

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Β΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ ΑΘΗΝΩΝ «Π. & Α. ΚΥΡΙΑΚΟΥ»

Διευθύντρια : Καθηγήτρια Μαρία Τσολιά

**Η ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ
CMV ΣΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

ΜΠΙΛΙΩ ΠΑΟΥΡΗ

Παιδίατρος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ


1. Καφετζής Δημήτριος- Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής
2. Παπαευαγγέλου Βασιλική- Καθηγήτρια Παιδιατρικής
3. Σολδάτου Αλεξάνδρα- Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Τσολιά Μαρία- Καθηγήτρια Παιδιατρικής
2. Παπαευαγγέλλου Βασιλική- Καθηγήτρια Παιδιατρικής
3. Καπτάμης Αντώνιος- Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής
4. Μίχος Αθανάσιος- Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής
5. Σολδάτου Αλεξάνδρα- Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής -
6. Κόσσυβα Λυδία- Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής
7. Σπυριδής Νικόλαος- Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως» (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202,παρ 2)

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἩΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ἸΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ἸΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ἸΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ἩΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ἸΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ἸΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ἸΘ
ἸΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ἸΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Ἡ ἸΔΩ, Ἡ ΔΚΟΥΣΩ, Ἡ ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ἩΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ἸΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας στην Παιδιατρική (2012)

Απόφοιτος Πανεπιστημίου Αθηνών, πτυχίο Ιατρικής Σχολής (2002)

Απόφοιτος ΤΕΙ Αθηνών Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων Σχολής Επαγγελματιών Υγείας-Πρόνοιας (1995)

Απολυτήριο Γυμνασίου-Λυκείου Ελληνογαλλικής Σχολής Πειραιά (1989)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Γ.Ν. «Π. & Α. ΚΥΡΙΑΚΟΥ» 2η Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ως Ακαδημαϊκή Υπότροφος Παιδιατρικής με ειδικό αντικείμενο "Σωματική Κακοποίηση στα παιδιά" (1/2016 - 12/2018)

Ιατρικό Κέντρο Αθηνών Α΄ Παιδιατρική Κλινική ως επιμελήτρια Παιδιάτρος (12/2013 - 12/2015)

Γ.Ν. «Π. & Α. ΚΥΡΙΑΚΟΥ» 2η Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με παράταση χρόνου ειδικότητας (ειδικευμένη παιδίατρος) (12/2012 - 10/2013).

Γ.Ν. «Π. & Α. ΚΥΡΙΑΚΟΥ» 2η Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ως ειδικευόμενη ιατρός Παιδιατρικής (10/2010 - 12/2012).

Γ.Ν. «ΑΣΚΛΗΠΕΙΟ ΒΟΥΛΑΣ» ως ειδικευόμενη ιατρός Παιδιατρικής (12/2005 - 11/2007).

ΜΕΤΡΟΠΟΛΙΤΑΝ , Διαγνωστικό Θεραπευτικό Κέντρο ως Ιατρός βοηθός Παθολόγος (Ιατρός θαλάμων-εφημερίες). (6/2004 - 12/2005) και (1/2008 – 10/2010).

Κ.Υ. Πάρου, υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου. (2/2003 - 3/2004)

Γ. Ν. ΣΥΡΟΥ «Βαρδάκειο και Πρώιο», τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση ως έμμισθος βοηθός στο Παθολογικό, Χειρουργικό, Καρδιολογικό τμήμα και στα αντίστοιχα εξωτερικά ιατρεία και στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του νοσοκομείου (10/2002 - 1/2003).

Ε.Α.Ν. ΠΕΙΡΑΙΑ «ΜΕΤΑΞΑ» ως τεχνολόγος ιατρικών εργαστηρίων στο Ανοσολογικό Τμήμα του νοσοκομείου (1997- 2002)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα « Η ανοσιακή απάντηση στον CMV σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς». (2009-σήμερα)

Συμμετοχή στην κλινική μελέτη με τίτλο «Εκτίμηση ανοσιακής απάντησης μετά από τετραδύναμο συζευγμένο εμβόλιο κατά του μηνιγγιτιδόκοκκου σε εφήβους που προηγουμένως έχουν εμβολιασθεί με μονοδύναμο εμβόλιο». (2012)

Συμμετοχή στην αναδρομική μελέτη με τίτλο « Η χαμένη ευκαιρία στην ανίχνευση σωματικής κακοποίησης σε νοσηλευόμενα παιδιά με επιβαρυσμένο κοινωνικό ιστορικό ή/και σοβαρό τραυματισμό τη διετία 2014-2015». (2016)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Quantiferon-Cytomegalovirus assay: A potentially useful tool in the evaluation of CMV-specific CD8+ T-cell reconstitution in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2018 May 18:e13220. doi: 10.1111/petr.13220. [Epub ahead of print]

Άρθρο ανασκόπησης με τίτλο «**Πνιγμός στα παιδιά**» στο περιοδικό Παιδιατρική , Τόμος 72, Τεύχος 4, σελ 252-260, Ιούλιος-Αύγουστος 2009.

Μελέτη με τίτλο «**Δευτεροπαθής θρομβοκυττάρωση σε παιδιά με ιογενή λοίμωξη του αναπνευστικού**» στο περιοδικό Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική , Τόμος 13, Τεύχος 2, σελ 86-92, 2008.

