto ya se había descrito tanto en el trasplante de órgano sólido como en el alo-TPH (Coquette et al., 2004; Dieamant et al., 2013; Görzer et al., 2010; Humar et al., 2003; Manuel et al., 2009; Puchhammer et al. 2006; Wu et al., 2010). En segundo lugar, el pico de carga de ADN de CMV y la duración del episodio de ADNemia tienden a ser mayores en infecciones mixtas. Además, el aclaramiento de la ADNemia en PL es más lento cuanto mayor es la diversidad genética. Aún más notorio es que en este tipo de infecciones la duración del tratamiento antiviral hasta el aclarado de la viremia es significativamente mayor que en episodios producidos por una sola variante genética. Este efecto fue independiente de factores clínicos pre- y post-trasplante, del tratamiento antiviral usado y del criterio para interrumpirlo, y de la naturaleza del episodio (inicial o recurrencia). Podría afirmarse que la diversidad genética de la población viral fue un marcador independiente del retraso en el aclaramiento de CMV. Desafortunadamente, el bajo número de episodios impidió realizar un estudio multivariante.

Sin embargo, para apoyar esta idea, la respuesta de células T CD8+ específicas para CMV (pp65/IE-1) polifuncionales en el momento previo al inicio del tratamiento (y posterior al debut de ADNemia de CMV) fue comparable en episodios mixtos y de una sola variante genotípica. De hecho, en muchos episodios no se detectó respuesta. Esto es relevante porque la duración de los episodios de ADNemia de CMV está inversamente relacionados con el número de linfocitos T CD8+ polifuncionales antes o en el momento de la detección de la ADNemia (Giménez, Blanco-Lobo et al., 2015; Giménez, Muñoz-Cobo et al., 2015). Estos datos deben tomarse con precaución ya que no se monitorizó la dinámica de expansión de estas células T específicas frente a CMV ni se determinó la especificidad a nivel de epítipo de la población de células T expandidas.

En relación con esto, recientemente se publicó un estudio en el que se observó que el control de la viremia por CMV en el receptor de alo-TPH estaba asociado a una respuesta T específica para CMV estable contra epítomos conservados de IE-1 o con reactividad

cruzada más que a la diversidad genética en sí (Smith et al., 2016). Sin embargo, existen varias explicaciones potenciales para nuestros hallazgos.

En primer lugar, en una infección mixta por CMV es más probable la presencia de variantes con sensibilidad reducida al tratamiento antiviral. No obstante, los genes para gO y gN no parecen estar relacionados con desequilibrios en los genes implicados en la resistencia a fármacos descrita en CMV. En nuestro estudio no realizamos ningún ensayo para evaluar el perfil de resistencia al tratamiento anti-CMV que valorase esta posibilidad, lo cual es una limitación de nuestro trabajo. Aunque es especulativo, en nuestra opinión la causa de estos episodios de larga duración de ADNemia de CMV se debe más a una expansión deficiente de linfocitos T específicos funcionales durante la replicación del virus que a la emergencia de variantes con mayor tolerancia a los antivirales. Motivo de ello sería la fluctuación de la ADNemia de CMV en PL en lugar de niveles crecientes de forma mantenida en el tiempo (Giménez, Blanco-Lobo et al., 2015; Giménez, Muñoz-Cobo et al., 2015).

En segundo lugar, las infecciones mixtas pueden suponer un mayor desafío para el sistema inmune que las infecciones por una única variante. Aunque tampoco se podría descartar la hipótesis contraria, en la que las infecciones mixtas son más frecuentes en pacientes con peor inmunidad frente a CMV (aunque nuestros datos no apoyan esta idea).

En tercer lugar, cambios en el comportamiento del virus que deriven en una mayor patogenicidad pueden ser más frecuentes en pacientes infectados por más de una variante como resultado de complementación entre células coinfectadas (Tong et al., 2017) o por recombinación intra-huesped (Renzette et al., 2013).

En cuarto lugar, el número o la frecuencia relativa de variantes genéticas de CMV varían después del inicio del tratamiento antiviral en cerca de la mitad de los casos analizados. Esto refleja que la susceptibilidad individual de cada variante de gN o gO es diferente para los fármacos antivirales o para la respuesta inmune celular (o para ambas), sin poder descartar otro motivo. Sin embargo, los cambios en la diversidad genotípica de CMV no parecen afectar a la duración del tratamiento antiviral hasta el aclarado de la ADNemia. De hecho, cambios similares se observaron en episodios recurrentes de ADNemia de CMV, aunque no se registraron nuevas variantes. Esto refleja que la relación de variantes presentes en un paciente concreto parece mantenerse estable con el tiempo.

En quinto lugar, no se detectaron nuevas mutaciones en la secuencia nucleotídica de las variantes de gN o gO de CMV tras la administración de tratamiento antiviral ni durante episodios recurrentes. Esto puede deberse a una tasa de mutación muy baja, a una fuerte selección de estos genes o a ambas. De igual forma, esto indica que la población de CMV en cada paciente podría ser más estable de lo que se había postulado (Renzette et al., 2013).

Además de la falta de ensayos de resistencia y el limitado número de episodios ya mencionados, este estudio tuvo una serie de limitaciones que nos pudo llevar a una infraestimación del número de infecciones por múltiples variantes. Por un lado, es posible que las cepas minoritarias sean más difíciles de detectar que las mayoritarias en muestras con bajas cargas de ADN. Además, analizamos dos regiones muy próximas del genoma de CMV y es posible que esto no fuera representativo de la variabilidad genética de todo el genoma. Por último, el ADN de CMV en PL es principalmente ADN libre muy fragmentado, por lo que la diversidad de todo el virión podría no haber sido detectada.

En global, estos resultados reflejan que la diversidad genética de la población de CMV puede influir en la cinética del aclaramiento de su ADNemia en el receptor de alo-TPH, influyendo, así, en la duración del tratamiento antiviral necesitado para el aclaramiento del virus. Quizás un análisis de la diversidad de CMV podría ser útil como marcador auxiliar para estimar el riesgo de viremias prolongadas de CMV y poder adaptar de forma individualizada la estrategia de tratamiento anticipado.

V. Conclusiones

1. El tiempo de duplicación de la carga de ADN de CMV en sangre como parámetro cinético de la replicación del virus permite la comparación directa de resultados entre distintos centros independientemente del tipo de ensayo QRT-PCR empleado. Además, el tiempo de duplicación puede ser un marcador universal que guíe el inicio del tratamiento antiviral anticipado en el receptor de alo-TPH.
2. El contenido celular de la sangre y la presencia o ausencia de tratamiento antiviral tienen un impacto importante en la magnitud de la carga de ADN de CMV cuantificada en muestras pareadas de plasma y sangre completa.
3. No existe relación sinérgica bidireccional entre las infecciones bacterianas y la infección activa por CMV en receptores de alo-TPH durante el post-trasplante inmediato.
4. La diversidad genética de la población de CMV podría influir en la cinética de aclaramiento de la ADNemia del virus y prolongar la duración del tratamiento antiviral hasta conseguir dicho aclarado.

VI. Bibliografía

Andrews, P. A., Emery, V. C., & Newstead, C. (2011). Summary of the British Transplantation Society Guidelines for the Prevention and Management of CMV Disease After Solid Organ Transplantation. *Transplantation*, 92(11), 1181–1187. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318235c7fc>

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 transplantation*, 40(9), 865–869. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705825>

Babady, N. E., Cheng, C., Cumberbatch, E., Stiles, J., Papanicolaou, G., & Tang, Y. W. (2015). Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*, 53(4), 1252–1257. <https://doi.org/10.1128/JCM.03435-14>

Biron, C. A., Byron, K. S., & Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine*, 320(26), 1731–1735. <https://doi.org/10.1056/NEJM198906293202605>

Boeckh, M., Gallez-Hawkins, G. M., Myerson, D., Zaia, J. A., & Bowden, R. A. (1997). 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*, 64(1), 108–113. <https://doi.org/10.1097/00007890-199707150-00020>

Boeckh, M., & Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 1673–1680. <https://doi.org/10.1172/JCI45449>

Boeckh, M., & Ljungman, P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 113(23), 5711–5719. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-143560>

Boeckh, M., Nichols, W. G., Chemaly, R. F., Papanicolaou, G. A., Wingard, J. R., Xie, H., Syrjala, K. L., Flowers, M. E., Stevens-Ayers, T., Jerome, K. R., & Leisenring, W. (2015). Valganciclovir for the prevention of complications of late cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, 162(1), 1–10. <https://doi.org/10.7326/M13-2729>

Boeckh, M., Nichols, W. G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J. R., & Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 9(9), 543–558. [https://doi.org/10.1016/s1083-8791\(03\)00287-8](https://doi.org/10.1016/s1083-8791(03)00287-8)

Boom, R., Sol, C. J., Schuurman, T., Van Breda, A., Weel, J. F., Beld, M., Ten Berge, I. J., Wertheim-Van Dillen, P. M., & De Jong, M. D. (2002). Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4105–4113. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.11.4105-4113.2002>

Bravo, D., Clari, M. Á., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., José Remigia, M., & Navarro, D. (2011). Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma Cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*, 49(8), 2899–2904. <https://doi.org/10.1128/JCM.00785-11>

Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Besse, B., André-Garnier, E., Ferre, V., & Imbert-Marcille, B. M. (2009). Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *Journal of medical virology*, 81(1), 90–98. <https://doi.org/10.1002/jmv.21334>

Britt, W. J., & Boppana, S. (2004). Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol*, 65(5), 395–402. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.008

Broers, A. E., van Der Holt, R., van Esser, J. W., Gratama, J. W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., Löwenberg, B., & Cornelissen, J. J. (2000). 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*, 95(7), 2240–2245.

Cappellano, P., Viscoli, C., Bruzzi, P., Van Lint, M. T., Pereira, C. A., & Bacigalupo, A. (2007). Epidemiology and risk factors for bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The new microbiologica*, 30(2), 89–99.

Clari, M. Á., Bravo, D., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., Giménez, E., Benmarzouk-Hidalgo, O. J., Pérez-Romero, P., & Navarro, D. (2013). Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(2), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.010>

Coquette, A., Bourgeois, A., Dirand, C., Varin, A., Chen, W., & Herbein, G. (2004). Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(2), 155–161. <https://doi.org/10.1086/421496>

Cook, C. H., Trgovcich, J., Zimmerman, P. D., Zhang, Y., & Sedmak, D. D. (2006). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *Journal of virology*, 80(18), 9151–9158. <https://doi.org/10.1128/JVI.00216-06>

Costa, C., Sidoti, F., Mantovani, S., Gregori, G., Proietti, A., Ghisetti, V., & Cavallo, R. (2016). Comparison of two molecular assays for detection of cytomegalovirus DNA in whole blood and plasma samples from transplant recipients. *The new microbiologica*, 39(3), 186–191.

Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 76-98, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00034-08

- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., . . . Hayward, G. S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 84(Pt 1), 17-28. doi:10.1099/vir.0.18606-0
- Dieamant, D. C., Bonon, S. H., Peres, R. M., Costa, C. R., Albuquerque, D. M., Miranda, E. C., Aranha, F. J., Oliveira-Duarte, G., Fernandes, V. C., De Souza, C. A., Costa, S. C., & Vigorito, A. C. (2013). Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC infectious diseases*, 13, 310. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-310>
- Dioverti, M. V., Lahr, B. D., Germer, J. J., Yao, J. D., Gartner, M. L., & Razonable, R. R. (2017). Comparison of Standardized Cytomegalovirus (CMV) Viral Load Thresholds in Whole Blood and Plasma of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients with CMV Infection and Disease. *Open forum infectious diseases*, 4(3), ofx143. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx143>
- Eid, A. J., & Razonable, R. R. (2010). New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs*, 70(8), 965–981. <https://doi.org/10.2165/10898540-000000000-00000>
- Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann-Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Löffler, J., Bokemeyer, C., Müller, C. A., & Kanz, L. (2000). Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone marrow transplantation*, 25(7), 757–763. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702226>
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., & Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99(11), 3916–3922. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.11.3916>
- Emery, V. C., Sabin, C. A., Cope, A. V., Gor, D., Hassan-Walker, A. F., & Griffiths, P. D. (2000). Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet (London, England)*, 355(9220), 2032–2036. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02350-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02350-3)
- Emery, V., Zuckerman, M., Jackson, G., Aitken, C., Osman, H., Pagliuca, A., Potter, M., Peggs, K., Clark, A., British Committee for Standards in Haematology, British Society of Blood and Marrow Transplantation, & UK Virology Network (2013). Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology*, 162(1), 25–39. <https://doi.org/10.1111/bjh.12363>
- Engels, E. A., Ellis, C. A., Supran, S. E., Schmid, C. H., Barza, M., Schenkein, D. P., Koc, Y., Miller, K. B., & Wong, J. B. (1999). Early infection in bone marrow transplantation: quantitative study of clinical factors that affect risk. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28(2), 256–266. <https://doi.org/10.1086/515103>

Fietze, E., Prösch, S., Reinke, P., Stein, J., Döcke, W. D., Staffa, G., Löning, S., Devaux, S., Emmrich, F., & von Baehr, R. (1994). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation*, 58(6), 675–680.

Fishman J. A. (2013). Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13 Suppl 3, 1–8. <https://doi.org/10.1111/ajt.12002>

Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD, the Collaborative Study Group (2010). Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleid Acid Amplification (NAT)-Based Assays. WHO/BS/10.2138, 1-40

Garrigue, I., Doussau, A., Asselineau, J., Bricout, H., Couzi, L., Rio, C., Merville, P., Fleury, H., Lafon, M. E., & Thiébaud, R. (2008). Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 493–498. <https://doi.org/10.1128/JCM.01499-07>

Giménez, E., Blanco-Lobo, P., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., Pérez-Romero, P., & Navarro, D. (2015). Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting. *The Journal of general virology*, 96(9), 2822–2831. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000203>

Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., & Navarro, D. (2014). Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value?. *Journal of clinical microbiology*, 52(2), 654–656. <https://doi.org/10.1128/JCM.02571-13>

Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., de la Cámara, R., Nieto, J., López, J., Remigia, M. J., Garcia-Noblejas, A., & Navarro, D. (2015). Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8(+) T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 17(3), 361–370. <https://doi.org/10.1111/tid.12391>

Giménez, E., Solano, C., Azanza, J. R., Amat, P., & Navarro, D. (2014). Monitoring of trough plasma ganciclovir levels and peripheral blood cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells to predict CMV DNAemia clearance in preemptively treated allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5602–5605. <https://doi.org/10.1128/AAC.02953-14>

Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernández-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., Furió, S., Calabuig, M., Tormo, N., & Navarro, D. (2008). 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. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3311–3318. <https://doi.org/10.1128/JCM.00797-08>

Gkrania-Klotsas, E., Langenberg, C., Sharp, S. J., Luben, R., Khaw, K. T., & Wareham, N. J. (2013). Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(10), 1421–1427. <https://doi.org/10.1093/cid/cit083>

Goodrich, J. M., Mori, M., Gleaves, C. A., Du Mond, C., Cays, M., Ebeling, D. F., Buhles, W. C., DeArmond, B., & Meyers, J. D. (1991). Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine*, 325(23), 1601–1607. <https://doi.org/10.1056/NEJM199112053252303>

Gurtler, V., Mayall, B. C., Wang, J., & Ghaly-Derias, S. (2014). The increased sensitivity of human cytomegalovirus (HCMV) PCR quantitation in whole blood affects reproductive rate (Ro) measurement. *Journal of virological methods*, 196, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.043>

Heininger, A., Haeberle, H., Fischer, I., Beck, R., Riessen, R., Rohde, F., Meisner, C., Jahn, G., Koenigsrainer, A., Unertl, K., & Hamprecht, K. (2011). Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Critical care (London, England)*, 15(2), R77. <https://doi.org/10.1186/cc10069>

Humar, A., Kumar, D., Gilbert, C., & Boivin, G. (2003). Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *The Journal of infectious diseases*, 188(4), 581–584. <https://doi.org/10.1086/377002>

Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 11(6), 697–711. doi:10.1586/14789450.2014.971116

Jones, S., Webb, E. M., Barry, C. P., Choi, W. S., Abravaya, K. B., Schneider, G. J., & Ho, S. Y. (2016). Commutability of Cytomegalovirus WHO International Standard in Different Matrices. *Journal of clinical microbiology*, 54(6), 1512–1519. <https://doi.org/10.1128/JCM.03292-15>

Jonjić, S., Pavić, I., Polić, B., Crnković, I., Lucin, P., & Koszinowski, U. H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *The Journal of experimental medicine*, 179(5), 1713–1717. <https://doi.org/10.1084/jem.179.5.1713>

Junghanss, C., Boeckh, M., Carter, R. A., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Maloney, D. G., Chauncey, T., McSweeney, P. A., Little, M. T., Corey, L., & Storb, R. (2002). Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood*, 99(6), 1978–1985. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.6.1978>

Kalejta, R. F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(2), 249–265, table of contents. doi:10.1128/membr.00040-07

- Kilpatrick, B. A., Huang, E. S., & Pagano, J. S. (1976). Analysis of cytomegalovirus genomes with restriction endonucleases *Hin D III* and *EcoR-1*. *Journal of virology*, 18(3), 1095–1105. <https://doi.org/10.1128/JVI.18.3.1095-1105.1976>
- Kuijpers, T. W., Baars, P. A., Dantin, C., van den Burg, M., van Lier, R. A., & Roosnek, E. (2008). Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*, 112(3), 914–915. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157354>
- Lazzarotto, T., Chiereghin, A., Piralla, A., Piccirilli, G., Girello, A., Campanini, G., Gabrielli, L., Costa, C., Prete, A., Bonifazi, F., Busca, A., Cairoli, R., Colombo, A. A., Zecca, M., Sidoti, F., Bianco, G., Paba, P., Perno, C. F., Cavallo, R., Baldanti, F., ... AMCLI-GLaIT working group (2018). Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus DNA Kinetics in Whole Blood and Plasma of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(8), 1699–1706. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.03.005>
- Lisboa, L. F., Asberg, A., Kumar, D., Pang, X., Hartmann, A., Preiksaitis, J. K., Pescovitz, M. D., Rollag, H., Jardine, A. G., & Humar, A. (2011). The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation*, 91(2), 231–236. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ff8719>
- Ljungman P. (2007). Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best practice & research. Clinical haematology*, 20(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2006.09.003>
- Ljungman, P., Griffiths, P., & Paya, C. (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(8), 1094–1097. <https://doi.org/10.1086/339329>
- Ljungman, P., Perez-Bercoff, L., Jonsson, J., Avetisyan, G., Sparrelid, E., Aschan, J., Barkholt, L., Larsson, K., Winiarski, J., Yun, Z., & Ringdén, O. (2006). Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91(1), 78–83.
- Machida, U., Kami, M., Fukui, T., Kazuyama, Y., Kinoshita, M., Tanaka, Y., Kanda, Y., Ogawa, S., Honda, H., Chiba, S., Mitani, K., Muto, Y., Osumi, K., Kimura, S., & Hirai, H. (2000). Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2536–2542. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2536-2542.2000>
- Manuel, O., Asberg, A., Pang, X., Rollag, H., Emery, V. C., Preiksaitis, J. K., Kumar, D., Pescovitz, M. D., Bignamini, A. A., Hartmann, A., Jardine, A. G., & Humar, A. (2009). Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(8), 1160–1166. <https://doi.org/10.1086/605633>

Marshall, E. E., & Geballe, A. P. (2009). Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(9), 609–619. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0064>

McCormick A. L. (2008). Control of apoptosis by human cytomegalovirus. *Current topics in microbiology and immunology*, 325, 281–295. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_16

McGeoch, D. J., Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*, 117(1), 90–104. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.002

Mutimer, D., Mirza, D., Shaw, J., O'Donnell, K., & Elias, E. (1997). Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. *Transplantation*, 63(10), 1411–1415. <https://doi.org/10.1097/00007890-199705270-00007>

Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., & Boeckh, M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *The Journal of infectious diseases*, 185(3), 273–282. <https://doi.org/10.1086/338624>

Pang, X. L., Fox, J. D., Fenton, J. M., Miller, G. G., Caliendo, A. M., Preiksaitis, J. K., American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice, & Canadian Society of Transplantation (2009). Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(2), 258–268. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02513.x>

Paya, C. V., Wiesner, R. H., Hermans, P. E., Larson-Keller, J. J., Ilstrup, D. M., Krom, R. A., Rettke, S., & Smith, T. F. (1993). Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *Journal of hepatology*, 18(2), 185–195. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(05\)80245-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(05)80245-4)

Pérez-Romero, P., Blanco, P., Giménez, E., Solano, C., & Navarro, D. (2015). An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virology*, 10(2), 113–134. doi:10.2217/fvl.14.102.

Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G., & Landini, M. P. (2004). Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews in medical virology*, 14(6), 383–410. <https://doi.org/10.1002/rmv.438>

Preiksaitis, J. K., Hayden, R. T., Tong, Y., Pang, X. L., Fryer, J. F., Heath, A. B., Cook, L., Petrich, A. K., Yu, B., & Caliendo, A. M. (2016). Are We There Yet? Impact of the First International Standard for Cytomegalovirus DNA on the Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(5), 583–589. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw370>

- Prösch, S., Wendt, C. E., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D. H., Volk, H. D., & Döcke, W. D. (2000). A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology*, 272(2), 357–365. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0367>
- Puchhammer-Stökl, E., Görzer, I. (2011). Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Future Virology*, 6(2), 259-271. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.87>
- Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pacht, C., & Merigan, T. C. (1991). Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *The Journal of infectious diseases*, 164(5), 835–842. <https://doi.org/10.1093/infdis/164.5.835>
- Razonable, R. R., Brown, R. A., Wilson, J., Groettum, C., Kremers, W., Espy, M., Smith, T. F., & Paya, C. V. (2002). The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation*, 73(6), 968–973. <https://doi.org/10.1097/00007890-200203270-00025>
- Reddehase, M. J., Baltesen, M., Rapp, M., Jonjić, S., Pavić, I., & Koszinowski, U. H. (1994). The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *The Journal of experimental medicine*, 179(1), 185–193. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.185>
- Renzette, N., Bhattacharjee, B., Jensen, J. D., Gibson, L., & Kowalik, T. F. (2011). Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS pathogens*, 7(5), e1001344. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001344>
- Renzette, N., Gibson, L., Bhattacharjee, B., Fisher, D., Schleiss, M. R., Jensen, J. D., & Kowalik, T. F. (2013). Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS genetics*, 9(9), e1003735. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003735>
- Schmidt, G. M., Horak, D. A., Niland, J. C., Duncan, S. R., Forman, S. J., & Zaia, J. A. (1991). A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *The New England journal of medicine*, 324(15), 1005–1011. <https://doi.org/10.1056/NEJM199104113241501>
- Schnepf, N., Scieux, C., Resche-Riggon, M., Feghoul, L., Xhaard, A., Gallien, S., Molina, J. M., Socié, G., Viglietti, D., Simon, F., Mazon, M. C., & Legoff, J. (2013). Fully automated quantification of cytomegalovirus (CMV) in whole blood with the new sensitive Abbott RealTime CMV assay in the era of the CMV international standard. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2096–2102. <https://doi.org/10.1128/JCM.00067-13>
- Sia, I. G., & Patel, R. (2000). New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 83–121. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.1.83-121.2000>

- Sinclair J. (2008). Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 41(3), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.11.014>
- Sinclair, J., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology*, 87(Pt 7), 1763–1779. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81891-0>
- Sinzger, C., Digel, M., & Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Current topics in microbiology and immunology*, 325, 63–83. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4
- Sissons, J. G., & Carmichael, A. J. (2002). Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *The Journal of infection*, 44(2), 78–83. <https://doi.org/10.1053/jinf.2001.0949>
- Slobedman, B., Barry, P. A., Spencer, J. V., Avdic, S., & Abendroth, A. (2009). Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *Journal of virology*, 83(19), 9618–9629. <https://doi.org/10.1128/JVI.01098-09>
- Smith, C., Brennan, R. M., Tey, S. K., Smyth, M. J., Burrows, S. R., Miles, J. J., Hill, G. R., & Khanna, R. (2016). Coinfection with Human Cytomegalovirus Genetic Variants in Transplant Recipients and Its Impact on Antiviral T Cell Immune Reconstitution. *Journal of virology*, 90(16), 7497–7507. <https://doi.org/10.1128/JVI.00297-16>
- Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., Hernández-Boluda, J. C., Remigia, M. J., Jarque, I., Calabuig, M. L., Garcia-Noblejas, A., Alberola, J., Tamarit, A., Gimeno, C., & Navarro, D. (2008). 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*, 93(9), 1434–1436. <https://doi.org/10.3324/haematol.12880>
- Solano, C., Benet, I., Remigia, M. J., de la Cámara, R., Muñoz-Cobo, B., Costa, E., Clari, M. A., Bravo, D., Amat, P., & Navarro, D. (2011). Immunological monitoring for guidance of preemptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: a pilot experience. *Transplantation*, 92(4), e17–e20. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318224f263>
- Solano, C., & Navarro, D. (2010). Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virology*, (5), 111-124
- Span, A. H., Grauls, G., Bosman, F., van Boven, C. P., & Bruggeman, C. A. (1992). Cytomegalovirus infection induces vascular injury in the rat. *Atherosclerosis*, 93(1-2), 41–52. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(92\)90198-p](https://doi.org/10.1016/0021-9150(92)90198-p)
- Staras, S. A., Dollard, S. C., Radford, K. W., Flanders, W. D., Pass, R. F., & Cannon, M. J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(9), 1143–1151. <https://doi.org/10.1086/508173>

Stinski, M. F. (1978). Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J Virol*, 26(3), 686-701. doi:10.1128/jvi.26.3.686-701.1978

Suganda, S., Tang, L., Carr, J., Sun, Y., Pounds, S., & Hayden, R. (2016). Comparative evaluation of whole blood versus plasma for quantitative detection of cytomegalovirus using an automated system. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 85(1), 23–25. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.12.008>

Tong, Y., Pang, X. L., Mabilangan, C., & Preiksaitis, J. K. (2017). Determination of the Biological Form of Human Cytomegalovirus DNA in the Plasma of Solid-Organ Transplant Recipients. *The Journal of infectious diseases*, 215(7), 1094–1101. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix069>

Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., López-Aldeguer, N., Hernández-Boluda, J. C., Remigia, M. J., Garcia-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 transplantation*, 45(3), 543–549. <https://doi.org/10.1038/bmt.2009.172>

Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., . . . Nelson, J. A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 78(20), 10960-10966. doi:10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004

von Müller, L., Hinz, J., Bommer, M., Hampl, W., Kluwick, S., Wiedmann, M., Bunjes, D., & Mertens, T. (2007). CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges?. *Bone marrow transplantation*, 39(6), 353–357. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705593>

Wu, X., Wang, Y., Xu, Y., Wu, D., Sun, A., Zhu, Z., Han, Y., Qiu, H., Tang, X., Fu, Z., He, G., Li, C., Ma, X., & Liu, Y. (2010). Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 16(5), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.12.001>

Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S. F., Palmer, J. M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., Spielberger, R., Nakamura, R., Forman, S. J., Zaia, J. A., & Diamond, D. J. (2009). Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*, 113(25), 6465–6476. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203307>

VII. Artículos

Would Kinetic Analyses of Plasma Cytomegalovirus DNA Load Help to Reach Consensus Criteria for Triggering the Initiation of Preemptive Antiviral Therapy in Transplant Recipients?

TO THE EDITOR—We read with interest the article by Preiksaitis et al [1] in which they assessed the impact of the first international standard for cytomegalovirus (CMV) DNA (World Health Organization) [2] on the harmonization of quantitative real-time (qRT-PCR) results reported on plasma specimens. The

authors showed that significant interassay (median 1.50 log₁₀ IU/mL) and intercenter variations for individual specimens persist [3]. In their (and our) opinion, this limits comparison of interinstitutional results, thus undermining the possibility of achieving universal consensus trigger values for preemptive antiviral therapy, which is a desirable goal. Here, we show that the CMV DNA doubling time (dt) may be a valuable parameter to that purpose. Since qRT-PCR assays show linearity above their limit of quantification, with slope coefficients that vary minimally when testing standard calibration panels [1, 4, 5], we hypothesized that kinetics analyses of plasma CMV DNA load may allow for direct comparison of results obtained across centers using similar or different qRT-PCR assays [6]. To test our hypothesis, we generated a panel of 4 human plasma specimens (CC-1 to CC-4) (Table 1) that contained increasing levels of CMV DNA, up to 1301 IU/mL (CC-4), which is below the level that would prompt initiation of antiviral therapy at our center (1500 IU/mL). Previously, we showed that a dt ≤ 2 days anticipated the eventual need of preemptive antiviral therapy in allogeneic stem cell transplant recipients with a positive predictive value of 100% [6]. We later reported that treating these patients upon dt ≤ 2 days led to a significant reduction of the time on antiviral therapy [7]. CMV DNA levels in the panel specimens were thus set to reproduce the following scenarios: analytically irrelevant increase of CMV DNA load (<3-fold) [5, 6] (pair A: CC-1 vs CC-2), significant increase (>3-fold), with dt > 2 days (pair B: CC-1 vs CC-3), or dt ≤ 2 days (pair C: CC-1 vs CC-4). The specimens in the panel were shipped to 9 laboratories.

Notably, we found that all centers correctly categorized pair C (dt, 0.51–1.71), all but 1 of pair A, and all but 2 of pair B (Table 1). For this analysis we excluded the results yielded by the COBAS Ampli-Prep Taqman CMV assay, since most

specimens had undetectable levels of CMV DNA.

In line with the data presented by Preiksaitis et al [1], the overall variance considering all panel specimens was >0.5 log₁₀ IU/mL (arbitrarily defined as an acceptable limit for interassay qRT-PCR variance): median 0.87 (range, 0.77–0.95) log₁₀ IU/mL. The variance (median) was notably lower when the same assay was used at different centers (ie, 0.18 for the Abbott assay and 0.27 for the Roche 6800 assay). A result bias relative to the mean result for each specimen in the panel was observed for some qRT-PCR assays (ie, Abbott vs Roche 6800) ($P = .005$, paired samples 2-tailed t test). A trend toward an inverse correlation between the amplicon size and the magnitude of CMV DNA loads measured was observed (Table 1).

Preiksaitis et al [1] wondered if we are already there. We are not, indeed, but we may be on the right track.

Notes

Acknowledgments. This work was performed under the auspices of the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology Quality Control program. The collaborators from the participating hospitals are Javier Aznar (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla), Laura Cardenoso (Hospital La Princesa, Madrid), Juan Carlos Galán (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid), Julio García-Rodríguez (Hospital La Paz, Madrid), Juan Gutiérrez-Aroca (Hospital Reina Doña Sofía, Córdoba), María Ángeles Marcos (Hospital Clinic, Barcelona), José Luis Pérez-Saénz (Hospital Son Espases, Palma de Mallorca), Tomás Pumarola (Hospital Valle de Hebrón, Barcelona), and Juan Carlos Rodríguez (Hospital General Universitario, Alicante). We thank Maria Ovies for her helpful assistance.

Potential conflicts of interest. All authors: No potential conflicts of interest. 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.

Victor Vinuesa,¹ Estela Giménez,¹ Carlos Solano,^{2,4} Concepción Gimeno,³ and David Navarro,^{1,5} for the Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology Quality Control Study Group

¹Microbiology Service, ²Hematology Unit, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación, ³Microbiology Service, Consorcio Hospital General, ⁴Department of Medicine, and ⁵Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Spain

Table 1. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays Evaluated and Sample Panel Cytomegalovirus DNA Load Testing Results at the Participating Centers

Center	DNA Extraction Method ^a	Real-Time Polymerase Chain Reaction Method/Limit of Detection (IU/mL) ^b	Amplicon Size (Nucleotides) ^c	CC-1 (IU/mL) ^d	CC-2 (IU/mL) ^d	CC-3 (IU/mL) ^d	CC-4 (IU/mL) ^d	R^2 ^e	CC-1 vs CC-2 ^f	CC-1 vs CC-3 (dt in Days) ^g	CC-1 vs CC-4 (dt in Days) ^h
1	m2000sp (Abbott)	New Abbott RealTime CMV/35	95 (UL80.5)/105 (UL34)	301	505	904	1301	0.97	<3-fold	2.55	1.28
2	m2000sp (Abbott)	New Abbott RealTime CMV/35	95 (UL80.5)/105 (UL34)	487	733	916	1387	0.95	<3-fold	NC (<3-fold)	1.71
3	EasyMag (Biomerieux)	RealStar CMV PCR Kit 1.0 (Altona)/90	<100	99	443	714	2231	0.83	>3-fold	1.33	0.51
4	Nimbus (Werfen)	RealStar CMV PCR Kit 1.0 (Altona)/90	<100	570	167	2179	2792	0.93	<3-fold	2.01	1.12
5	COBAS 6800 (Roche)	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34.5	150	82	126	220	413	0.91	<3-fold	2.67	1.10
6	COBAS 6800 (Roche)	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34.5	150	121	235	372	366	0.88	<3-fold	2.34	1.60
7	COBAS 6800 (Roche) ⁱ	COBAS Taqman CMV test (COBAS 6800)/34.5	150	121	230	359	560	0.97	<3-fold	NC (<3-fold)	1.16
7	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	<137	<137	<137	ND	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)
8	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	156	244	<137	ND	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)
9	COBAS AmpliPrep CMV	COBAS Taqman CMV test/137	340	<137	242	<137	<137	ND	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)	NC (CC-1 below LOD)
10	QIAasymphony SP (Qiagen)	CMV-Q Alert Kit (Nanogen)/ABI 7300/236	Unknown	421	355	863	1269	0.84	<3-fold	NC (<3-fold)	1.58

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; dt, doubling time; LOD, limit of detection; NC, not calculated; PCR, polymerase chain reaction; SCT, stem cell transplantation.

^{a,b} Methods performed following the instructions of the respective manufacturer: Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois; Altona Diagnostics, Hamburg, Germany; Biomerieux, L'Etoile, France; Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italy; Qiagen, Valencia, California; Roche Diagnostics, Pleasanton, California; Werfen, Barcelona, Spain. Limit of detection according to the respective manufacturer.

^c Amplicon sizes according to [1]. The amplicon size for the Roche COBAS 6800 was revealed by an official source.

^d Sequential leftover plasma specimens from 3 Allo-SCT patients (CMV DNA load range, 8310–123 808 IU/mL, as measured by the Abbott RealTime CMV assay at Hospital Clínico Universitario of Valencia-center 1-) that had been stored at -70°C upon reception were thawed, pooled, and diluted conveniently with plasma specimens from Allo-SCT testing negative by the Abbott RealTime PCR to generate 4 individual "clinical" samples (CC-1 to CC-4). The nominal value for CMV DNA content of each panel specimen is shown in center 1 row (mean of 2 determinations). All specimens in the panel had CMV DNA loads below the threshold level for initiation of preemptive antiviral therapy at our center (1000 copies/mL—approximately 1500 IU/mL). All specimens in the panel were frozen at -70° and shipped overnight on dry ice to 9 laboratories (1 mL/sample). All specimens were tested in singlet at the different laboratories. The variance for individual specimens of the panel is defined as the difference between the highest and the lowest result (in \log_{10} IU/mL).

^e R^2 is a statistical measure of how close the data are to the fitted regression line. It indicates the percentage of the response variable variation that is explained by a linear model. A value of 1 indicates that the model explains all the variability of the response data around its mean.

^f Pair A (CC-1 vs CC-2) was set to represent a nonsignificant increase in CMV DNA load (<3-fold).

^g Pair B (CC-1 vs CC-3) was set to represent a significant increase in CMV DNA load, with a dt > 2 days. The CMV dt was calculated using the standard exponential function: $dt = \ln 2/K$ (growth rate), being $K = \Delta \ln \text{CMV DNA load (CC-3 vs CC-1)}/\Delta \text{time}$ (arbitrarily considered as 7 days). Only increases between the first and the second CMV DNA load values of >3-fold were considered for analysis.

^h Pair C (CC-1 vs CC-4) was set to represent a significant increase in CMV DNA load, with a dt \leq 2 days. Δ time was arbitrarily considered as 3 days.

ⁱ The specimens in the panel were shipped on dry ice to center 6 for reanalysis (COBAS 6800).

References

1. Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, et al. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. *Clin Infect Dis* **2016**; 63:583–9.
2. Freyer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD; and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO international standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification-based assays. WHO/BS/10.2138, pp 1–40. Geneva, Switzerland, 18–22 October 2010.
3. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice; Canadian Society of Transplantation Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* **2009**; 9:258–68.
4. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* **2013**; 51:540–6.
5. Clari MÁ, Bravo D, Costa E, et al. Comparison of the new Abbott real time CMV assay and the Abbott CMV PCR kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2013**; 75:207–9.
6. Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* **2014**; 52:654–6.
7. Solano C, Giménez E, Piñana JL, et al. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant* **2016**; 51:718–21.

Correspondence: D. Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Ad. Blasco Ibañez 17, Valencia 46010, Spain (david.navarro@uv.es).

Clinical Infectious Diseases® 2016;63(11):1533–5

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/cid/ciw608

ORIGINAL ARTICLE

Lack of evidence for a reciprocal interaction between bacterial and cytomegalovirus infection in the allogeneic stem cell transplantation setting

Víctor Vinuesa¹, Carlos Solano^{2,3}, Estela Giménez¹, José L. Piñana², Juan Carlos Hernández Boluda², Paula Amat² & David Navarro^{1,4}

1 Microbiology Service, Fundación INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

2 Hematology Service, Fundación INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

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

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

Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.

Tel.: 34(96)3864657;

fax: 34(96)3864173;

e-mail: david.navarro@uv.es

SUMMARY

Pathogenic interactions between bacteria and cytomegalovirus (CMV) may potentially occur early after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). This possibility nevertheless has not been investigated in depth. This was a retrospective study that included 170 consecutive patients who underwent 173 allo-SCTs. Both bacterial infection (most of which were bacteremic) and CMV DNAemia were detected in 78 allo-SCTs (62.9%). In total, 51 and 32 episodes of bacterial infection preceded or occurred after CMV DNAemia detection, respectively. Both events were diagnosed concurrently in four allo-SCTs. The cumulative incidence of bacterial infection (of any type) over the study period was comparable in patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia ($P = 0.321$). Cox proportional hazards regression analysis failed to identify CMV DNAemia as a significant risk factor for bacterial infection. Likewise, the cumulative incidence of CMV DNAemia within the study period was not significantly different in patients with or without a preceding episode of bacterial infection ($P = 0.189$). Furthermore, the occurrence of bacterial infection within episodes of active CMV infection had no apparent impact on the kinetics of CMV DNAemia. Our data, thus, do not support the existence of a bidirectional synergistic effect between bacterial infection and active CMV infection in the allo-SCT setting.