EUROPEAN ACADEMY OF PEDIATRICS 2017 OCTOBER LJUBLJANA ePoster- Abstract *published in the European Journal of Paediatrics: Age and Outcome of Inpatients Evaluated for Possible Physical Abuse at a Tertiary Children's Hospital in Greece.*

EUROPEAN ACADEMY OF PEDIATRICS 2017 OCTOBER LJUBLJANA ePoster- Abstract *published in the European Journal of Paediatrics: Missed Opportunities for the Detection of Physical Abuse and Neglect among Patients Hospitalized with Burns at a Tertiary Children's Hospital in Greece.*

WORLD SUMMIT ON PEDIATRICS 2017 JUNE ROME Poster: **Evaluation of an educational campaign to raise awareness of child physical abuse among health care professionals in Greece.**

ESPID 2015 MAY LEIPZIG Poster: **Cytomegalovirus infection in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation for malignant and non malignant diseases.**

ESID 2014 NOVEMBER PRAGUE Poster: **Validation of Quantiferon-CMV assay for monitoring of Cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell reconstitution in pediatric patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεογνολογίας, Αθήνα 11-13 Μαΐου 2012. Αναρτημένη ανακοίνωση : **Εμβρυϊκή μηκωνιακή περιτονίτιδα σε δίδυμη IVF κύηση.**

46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κέρκυρα 13-15 Ιουνίου 2009. Αναρτημένη ανακοίνωση : **Ατοπικοί δείκτες και βαρύτητα του άσθματος.**

EAACI 2008 JUNE BARCELONA. Poster: **Acute urticaria and its association with atopy in hospitalized children.**

9th Congress of the European Society for Pediatric Dermatology, Athens May 15-17 2008. Posters: **a) Acute urticaria in hospitalized children. Etiology and clinical presentation. b) Erythema nodosum in hospitalized children. Etiology and clinical course. c) Acute urticaria in relation to infections in hospitalized patients.**

18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, Νοέμβριος 2007
Προφορική ανακοίνωση: **Θρομβοκυττάρωση και RSV λοίμωξη σε νοσηλευόμενους παιδιατρικούς ασθενείς.**

Third European Congress of Virology Nurnberg-Germany September 2007
Poster : **Thrombocytosis as an early laboratory finding in children with a respiratory tract viral infection**

EAACI 2007 GOTEBOURG Poster : **Are markers of atopic sensitization clearly associated with asthma severity in children? A question not fully answered**

44^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος 9-11 Ιουνίου 2006
Αναρτημένη ανακοίνωση με θέμα: **Διαφοροποιήσεις στη μελέτη προβλημάτων υγείας παιδικού πληθυσμού από την Αλβανία σε μία 10ετία**

16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, Κως, 14-18 Απριλίου 2004, προφορικές ανακοινώσεις: **α) Η οργάνωση της βραχείας νοσηλείας σε Κέντρα Υγείας: Η εμπειρία του ΚΥ Πάρου. β) Επιδημιολογική μελέτη διακομιδών ασθενών από μια νησιωτική απομονωμένη περιοχή. γ) Η απόφαση για αεροδιακομιδή: από ποιους παράγοντες επηρεάζεται; δ) Βραχεία νοσηλεία ασθενών σε Κέντρα Υγείας: Το κλειδί για την αποσυμφόρηση της τριτοβάθμιας περίθαλψης.**

5^ο Πανελλήνιου Συνέδριο Ανοσολογίας 31 Οκτωβρίου-3 Νοεμβρίου Αθήνα 2001. Αναρτημένη ανακοίνωση με θέμα: **Σπάνια αυτοαντισώματα σε ασθενείς με λέμφωμα και λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό**

1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προληπτικής Ιατρικής 19-21 Ιανουαρίου 2001 Αθήνα.
Προφορική ανακοίνωση με θέμα: **Αποτελέσματα κολλαγονικού ελέγχου σε ασθενείς της Πάτμου**

10^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 28-31 Οκτωβρίου 1999 Ρόδος.
Αναρτημένη ανακοίνωση με θέμα: **Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα σε αιματολογικούς ασθενείς-Πρόδρομη ανακοίνωση**

ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ-ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Εκπαιδέτρια στην "Εξειδικευμένη υποστήριξη της ζωής στα παιδιά" (**ALS-Pediatric Education for Prehospital Professionals-PEPP**) (2013)

Εκπαίδευση στην "Εξειδικευμένη υποστήριξη της ζωής στα νεογνά" (**Newborn Life Support- NLS**) (2013)

Εκπαίδευση στην "Εξειδικευμένη υποστήριξη της ζωής στα παιδιά" (**APLS-Advanced Pediatric Life Support- APLS**) (2006)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Γαλλικά: SORBONNE II

Αγγλικά: PROFICIENCY UNIVERSITY OF CAMBRIDGE

Ιταλικά: CILS LIVELLO TRE UNIVERSITA DI SIENA

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλους όσους συνέβαλλαν για την εκπόνηση της.

Τον Ομ. Καθηγητή Δ. Καφετζή όπως και την Καθηγήτρια Μ. Τσολιά, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν παρέχοντας μου τη δυνατότητα συμμετοχής στο κλινικό και ερευνητικό έργο της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Την Καθηγήτρια Β. Παπαευαγγέλου για την δυναμική υποστήριξη και την επιστημονική επίβλεψη κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τον Παιδίατρο-Αιματολόγο Ε. Γουσέτη για την αρχική σύλληψη της βασικής ιδέας και την πολύτιμη καθοδήγηση του στον σχεδιασμό καθώς και την επεξεργασία και ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Το προσωπικό της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών-Ελπίδα και ιδιαιτέρως τις Παισίου Α., Θεοδοσάκη Μ., Πετράκου Ε. καθώς και τις νοσηλεύτριες των εξωτερικών ιατρείων για την πολύτιμη βοήθεια τους στην συλλογή των δειγμάτων και τις πρακτικές τους συμβουλές.

Το προσωπικό του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου «Π&Α Κυριακού» για την πολύτιμη βοήθεια στην πραγματοποίηση του εργαστηριακού τμήματος της έρευνας καθώς μου παρείχαν χώρο και υλικοτεχνικό εξοπλισμό προκειμένου να πραγματοποιήσω τις τελικές μετρήσεις.

Ιδιαίτερη μνεία στην Επ.Καθηγήτρια Α. Σολδάτου για την ανάθεση της παρούσας διατριβής, την έμπρακτη βοήθεια κατά το σχεδιασμό και την υλοποίηση της έρευνας, την αμέριστη στήριξη και την ενθάρυνση που μου έδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Η μεταξύ μας συνεργασία ήταν και παραμένει άψογη και ελπίζω να συνεχιστεί για πολύ καιρό ακόμα στο μέλλον.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου για την στήριξη και την αγάπη της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Γενικό Μέρος	11
1.Εισαγωγή	12
1.1 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	12
1.2. Ορισμός	13
1.3. Ενδείξεις μεταμόσχευσης	13
1.4. Ενδείξεις μεταμόσχευσης ΑΑΚ στα παιδιά	17
1.4.1. Κακοήθη νοσήματα	18
1.4.2. Μη κακοήθη νοσήματα	19
1.5. Η ανοσιακή αποκατάσταση μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων	21
1.6. Λοιμώξεις στη ΜΑΑΚ	24
1.7. CMV λοίμωξη	30
1.8. Ορισμοί	39
1.9. Η ανοσιακή απάντηση στον κυτταρομεγαλοϊό.	41
1.9.1 Μη ειδική ανοσία	41
1.9.2. Ειδική ανοσία	42
1.9.3 Κυτταρική ανοσία	43
1.10. Η CMV λοίμωξη στη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.	47
1.11. Πρόληψη και αντιμετώπιση της CMV λοίμωξης στους ασθενείς με ΜΑΑΚ.	51
1.12. Διαγνωστική προσέγγιση CMV λοίμωξης	56
1.13. Μέθοδοι ανίχνευσης ειδικής ανοσιακής απάντησης για τον CMV	60

Ειδικό Μέρος	64
2. Σκοπός της μελέτης	65
2.1. Σχεδιασμός μελέτης	68
3. Μεθοδολογία	70
3.1. Αρχές της μεθόδου	70
3.2. Διαδικασία	75
3.3. Στατιστική ανάλυση	78
4. Αποτελέσματα	79
4.1. Παρακολούθηση CMV ιαιμίας	81
4.2. Παρακολούθηση της ειδικής CMV ανοσιακής απάντησης	84
5. Συζήτηση	93
6. Συμπεράσματα	102
7. Περίληψη	103
8. Abstract	105
9. Συντομογραφίες	107
10. Βιβλιογραφία	108

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ) χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως θεραπεία διάσωσης σε ασθενείς με τελικού σταδίου αιματολογικά νοσήματα. Η πρώτη προσπάθεια μεταμόσχευσης μυελού των οστών από άνθρωπο σε άνθρωπο έγινε το 1939 σε ασθενή με μυελική απλασία που προκλήθηκε από λήψη χρυσού. (Osgood et al, 1939) Τις επόμενες δεκαετίες έγιναν αρκετές μελέτες σε ποντίκια που αφορούσαν την τοξική επίδραση της ακτινοβολίας στο μυελό των οστών. Επιπλέον έγιναν προσπάθειες ενδοφλέβιας έγχυσης μυελού των οστών σε ασθενείς με τελικού σταδίου αιματολογικές κακοήθειες. Η έγχυση γινόταν μετά από υψηλές δόσεις ακτινοβολίας ή χημειοθεραπείας και ήταν είτε ανεπιτυχής είτε κατέληγε σε μερική εγκατάσταση του μοσχεύματος.

Η ανακάλυψη του συστήματος των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA) και η ανάπτυξη μεθόδων τυποποίησης της ιστοσυμβατότητας την δεκαετία του 1960 έδωσε μεγάλη ώθηση στο όλο εγχείρημα. Οι πρώτες επιτυχημένες μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών έγιναν το 1968 σε παιδιά με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια και σύνδρομο Wiskott-Aldrich για να ακολουθήσει όλο και μεγαλύτερος αριθμός ασθενών με λευχαιμίες ανθεκτικές στη συμβατική χημειοθεραπεία. (Thomas et al, 1999) Σύμφωνα με το European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) μεταξύ 1970 και 2002 πραγματοποιήθηκαν 31713 μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών κυττάρων σε ασθενείς ≤ 18 ετών. (Miano M. et al, 2007) Στη χώρα μας στη Μονάδα μεταμόσχευσης μυελού των οστών του Νοσοκομείου Παίδων Αγία Σοφία από τον Μάιο του 1993 έως τον Μάιο του 2008 πραγματοποιήθηκαν 430 ΜΑΑΚ σε ασθενείς ηλικίας 4 μηνών μέχρι 24 ετών. Από αυτές οι 285 ήταν αλλογενείς.