Transplant International 2016; 29: 1196–1204

Key words

allogeneic stem cell transplantation, bacteremia, bacterial infection, CMV DNAemia, cytomegalovirus

Received: 22 April 2016; Revision requested: 28 June 2016; Accepted: 2 August 2016; Published online: 13 September 2016

Introduction

Recovery of innate and adaptive immune cell types after allogeneic stem cell transplantation (Allo-SCT) follows different kinetic profiles [1]. Neutrophils, which are depleted as a result of the conditioning regimen, recover at 14–30 days depending upon the source of stem cells. During the neutropenic phase, extracellular bacteria are

mainly responsible of infectious complications [2]. The use of high doses of parenteral corticosteroids for the treatment of severe acute graft-versus-host disease (aGvHD) further increases the risk of local or systemic bacterial infection [2]. In turn, reconstitution of adaptive T- and NK-cell immunity is crucial for the control of virus infection. The first 100 days after allo-SCT are characterized by immune deficiencies affecting these cell

subsets [1] that render the patient highly susceptible to infection caused by viruses, particularly those establishing chronic-persistent infections such as cytomegalovirus (CMV) [3]. In this scenario, pathogenic interactions between bacteria and viruses may conceivably occur. The potential role of bacterial infection in promoting active CMV infection in the allo-SCT setting has not been thoroughly investigated. In turn, CMV readily infects macrophages *in vivo*, impairing their ability to recognize and eliminate bacteria by phagocytosis [4]. Furthermore, infection of endothelial cells by CMV may facilitate bacterial invasion across mucosal barriers [5]. Thus, CMV replication may potentially increase the risk of organ-specific or systemic bacterial infection in the allo-SCT setting. This possibility, nevertheless, is mainly supported by indirect evidence [6–8]. The current study aimed to investigate whether a synergistic interaction between bacteria and CMV does occur early following allo-SCT. As an advantage over previous studies directly or indirectly addressing this issue, highly sensitive real-time PCR assays were employed for CMV surveillance.

Subjects and methods

Patients

This retrospective study included 170 nonconsecutive patients who underwent 173 allo-SCT at the Hematology Unit of the Hospital Clínico Universitario of Valencia from February 2006 to April 2014. CMV-seronegative patients receiving an allograft from CMV-seronegative donors were excluded from the study, as the incidence of CMV DNAemia in this group is negligible. The median age of patients was 48 years (range, 18–70 years). Relevant clinical and demographic data of the patients are summarized in Table 1. The study period comprised the first 60 days following transplantation, a time frame at which both bacterial infection and CMV DNAemia occur more frequently. The study was approved by the local review board and ethics committee. All patients gave written informed consent prior to participation in the study.

Definition and management of bacterial infection

All patients were attended in HEPA-filtered positive air pressure rooms until engraftment and harbored an indwelling central venous catheter of the Hickman type. All patients received antibacterial prophylaxis with fluoroquinolones. Two sets of blood cultures (BD

Table 1. Demographic characteristics of the patients.

Parameter	No. of patients (%) [*]
Sex	
Male	106 (62.3)
Female	64 (37.7)
Underlying disease	
Acute myeloid leukaemia	64 (37.7)
Non-Hodgkin's lymphoma	41 (24.1)
Myelodysplastic syndrome	8 (4.7)
Acute lymphocytic leukaemia	14 (8.2)
Chronic lymphocytic leukaemia	13 (7.7)
Multiple Myeloma	6 (3.5)
Hodgkin's lymphoma	8 (4.7)
Aplastic Anemia	1 (0.6)
Others	15 (8.8)
HLA-matching	
Matched	132 (76.3)
Mismatched	41 (23.7)
Donor type	
Related	87 (50.3)
Unrelated	86 (49.7)
Stem cell source	
Peripheral blood	131 (75.7)
Umbilical cord blood	35 (20.2)
Bone marrow	7 (4.1)
Conditioning regimen	
Myeloablative	68 (39.3)
Nonmyeloablative	105 (60.7)
Graft-versus-host disease prophylaxis	
Cyclosporin A/methotrexate	70 (40.5)
Cyclosporin A/mycophenolate mofetil	31 (17.9)
Other combinations	72 (41.6)
CMV serostatus	
D+/R+	99 (57.2)
D-/R+	64 (37)
D+/R-	10 (5.8)
Acute Graft-versus-host disease developing during the study period (days 0–60)	
0–I	147 (85.0)
II–IV	26 (15.0)

CMV, cytomegalovirus; D, donor; HLA, human leukocyte antigen; R, recipient.

^{*}A total of 170 patients undergoing 173 allogeneic stem cell transplants were included in the study.

BACTECTM Plus Aerobic/F and BD BACTECTM Plus Anaerobic/F; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) were drawn upon occurrence of fever (>37 °C) and/or the presence of clinical signs or symptoms of infection. Empirical antibacterial treatment was then initiated, in most cases with a third-generation cephalosporin and aminoglycoside or carbapenem. Antibiotic treatment was adapted to antimicrobial susceptibility testing results when deemed appropriate.

Blood cultures were obtained on a daily basis until resolution of the episode. A bloodstream infection was defined as: (i) the isolation of one or more recognized pathogenic bacteria (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* species, *Enterococcus* species, and *Pseudomonas aeruginosa*) from one or more blood cultures, and (ii) the isolation of the same potential contaminant (e.g., coagulase-negative *Staphylococcus* species, *Streptococcus* species) from two or more blood cultures drawn on separate occasions within a 48-h period [9,10]. Urinary tract, gastrointestinal, lower respiratory tract, skin and soft tissue and skeletal infections were defined following Infectious Diseases Society of America (IDSA) criteria (http://www.idsociety.org/Organ_System/) and were diagnosed on the basis of the 2013 recommendations of the IDSA and the American Society for Microbiology [11]. Primary and recurrent episodes (those occurring after negative cultures from the site of infection) of bacterial infection were considered for the analyses reported herein.

Management of CMV infection

From February 2006 to May 2010, patients were monitored for CMV infection by the pp65 antigenemia assay (AG) and the CMV real-time PCR Kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) (once a week), although the administration of preemptive antiviral therapy was guided solely by the AG assay (>1 positive pp65 cells/200 000 polymorphonuclear leukocytes). From May 2010 to May 2012, CMV surveillance was exclusively performed by real-time PCR (CMV real-time PCR Kit) and antiviral therapy was initiated when the plasma CMV DNA load reached >500 copies/ml (Abbott CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) [12]. Since May 2012, the CMV DNA load threshold for the initiation of antiviral therapy was set at 1000 copies/ml, as determined by the new CMV real-time PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) [13]. Preemptive antiviral therapy was administered following previously detailed protocols [12]. CMV DNAemia (active CMV infection) was defined by the detection of any level of CMV DNA in plasma. The duration of a given episode of CMV DNAemia was defined as the interval between the day of the first positive PCR result and the day of the first negative (undetectable) result.

Statistical analysis

The relationship between bacterial and active CMV infection was assessed by treating these post-transplant

events as time-dependent covariates using competing risk regression [14]. These analyses were run using the statistical software R (<http://www.r-project.org/>). The relapse of underlying disease and early death were considered as competitive events for both active CMV infection and bacterial infection. Cox proportional hazards regression reporting hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) were used in the univariate analyses and the multivariate analysis of potential risk factors for the development of active CMV infection and bacterial infection, including baseline parameters such as the type of allo-SCT (related versus unrelated/HLA-matched versus HLA-mismatched), the source of stem cells, the conditioning regimen, and the GvHD prophylaxis regimen. All post-transplant events including aGvHD, neutropenia after the engraftment, bacterial infection, and CMV DNAemia were entered as time-dependent covariates. For multivariate analyses, only variables with parameter estimates showing a P value ≤ 0.10 in the univariate analyses were included. Median values (days, CMV DNA loads) were compared by means of the Mann-Whitney U -test. Two-sided P -values < 0.05 were deemed to be significant. The latter statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Incidence of bacterial infection and CMV DNAemia

Bacterial infection was documented in 98 of 173 allo-SCTs (56.6%) within the study period, at a median of 8 days (range, 0–59 days) after transplant. Nine patients had a second bacterial infection episode at a median of 43 days after transplant (range, 7–58 days); thus, in total, 107 episodes were registered. All but one episode were monomicrobial. Seventy-one were caused by Gram-positive bacteria and 35 by Gram-negative rods. Eighty episodes (74.7%) were bloodstream infections. The type of infection and the spectrum of bacteria isolated are shown in Table 2.

CMV DNAemia was detected in 124 of 173 allo-SCTs (71.7%), at a median of 26 days after transplant (range, 6–60 days). Preemptive antiviral therapy was administered in 86 of these episodes (69.4%). CMV DNAemia lasted a median of 42 days (range, 2–259 days). The median CMV DNA load peak level during episodes was 1715 IU/ml (range, 35–1 431 756 IU/ml). No recurrent episodes of CMV DNAemia were detected within the study period.

As shown in Table 3, both bacterial infection and CMV DNAemia were detected in 78 allo-SCTs (62.9%).

Table 2. Type of bacterial infection and spectrum of bacteria isolated (monomicrobial infections).

Type of infection	No. (%)
Bloodstream infections	76 (71.0)
Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> spp.	48 (63.1)
<i>Enterobacteriaceae</i>	12 (15.8)
<i>Enterococcus</i> spp.	7 (9.2)
<i>Streptococcus</i> spp.	3 (4.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (2.6)
Other Gram-negative bacteria	3 (4.0)
Anaerobials	1 (1.3)
Urinary tract infections	15 (14.0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	11 (73.3)
<i>Enterococcus</i> spp.	3 (20.0)
Other Gram negatives	1 (6.7)
Respiratory tract infections	2 (1.9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (50.0)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 (50.0)
Gastrointestinal infections	4 (3.7)
<i>Salmonella</i> spp.	3 (75.0)
<i>Clostridium difficile</i>	1 (25.0)
Skin, soft-tissue or skeletal infections	10 (9.4)
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	5 (50.0)
<i>Enterococcus</i> spp.	1 (10.0)
<i>Streptococcus anginosus</i>	2 (20.0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (10.0)

In 42 patients, bacterial infection occurred prior to CMV DNAemia, while in 23 patients, CMV DNAemia preceded bacterial infection, and in four patients, both events developed concomitantly (these episodes were analyzed bidirectionally). The remaining nine patients had two episodes of bacterial infection, one occurring prior to the diagnosis of CMV DNAemia and another

Table 3. Occurrence of bacterial infection and CMV DNAemia in the study cohort.

	No. of Allo-SCT (%)
No CMV DNAemia	49 (28.3)
No bacterial infection	29 (59.2)
Bacterial infection	20 (40.8)
CMV DNAemia	124 (71.7)
No bacterial infection	46 (37.1)
Bacterial infection	78 (62.9)
Prior to CMV DNAemia	42 (53.8)
After CMV DNAemia	23 (29.4)
Concurrent to	4 (5.1)
CMV DNAemia	
Bacterial infection prior and after CMV DNAemia	9 (11.5)

CMV, cytomegalovirus.

developing after it. Thus, in total, final figures taken for analyses shown below were 55 (for episodes of bacterial infection occurring prior to CMV DNAemia) and 36 (for episodes occurring after CMV DNAemia). Cumulative incidence curves of both CMV DNAemia and bacterial infection within the study period are shown in Figure S1.

Six patients died within the study period (at days +10, $n = 2$, +24, +26, +54, +58). The cause of death was severe aGvHD ($n = 1$), septic shock ($n = 2$), and nosocomial pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*, and it was not ascertained in the remaining two cases.

DNAemia as a risk factor for bacterial infection

CMV DNAemia preceded the occurrence of bacterial infection in 36 allo-SCTs (75% of which were bacteremic infections). Gram-positive bacteria were involved in 27 of these episodes (all but one monomicrobial), and Gram-negative rods were responsible for the remaining cases. The median time from CMV DNAemia detection to the documentation of bacterial infection was 25.5 days (range, 0–59 days). As shown in Fig. 1a, the cumulative incidence of bacterial infection (of any type) over the study period (from the day of cell infusion to day +60 after transplant) was overall comparable in patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia ($P = 0.552$). Likewise, the cumulative incidence of bacterial infection was not significantly different ($P = 0.271$) when the analysis was restricted to those bacterial infection episodes occurring near the time of documentation of CMV DNAemia (within 15 days; $n = 26$) (Fig. 1b). We further assessed the potential effect of CMV DNAemia on the development of bacterial infection by conducting a landmark time-point analysis. For this analysis, the baseline time point was set at day +30, as this was the median time from transplant to documentation of CMV DNAemia. Again, the incidence of bacterial infection was similar irrespective of whether or not a preceding episode of CMV DNAemia did occur ($P = 0.390$) (Figure S2).

The median CMV DNA peak load within episodes of active CMV infection was comparable ($P = 0.248$) irrespective of whether bacterial infection did (2215 IU/ml) or did not (860 IU/ml) develop subsequently. As shown in Table 4, the occurrence of CMV DNAemia was not found to be a risk factor for bacterial infection in the univariate Cox regression analysis. In our cohort, none of the pre- or post-transplant parameter included in the univariate models was found to associate significantly

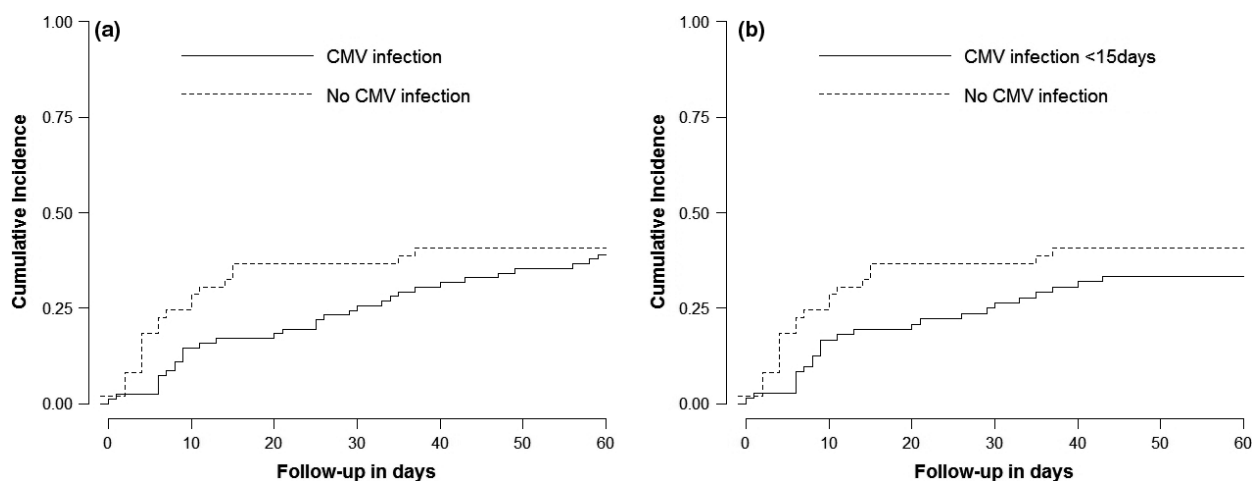


Figure 1 Impact of CMV DNAemia on the risk of subsequent bacterial infection in allogeneic stem cell transplant recipients (allo-SCT). (a) Overall cumulative incidence of bacterial infection from the day of hematopoietic stem cells infusion (day 0) to day +60 after transplant in patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia. (b) Cumulative incidence of bacterial infection in patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia (this occurring a maximum of 15 days earlier).

with the occurrence of bacterial infection in multivariate models (Table 4).

Occurrence of bacterial infection and risk of subsequent CMV DNAemia

The potential effect of bacterial infection in promoting CMV DNAemia was investigated next. Bacterial infection preceded CMV DNAemia in 55 allo-SCTs. These infections were caused by Gram-positive organisms in 38 cases and by Gram-negative rods in the remaining 17 cases and were diagnosed at a median of 7 days after transplant (range, 0–41 days). Of these episodes, 40 were bacteremic. As shown in Fig. 2a, the cumulative

incidence of CMV DNAemia within the study period was not significantly different in patients with or without a preceding episode of bacterial infection ($P = 0.207$). This was also the case when bacterial infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria were considered separately ($P = 0.156$ and $P = 0.319$, respectively; Fig. 2b), or when only bloodstream infections were included in the analysis ($P = 0.342$; Fig. 2c). Likewise, the cumulative incidence of CMV DNAemia was also comparable ($P = 0.586$; Fig. 2d) when only episodes developing closely after bacterial infection (within 15 days; $n = 25$) were taken into consideration for the analysis. Landmark time-point analyses seemed to confirm the above

Table 4. Risk factors for the development of bacterial infection in a cohort of allogeneic stem cell transplant recipients.

Factor	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
HLA-matching	2.12 (1.37–3.29)	0.001	1.87 (0.60–5.78)	0.277
Donor type (unrelated versus related)	1.12 (0.74–1.70)	0.577		
Stem cell source				
Umbilical cord blood versus Peripheral blood	1.96 (1.23–3.12)	0.005	1.84 (0.54–6.25)	0.327
Conditioning regimen (myeloablative versus nonmyeloablative)	1.50 (0.99–2.27)	0.053	0.57 (0.21–1.54)	0.270
Graft-versus-host disease prophylaxis				
CyA-MTX versus Others	0.72 (0.46–1.14)	0.160		
CyA-MMF versus Others	0.84 (0.47–1.50)	0.568		
Acute graft-versus-host disease (II–IV versus 0–I)	2.64 (1.07–6.53)	0.035	0.54 (0.24–1.23)	0.973
CMV DNAemia	1.00 (0.57–1.75)	0.993		
Neutropenia post engraftment (after day +21 after Allo-SCT)	2.24 (0.91–5.52)	0.080	1.85 (0.68–5.02)	0.229

CyA, cyclosporin A; CMV, cytomegalovirus; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil.

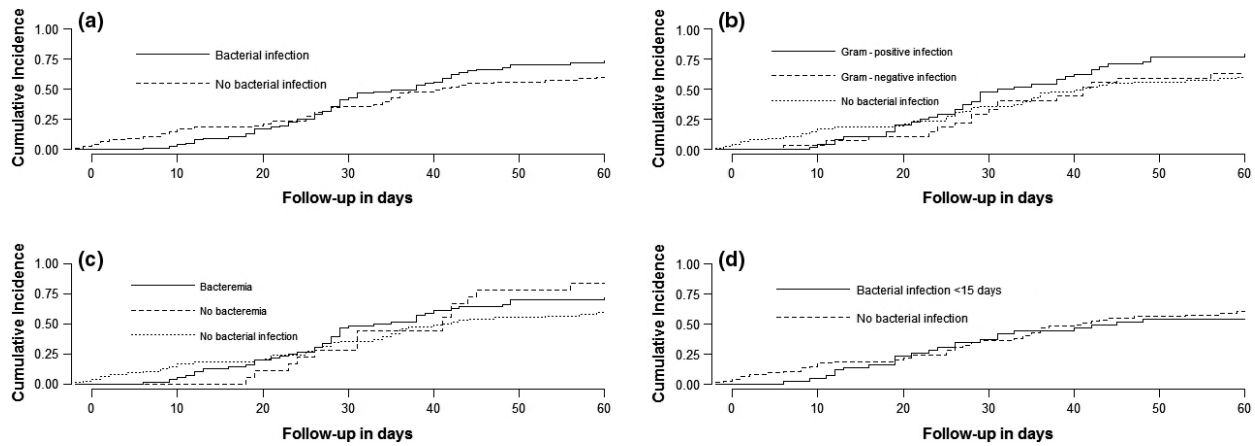


Figure 2 Analysis of the potential effect of bacterial infection on the risk of subsequent CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients (allo-SCT). (a) Overall cumulative incidence of CMV DNAemia in patients with or without a preceding episode of bacterial infection from the day of hematopoietic stem cells infusion (day 0) to day +60 after transplant. (b) Cumulative incidence of CMV DNAemia in patients with or without a preceding episode of bacterial infection caused by either Gram-positive or Gram-negative bacteria. (c) Cumulative incidence of CMV DNAemia in patients with or without a preceding episode of a bloodstream bacterial infection. (d) Cumulative incidence of CMV DNAemia in patients with or without a preceding episode of bacterial infection (this occurring a maximum of 15 days earlier).

observations. For these analyses, two base line time points were chosen: day +7, time at which the incidence of bacterial infection is high, and day +30 to mimic the time point selected for evaluating the impact of CMV DNAemia on the occurrence of bacterial infection. In effect, the cumulative incidence of CMV DNAemia was comparable in patients with or without a preceding episode of bacterial infection ($P = 0.151$ at day +7, and $P = 0.164$ at day +30). (Figure S3).

The median CMV DNA peak load within episodes of active CMV infection was comparable ($P = 0.407$) irrespective of whether these were preceded (1883 IU/ml) or not (860 IU/ml) by a bacterial infection. Neither bacterial infection nor other pre- or post-transplant factors were found to be a significant risk factor for CMV DNAemia in our cohort (Table 5).

Effect of bacterial infection on the kinetics of ongoing episodes of CMV DNAemia

We next investigated whether the occurrence of a bacterial infection within the episodes of active CMV infection ($n = 25$) had any effect on the kinetics of plasma CMV DNAemia. The data are shown in Table 6. Both the plasma CMV DNA peak load within episodes of CMV DNAemia and the duration of CMV DNAemia were comparable regardless of whether or not a bacterial infection occurred. Likewise, the number of episodes that required the administration of antiviral therapy was similar in both comparison groups, regardless of the criteria used for triggering the inception of

therapy (pp65 antigenemia or real-time PCR results; $P = 0.22$ for pp65 antigenemia and $P = 0.389$ for real-time PCR).

Discussion

It has long been suggested that CMV may promote bacterial superinfection in allo-SCT recipients [6–8]. Although mechanistically plausible [4,5], mostly indirect evidence supports this assumption. In this sense, Broers *et al.* [6] showed that CMV-seropositive allo-SCT patients receiving T-cell-depleted allografts had an increased risk of bacterial infection (mostly pulmonary infection) as compared to CMV D-/R- patients. Likewise, Craddock *et al.* [7] reported a similar phenomenon in the unrelated T-cell-depleted setting. Furthermore, Nichols *et al.* [8] observed a high risk of death due to bacterial and fungal infection in CMV-seronegative patients receiving an allograft from CMV-seropositive donors that could not be linked to the occurrence of ganciclovir-induced neutropenia. Notably, these authors found no association between the presence of pp65 antigenemia and these infectious complications. In contrast, Capellano *et al.* [15] identified positive pp65 antigenemia as a significant risk factor for bloodstream bacterial infection in multivariate models. Nevertheless, the antigenemia assay is markedly less sensitive than real-time PCR assays [16], so it may fail to detect episodes of active CMV infection in which the virus replicates at a low level and is cleared without the need for antiviral therapy. This could be of relevance,

Table 5. Risk factors for the development of cytomegalovirus DNAemia in a cohort of allogeneic stem cell transplant recipients.

Factor	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
HLA-matching	1.87 (1.25–2.80)	0.002	1.70 (0.97–2.97)	0.066
Donor type (unrelated versus related)	1.81 (1.24–2.65)	0.002	1.65 (0.96–2.86)	0.072
Stem cell source				
Umbilical cord blood versus Peripheral blood	1.94 (1.26–2.97)	0.002	0.80 (0.37–1.69)	0.562
Conditioning regimen (myeloablative versus nonmyeloablative)	1.71 (1.18–2.49)	0.005	1.45 (0.87–2.43)	0.154
Graft-versus-host disease prophylaxis				
CyA-MTX versus Others	0.65 (0.43–0.99)	0.045	0.99 (0.56–1.77)	0.964
CyA-MMF versus Others	1.18 (0.74–1.90)	0.483		
Acute graft-versus-host disease (II–IV versus 0–I)	1.38 (0.69–2.73)	0.361		
CMV serostatus				
D+/R+ versus D+/R–	1.83 (0.73–4.55)	0.194		
D–/R+ versus D+/R–	2.15 (0.85–5.41)	0.105		
Bacterial infection	0.76 (0.51–1.13)	0.169	0.87 (0.58–1.35)	0.572

CyA, cyclosporin A; CMV, cytomegalovirus; MMT, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; D, donor; R, recipient.

Table 6. Effect of bacterial infection occurring within episodes of active CMV infection on the dynamics of CMV DNAemia.

Parameter	Bacterial infection		P value*
	Yes (n = 25)	No (n = 48)	
Need of antiviral treatment, no. (%)			
Yes	18 (72)	30 (62.5)	0.324
No	7 (28)	18 (37.5)	
CMV episode duration, median days, (range)	44 (8–155)	49 (4–257)	0.508
Median CMV DNA peak load in log IU/ml (range)	3.41 (1.47–4.80)	2.84 (0.89–6.15)	0.252

CMV, Cytomegalovirus.

*Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U*-test. Frequency comparisons for categorical variables were carried out using the chi-square test (Fisher’s exact test). Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

inasmuch as low-level CMV replication may potentially exert immunomodulatory effects. In this context, we sought to examine this pathogenic possibility in a cohort of allo-SCT recipients who were systematically monitored for the presence of CMV in blood by means of highly sensitive real-time PCR assays. Our data do not support the idea that active CMV infection is a promoting factor for bacterial infection early after transplant. First, the cumulative incidence of bacterial infections, most of which were bacteremic, was similar in patients with or without a preceding episode of CMV DNAemia. Second, the magnitude of CMV replication within episodes of active CMV infection, as inferred by the plasma CMV DNA peak load, had no apparent impact on the risk of subsequent bacterial

infection. Third, Cox regression models failed to identify CMV DNAemia as a significant risk factor for bacterial infection. In support of our view, Boeckh *et al.* [17] recently reported that valganciclovir prophylaxis, which abrogates CMV replication, was not superior in reducing the incidence of complications of late cytomegalovirus infection (composite end point of CMV disease, invasive bacterial or fungal disease, or death) when compared with polymerase chain reaction-guided pre-emptive therapy. Bacterial components such as lipopolysaccharide as well as inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α , or interleukin-1 β , trigger the reactivation of latent murine CMV infection [18]. Furthermore, sepsis of bacterial origin has been identified as a risk factor for active CMV infection in

solid organ transplant recipients [19,20] and in critically ill patients [21]. We found, nevertheless, no evidence pointing to bacterial infection as being a relevant risk factor for the occurrence of CMV DNAemia. Neither the cumulative incidence nor the dynamics of CMV DNAemia within episodes of active CMV infection appeared to be influenced by the presence or absence of a preceding episode of bacterial infection. Furthermore, the occurrence of bacterial infection within episodes of active CMV infection had no apparent impact on the kinetics of CMV DNAemia. In fact, the number of episodes that required the inception of preemptive antiviral therapy was similar regardless of whether bacterial infection either developed or not.

The major limitations of the present study are the relatively scarce number of patients experiencing both bacterial and active CMV infections in the cohort and its retrospective nature. Other limitations that deserve comment are the following: (i) the heterogeneity of the patient cohort, (ii) the inclusion of different types of bacterial infections (most of them were nevertheless bloodstream infections), (iii) the fact that local interactions between bacteria and CMV potentially occurring in tissues or organs (and not leading to viremia) were inevitably missed, and (iv) the use of antibacterial prophylaxis, which may have masked naturally occurring interactions between bacteria and CMV. In summary, our data do not support the existence of a bidirectional synergistic effect between bacterial infection and active CMV infection in the allo-SCT setting. Nevertheless, prospective and more homogeneous studies involving larger cohorts are needed to conclusively settle this issue.

Authorship

VV and EG: performed PCR analyses and assisted in the analysis of the data. CS, JLP, JCH-B and PA: contributed to the analysis of the data and attended the patients. DN:

designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript.

Funding

This research was supported by grants (12/1992, 11/01357) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). This work was also supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud.

Conflict of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario de Valencia, Fundación INCLIVA.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Figure S1. Overall cumulative incidence of bacterial infection and CMV DNAemia from the day of hematopoietic stem cells infusion (day 0) to day + after transplant.

Figure S2. Cumulative incidence of bacterial infection from day +30 to day +60 after allogeneic stem cell transplantation in patients with or without a prior episode of CMV DNAemia.

Figure S3. Cumulative incidence of CMV DNAemia from day +7 to day +60 after transplant (A), and from day +30 to day +60 after transplant (B) in allogeneic stem cell transplant patients with or without a preceding episode of bacterial infection.

REFERENCES

1. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**: 835.
2. Engels EA, Ellis CA, Supran SE, et al. Early infection in bone marrow transplantation: quantitative study of clinical factors that affect risk. *Clin Infect Dis* 1999; **28**: 256.
3. Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 2010; **5**: 111.
4. Sinclair J. Human cytomegalovirus: latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* 2008; **41**: 180.
5. Span AH, Grauls G, Bosman F, van Boven CP, Bruggeman CA. Cytomegalovirus infection induces vascular injury in the rat. *Atherosclerosis* 1992; **93**: 41.
6. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, et al. 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.
7. Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F, et al. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease

- prophylaxis. *Br J Haematol* 2001; **112**: 228.
8. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis* 2002; **185**: 273.
 9. Gaynes RP, Horan TC. National Nosocomial Infections Surveillance Systems: Surveillance of Nosocomial Infection. In: Mayhall CG, ed. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996: 1017; App-A-1-14.
 10. Glynn A, Ward V, Wilson J, et al. *Public Health Laboratory Service. Hospital-Acquired Infections, Surveillance, Policies and Practice*. London: PHLS, 1997: 16–28.
 11. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013; **57**: e22.
 12. 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; **46**: 1437.
 13. Clari MÁ, Bravo D, Costa E, et al. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **75**: 207.
 14. Scheike TH, Zhang MJ. Analyzing competing risk data using the R timereg package. *J Stat Softw* 2011; **38**: pii: i02.
 15. Cappellano P, Viscoli C, Bruzzi P, Van Lint MT, Pereira CA, Bacigalupo A. Epidemiology and risk factors for bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *New Microbiol* 2007; **30**: 89.
 16. 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.
 17. Boeckh M, Nichols WG, Chemaly RF, et al. Valganciclovir for the prevention of complications of late cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2015; **162**: 1.
 18. Cook CH, Trgovcich J, Zimmerman PD, Zhang Y, Sedmak DD. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* 2006; **80**: 9151.
 19. Paya CV, Wiesner RH, Hermans PE, et al. Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *J Hepatol* 1993; **18**: 185.
 20. Mutimer D, Mirza D, Shaw J, O'Donnell K, Elias E. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. *Transplantation* 1997; **63**: 1411.
 21. Heining A, Haeberle H, Fischer I, et al. Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care* 2011; **15**: R77.

The impact of virus population diversity on the dynamics of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients

Víctor Vinuesa,¹ María Alma Bracho,² Eliseo Albert,¹ Carlos Solano,^{3,4} Manuela Torres-Puente,² Estela Giménez,¹ Fernando González-Candelas^{2,5,6} and David Navarro^{1,7,*}

Abstract

Mixed cytomegalovirus (CMV) infections are associated with delayed viral clearance in solid organ transplant recipients. We investigated whether this could be extrapolated to allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients. A total of 48 plasma specimens, obtained during 29 episodes of active CMV infection in 25 non-consecutive allo-SCT patients, were analysed. Baseline blood specimens, drawn shortly prior to the inception of pre-emptive antiviral therapy (pre-treatment specimen; $n=29$), as well as follow-up samples obtained either after the initiation of antiviral therapy (post-treatment specimen; $n=15$) or during recurrent episodes ($n=4$) were analysed. Plasma CMV DNA loads were quantified by real-time PCR and the CMV genotyping was performed by ultra-deep sequencing of hypervariable regions in the genes coding for glycoproteins N (gN) and O (gO). A trend towards higher CMV DNA peak loads, longer CMV DNAemia episode durations and slower CMV DNAemia decay rates was observed for episodes with mixed CMV genotype populations compared to those caused by single CMV variants, although the differences did not reach statistical significance. The length of the treatment course required to clear DNAemia was significantly longer in these mixed episodes ($P=0.002$). Significant changes in the number or frequency of CMV gN or gO genetic variants were documented following the initiation of antiviral therapy or in recurrent episodes. CMV diversity may have a major impact on the kinetics of CMV DNAemia clearance during the treatment of active CMV infection episodes in allo-SCT recipients.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) is a large double-stranded DNA virus with a genome size of about 235 Kb [1] that exhibits a high degree of variability, particularly in genes encoding envelope glycoproteins, such as gB (*UL55*), gO (*UL74*), gN (*UL73*) and *UL139*, and viral evasion genes, including *UL144*, *UL146* and *UL147* (reviewed in [2, 3]). Recent data have provided evidence that CMV may exist as a complex mixture of genome types in humans [4], most strikingly in CMV-seropositive transplant patients who are reinfected by donor-derived CMV strains [5]. CMV infection remains a frequent cause of morbidity in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients, despite major advancements in

CMV surveillance methods and the availability of antivirals with relatively high intrinsic activity against the virus [6].

Allo-SCT patients who develop viraemia are most commonly managed by a pre-emptive antiviral therapy approach [6, 7] in which antiviral treatment is initiated upon the detection of CMV DNA blood loads above a predetermined threshold, although this limit varies widely across institutions [8]. Both the *in vivo* susceptibility of CMV to antivirals and, notably, the magnitude of the CMV-specific functional CD8⁺ and CD4⁺ T cell expansion triggered by CMV replication are known to exert a major force on the dynamics of viraemia in these patients [9, 10]. Nevertheless, data obtained in the solid organ transplantation (SOT) setting suggest that CMV genetic complexity may also be relevant, because mixed CMV

Received 8 May 2017; Accepted 7 August 2017

Author affiliations: ¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain; ²Unidad Mixta 'Infección y Salud Pública' FISABIO-Salud Pública, Valencia, Spain; ³Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain; ⁴Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁵CIBER Epidemiología y Salud Pública, Valencia, Spain; ⁶Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), University of Valencia-CSIC, Valencia, Spain; ⁷Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

*Correspondence: David Navarro, david.navarro@uv.es

Keywords: Cytomegalovirus (CMV); allogeneic stem cell transplant recipients; CMV DNAemia; virus population diversity.

Abbreviations: allo-SCT, allogeneic stem cell transplant; aGVHD, acute graft versus host disease; CMV, cytomegalovirus; gN, glycoprotein N; gO, glycoprotein O; GT, genotype; SOT, solid organ transplantation; UDS, ultra-deep sequencing.

GenBank Accession numbers of new sequences: LT622645 to LT622799.

Six supplementary tables are available with the online Supplementary Material.

infections appear to be associated with higher viral loads, delayed viral clearance and poorer clinical outcomes [11–13]. Whether these observations can be extrapolated to the allo-SCT setting is yet to be elucidated. Here, we aimed to determine the genetic diversity of the viral population present during episodes of active CMV infection in allo-SCT recipients by means of ultra-deep sequencing of hypervariable regions in the genes coding for glycoproteins N (gN) and O (gO), and to assess whether this parameter influences the dynamics of CMV DNAemia clearance following the inception of antiviral treatment.

RESULTS

Cytomegalovirus population genetic diversity in cytomegalovirus DNAemia episodes in allo-SCT recipients

First, we determined the CMV population's genetic diversity in blood samples drawn during episodes of active CMV infection before the initiation of pre-emptive antiviral therapy. CMV genotyping was performed by ultra-deep sequencing (UDS) of hypervariable regions in the genes coding for gN and gO. We analysed 34 pre-treatment plasma specimens, each from separate CMV DNAemia episodes that occurred in 30 different patients. We were unable to amplify CMV DNA suitable for UDS from five of these specimens. We could not identify any differential features for these failed samples (data not shown). Thus, we finally included pre-treatment plasma specimens from 29 CMV DNAemia episodes in 25 patients (Table 1); 21 of these were the first episode and developed at a median of 33 days (range 4–66 days) after transplant, while 8 were recurrent episodes that occurred at a median of 140.5 days (range 101–368 days) after transplant. The relevant features of the episodes are shown in Table 2. Of note, all but five episodes (occurring in patients who eventually died) resolved after the administration of antiviral treatment. The performance of genotypic drug resistance tests in these five cases was deemed to be unnecessary because the patients died within 3 weeks after the initiation of pre-emptive therapy. At our institution, resistance tests are conducted upon the detection of significant CMV DNA load increases after 3 weeks of antiviral treatment.

UDS yielded between 657 612 and 12 530 sequences per sample and amplicon set (average 93 904 sequences). The length of the gN and gO CMV genetic variants ranged from 349 to 361 nucleotides and 246 to 255 nucleotides, respectively. Minimum sequence depths were 571 sequences for the less represented gN genetic variant (nP12pre sample, 0.009 %) and 1188 sequences for the less represented gO gene genetic variant (oP18post sample, 0.012 %; Tables S1 and S2, available in the online Supplementary Material), respectively. Globally, 15 gN protein genetic variants were found for *UL73*: three genotype 1 (GT1), two genotype 2 (GT2), two genotype 3 (GT3) and eight genotype 4 (GT4); six matched reference sequences, seven were identical to GenBank sequences and two were new sequences (both

only differed from the nearest deposited sequences by a single nucleotide). Interestingly, patient 28 exhibited a mixed population of two gN variants with a difference in only one *UL73* codon. Similarly, 13 genetic variants were detected for *UL74* encoding gO genetic variants: 5 GT1, 4 GT2, 2 GT3 and 2 GT5; 10 matched reference sequences, 4 were identical to deposited sequences and 1 was a new sequence (only differing from the most similar deposited sequence by a single nucleotide). Phylogenetic trees for the CMV gN and gO genetic sequences are shown in Fig. 1.

A single gN or gO genetic variant was found in 11 pre-treatment specimens, while the remaining 18 specimens contained more than 1 variant. Specifically, when the *UL73* sequences were analysed, 13 specimens contained 2 variants, 4 contained 3 variants and 1 specimen had 4 variants; *UL74* sequence analyses yielded 11, 6 and 1 specimen(s) containing 2, 3, or 4 variants, respectively (Fig. 2, Tables 3, S2 and S3).

Cytomegalovirus population genetic diversity and dynamics of cytomegalovirus DNAemia clearance

Next, we investigated whether CMV genetic diversity prior to the administration of antiviral therapy had any impact on the kinetics and duration of CMV DNAemia (Table 4). A trend towards higher CMV DNA peak loads, longer CMV DNAemia episode durations and slower decay rates (half-lives) were observed for episodes involving more than one genetic variant (gN, gO, or both), but these differences did not reach statistical significance. Nevertheless, the duration of antiviral treatment courses required to achieve CMV DNAemia clearance was significantly longer in genetically mixed CMV episodes compared to episodes involving only one genetic variant, regardless of whether *UL73* or *UL74* sequences were considered for the analyses. This effect was independent of the criteria established to interrupt antiviral therapy (see the Methods section), or the antiviral agent used (usually valganciclovir; data not shown). In this context, it is of relevance to underline the fact that mixed genotypes were seen in two out of the five episodes that were active at the time of a patient's death. Likewise, the combined gN and gO haplotype correlated significantly with the nucleotide diversity indexes and the length of antiviral treatment courses (Table 5).