1.2. Ορισμός

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ) αφορά οποιαδήποτε μέθοδο όπου αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα προερχόμενα από οποιοδήποτε τύπο δότη και από οποιαδήποτε πηγή, δίνονται σε έναν λήπτη με σκοπό την αντικατάσταση και ανασύσταση του αιμοποιητικού ιστού μερικώς ή ολικώς. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να προέρχονται από το μυελό των οστών (ΜΟ), κινητοποιημένο περιφερικό αίμα (ΚΠΑ) ή ομφάλιο αίμα (ΟΑ). (Ljungman P. et al, 2010)

1.3. Είδη μεταμόσχευσης

Οι δύο βασικές κατηγορίες μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΑΑΚ) είναι η αλλογενής, όπου τα ΑΑΚ προέρχονται από υγιή δότη και η αυτόλογη, όπου τα ΑΑΚ προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή, συνήθως σε φάση ύφεσης της νόσου. Ο περαιτέρω διαχωρισμός των διαφόρων τύπων μεταμόσχευσης γίνεται με βάση τον δότη, την ένταση του σχήματος προετοιμασίας και την πηγή των ΑΑΚ. (Coperlan E A, 2006) Πίνακας 1

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

	Αλλογενής	Αυτόλογη
Ανάλογα με τον δότη	Μονοζυγωτικός δίδυμος αδελφός	
	Ιστοσυμβατός συγγενής	
	Μη συγγενής HLA-ιστοσυμβατός δότης	
	Απλο-ταυτόσημος συγγενής δότης	
Ανάλογα με την πηγή των κυττάρων	Μυελός των οστών	Μυελός των οστών
	ΑΑΚ αίματος	ΑΑΚ αίματος
	Ομφαλοπλακουντιακό αίμα	
Ανάλογα με το σχήμα προετοιμασίας	Πλήρους έντασης (Μυελοαφανιστική)	Πλήρους έντασης
	Μειωμένης έντασης	
	Μη μυελοκατασταλτική	

Η φιλοσοφία της αυτόλογης μεταμόσχευσης AAK βασίζεται στη χορήγηση υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας για την επίτευξη της μέγιστης δυνατής ανταπόκρισης της νεοπλασίας. Με την επαναχορήγηση των AAK επιτυγχάνεται αποκατάσταση της αιμοποίησης.

Η αλλογενής μεταμόσχευση βασίζεται στις εξής παραμέτρους: α) Το σχήμα προετοιμασίας, β) την ανοσολογική δράση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (λήπτη), γ) το βαθμό της HLA ιστοσυμβατότητας.

Στο σχήμα προετοιμασίας χορηγείται χημειοθεραπεία συχνά σε συνδυασμό με ακτινοβολία που σκοπό έχουν να καταστρέψουν το αιμοποιητικό σύστημα του ασθενούς και να καταστείλουν το ανοσοποιητικό του σύστημα, ειδικότερα τα T-κύτταρα προς αποφυγή απόρριψης του μοσχεύματος. Στη συνέχεια ο ασθενής δέχεται ενδοφλεβίως αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από τον δότη.

Η ανοσολογία της MAAK διαφέρει από αυτή άλλων τύπων μεταμόσχευσης, καθώς επιπλέον των αρχέγονων κυττάρων, το μόσχευμα περιλαμβάνει ώριμα κύτταρα του αίματος του δότη όπως T-κύτταρα, φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Natural killers-NK), δένδριτικά. Τα κύτταρα αυτά προκαλούν επανασύσταση του λέμφο-αιμοποιητικού συστήματος του λήπτη με αποτέλεσμα εξάλειψη της υπολειπόμενης νεοπλασίας. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως graft versus leukemia effect (Δράση μοσχεύματος έναντι της λευχαιμίας-GVL). Ο ανοσολογικός αυτός μηχανισμός είναι επίσης υπεύθυνος και για τη νόσο του μοσχεύματος έναντι στον ξενιστή (graft versus host disease-GVHD). Και για τις δύο δράσεις υπεύθυνη είναι η κυτταροτοξικότητα των T-λεμφοκυττάρων του δότη. Στη GVL τα T-λεμφοκύτταρα στρέφονται εναντίον των λευχαιμικών κυττάρων εξαιτίας των διαφορών στα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, δράση η οποία είναι επιθυμητή. Ωστόσο επειδή κάποια από αυτά τα αντιγόνα βρίσκονται και σε φυσιολογικούς ιστούς του λήπτη (στο δέρμα, στη γαστρεντερική οδό και στο ήπαρ) τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα στρέφονται εναντίον αυτών, προκαλώντας GVHD, εκδήλωση με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα.

Η επιτυχία της αλλογενούς μεταμόσχευσης μπορεί να υπονομευτεί από το βαθμό διαφοράς στα αντιγόνα του μείζονος (MHC) και ελάσσονος συστήματος ιστοσυμβατότητας μεταξύ δότη και λήπτη. Τα HLA αντιγόνα διακρίνονται σε δύο τάξεις, την τάξη I και την τάξη II. Μεταξύ τους υπάρχουν διακριτές διαφορές που αφορούν τη δομή τους, την κατανομή τους στα διάφορα κύτταρα, ιστούς και το αντιγονοπαρουσιαστικό τους προφίλ στα T-λεμφοκύτταρα. Τα αντιγόνα της τάξης I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) παρουσιάζουν πεπτιδία στα CD8+ T-κύτταρα ενώ τα τάξης II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) παρουσιάζουν πεπτιδία στα CD4+ T-κύτταρα. Είναι φανερό ότι λόγω του τεράστιου πολύμορφισμού στον άνθρωπο, ακόμα και μικρές διαφορές στα μόρια του MHC μπορούν να πυροδοτήσουν οξεία ανοσιακή διέγερση μεταξύ δότη-λήπτη (απόρριψη μοσχεύματος-GVHD). Τα αντιγόνα του ελάσσονος συστήματος ιστοσυμβατότητας προκύπτουν από τον πολυμορφισμό των μη HLA πρωτεϊνών, από διαφορές στο επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών ή στο γονιδίωμα μεταξύ ανδρών και γυναικών. Οι διαφορές αυτές είναι ικανές να προκαλέσουν GVHD ακόμα και σε μεταμόσχευση από HLA συμβατό δότη. (Bollard et al, 2006) Ιδανικά ο καλύτερος δότης είναι ο πλήρως ιστοσυμβατός αδελφός. Εάν δεν υπάρχει, τότε εναλλακτικά αναζητείται άλλος ιστοσυμβατός συγγενής ή μη συγγενής εθελοντής. Καθώς η πιθανότητα ανεύρεσης ιστοσυμβατού δότη από το οικογενειακό περιβάλλον είναι 25-30% η πλειοψηφία των ασθενών κατάφεύγει στις Τράπεζες εθελοντών δοτών και ομφαλοπλακουντικού αίματος. Με αυτόν τον τρόπο σημαντικός αριθμός MAAK γίνεται με εθελοντές μη συγγενείς δότες, από ομφαλικά μοσχεύματα και από απλοταυτόσημους γονείς. (Godley et al, 2010 Rocha V. et al, 2008) Πίνακας 2

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

	Μειονεκτήματα	Πλεονεκτήματα
Μη συγγενείς	Θνητότητα GVHD ↑	Υποτροπή ↓
ΟΠΑ	Θνητότητα Υποτροπή ↑	GVHD ↓ Λοίμωξη από CMV ↓ Ταχεία πραγματοποίηση
Απλοταυτόσημες	Υποτροπή ↑ Λοιμώξεις	Διαθέσιμος δότης για όλους

ΟΠΑ: Ομφαλοπλακουντικό αίμα GVHD: Graft versus host disease, CMV: Cytomegalovirus

1.4. Ενδείξεις μεταμόσχευσης ΑΑΚ στα παιδιά

Η μεταμόσχευση ΑΑΚ αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία σε παιδιά τα οποία πάσχουν από κακοήθειες, αιματολογικές παθήσεις (απλαστική αναιμία, αιμοσφαιρινοπάθειες), μεταβολικά νοσήματα και ανοσοανεπάρκειες. (Ljungman P et al, 2010–Locatelli F. et al, 2008) Πίνακας 3

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΑΛΛΟΓΕΝΟΥΣ ΜΑΑΚ ΓΙΑ	ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ
-Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία	-Αιμοφαγοκυτταρική λεμφοιστιοκύτωση
-Οξεία μυελογενή λευχαιμία σε 1 ^η πλήρη ύφεση	- Σύνδρομο Bernard-Soulier, θρομβασθένεια Glanzmann, συγγενής αμεγακαρυοκυτταρική θρομβοκυττοπενία
-Χρόνια μυελογενή λευχαιμία(χρωμόσωμα Ph+)	-Βλεννοπολυσακχαριδώσεις (v. Hurler) -Υπεροξειδοσωμικά νοσήματα (v.Krabbe, αδρενολευκοδυστροφία)
-Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	-Νεογνική κακοήθης οστεοπέτρωση
-Hodgkin και non Hodgkin λεμφώματα	-Επικίνδυνη για τη ζωή κυτταροπενία που δεν ανταποκρίνεται στη συμβατική θεραπεία
-Ορισμένοι συμπαγείς όγκοι	
-Σοβαρή επίκτητη απλαστική αναιμία	
-Αναιμία Fanconi	
-Συγγενής δυσκεράτωση	
-Αναιμία Diamond-Blackfan	
-Μείζων θαλασσαιμία	
-Δρεπανοκυτταρική νόσος	
-Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID)	
-Hyper IgM Σύνδρομο	
-Ανεπάρκεια προσκόλλησης λευκοκυττάρων	
- Σύνδρομο Omenn	
- Σύνδρομο Wiscott-Aldrich	
- Σύνδρομο Chediak-Higashi	
- Σύνδρομο Kostmann	
- Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος	
- Σύνδρομο Duncan	

1.4.1 Κακοήθη νοσήματα

- **Οξεία Λεμφογενής Λευχαιμία (ΟΛΛ)** Η ΟΛΛ αποτελεί την πιο συχνή ένδειξη για ΜΑΑΚ. Πραγματοποιείται κυρίως σε παιδιά που βρίσκονται στην 1^η πλήρη ύφεση τα οποία όμως ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου για υποτροπή. Ως τέτοιοι ορίζονται οι ασθενείς που έχουν προβλεπόμενη επιβίωση ελεύθερη νόσου (event-free survival-EFS) <50%. Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται η αναδιάταξη t(9;22) ή t(4;11), η μη απάντηση μετά από 1 εβδομάδα κορτιζονοθεραπείας, ο T-ανοσοφαινότυπος, >100000 κακοήθη κύτταρα/μl στη διάγνωση, τα υψηλά ποσοστά της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, η αντοχή στην αρχική χημειοθεραπεία. (Schrauder et al, 2006). Οι ασθενείς με ΟΛΛ που παρουσιάζουν γρήγορη υποτροπή της νόσου έχουν έως 90% πιθανότητα 2^{ης} ύφεσης. Επομένως είναι κατάλληλοι υποψήφιοι για ΜΑΑΚ είτε από πλήρως συμβατό αδελφό ή μη συγγενή συμβατό δότη. (Borgmann A et al,2003 Locatelli et al, 2002)
- **Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)** Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων δεν συστήνεται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με ΟΜΛ χαμηλού κινδύνου στην 1^η ύφεση καθώς αυτοί ωφελούνται περισσότερο από τη χημειοθεραπεία.(Gibson et al, 2005) Αποτελεί ένδειξη στα παιδιά με ΟΜΛ με EFS μεταξύ 55%-72%, στη βρεφική ΟΜΛ και στα παιδιά με FABM0, M6, M7 .(Marks et al,2006).
- **Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ).** Η ΧΜΛ είναι σπάνια νόσος στα παιδιά. Η αλλογενής ΜΑΑΚ θεωρείται ως η πλέον αποτελεσματική θεραπεία για παιδιά με Φιλαδέλφεια θετικό χρωμόσωμα ΧΜΛ. (Cwynarski et al, 2003). Ωστόσο από τότε που οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης εγκρίθηκαν για την εφαρμογή τους σε παιδιά και εφήβους η ΜΑΑΚ δεν αποτελεί πρώτη επιλογή θεραπείας.(Ljungman P et al, 2010)
- **Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)** Η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί θεραπεία εκλογής στα παιδιά με πρωτοπαθή ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένης της νεανικής μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας και της δευτεροπαθούς ΧΜΛ. (Ljungman P et al,2010)