We must stress that neither the demographics nor the pre/post-transplant clinical characteristics differed significantly between patients with genetically mixed or single-variant CMV infections (Table S3). In particular, the use of high doses of corticosteroids to treat acute graft-versus-host disease (aGvHD; grades II–IV) – which significantly impair CMV-specific functional T cell expansion [9] – was comparable in both groups. In addition, both the initial CMV DNA load and the nature of the episode (initial vs recurrent) were also similar between the two groups ($P > 0.5$). Furthermore, undetectable levels of CMV-specific polyfunctional (bifunctional +trifunctional) CD8⁺ T cells were observed in most episodes (in 11 out of 13 episodes from which immunological data were available –5 with a mixed CMV population and 6 with a single variant) prior to the initiation of antiviral therapy (median,

Table 1. Demographic and clinical characteristics of allogeneic stem cell transplant patients

Patient	Age	Gender	Underlying disease	Stem cell source	Donor type	HLA matching*	CMV serological status	Acute GvHD (grade)†
P01	56	Male	AML	PB	Related	Matched	D+/R+	0–I
P02	40	Male	NHL	PB	Unrelated	Matched	D-/R+	0–I
P03	62	Female	AML	PB	Related	Mismatched	D+/R+	0–I
P04	39	Female	AML	PB	Unrelated	Matched	D+/R+	II–IV
P05	43	Male	NHL	PB	Related	Mismatched	D-/R+	II–IV
P06	65	Male	MDS	PB	Related	Matched	D+/R+	II–IV
P07	69	Male	NHL	PB	Unrelated	Matched	D-/R-	0–I
P08	54	Male	CLL	PB	Related	Matched	D+/R+	II–IV
P09	67	Male	MDS	PB	Related	Matched	D+/R+	II–IV
P10	66	Male	AML	BM	Related	Mismatched	D+/R+	II–IV
P11	61	Male	NHL	PB	Unrelated	Matched	D-/R+	II–IV
P12	67	Female	MDS	PB	Related	Matched	D+/R+	0–I
P14	40	Female	NHL	PB	Unrelated	Mismatched	D+/R+	II–IV
P15	56	Female	LLC	PB	Related	Matched	D+/R+	II–IV
P16	63	Male	MF	PB	Unrelated	Matched	D-/R+	0–I
P17	58	Male	ALL	PB	Unrelated	Matched	D-/R+	0–I
P18	62	Female	MF	PB	Related	Mismatched	D+/R+	II–IV
P19	47	Male	NHL	PB	Related	Mismatched	D+/R+	0–I
P20	62	Female	AML	PB	Related	Mismatched	D+/R+	0–I
P21	65	Male	CLL	PB	Related	Matched	D+/R+	II–IV
P22	62	Male	AML	PB	Related	Mismatched	D+/R+	II–IV
P23	54	Female	CML	BM	Related	Mismatched	D-/R+	II–IV
P24	64	Female	NHL	PB	Unrelated	Mismatched	D+/R+	II–IV
P28	60	Male	NHL	PB	Related	Mismatched	D+/R+	II–IV
P32	69	Male	CLL	PB	Unrelated	Matched	D-/R+	0–I

AML, acute myeloid leukaemia; ALL, acute lymphoid leukaemia; BM, bone marrow; CLL, chronic lymphoid leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; D, donor; GvHD, graft-versus-host disease; HLA, human leukocyte antigen; MDS, myelodysplastic syndrome; NHL, non-Hodgkin lymphoma; PB, peripheral blood; R, recipient.

*HLA-mismatch was defined as the presence of one disparity in 10 HLAs at A, B, C, or DRB1 loci, as determined by high-resolution genotyping in either sibling or unrelated donors.

†AGvHD was diagnosed and graded (grades II–IV are severe), as previously reported in Glucksberg *et al.* [37].

19 days; range, 7–30 days). This is relevant because the level of peripheral CMV-specific functional CD8⁺ T cells present, either prior to or at the time of CMV DNAemia onset, influences the kinetics of CMV DNAemia clearance in allo-SCT recipients dramatically [9, 10].

Dynamics of cytomegalovirus genetic variants following the initiation of antiviral treatment

We then investigated whether antiviral therapy administration affected the number or frequency of CMV gN or gO genetic variants. Post-treatment plasma specimens, obtained at a median of 14 days (range, 4–52 days) after antiviral therapy initiation, were available for 15 out of the 29 CMV DNAemia episodes (Fig. 2, Tables 3, S1 and S2). The analysis of these samples revealed a significant difference in either the number or frequency of variants in the pre- and post-treatment paired samples in nearly half the cases (7 of 15 for gN; Table S4). However, the results differed slightly, depending on the genome region used for the comparison: gN analyses yielded a better resolution (two more cases with

significant differences) than for gO. In most cases, there was a decrease in genetic complexity (fewer variants or lower frequencies of one or more variants) over time, and the appearance of new genetic variants after antiviral treatment inception was not observed. Interestingly, the nucleotide sequences of the individual *UL73* or *UL74* variants remained stable over time.

Following this, we investigated whether changes in the genetic composition of the gN/gO protein populations present during antiviral treatment had any impact on the length of antiviral treatment courses. We found that the number of treatment days required to clear CMV viraemia was comparable, irrespective of whether or not there were any changes in the CMV population ($P=0.463$ and $P=0.090$ for *UL73* and *UL74*, respectively).

Variation in cytomegalovirus genetic populations in recurrent episodes of cytomegalovirus DNAemia

Finally, we investigated whether variations in the number or frequency of genetic variants occurred during recurrent

Table 2. Features of the CMV DNAemia episodes included in the study

Episode	Initial CMV DNA load*	Pre-treatment CMV DNA load Copies ml ⁻¹	Post-treatment CMV DNA load	Time after transplantation (pre-/post-treatment specimens)	Duration of the episode Days	CMV DNA load half-life	Treatment duration
P01E1	31	20 000	NA	49	58	2.22	44
P01E2	80	5200	NA	126	12	NC	0
P02	121	1652	1373	138/145	156	1.8	28
P03	27	17 270	8538	44/54	137	6.88	126
P04	107	643	2039	94/124	112	6.26	77
P05	27	1521	13 165	34/48	42	8.26	35
P06	60	2414	908	153/167	37	3.52	28
P07	70	991	NA	54	144	2.68	61
P08	41	2842	1323	80/84	37	5.77	23
P09	28	1637	1272	383/189	21	16.48	36
P10	29	2932	NA	47	51	4.57	46
P11	67	4782	967	54/70	51	2.73	46
P12	192	2400	1081	213/229	38	14.81	35
P14	226	1669	NA	106	100	5.41	105
P15E1	28	1154	NA	94	93	1.65	23
P15E2	39	962	NA	203	30	1.12	19
P16E1	497	2896	NA	44	53	11.7	52
P16E2	56	2028	NA	128	103	8.91	100
P17	26	1545	7961	62/76	79	9.38	61
P18	23	3778	8888	55/83	145	1.26	138
P19	262	4771	1161	38/90	110	1.4	112
P20	83	2081	1515	50/60	42	7.46	35
P21	1963	1374	NA	165	51	27.2	66
P22E1	45	1702	NA	45	33	9.06	31
P22E2	316	7039	NA	111	38	3.93	44
P23	116 504	116 504	1 055 374	54/63	88	1.03	102
P24	1 079	1 079	4708	22/27	35	16.67	34
P28	30	132 629	NA	64	100	2.02	94
P32	21	6620	NA	286	403	82.3	154

NA, specimen not available for ultra-deep sequencing; NC, not calculated.

*Initial CMV DNA load is that measured at the time of detection of CMV DNAemia.

episodes of CMV DNAemia. Four patients in our cohort (patients 1, 15, 16 and 22) developed a recurrent episode. The time elapsed between the initial and the relapse episodes was 77, 109, 84 and 66 days, respectively. Significant variations in the number or frequency of CMV gN or gO genetic variants were observed in three of the episodes (Table S5). A reduction in the complexity of these genetic populations was seen in all cases, and no new variants emerged compared to those found in the initial episodes.

DISCUSSION

Genetic heterogeneity in CMV was first reported some time ago [14] and now recent studies have exhaustively characterized it through full-genome analyses using UDS methods [15–17]. It is biologically feasible that a correlation between viral genetic variability and strain pathogenicity exists [2], yet definitive evidence supporting this is lacking. An

increasing body of experimental evidence suggests that mixed-genotype infections in SOT patients may be associated with delayed clearance of viraemic episodes and worse clinical outcomes [11–13]. In the Allo-SCT setting, two recent studies failed to prove an association between infections with mixed gB (*UL55* gene) genotypes and a higher incidence of CMV end-organ disease [18, 19]. They genotyped *UL55* either by PCR-restriction fragment-length polymorphism analysis [18] or by nested PCR [19], and thus it was not possible to achieve a precise estimation of the genetic complexity of the viral population. Given the demonstrated utility of *UL73* and *UL74* UDS for assessing viral population diversity in SOT recipients [5, 20], here we employed the same technique in highly polymorphic regions of these same genes to investigate the impact of gN and gO genetic diversity in the CMV population on the dynamics of CMV DNAemia clearance.

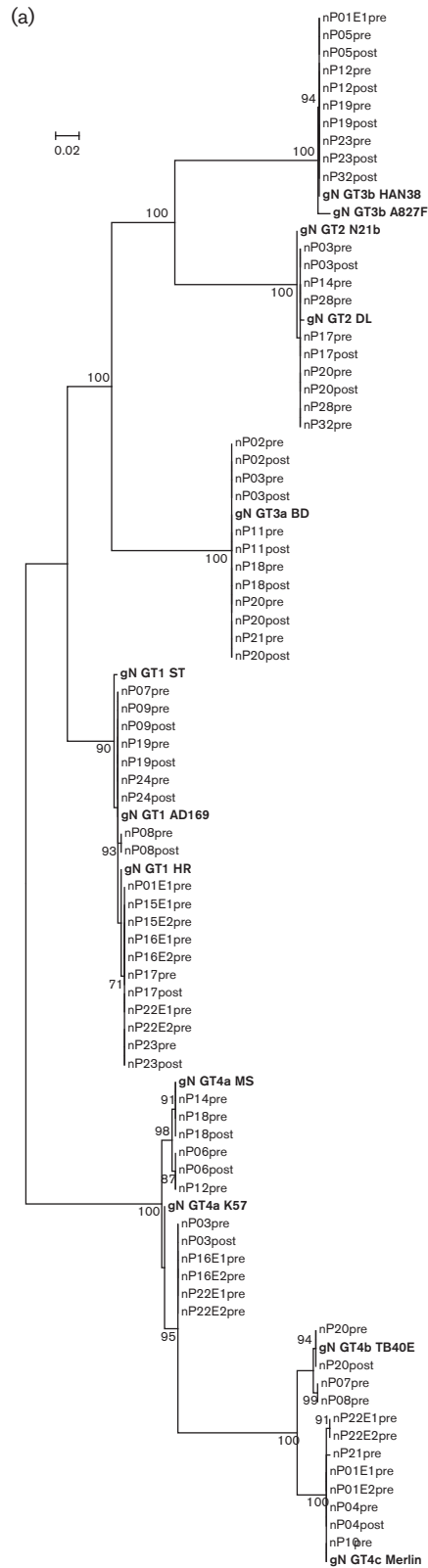
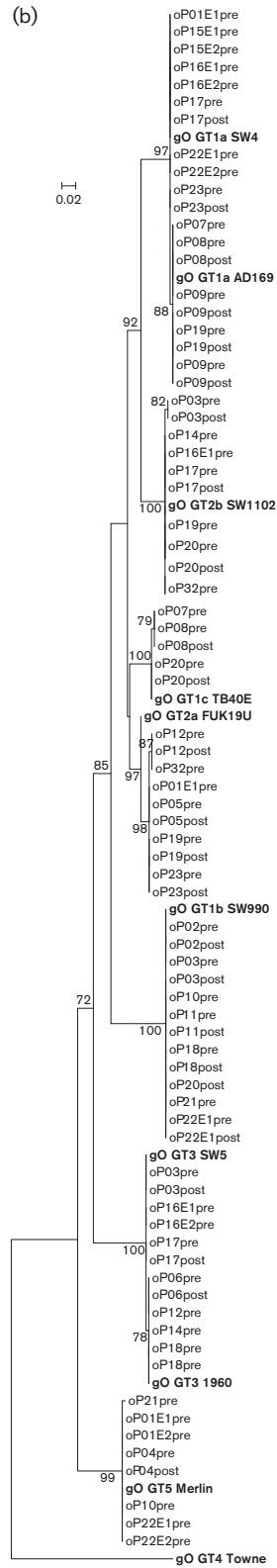


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogenetic reconstructions for cytomegalovirus (CMV) genetic variants. (a) Glycoprotein N (gN) polymorphic genetic region (*UL73* gene; 366 bp). (b) Glycoprotein O (gO) polymorphic region (*UL74* gene; 257 bp). Bootstrap values >75% are shown. Scale bars indicate the number of substitutions per nucleotide position. Reference sequences for genotypes are shown in bold.

Fig. 1. (cont.)



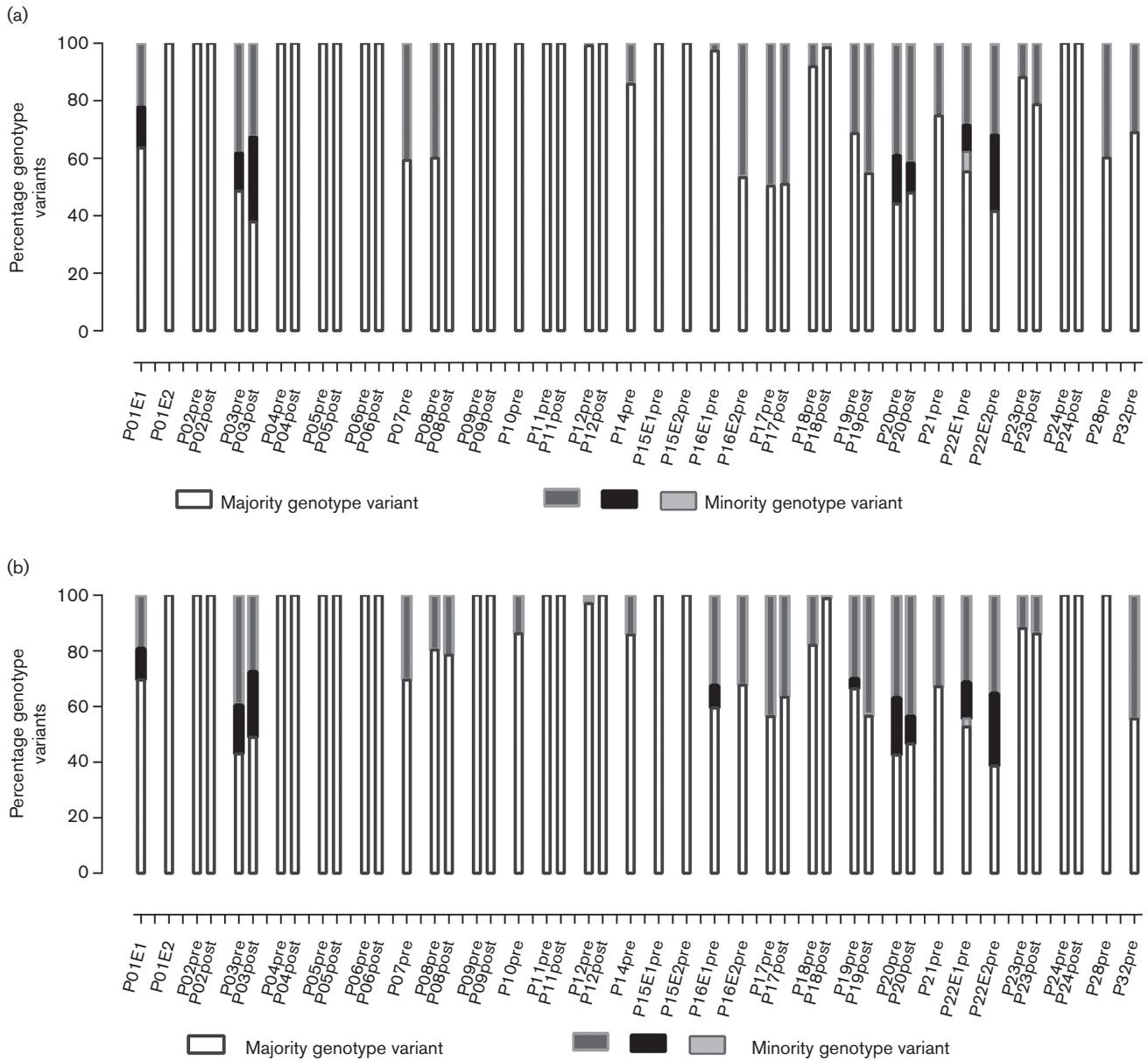


Fig. 2. Genotype diversity and relative frequencies of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein N and O (gN and gO) (*UL73* and *UL74* genes, respectively) variant populations as determined by ultra-deep sequencing in pre-treatment and post-treatment plasma specimens from allogeneic stem cell transplant recipients who developed an episode of CMV DNAemia.

We drew several conclusions from our data. First, mixed infections are common in allo-SCT recipients, irrespective of their pre-transplantation or donor CMV serostatus. This concurs with previous observations in allo-SCT and SOT settings [5, 11–13, 18–21]. Second, while the initial plasma CMV DNA loads were comparable in both multiple- and single-genetic-variant episodes, the peak CMV DNA load and CMV DNAemia episode duration tended to be higher in multiple-variant viraemia. Furthermore, the rate of CMV DNAemia decay in plasma, as inferred from the CMV DNA half-lives, was slower in episodes with greater CMV

population genetic diversity, and most notably, the duration of antiviral treatment until viraemia clearance was significantly longer in these episodes than in those involving only one genetic variant. This effect was apparently independent of pre-transplant and post-transplant clinical factors, the therapeutic regimen used, the criterion for stopping antiviral treatment and the nature of the episode (initial vs recurrent), thus suggesting that viral-population genetic diversity may indeed be an independent marker of delayed viral clearance.