- **Κακοήθη λεμφώματα (Hodgkin και non-Hodgkin λεμφώματα).** Τα παιδιά που πάσχουν από λεμφώματα έχουν καλή πρόγνωση όταν υποβάλλονται στη συμβατική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Η αλλογενής ΜΑΑΚ μπορεί να βοηθήσει στους ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο όταν γίνεται νωρίς μετά την υποτροπή και ειδικότερα εάν υπάρχει διαθέσιμος συμβατός δότης. (Ljungman P et al, 2010).
- **Συμπαγής όγκοι** Το νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου είναι μέχρι στιγμής η μόνη ένδειξη στην οποία ο συνδυασμός υψηλής δόσης χημειοθεραπείας και αυτόλογης ΜΑΑΚ έχει όφελος. (Ladenstein et al, 2008, Matthay et al, 2009). Άλλες ενδείξεις είναι το υψηλού κινδύνου σάρκωμα Ewing, η υποτροπή όγκου Wilms και το σάρκωμα μαλακών μορίων σταδίου IV. (Ljungman P et al, 2010).

1.4.2. Μη κακοήθη νοσήματα

- **Αιμοσφαιρινοπάθειες** Η αλλογενής ΜΑΑΚ από υγιή πλήρως ταυτόσημο αδελφό ή ομφάλιο αίμα από συγγενή δότη είναι η θεραπεία εκλογής σε νεαρούς ασθενείς με ομόζυγη θαλασσαιμία. Όσον αφορά τη δρεπανοκυτταρική νόσο η ΜΑΑΚ συστήνεται σε μια υποομάδα ασθενών που είτε δεν απαντούν στη θεραπεία με υδροξυουρία είτε παρουσιάζουν αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, υποτροπιάζουσες αγγειοαπόφρακτικές κρίσεις και/ή οξύ θωρακικό σύνδρομο, οστεονέκρωση ή/και σοβαρή αναιμία. (Locatelli et al, 2003)
- **Απλαστική αναιμία, αναιμία Fanconi, αναιμία Blackfan-Diamond** Για τα παιδιά με σοβαρή επίκτητη απλαστική αναιμία η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων με έναν HLA-ταυτόσημο συγγενή δότη αποτελεί τη βέλτιστη θεραπεία. Δεδομένου ότι η πιθανότητα επιβίωσης μετά τη ΜΑΑΚ φτάνει >80%, σε κάθε παιδί με σοβαρή επίκτητη απλαστική αναιμία πρέπει να πραγματοποιείται HLA ταυτοποίηση το συντομότερο δυνατό. Τα παιδιά με αναιμία Blackfan-Diamond που δεν απαντούν στην κορτιζόνη ή είναι κορτικοεξαρτώμενα μπορούν να ωφεληθούν από τη μεταμόσχευση. Τέλος η σοβαρή ανεπάρκεια του μυελού των οστών που παρατηρείται στην αναιμία Fanconi και τη συγγενή

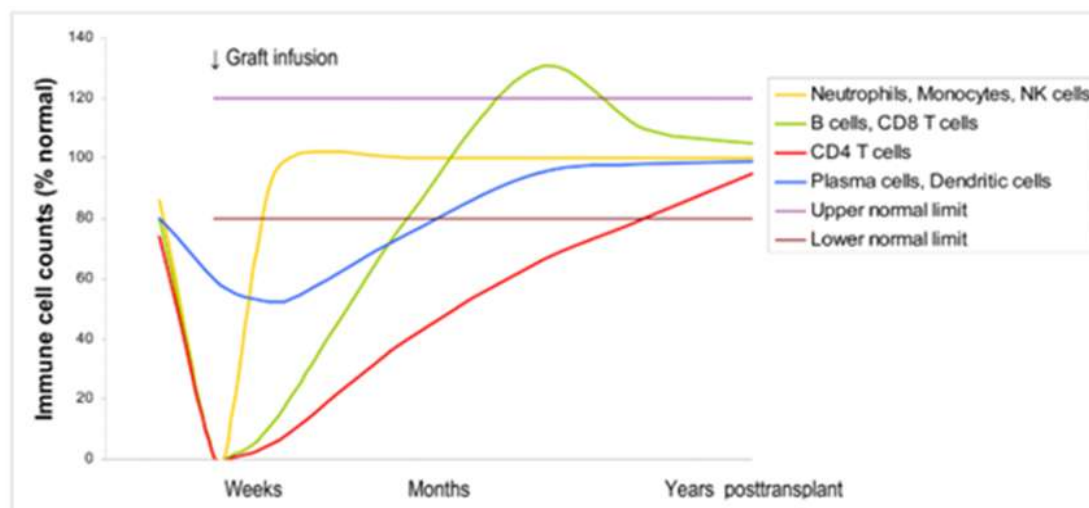
δυσκεράτωση μπορεί να αντιμετωπισθεί θεραπευτικά με αλλογενή MAAK. (Scheinberg P., 2012 , Davies et al, 2007)