Table 3. Cytomegalovirus glycoprotein N and O genetic variants found prior to and after the inception of pre-emptive antiviral therapy in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients

Episode/plasma sample	Glycoprotein N (gN)		Glycoprotein O (gO)	
	Variant*	Frequency (%)	Variant*	Frequency (%)
P01E1pre†	GT4c_Merlin	63.6	GT5_Merlin	69.5
	GT3b_HAN38	22.1	GT2a_PAV24	19.3
	GT1_PAV12	14.2	GT1a_SW4	11.2
P01E2pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P02pre	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P02post	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P03pre	GT3a_BD	48.6	GT1b_SW990	43.0
	GT4a_PAV4	38.2	GT3_SW5	39.7
	GT2_PAV11	13.2	GT2b_new	17.3
P03post	GT3a_BD	37.8	GT1b_SW990	48.9
	GT2_PAV11	32.6	GT3_SW5	27.6
	GT4a_PAV4	29.6	GT2b_new	23.5
P04pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P04post	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	100
P05pre	GT3b_HAN38	100	GT2a_PAV24	100
P05post	GT3b_HAN38	100	GT2a_PAV24	100
P06pre	GT4a_9cCMV	100	GT3_1960	100
P06post	GT4a_9cCMV	100	GT3_1960	100
P07pre	GT1_AD169	59.3	GT1a_AD169	69.5
	GT4b_PAV18	40.7	GT1c_PAV18	30.5
P08pre	GT1_new	60	GT1a_AD169	80.3
	GT4b_PAV18	40	GT1c_PAV18	19.7
P08post	GT1_new	100	GT1a_AD169	78.5
			GT1c_PAV18	21.5
P09pre	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
P09post	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
P10pre	GT4c_Merlin	100	GT5_Merlin	86.2
			GT1b_SW990	13.8
P11pre	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P11post	GT3a_BD	100	GT1b_SW990	100
P12pre	GT3b_HAN38	99.1	GT2a_BE/12/2011	97.0
	GT4a_9cCMV	0.9	GT3_1960	3.0
P12post	GT3b_HAN38	100	GT2a_BE/12/2011	100
P14pre	GT2_PAV11	85.8	GT2b_SW1102	85.8
	GT4a_MS	14.2	GT3_1960	14.2
P15E1pre†	GT1_PAV12	100	GT1a_SW4	100
P15E2pre	GT1_PAV12	100	GT1a_SW4	100
P16E1pre†	GT4a_PAV4	97.4	GT1a_SW4	59.4
	GT1_PAV12	2.6	GT3_SW5	32.6
			GT2b_SW1102	8.0
P16E2pre	GT4a_PAV4	53.3	GT1a_SW4	67.7
	GT1_PAV12	46.7	GT3_SW5	32.3
P17pre	GT1_PAV12	50.3	GT1a_SW4	56.4
	GT2_U8	49.7	GT2b_SW1102	43.6
P17post	GT2_U8	51.0	GT1a_SW4	63.4
	GT1_PAV12	49.0	GT2b_SW1102	36.6
P18pre	GT3a_BD	91.9	GT1b_SW990	82.0
	GT4a_MS	8.1	GT3_1960	18.0
P18post	GT3a_BD	98.5	GT1b_SW990	98.8
	GT4a_MS	1.5	GT3_1960	1.2

Table 3. cont.

Episode/plasma sample	Glycoprotein N (gN)		Glycoprotein O (gO)	
	Variant*	Frequency (%)	Variant*	Frequency (%)
P19pre	GT3b_HAN38	68.7	GT2a_PAV24	66.3
			GT1a_AD169	30.1
P19post	GT1_AD169	31.3	GT2b_SW1102	3.6
	GT1_AD169	54.7	GT1a_AD169	56.5
P20pre	GT3b_HAN38	45.3	GT2a_PAV24	43.5
	GT2_U8	44.1	GT1c_TB40E	42.5
P20post	GT4b_TB40E	39.0	GT2b_SW1102	36.9
	GT3a_BD	16.9	GT1b_SW990	20.5
P21pre	GT2_U8	47.9	GT1c_TB40E	46.5
	GT4b_TB40E	41.6	GT2b_SW1102	43.6
P22E1pre†	GT3a_BD	10.5	GT1b_SW990	9.9
	GT4c_PAV16	74.8	GT5_BD	67.1
P22E2pre	GT3a_BD	25.2	GT1b_SW990	32.9
	GT1_PAV12	55.3	GT1a_SW4	52.6
P23pre	GT3a_BD	28.6	GT1b_SW990	31.5
	GT4a_PAV4	9.4	GT3_SW5	13.0
P23post	GT4c_new	6.8	GT5_Merlin	2.9
	GT1_PAV12	41.5	GT3_SW5	38.6
P24pre	GT4c_new	31.8	GT1a_SW4	35.5
	GT4a_PAV4	26.6	GT5_Merlin	25.9
P24post	GT1_PAV12	88.1	GT1a_SW4	88.1
	GT3b_HAN38	11.9	GT2a_PAV24	11.9
P28pre	GT1_PAV12	78.7	GT1a_SW4	86.1
	GT3b_HAN38	21.3	GT2a_PAV24	13.9
P32pre	GT1_AD169	100	GT1a_AD169	100
	GT2_PAV11	60.1	GT2b_SW1102	100
P32post	GT2_U8	39.9		
	GT2_U8	68.9	GT2b_SW1102	55.5
	GT3b_HAN38	31.1	GT2a_BE/12/2011	44.5

*Reference for deposited sequences.

†Two consecutive episodes of CMV DNAemia (P01E1pre, P15E1pre, P16E1pre and P22E1pre) and first recurrences (P01E2pre, P15E2pre, P16E1pre and P22E1pre) were analysed for patients P01, P15, P16 and P22.

Unfortunately, the low number of episodes included in this study precluded the performance of any meaningful multi-variable analyses. However, in support of this hypothesis, the polyfunctional CMV pp65/IE-1-specific CD8⁺ T cell response, analysed shortly after the onset of CMV DNAemia (and prior to the initiation of antiviral therapy) was comparable between single and mixed CMV genotype variant episodes. In fact, undetectable responses were observed in most episodes. This is relevant because the duration of CMV DNAemia episodes is inversely related to the number of polyfunctional CD8⁺ T cells present prior to (or at the time of) CMV DNAemia detection [22, 23]. Nevertheless, these data should be interpreted with caution, as we did not monitor the dynamics of CMV-specific T-cell expansion over time, and nor did we determine the epitope-specificity of the expanding T-cell populations.

In this context, recent observations seem to indicate that the induction of a stable CMV-specific T-cell response against either conserved or cross-reactive IE-1-epitopes, rather than CMV genetic diversity itself, is associated with efficient CMV viraemia control in allo-SCT recipients [21]. Although they are speculative, there are several potential, non-mutually exclusive, explanations for our findings.

First, mixed CMV viral infections are more likely to feature variants with decreased susceptibility to antiviral treatment than those with a single CMV genetic variant. Nevertheless, gN and gO genes do not appear to be in linkage disequilibrium with *UL97* (encoding a viral kinase that phosphorylates ganciclovir) or *UL54* (encoding a viral polymerase) [16]. Neither phenotypic nor genotypic susceptibility/resistance assays were performed to investigate this possibility, which certainly can be considered to be a limitation of this

Table 4. Features of cytomegalovirus DNAemia episodes according to the viral genetic diversity in pre-treatment plasma specimens

Gene	No. of variants	No. of episodes	Cytomegalovirus DNA peak load (copies ml ⁻¹)		Length of antiviral therapy (days)		Duration of cytomegalovirus DNAemia episodes (days)		Half-life (days)	
			Median (range)	P-value*	Median (range)	P-value*	Median (range)	P-value*	Median (range)	P-value*
gN	One	11	4708 (1154–13 165)	0.076	34 (0–77)	0.002	42 (12–156)	0.076	4.05 (1.12–16.67)	0.588
	More than one	18	6962.5 (1963–1 055 374)		63.5 (23–154)		83.5 (33–403)		6.33 (1.03–82.3)	
gO	One	11	4708 (1154–132 629)	0.122	34 (0–94)	0.007	42 (12–156)	0.146	3.12 (1.12–16.67)	0.408
	More than one	18	6962.5 (1963–1 055 374)		61 (23–154)		68.5 (33–403)		6.33 (1.03–82.3)	

Statistically significant associations are shown in bold.

*Differences between medians were compared using the Mann–Whitney U test. Two-sided exact P-values are reported. A P-value <0.05 was considered to be statistically significant.

study. Although it is speculative, in our view, the lack of a robust expansion of functional CMV-specific T cells upon CMV replication rather than the emergence of variants with decreased susceptibility to antivirals was the main driving force accounting for the occurrence of long-lasting episodes of CMV DNAemia (the plasma CMV DNA load fluctuated rather than increasing significantly over time) [22, 23].

Second, mixed infections may pose a greater challenge to the immune system than single infections, especially when recipient and donor-derived variants coexist, as previously suggested [13]. However, we cannot definitively rule out the reverse hypothesis, that mixed-genotype infections mostly arise in patients with poor CMV-specific immunity, although our data do not seem to support this idea.

Third, qualitative changes in viral fitness, leading to enhanced pathogenicity, may occur in multiply-infected hosts as a result of functional trans-complementation within coinfecting cells [24] or intrahost recombination [15], although the methodology used in this work does not allow its documentation.

Fourth, the number or relative frequency of CMV genetic variants changed after the inception of antiviral treatment in nearly half the cases we analysed. This observation most likely reflects differences in the individual susceptibility of the gN/gO genetic variants to antiviral agents, T cell-mediated immune responses, or both, although other explanations (e.g. stochasticity or promotion by proinflammatory or stress signals) cannot be ruled out completely. Nevertheless, changes in the CMV genotype diversity did not appear to impact on the length of the antiviral courses required to achieve CMV DNAemia clearance. Similar changes were observed in recurrent CMV DNAemia episodes, but no new genetic variants were documented, suggesting that the spectrum of CMV variants in a given patient may remain stable over time.

Fifth, no new mutations in the CMV gN/gO variant nucleotide sequences were detected after antiviral therapy administration or during recurrent episodes. This could be attributed to a very low mutation rate (estimated in the 1·10⁻⁸ to 1·10⁻⁹ range by computation of the maximum mutation rate that would give a probability of 0.05 or lower of observing no new mutations in the two CMV genes analysed), to the action of strong selection on these genes, or to both factors. In any case, this indicates that within-patient CMV populations are more stable than previously postulated with a whole-genome sequencing approach [15]. In this sense, we adopted a rather conservative approach for the estimation of within-host genotypic diversity, so that only previously described (and deposited) variants were retained for the analyses. It is unclear whether such a stringent approach was employed in previous studies claiming the existence of high within-patient genotypic variability over time [15]. This apparent discrepancy will only be settled when more evidence accumulates.

Table 5. Correlation between cytomegalovirus glycoprotein N and O nucleotide and haplotype diversity and virological parameters

CMV genetic diversity (gene region)		CMV DNA peak load (copies ml ⁻¹)	Duration of CMV DNAemia (days)	Half-life (days)	Duration of antiviral treatment (days)
Correlation index (σ)/P-value*					
Nucleotide diversity index (Pi)	gN	0.226/0.239	0.275/0.349	0.130/0.508	0.312/0.099
	gO	0.295/0.120	0.098/0.613	0.283/0.145	0.330/0.080
	gNgO†	0.303/0.110	0.214/0.266	0.232/0.236	0.408/ 0.028
Haplotype diversity index (Hap)	gN	0.260/0.173	0.184/0.340	0.157/0.425	0.336/0.075
	gO	0.313/0.098	0.267/0.170	0.266/0.169	0.404/ 0.030
	gNgO†	0.295/0.121	0.217/0.259	0.220/0.260	0.395/ 0.034

Statistically significant (*P* value <0.05) associations are shown in bold. CMV, cytomegalovirus.

*Association between virological variables and haplotype (Hap) and nucleotide (Pi) diversity indices was assessed using Spearman rho tests via the R package (<http://www.R-project.org/>).

†Combined regions.

In addition to the above-mentioned omission of resistance tests, the current study has some limitations that may have led to the underestimation of the number of multiple strain infections. First, it is possible that minor strains are less easily detected in samples with lower DNA loads than in those with higher ones. Second, we analysed two closely linked regions of the CMV genome and it is possible that in these samples they are not fully representative of the genetic variability at the whole-genome level. Third, CMV DNA in plasma is almost exclusively free DNA, highly fragmented, and not virion-associated, so that not all virus diversity might be captured [25]. Additionally, we analysed a limited number of episodes.

In summary, our data indicate that genetic diversity in the CMV population may influence the kinetics of CMV DNAemia clearance in allo-SCT recipients, thus determining the length of antiviral treatment needed for viraemia clearance. Although it is speculative, one could envision viral diversity analysis, perhaps by whole-genomic sequencing directly from clinical specimens [15–17], as an ancillary tool for estimating the risk of prolonged CMV viraemia in allo-SCT patients, therefore helping to optimize and individualize pre-emptive antiviral treatments. In our opinion, given the potential clinical relevance of our findings, further studies with larger cohorts are warranted in order to further explore these possibilities.

METHODS

Patients and samples

A total of 53 plasma specimens, obtained during 34 episodes of active CMV infection in 30 non-consecutive allo-SCT patients, were included in this retrospective study. The patients underwent allo-SCT in the Hematology Unit at the Hospital Clínico Universitario in Valencia, Spain between May 2013 and December 2014. We analysed baseline blood specimens, drawn shortly prior to the inception of pre-emptive antiviral therapy (pre-treatment specimen; *n*=34), as well as follow-up samples obtained either after the initiation

of antiviral therapy (post-treatment specimen; *n*=15) or within recurrent episodes (*n*=4). A minimum volume of 1 ml was required for the studies described below. The availability of a sufficient volume of plasma was the only restrictive criterion for the inclusion of cases. The plasma samples were retrieved from storage at –80 °C for the analyses and had never been previously thawed.

Virological monitoring and active cytomegalovirus infection management

Pre-emptive antiviral therapy with valganciclovir, i.v. ganciclovir or foscarnet was initiated upon the detection of >1000 copies ml⁻¹ (1500 IU ml⁻¹) of CMV DNA in plasma, as determined by quantitative real-time PCR (Abbott Real-Time CMV assay; Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA; detection limit, 20 copies ml⁻¹ or 31.5 IU ml⁻¹) and was interrupted upon the documentation of two consecutive negative (undetectable) PCR results after a minimum of 2 weeks' treatment (until January 2014) or at the first negative PCR result (after April 2014), as previously described [10, 26]. The virological load was monitored at least once a week during active CMV infection episodes.

PCR amplification for Illumina sequencing

Total DNA was isolated from 1 ml of plasma using the NucliSENS easyMAG extraction platform (bioMérieux, L'Étoile, France) with a 35 µl elution volume. Each viral DNA isolation round (maximum 23 samples) included a negative extraction control consisting of PCR-grade water that was subsequently used in PCR amplification. Two CMV regions of about 361 and 255 bp in *UL73* and *UL74* (gN and gO proteins, respectively) were amplified in an initial PCR [5], followed by a hemi-nested PCR using oligonucleotides extended at the 5' end with Illumina adapters (Table S6). The PCR reactions were carried out with the KAPA HiFi HotStart DNA 2× ready mix (KAPA Biosystems) with either 4.4 µl of eluted DNA (first PCR) or 1 µl of the first PCR product (hemi-nested PCR) under the following conditions: 95 °C for 3 min; 25 cycles of 98 °C for 20 s,

60 °C (UL73) or 57 °C (UL74) for 15 s, and 72 °C for 30 s; 5 min at 72 °C and then hold at 8 °C. The PCR products were then visualized by gel electrophoresis (1.4 % agarose in 1 × TBE buffer). Next, a post-PCR clean-up was performed with an Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter). An index PCR was carried out with the Illumina Nextera XT Index kit (Illumina), as recommended in the 16S sample preparation guide for the Illumina MiSeq system (<http://www.illumina.com>). After the incorporation of indexes to the CMV amplicons, the libraries were cleaned up again with AMPure XP beads, quantified with a Qubitfluorimeter (Invitrogen Life Technologies), pooled at the standard concentration of 4 nM each and sequenced by 2 × 300 bp paired-end sequencing on the MiSeq platform using a MiSeq v3 reagent kit (Illumina). An average of 93 904 joined reads (range 657 612 to 12 530) were obtained per PCR amplicon after quality control.

Sequence analysis and genotype frequency estimates

Quality assessment of the generated pair-end reads, R1 and R2, was performed using the ‘prinseq-lite’ program [27] applying 3’ trimming to maintain at least a mean quality score of 20 in 20 bp windows. Generated pair reads were joined with the ‘fastq-join’ command-line program implemented in the ea-tools suite [28]. Alignments were built with the InDel Fixer program (<https://github.com/cbg-ethz/InDelFixer>) using the gN or gO genotypes described in Görzer *et al.* [5] as reference sequences. The QuasiRecomb program [29] was then used to obtain reconstructed DNA sequences and their relative frequencies within samples. Finally, in order to remove chimaeric sequences synthesized either in the PCRs or in the joining of pair-end reads, we implemented the UCHIME algorithm [30] in the USEARCH software package using the same reference sequences as above. Underrepresented sequences, with frequencies below 10^{-4} , were removed from the analysis.

Genetic and phylogenetic analyses

The haplotype diversity index (Hap) and the nucleotide diversity index (Pi) were obtained using the DnaSP program, version 5 [31]. Combined measures of diversity for the two genome regions were obtained as weighted averages of the corresponding estimates. The genetic composition of CMV populations in pre- and post-treatment samples from the same individual were compared using the randomization test implemented in the Arlequin program, version 3.5.2.2 [32]. Sequence alignments for each sample with reference sequences were performed with CLUSTALW 2.1 [33]. Maximum-likelihood phylogenetic trees were built with RAxML, version 8.2.8 [34], with the general time-reversible model of nucleotide substitution, a gamma-distribution approximation to account for rate-heterogeneity and bootstrap support for branches through the use of 1000 replicates. The trees were edited using the Tree Explorer tool in MEGA5 [35]. Finally, the GenBank accession numbers for the sequences derived in this study are LT622645 to LT622799.

Immunological monitoring

Polyfunctional CMV-specific (IE-1+pp65) CD8⁺ T cells were enumerated by intracellular cytokine staining (ICS), as previously described [22, 23]. We specifically quantified bifunctional (either producing IFN- γ +TNF- α , or producing and expressing IFN- γ +CD107a and TNF- α +CD107a) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific CD8⁺ T cells.

Cytomegalovirus DNAemia dynamics

The plasma CMV DNA-load half-life was calculated following the formula $N_t = N_0 e^{-\lambda t}$, where N_0 is the initial CMV DNA load, N_t is the viral load remaining after a time t , $t_{1/2}$ is the half-life and λ is the decay constant. It follows that $t_{1/2} = \ln(2)/\lambda$ [36].

Definitions

A recurrent episode of CMV DNAemia was one that occurred at least 15 days after resolution of the previous one. The duration of CMV DNAemia was the period of time between the day of the first positive PCR result and the day of the first negative PCR result. For episodes that had not been cleared at the time of the patient’s death, the day of the last positive PCR result was considered for the analyses.

Statistical analyses

The frequency of genetic variants was compared using the χ^2 test (Fisher exact test). Differences between medians were compared using the Mann–Whitney U test (two independent variables). Two-sided exact *P*-values are reported; a *P*-value <0.05 was considered to be statistically significant. Data were analysed with the aid of the statistical package SPSS, version 20.0 (SPSS). The association between virological variables and Hap and Pi indices was tested using Spearman rho tests via the R package (<http://www.R-project.org/>).

Funding information

The study was supported by grants from the FIS [Healthcare Research Fund (*Fondo de Investigaciones Sanitarias* in the original Spanish), the Ministry of Health and Consumer Affairs, Spain] (FIS 12/01992), the Ministry of Economy and Competitiveness [MINECO (*Ministerio de Economía y Competitividad* in the original Spanish)] (BFU2014-58656-R) and the Valencian Regional Government (PROMETEO/2016/122).

Acknowledgements

Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The study was approved by the local Review Board and Ethics Committee (Ethical Committee of Clinical Research of the University Clinical Hospital of Valencia) in its meeting of May 2011. All the patients gave their written informed consent prior to participation in the study.

References

- Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L *et al.* Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004;85:1301–1312.