- **Μεταβολικά νοσήματα** Η MAAK έχει ένδειξη στα λυσσοσωμικά αθροιστικά νοσήματα. Η επιτυχία της μεταμόσχευσης εξαρτάται από τον βαθμό εγκατάστασης του μοσχεύματος, τα επίπεδα ενζύμου στα ερυθρά κύτταρα του δότη, το βαθμό χιμairισμού και την ανοσολογική αντίδραση στο φυσιολογικό ένζυμο του δότη.(Ljungman P et al, 2010).
- **Ανοσοανεπάρκειες** Η αλλογενής MAAK μπορεί να θεραπεύσει τις περισσότερες από τις θανατηφόρες μορφές ανοσοανεπαρκειών. Αν και οι ασθενείς παρουσιάζουν κλινική ετερογένεια ωστόσο τα ποσοστά επιτυχίας είναι υψηλά. Οι ενδείξεις αφορούν τόσο HLA ταυτόσημο όσο και εναλλακτικούς δότες. Ειδικότερα για το SCID οι ασθενείς πρέπει να μεταμοσχεύονται όσο το δυνατόν νωρίτερα. Τα ποσοστά επιβίωσης μετά από αλλογενή MAAK είναι >90% εάν πραγματοποιηθεί σύντομα μετά τη γέννηση. Προγνωστικοί παράγοντες είναι η ηλικία, ο τύπος του SCID(B(+) ή B(-)), η κλινική κατάσταση τη στιγμή της διάγνωσης και κυρίως η παρουσία λοίμωξης του αναπνευστικού και ο βαθμός της HLA ιστοσυμβατότητας.(Antoine C.et al, 2003 , Cavazzana-Calvo M.et al, 2008)

1.5. Η ανοσιακή αποκατάσταση μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων

Η αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος μετά από ΜΑΑΚ είναι κριτικής σημασίας καθώς οι λοιμώξεις λόγω ανοσολογικής ανεπάρκειας προκαλούν σημαντική νοσηρότητα ή/και θνητότητα. Ο ρυθμός της αποκατάστασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του σχήματος προετοιμασίας καθώς και από το είδος του μοσχεύματος. (Trigg M.,2004) Έτσι οι λήπτες ΜΑΑΚ που ακολουθούν ένα πλήρως μυελοκατασταλτικό σχήμα προετοιμασίας παρουσιάζουν μια περίοδο βαριάς πανκυταροπενίας που διαρκεί από μέρες έως εβδομάδες. Η ταχύτητα ανάκαμψης των ουδετερόφιλων εξαρτάται κυρίως από την πηγή του μοσχεύματος: ο κατά προσέγγιση χρόνος αποκατάστασης είναι 2 εβδομάδες για το κινητοποιημένο με G-CSF περιφερικό αίμα, 3 εβδομάδες για τον μυελό των οστών και 4 εβδομάδες για το ομφαλοπλακουντιακό μόσχευμα. Η αύξηση των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και NK κυττάρων ακολουθείται από την αποκατάσταση των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων για να ολοκληρωθεί με τα T και B λεμφοκύτταρα. Σχήμα 1

ΣΧΗΜΑ 1



Σχήμα 1:Ανοσολογική αποκατάσταση μετά από ΜΑΑΚ και η σχέση της με το είδος του μοσχεύματος.Storek J: Expert Opinion on Biological Therapy (Informa) 8(5):583–597, 2008

Η επίδραση των μη μυελοκατασταλτικών σχημάτων προετοιμασίας είναι σαφώς ηπιότερη μάλιστα με ορισμένα πρωτόκολλα επιτυγχάνεται ικανοποιητική εγκατάσταση του μοσχεύματος χωρίς σημαντική ανοσοκαταστολή. Ωστόσο ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο προετοιμασίας η πορεία αποκατάστασης των λεμφοκυττάρων είναι παρόμοια. Αντίθετα με ότι συμβαίνει με τις άλλες αιμοποιητικές σειρές όπου η αποκατάσταση πραγματοποιείται μέσα σε εβδομάδες από την MAAK η ανάκαμψη των λεμφοκυττάρων είναι μια μακροχρόνια διαδικασία. Πράγματι η επιστροφή στην επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος απαιτεί αρκετούς μήνες, ενώ ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν ανοσολογικό έλλειμμα για αρκετά χρόνια μετά τη μεταμόσχευση.

Γενικά τα NK είναι ο πρώτος υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων που αποκαθίσταται και αυτό συμβαίνει συνήθως 1-2 μήνες μετά τη MAAK. Ακολουθούν τα CD8⁺ T-κύτταρα τα οποία φτάνουν σε ικανοποιητικά επίπεδα 2 με 8 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Τέλος ακολουθεί η αύξηση των B- λεμφοκυττάρων και των CD4⁺ T- κυττάρων. (Tomblyn M. et al, 2009).

Ειδικότερα, η αναγέννηση των B-λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται πρώτως από τα προγονικά λεμφικά κύτταρα του μυελού των οστών όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση των αρχέγονων μορφών τους. Ωστόσο η αποκατάστασή τους εξαρτάται κατά πολύ από το μικροπεριβάλλον του μυελού το οποίο παρουσιάζει ευαισθησία στη βλάβη που προκαλείται από την επίδραση των σχημάτων προετοιμασίας όσο και από τα βλαπτικά αποτελέσματα της εμφάνισης του GVHD και της θεραπείας που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του. Πράγματι, οι ασθενείς που έχουν παρουσιάσει έστω και περιορισμένης κλίμακας GVHD εξαρτώμενο από την κορτιζόνη, εμφανίζουν βραδύτερη αύξηση των B-λεμφοκυττάρων σε σχέση με αυτούς που δεν παρουσιάζουν GVHD. (Storek J. et al, 2001) Επιπλέον, το είδος του μοσχεύματος φαίνεται να παίζει ρόλο καθώς οι ασθενείς που λαμβάνουν μεταμόσχευση με ομφάλιο αίμα έχουν γρηγορότερη άνοδο των B-κυττάρων. (Storek J., 2008) Βέβαια για να έχουμε πλήρη αποκατάσταση της χυμικής ανοσίας μετά τη MAAK είναι απαραίτητα όχι μόνο τα πρώιμα B-κύτταρα αλλά και τα B-κύτταρα μνήμης. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με την περιβαλλοντική έκθεση είτε με τον εμβολιασμό για κοινά παθογόνα και απαιτεί και τη βοήθεια