2. Pignatelli S, dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 2004;14:383–410.
3. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I. Human cytomegalovirus: an enormous variety of strains and their possible clinical significance in the human host. *Future Virol* 2011;6:259–271.
4. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF. Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001344.
5. Görzer I, Guelly C, Trajanoski S, Puchhammer-Stöckl E. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J Virol* 2010;84:7195–7203.
6. Romero PP, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol* 2015;10:113–134.
7. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009;113:5711–5719.
8. Solano C, De La Cámara R, Vázquez L, López J, Giménez E *et al.* Cytomegalovirus infection management in allogeneic stem cell transplant recipients: a National Survey in Spain. *J Clin Microbiol* 2015;53:2741–2744.
9. Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J *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.
10. Giménez E, Solano C, Azanza JR, Amat P, Navarro D. Monitoring of trough plasma ganciclovir levels and peripheral blood cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells to predict CMV DNAemia clearance in preemptively treated allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5602–5605.
11. Humar A, Kumar D, Gilbert C, Boivin G. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *J Infect Dis* 2003;188:581–584.
12. Coquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W *et al.* Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004;39:155–161.
13. Manuel O, Asberg A, Pang X, Rollag H, Emery VC *et al.* Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis* 2009;49:1160–1166.
14. Kilpatrick BA, Huang ES, Pagano JS. Analysis of cytomegalovirus genomes with restriction endonucleases Hin D III and EcoR-1. *J Virol* 1976;18:1095–1105.
15. Renzette N, Gibson L, Bhattacharjee B, Fisher D, Schleiss MR *et al.* Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genet* 2013;9:e1003735.
16. Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, van Damme E, Dvorak J *et al.* High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol* 2015;89:7673–7695.
17. Hage E, Wilkie GS, Linnenweber-Held S, Dhingra A, Suárez NM *et al.* Characterization of human cytomegalovirus genome diversity in immunocompromised hosts by whole genomic sequencing directly from clinical specimens. *J Infect Dis* 2017;215:1673–1683.
18. Wu X, Wang Y, Xu Y, Wu D, Sun A *et al.* Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:647–652.
19. Dieamant DC, Bonon SH, Peres RM, Costa CR, Albuquerque DM *et al.* Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis* 2013;13:310.
20. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I, Zoufaly A, Jaksch P, Bauer CC *et al.* Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients. *Transplantation* 2006;81:187–194.
21. Smith C, Brennan RM, Tey SK, Smyth MJ, Burrows SR *et al.* Coinfection with human cytomegalovirus genetic variants in transplant recipients and its impact on antiviral T cell immune reconstitution. *J Virol* 2016;90:7497–7507.
22. Giménez E, Blanco-Lobo P, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P *et al.* Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting. *J Gen Virol* 2015;96:2822–2831.
23. Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, de La Cámara R *et al.* Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8⁺ T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2015;17:361–370.
24. Tong Y, Pang XL, Mabilangan C, Preiksaitis JK. Determination of the biological form of human cytomegalovirus DNA in the plasma of solid-organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2017;215:1094–1101.
25. Cicin-Sain L, Podlech J, Messerle M, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Frequent coinfection of cells explains functional *in vivo* complementation between cytomegalovirus variants in the multiply infected host. *J Virol* 2005;79:9492–9502.
26. Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P *et al.* Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:1010–1012.
27. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27:863–864.
28. Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma J* 2013;7:1–8.
29. Töpfer A, Zagordi O, Prabhakaran S, Roth V, Halperin E *et al.* Probabilistic inference of viral quasispecies subject to recombination. *J Comput Biol* 2013;20:113–123.
30. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;27:2194–2200.
31. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009;25:1451–1452.
32. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 2010;10:564–567.
33. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA *et al.* CLUSTAL W and CLUSTAL X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–2948.
34. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014;30:1312–1313.
35. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–2739.
36. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication *in vivo*. *J Exp Med* 1999;190:177–182.
37. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295–304.



Virology

Factors influencing cytomegalovirus DNA load measurements in whole blood and plasma specimens from allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients

Víctor Vinuesa^{a,1}, Estela Giménez^{a,1}, Carlos Solano^{b,c}, Eliseo Albert^a, Ignacio Torres^a, Ariadna Pérez^b, Juan Carlos Hernández-Boluda^b, José Luis Piñana^b, David Navarro^{a,d,*}

^a Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^b Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, INCLIVA Research Institute, Valencia, Spain

^c Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

^d Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2018

Received in revised form 18 October 2018

Accepted 18 November 2018

Available online 22 November 2018

Keywords:

Cytomegalovirus

Whole blood

Plasma

Real-time PCR

Allo-HSCT

Viral load

ABSTRACT

We assessed the impact of several parameters, including the nature of the episode of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia, the use of preemptive antiviral therapy, and the blood cell content in CMV DNA loads measured in whole blood (WB) and plasma (PL). CMV DNA load was quantified in 245 paired specimens collected within 43 postengraftment episodes of CMV DNAemia by using the CMV RealTime CMV PCR (Abbott Molecular). Concordant categorical results were obtained for 78.4% of paired specimens (Kappa index, 0.385; $P = <0.001$). Overall, CMV DNA loads in PL were higher than those in WB (mean bias, +0.115 log IU/mL) in both initial and recurrent episodes; this was so in post-antiviral treatment but not in pretreatment paired specimens. Median CMV DNA doubling time values in both compartments were not significantly different. Leukocyte counts had a significant impact on the comparability of CMV DNA loads measured in both matrices.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection is a major threat following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), as it may lead to end-organ disease and increase nonrelapse mortality (Pérez Romero et al., 2015). Preemptive therapy (PET) is the first-choice strategy for the prevention of CMV-related complications in this transplant modality (Pérez Romero et al., 2015). Systematic and frequent monitoring of CMV DNA load in the blood compartment is a cornerstone for the success of this therapeutic approach, most commonly using whole blood (WB) and plasma (PL) as matrices. Current consensus guidelines for CMV infection management in allo-HSCT describe both as equally suitable for that purpose (Emery et al., 2013; 7th ECIL, 2017). Nevertheless, a number of studies indicate that CMV DNA loads measured in both compartments are not similar (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Diaverti et al., 2017; Garrigue et al., 2008; Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007). Unfortunately, only a few of these studies

were conducted using molecular methods approved by regulatory agencies (either CE, FDA, or both) for the 2 matrices (Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018), of paramount importance for a rigorous comparative analysis.

Here we assessed the impact of several parameters, including the nature of the episode of CMV DNAemia (initial vs. recurrent), the use of antiviral therapy, and the blood cell content on CMV DNA loads measured in paired WB and PL specimens from allo-HSCT recipients.

2. Patients and methods

2.1. Patients and clinical specimens

In this retrospective single-center study, we included a total of 245 paired PL and WB specimens (total number, 490 samples) from 33 non-consecutive allo-HSCT recipients (baseline characteristics of patients are shown in Supplementary Table 1) submitted to our clinical microbiology laboratory within the period February–September 2014. PL specimens were used for routine CMV DNA load quantitation as per laboratory guidelines. WB samples were requested for the current study and were scheduled to be collected with the same frequency as the PL

* Corresponding author. Tel.: +34-96-1973500; fax: +34-96-3864173.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

¹ Both authors contributed equally to the present work.

specimens. Leftover PL specimens and unmanipulated WB samples were cryopreserved at -70°C within 24 h of receipt, until used. The availability of at least 2 paired specimens/episode of CMV DNAemia was the only criterion for episodes inclusion.

2.2. CMV DNA quantitation in whole blood and plasma

CMV DNA load in both matrices was quantified using the CMV RealTime CMV PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) (Clari et al., 2013). This assay targets the UL34 and UL80.5 ORFs of the CMV genome and has been validated for CMV DNA quantitation in both PL and WB specimens (CE label for both matrices and FDA approval for EDTA-plasma specimens). According to the manufacturer, both the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) are 31.2 IU/mL for PL and 62.4 IU/mL for WB. DNA extraction from both matrices was performed with the Abbott mSample preparation system DNA Kit on the 2000sp instrument. The starting volume for DNA extraction was 500 μL for PL and 300 μL for WB, and the final elution volumes were 70 μL and 110 μL , respectively. An internal control is supplied to check the overall process including DNA extraction and possible PCR inhibition. Amplification and real-time detection of CMV DNA were performed on the m2000rt platform. For both matrices, the total PCR volume was 60 μL (35 μL eluate and 25 μL master mix). Cryopreserved whole blood and plasma specimens were retrieved and analyzed in parallel within 24 h of thawing. The specimens were assayed in singlet in several consecutive runs. Paired specimens from individual patients were analyzed in the same run.

2.3. CMV infection management

CMV DNA load monitoring was conducted once or twice a week (at physician discretion) during CMV DNAemia episodes. Antiviral therapy with (val)ganciclovir or foscarnet at conventional doses was initiated when the PL CMV DNA load reached levels of 1000 copies/mL (>1500 IU/mL) in a single specimen and was interrupted upon documentation of 1 or 2 consecutive negative PCR results (Solano et al., 2013).

2.4. Blood cell counts

The absolute leukocyte, lymphocyte, and mononuclear cell counts were enumerated with either the ADVIA 120 Hematology System (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) or the XN-9000™ Hematology Analyzer (Sysmex Co., Kobe, Japan).

2.5. Kinetic analyses of CMV DNA load

The CMV DNA doubling time (dt) and half-life were estimated as previously reported (Giménez et al., 2014; Muñoz-Cobo et al., 2011). The CMV DNA dt was estimated using CMV DNA loads measured in 2 successive specimens (usually the 2 first specimens yielding detectable CMV DNA loads) in the absence of antiviral therapy. The dt (in days) is given by $dt = (t_2 - t_1) \times \ln(2)/\ln(q_2/q_1)$, with q_1 and t_1 being the CMV DNA load at the time of the first measurement, respectively, and q_2 and t_2 the CMV DNA load at the time of the second one, respectively. CMV dt calculations were performed only for episodes in which the increase in CMV DNA load between the 2 specimens drawn no longer than 10 days apart was ≥ 3 -fold. The kinetics of CMV DNA load clearance follows a logarithmic decay curve in episodes treated with antivirals, expressed by the equation $y_t = y_0 e^{-kt}$, where y_0 is the CMV DNA load at the time of treatment inception, t is time from initiation of antiviral therapy, and k is the decay constant. A nominal value of 10 IU/mL was arbitrarily ascribed for specimens with undetectable CMV DNA load. CMV DNA load half-life was then calculated using the equation $\ln 2/k$.

2.6. Statistical methods

CMV DNA loads in IU/mL were transformed to \log_{10} prior to performing comparisons. The qualitative agreement between PL and WB results was estimated using Kappa statistics. Differences between median values were analyzed using either the Wilcoxon rank test (for paired samples) or the Mann–Whitney U test for independent measurements, as appropriate. Quantitative correlations between the CMV DNA loads were assessed using the Spearman correlation test. The Bland and Altman method was used to evaluate the agreement between CMV DNA loads measured in both matrices. Sensitivity was calculated considering all detectable CMV DNA results in either specimen as true positives. Statistical calculations were performed using the SPSS 17.0 program (SPSS Inc. Chicago, IL); P values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Features of CMV DNAemia episodes

In all, 245 paired PL and WB specimens collected within 43 episodes of CMV DNAemia occurring following engraftment in 33 allo-HSCT recipients were tested. A median of 5 paired specimens/episode (range, 2–23) was available. Out of the 43 episodes, 24 were initial episodes and 19 were recurrences. According to routine PCR testing results using fresh plasma specimens, initial episodes developed at a median of 30 days (range, day 17–50) after allo-HSCT, and recurrences were documented at a median of 193 days after transplantation (range, day 35–599). Median CMV DNA peak levels in initial and recurrent episodes of CMV DNAemia were 3.26 \log IU/mL (range, 1.75–6.09 \log IU/mL) and 2.92 \log IU/mL (range, 2.22–3.65 \log IU/mL), respectively. Overall, 19 out of the 43 episodes were preemptively treated with antivirals (12 initial episodes and 7 recurrences).

3.2. CMV DNA loads in plasma and whole blood specimens

In total, 192 out of the 245 paired specimens (78.4%) yielded concordant categorical results (positive, including detectable and quantifiable, or negative [not detectable]) (Kappa index, 0.385; $P = <0.001$). The data are shown in Table 1. CMV DNA was detectable in 163 paired specimens (66.5%), whereas negative results were recorded for 29 (11.8%). Discordant results were obtained for 53 paired specimens (21.6%). In most cases ($n = 33$), these yielded negative results in WB but positive in PL (median, 1.71 \log_{10} IU/mL; range, 1.48–2.92 \log_{10} IU/mL). The opposite was seen in the remaining 20 paired specimens (median CMV DNA load in WB, 1.79 \log IU/mL; range, 1.79–2.39 \log IU/mL).

Table 1

Categorical concordance between CMV DNA detection in paired PL and WB specimens from allo-HSCT recipients.

CMV DNA in plasma ^a	CMV DNA in whole blood (no. of specimens)		
	Quantifiable ($>$ LOQ)	Detectable but not quantifiable ($<$ LOQ)	Not detectable
Quantifiable ($>$ LOQ)	132	28	29
Detectable but not quantifiable ($<$ LOQ)	0	3	4
Not detectable	5	15	29

^a According to the manufacturer, both the LOD and LOQ are 31.2 IU/mL (95% confidence) for PL and 62.4 IU/mL (95% confidence) for WB. Nevertheless, the assay is capable of detecting CMV DNA levels below this threshold in both matrices, although with a lower confidence (75%). In our experience, these very low CMV DNA loads are not usually bleeps but eventually increase in subsequent specimens to become quantifiable (unpublished data). Thus, specimens meeting this characteristic were categorized here as having detectable but not quantifiable CMV DNA.

Thus, in our series CMV DNAemia detection was achieved more frequently using PL than WB (89.0% vs. 84.0%, respectively).

Overall, CMV DNA loads quantified in PL were significantly higher ($P = <0.0001$) than those in WB (Fig. 1 panel A), as shown by a mean bias of $+0.115 \log \text{ IU/mL}$ (range, -0.660 to 0.890) (Fig. 1, panel B). This trend was documented for specimens containing both low (arbitrarily defined as $\leq 1000 \text{ IU/mL}$) and high ($>1000 \text{ IU/mL}$) CMV

DNA levels. Nevertheless, the difference was not statistically significant for low-CMV DNA content specimens (Table 2).

Overall, CMV DNA loads measured in whole blood and plasma correlated significantly (Fig. 2, panel A). The degree of correlation was notably lower, yet significant, for paired specimens with low CMV DNA content (Fig. 2, panel B) than for those with high CMV DNA load (Fig. 2, panel C).

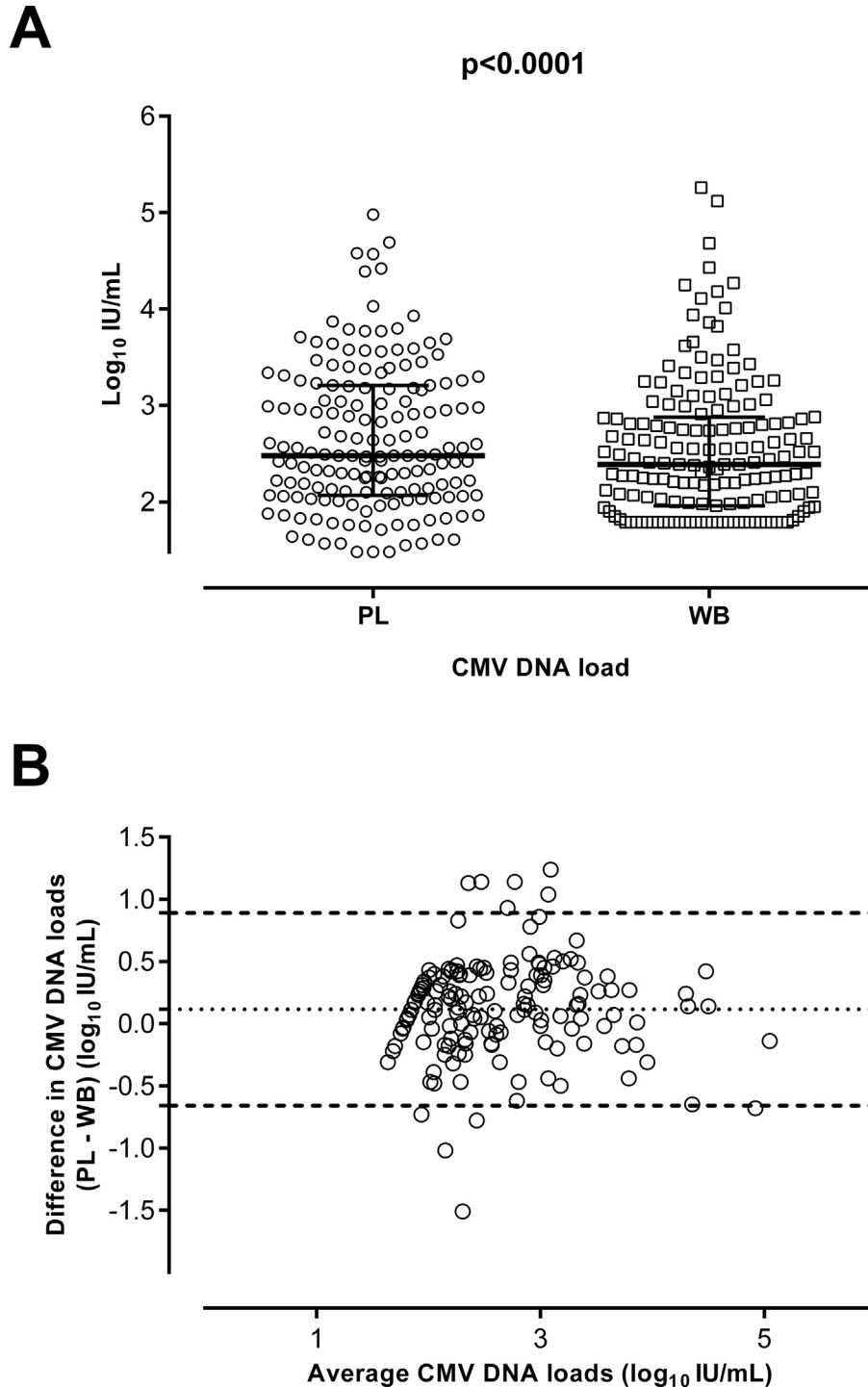


Fig. 1. CMV DNA loads measured in PL and WB specimens from allo-HSCT recipients. (A) CMV DNA loads (log IU/mL) in 163 paired PL and WB yielding positive (detectable) PCR results in both matrices. PL and WB specimens with detectable CMV DNA but below the LOQ were arbitrarily ascribed a nominal value of 1.48 log IU/mL or 1.79 log IU/mL (0.01 log IU/mL lower than the LOQ in these matrices), respectively. The P value is shown. (B) Bland-Altman analysis of the results shown in panel A.

Table 2
CMV DNA loads in paired PL and WB specimens from allo-HSCT recipients.

Categories (no. of specimens) ^a	CMV DNA load in PL in log IU/mL ^b		CMV DNA load in WB in log IU/mL ^b		P value
	Median	Range	Median	Range	
Total (163)	2.48	1.48–4.98	2.39	1.79–5.26	<0.0001
≤3 log IU/mL (113)	2.25	1.48–3.0	2.18	1.79–3.43	0.058
>3 log IU/mL (50)	3.46	3.02–4.98	3.22	1.9–5.26	<0.0001

^a Categories were arbitrarily established according to CMV DNA loads measured in PL at the time of routine testing. Overall, these figures differed by <0.11 log IU/mL from PL CMV DNA loads measured in cryopreserved specimens.

^b The dynamic range of quantitation of the assay is 1.48 to 8.19 log₁₀ IU/mL and 1.79 to 8.19 log₁₀ IU/mL for PL and WB, respectively, and the intra-assay and interassay coefficients of variation for CMV DNA loads within the linear range of quantitation are <0.25 log₁₀ according to the manufacturer and our own experience (unpublished results). PL and WB specimens with detectable CMV DNA but below the LOQ were arbitrarily ascribed a nominal value of 1.48 log IU/mL or 1.79 log IU/mL (0.01 log IU/mL lower than the LOQ in these matrices), respectively.

The above observations were consistently reproduced when initial and recurrent episodes of CMV DNAemia were considered separately for analysis (Supplementary Table 2).

3.3. The effect of antiviral treatment on CMV DNA loads in whole blood and plasma

Out of the 163 paired specimens with detectable CMV DNA, 73 (44.8%) were obtained while patients were under antiviral treatment. CMV DNA loads in pretreatment paired samples were not significantly different across specimen types (PL: median, 2.3 log IU/mL; range, 1.48–4.58 log IU/mL; WB: median, 2.26 log IU/mL; range, 1.79–2.56 log IU/mL; $P = 0.740$), whereas CMV DNA loads in PL were significantly higher than in WB ($P = <0.0001$) in posttreatment specimens (median 3.0 log IU/mL; range, 1.61–4.98 log IU/mL in PL and median, 2.65 log IU/mL; range 1.79–5.12 log IU/mL, in WB).

3.4. The effect of blood cellularity on CMV DNA loads in whole blood and plasma

Contemporary blood cell counts were available for a total of 158 out of 163 paired PL and WB specimens with detectable CMV DNA. As shown in Fig. 3, total leukocyte counts were significantly higher in blood samples in which CMV DNA loads in WB exceeded (any level) those in PL specimens ($n = 57$) than in those in which the opposite was observed (panel A). In contrast, the absolute numbers of lymphocytes (panel B) and monocytes (panel C) were not significantly different.

3.5. Kinetics of CMV DNA load in plasma and whole blood

We compared the CMV DNA dt_s in paired PL and WB specimens. A total of 28 episodes out of the 43 episodes of CMV DNAemia included

in the study fulfilled the criteria for dt calculation; the remaining 15 episodes were excluded because either the difference between q1 (initial CMV DNA load) and q2 (CMV DNA load at the time of the second PCR positive result) was <3-fold ($n = 9$) or the time elapsed between q1 and q2 measurements (t1 and t2) was longer than 10 days ($n = 6$) (Giménez et al., 2014; Muñoz-Cobo et al., 2011). Nominal values of 30 IU/mL and 61 IU/mL were considered for PL and WB specimens with detectable–not quantifiable results. Overall, median CMV DNA dt values in both compartments were comparable (median 2.01 days, range 0.93–4.77 days in PL and median 2.32 days, range 0.92–5.28 days in WB; $P = 0.260$) and did correlate significantly ($P = <0.0001$). Categorical agreement for CMV dt_s (≤2 days vs. >2 days) was observed in 20 out of the 28 episodes (Kappa, 0.429; $P = 0.004$). CMV DNA clearance following inception of PET, as inferred by its half-life, appeared faster in WB than in PL (median 4.93 days, range 1.30–14.81 days in PL and median 2.43 days, range 1.17–13.57 days in WB; 12 episodes were included for analyses), although the difference did not reach statistical significance ($P = 0.180$), yet the first undetectable PCR result was observed in PL or WB for a comparable ($P = 0.51$) number of episodes subjected to analysis (not shown).

4. Discussion

Several studies have compared CMV DNA loads measured in WB and PL samples drawn from allo-HSCT recipients (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Garrigue et al., 2008; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007), but aside from ours, only 2 (Jones et al., 2016; Lazzarotto et al., 2018) employed a real-time PCR assay approved by international agencies for use in both matrices: CE for the Abbott assay (Jones et al., 2016) and FDA for the artus® CMV QSR GQ Kit (QIAGEN, Hamburg, Germany) (Lazzarotto et al., 2018). There is currently no consensus on which specimen should be used for CMV DNA load monitoring in this setting. In fact, recent consensus guidelines for managing CMV infection in this transplant modality are cautious on the matter and do not favor the use of one over the other (Emery et al., 2013; 7th ECIL, 2017). There are a number of issues on this topic that remain unsettled. First, which specimen is better for documentation of CMV DNAemia? In our experience, PL specimens were slightly better than WB; this is in line with data obtained with the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV test from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN) (Babady et al., 2015; Dioverti et al., 2017; Suganda et al., 2016) and the artus® CMV QSR GQ Kit (QIAGEN, Hamburg, Germany) (Lazzarotto et al., 2018) and is presumably due, at least in part, to the increased sample volume used for PL specimens (Babady et al., 2015; Dioverti et al., 2017; Suganda et al., 2016). In contrast, 2 studies reported the opposite results; in 1 of them (Costa et al., 2016), 2 different real-time PCR assays were used for CMV DNA monitoring in PL and WB; the other employed a substantially less sensitive end-point PCR assay, the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR (Roche Diagnostics) (von Müller et al., 2007).

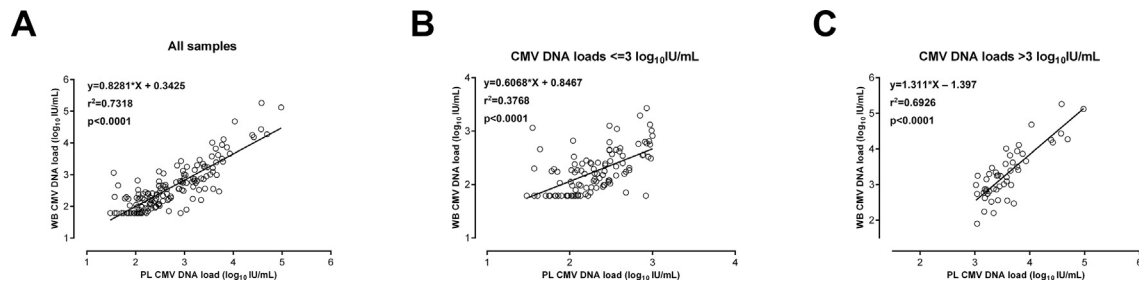


Fig. 2. Linear correlation between CMV DNA loads quantified in PL and WB from allo-HSCT recipients. (A) Correlation for all paired PL and WB specimens included in the analyses. PL and WB specimens with detectable CMV DNA but below the LOQ were arbitrarily ascribed a nominal value of 1.48 log IU/mL or 1.79 log IU/mL respectively. Correlation between CMV DNA loads measured in PL and WB according to the CMV DNA content measured in PL at the time of routine testing; (B) low content (CMV DNA load ≤1000 IU/mL) and (C) high content (CMV DNA load >1000 IU/mL). Spearman rank correlation and P values are shown.

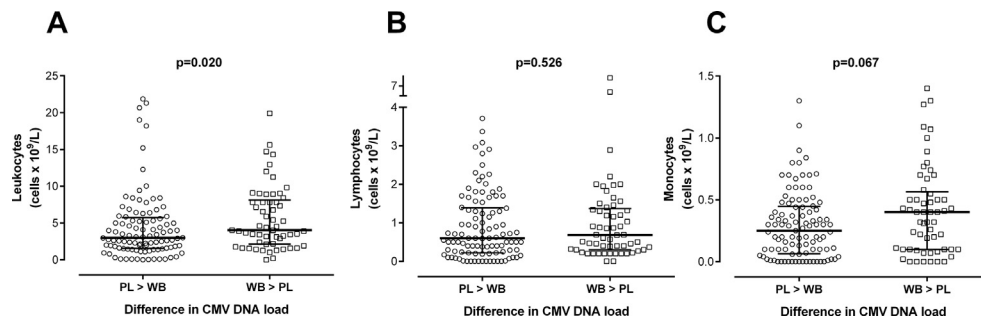


Fig. 3. Impact of blood cell counts on CMV DNA loads measured in PL and WB paired specimens from allo-HSCT recipients. The number of cases in which the CMV DNA load was higher (any increase) in WB than in PL or vice versa was plotted against the total number of leukocytes (A), lymphocytes (B), and monocytes (C) in contemporary blood specimens. *P* values are shown for comparisons.

Second, how do CMV DNA loads quantified in both compartments compare? There is consensus that CMV DNA loads measured in WB and PL correlate significantly in allo-HSCT recipients (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Lazzarotto et al., 2018; Suganda et al., 2016; von Müller et al., 2007), although the extent to which varies widely across studies (R^2 from 0.489 to 0.9575). In our series, the degree of correlation was overall fairly good ($R^2 = 0.73$) but was notably lower ($R^2 = 0.376$) for paired specimens with low CMV DNA content (arbitrarily defined as ≤ 1000 IU/mL). Historically, transplant recipients have been reported as having higher magnitude CMV DNA loads in WB than in PL (Garrigue et al., 2008; Lisboa et al., 2011; Razonable et al., 2002; von Müller et al., 2007), attributed in part to the highly cell-associated nature of CMV (Pérez Romero et al., 2015). This trend is also seen in more recent studies targeting allo-HSCT recipients (Babady et al., 2015; Costa et al., 2016; Dioverti et al., 2017; Lazzarotto et al., 2018; Suganda et al., 2016). Our data indicated otherwise. In fact, overall CMV DNA loads quantified in PL were higher than in WB, this proving true over the entire range of CMV DNA values measured, both in initial and in recurrent episodes. Several non-mutually exclusive reasons may account for this discrepancy: i) The degree of commutability of the CMV WHO IS (to which CMV PCR assays are calibrated nowadays) in both matrices may differ across commercially available PCR assays; in addition, careful validation of conversion factors provided by the manufacturers for the WHO IS in WB has been shown to be advisable (Schnepf et al., 2013). ii) The use of PCR assays with large amplicon sizes (i.e., the Roche assay with amplicon size 340 nt vs. 95 nt-UL80.5 and 105 nt-UL34 for the Abbot assay) may underestimate to a greater extent CMV DNA loads in PL than in WB. This assumption is based on 2 facts: (i) CMV DNA in PL is almost exclusively free DNA, highly fragmented, and not virion associated (Boom et al., 2002; Tong et al., 2017), whereas WB contains infectious virions (intact genomes) in addition to fragmented viral DNA (Pérez Romero et al., 2015), and (ii) PCR assays with small amplicon sizes yield significantly higher CMV DNA loads in PL compared to assays with larger amplicon sizes (Preiksaitis et al., 2016; Tong et al., 2017).

Our data provide further clues for interpreting the above studies. We showed that after engraftment, variations of blood leukocytes but not monocytes or lymphocytes counts have a notable impact on viral loads measured in both matrices, as previously hinted (Bressollette-Bodin et al., 2009). Specifically, total leukocyte counts were significantly higher in blood samples in which CMV DNA loads in WB exceeded those in PL specimens. This is consistent with the role of neutrophils as major reservoirs of CMV DNA within episodes of active CMV infection and with the fact that CMV accessing the blood compartment from organ and tissues may be a quantitatively relevant source of viral DNA in plasma (Pérez Romero et al., 2015). We also observed that the difference between CMV DNA load in PL and WB specimens reached statistical significance for post-antiviral treatment paired specimens but not for pretreatment ones. This could be explained by the fact that CMV DNA levels in PL appeared to decline at a slower pace than in WB, as

reflected by a higher (not significant) half-life, in agreement with a previous study (Lazzarotto et al., 2018). Despite this, first undetectable PCR results were obtained in both matrices at a comparable frequency. Accordingly, in our setting, the use of WB instead of PL would not have led to longer antiviral treatment courses.

We previously showed that the CMV DNA dt_s , as calculated herein, is relatively unaffected by the inherent variability in CMV DNA loads provided by different CMV real-time PCR assays, thus permitting comparison (Vinuesa et al., 2016). CMV DNA $dt_s \leq 2$ days were found to anticipate the need for antiviral therapy according to our local criteria (Giménez et al., 2014). Here, we found reasonable agreement between CMV DNA dt_s in both matrices; thus, this parameter may be used as a trigger to start PET when CMV DNA load is monitored in WB. In line with our observation, Babady et al. (2015) reported comparable trends (similar slopes) of CMV DNA load in paired PL and WB specimens from a number of allo-HSCT recipients.

The current study has 2 main limitations. First, despite having the same collection schedule as the PL specimens, a number of WB specimens were unavailable. Second, cryopreserved specimens were used for side-by-side PCR analyses in both matrices; nevertheless, it is uncertain to what extent (if any) this could have had an impact on our observations.

In our view, the data presented herein add to the current body of knowledge on this issue and may assist transplant centers to choose between WB and PL for CMV DNA monitoring in allo-HSCT recipients.

5. Conclusion

Blood cell content and presence or absence of antiviral treatment have a major impact on the magnitude of CMV DNA loads quantified in paired whole blood and plasma specimens obtained from allo-HSCT recipients.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.012>.

Acknowledgments

We are grateful to Abbott Molecular Inc. for providing the kits used here free of charge. Abbott Molecular Inc. played no role in data collection and interpretation, manuscript preparation, or the decision to submit this work for publication. Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM16/00200).

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Babady NE, Cheng C, Cumberbatch E, Stiles J, Papanicolaou G, Tang YW. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1252–7.
- Boom R, Sol CJ, Schuurman T, Van Breda A, Weel JF, Beld M, et al. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *J Clin Microbiol* 2002;40:4105–13.
- Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Besse B, André-Garnier E, Ferre V, Imbert-Marcille BM. Cellular normalization of viral DNA loads on whole blood improves the clinical management of cytomegalovirus or Epstein Barr virus infections in the setting of pre-emptive therapy. *J Med Virol* 2009;81:90–8.
- Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, et al. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:207–9.
- Costa C, Sidoti F, Mantovani S, Gregori G, Proietti A, Ghisetti V, et al. Comparison of two molecular assays for detection of cytomegalovirus DNA in whole blood and plasma samples from transplant recipients. *New Microbiol* 2016;39:186–91.
- Dioverti MV, Lahr BD, Germer JJ, Yao JD, Gartner ML, Razonable RR. Comparison of standardized cytomegalovirus (CMV) viral load thresholds in whole blood and plasma of solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients with CMV infection and disease. *Open Forum Infect Dis* 2017;4, ofx143.
- Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H, Pagliuca A, et al. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;162:25–39.
- 7th European Conference of Infections in Leukemia (ECIL). www.ecil-leukaemia.com, 2017.
- Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008;46:493–8.
- Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* 2014; 52:654–6.
- Jones S, Webb EM, Barry CP, Choi WS, Abravaya KB, Schneider GJ, et al. Commutability of cytomegalovirus WHO international standard in different matrices. *J Clin Microbiol* 2016;54:1512–9.
- Lazzarotto T, Chiereghin A, Piralla A, Piccirilli G, Girello A, Campanini G, et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA kinetics in whole blood and plasma of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:1699–706.
- Lisboa IF, Asberg A, Kumar D, Pang X, Hartmann A, Preiksaitis JK, et al. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation* 2011;91:231–6.
- Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, Bravo D, Clari MÁ, Benet I, et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1602–11.
- Pérez Romero P, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol* 2015;10:113–34.
- Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, Pang XL, Fryer JF, Heath AB, et al. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. *Clin Infect Dis* 2016;63: 583–9.
- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73:968–73.
- Schnepf N, Scieux C, Resche-Riggon M, Feghoul L, Xhaard A, Gallien S, et al. Fully automated quantification of cytomegalovirus (CMV) in whole blood with the new sensitive Abbott RealTime CMV assay in the era of the CMV international standard. *J Clin Microbiol* 2013;51:2096–102.
- Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P, Clari MA, et al. Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:1010–2.
- Suganda S, Tang L, Carr J, Sun Y, Pounds S, Hayden R. Comparative evaluation of whole blood versus plasma for quantitative detection of cytomegalovirus using an automated system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;85:23–5.
- Tong Y, Pang XL, Mabilangan C, Preiksaitis JK. Determination of the biological form of human cytomegalovirus DNA in the plasma of solid-organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2017;215:1094–101.
- Vinuesa V, Giménez E, Solano C, Gimeno C, Navarro D. Would kinetic analyses of plasma cytomegalovirus DNA load help to reach consensus criteria for triggering the initiation of preemptive antiviral therapy in transplant recipients? *Clin Infect Dis* 2016; 63:1533–5.
- von Müller L, Hinz J, Bommer M, Hampl W, Kluwick S, Wiedmann M, et al. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant* 2007;39:353–7.

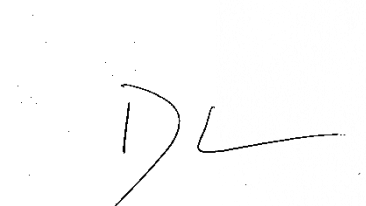
VIII. Anexos

Anexo I**Escrito del director de la tesis doctoral sobre el factor de impacto de las publicaciones que se recogen en la misma**

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	Clinical Infectious Diseases	2016	8,313
2	Transplant International	2016	3,177
3	Journal of General Virology	2017	3,376
4	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	2018	2,499

Dr. David Navarro Ortega
Catedrático, Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología i Ecologia,
Universitat de València



Valencia, enero de 2021

Anexo II

Escrito del director de la tesis doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la misma

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, realizo el presente informe en el que se detalla la participación del doctorando en cada una de las publicaciones que componen esta tesis doctoral. Además, los resultados obtenidos en coautoría no han sido utilizados ni implícita ni explícitamente para la realización de otra tesis doctoral.

Publicación 1

Vinuesa, V., Giménez, E., Solano, C., Gimeno, C., Navarro, D., & Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology Quality Control Study Group (2016). Would Kinetic Analyses of Plasma Cytomegalovirus DNA Load Help to Reach Consensus Criteria for Triggering the Initiation of Preemptive Antiviral Therapy in Transplant Recipients? *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(11), 1533–1535. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw608>

Contribución del doctorando:

Víctor Vinuesa realizó la mayor parte metodológica y contribuyó al análisis de los resultados. También revisó el texto definitivo.

Publicación 2

Vinuesa, V., Solano, C., Giménez, E., Piñana, J. L., Boluda, J. C., Amat, P., & Navarro, D. (2016). Lack of evidence for a reciprocal interaction between bacterial and cytomegalovirus infection in the allogeneic stem cell transplantation setting. *Transplant*

international: official journal of the European Society for Organ Transplantation, 29(11), 1196–1204. <https://doi.org/10.1111/tri.12831>

Contribución del doctorando:

Víctor Vinuesa realizó la mayor parte analítica, incluyendo la recogida de datos y la realización de las PCR. Contribuyó al análisis de los datos y revisó el texto definitivo.

Publicación 3

Vinuesa, V., Bracho, M. A., Albert, E., Solano, C., Torres-Puente, M., Giménez, E., González-Candelas, F., & Navarro, D. (2017). The impact of virus population diversity on the dynamics of cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *The Journal of general virology*, 98(10), 2530–2542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000916>

Contribución del doctorando:

Víctor Vinuesa realizó la mayor parte analítica, incluyendo la recogida de datos y la obtención de las muestras. Contribuyó al análisis de los datos y revisó el texto definitivo.

Publicación 4

Vinuesa, V., Giménez, E., Solano, C., Albert, E., Torres, I., Pérez, A., Hernández-Boluda, J. C., Piñana, J. L., & Navarro, D. (2019). Factors influencing cytomegalovirus DNA load measurements in whole blood and plasma specimens from allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 94(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.11.012>

Contribución del doctorando:

Víctor Vinuesa realizó la mayor parte analítica, incluyendo la recogida de datos y la realización de las PCR. Contribuyó al análisis de los datos y revisó el texto definitivo.

Dr. David Navarro Ortega
Catedrático, Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología i Ecología,
Universitat de València

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'D' followed by a horizontal line and a small flourish.

Valencia, enero de 2021