των CD4⁺ T-κυττάρων. Επομένως, οι λήπτες MAAK ακόμα και αν δεν παρουσιάσουν GVHD και φαίνεται να έχουν φυσιολογικό απόλυτο αριθμό B- λεμφοκυττάρων μέσα σε 6 μήνες από την μεταμόσχευση δεν θα πρέπει να θεωρείται ότι έχουν επιτύχει πλήρη αποκατάσταση της χυμικής τους ανοσίας για τουλάχιστον 1 χρόνο μετά από αυτή. (Tomblin M. et al, 2009)

Όσον αφορά τα T-κύτταρα η πορεία της αναγέννησής τους είναι ανεξάρτητη της επίδρασης του θύμου. Εδώ τα ώριμα T-κύτταρα που περιλαμβάνονται στο μόσχευμα εξαπλώνονται in vivo ως απάντηση στην T-λεμφοπενία. Η διαδικασία ευνοείται από μια σειρά παραγόντων όπως η αυξημένη διαθεσιμότητα ομοιοστατικών κυτοκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-7 και IL-15 λόγω της λεμφοπενίας, φλεγμονωδών κυτοκινών λόγω της βλάβης των ιστών και στην έκθεση σε ιικά αντιγόνα. Η ανάπτυξη αυτή αφορά περισσότερο τα CD8⁺ T-κύτταρα παρά τα CD4⁺ T-κύτταρα για αρκετούς μήνες μετά τη μεταμόσχευση. (Mackall et al, 1997)

Συμπληρωματικά θα αναφέρουμε και τους επιθηλιακούς φραγμούς που αποτελούν τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος και συμμετέχουν στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά των λοιμώξεων. Ο χρόνος της αποκατάστασης τους ποικίλει αναλόγως της βλάβης που έχουν υποστεί λόγω της παρουσίας του GVHD και από την επίδραση της ακτινοβολίας κατά την προετοιμασία.

Γενικά τα παιδιά ανέχονται την μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων καλύτερα από τους ενήλικες για αρκετούς λόγους όπως:

- Οι ιστοί τους αναγεννιούνται γρηγορότερα από τους ενήλικες μετά από τη βλαπτική επίδραση της προπαρασκευαστικής χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας
- Τα παιδιά είναι πιθανότερο να λάβουν μεγαλύτερες δόσεις αιμοποιητικών κυττάρων κατά την μεταμόσχευση καθώς οι δότες τους είναι συχνότερα μεγαλύτεροι ή ενήλικες

- Έχουν ακέραιο θύμο αδένες ο οποίος αν και στερείται Τ-κυττάρων λόγω της θεραπείας προετοιμασίας ωστόσο έχει την αρχιτεκτονική που επιτρέπει την αναγέννηση των βλαστικών κέντρων και την παραγωγή νέων λεμφοκυττάρων
- Η χρήση ομφαλοπλακουντικού μοσχεύματος είναι εξαιρετικά ευνοϊκή για τα παιδιά καθώς είναι πλούσιο σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με υψηλό δυναμικό αύξησης και συνδέονται με μικρότερη εμφάνιση GVHD. (Trigg M., 2004).

1.6. Λοιμώξεις στη ΜΑΑΚ

Η πορεία της ανοσιακής αποκατάστασης μετά από μια μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων μιμείται την εξέλιξη του ανοσοποιητικού συστήματος όπως την συναντάμε στην πρώιμη βρεφική και παιδική ηλικία. Αυτό συμβαίνει λόγω της εξαιρετικής ανωριμότητας και κατά κάποιο τρόπο «απειρίας» που χαρακτηρίζει το ανοσιακό σύστημα στη φάση αυτή. Για το λόγο αυτό τους πρώτους μήνες μετά τη ΜΑΑΚ το παιδί παραμένει επιρρεπές σε μία μεγάλη ποικιλία λοιμωδών παραγόντων.(Trigg M., 2004). Το είδος των μικροοργανισμών και των λοιμώξεων εξαρτώνται από τη χρονική φάση της μεταμόσχευσης και από την ανοσολογική αποκατάσταση στη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Έτσι η μετα-μεταμοσχευτική περίοδος μπορεί να επιπλακεί από λοιμώξεις οφειλόμενες σε βακτήρια, ιούς, μύκητες και πρωτόζωα που εμφανίζονται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές.

Ειδικότερα, στην πρώιμη φάση (0-1 μήνα μετά τη μεταμόσχευση) λόγω της σοβαρής ουδετεροπενίας και της βλάβης στους βλεννογόνους παρατηρούνται βακτηριαιμίες από βακτήρια προερχόμενα από την αναπνευστική ή γαστρεντερική οδό των ασθενών. Επιπλέον η παρουσία κεντρικών φλεβικών καθετήρων αυξάνει τον κίνδυνο λοιμώξεων από gram θετικά βακτήρια. Η εμπειρική χορήγηση αντιβιοτικών καθώς και ενδοφλέβιας γ-σφαιρίνης μειώνουν τον κίνδυνο σε αυτή την πρώιμη περίοδο. Η αναζωπύρωση του ιού του απλού έρπητα αποτελεί επίσης ένα σοβαρό πρόβλημα καθώς συμβαίνει σε έως και το 70% των οροθετικών ασθενών λόγω της βλάβης των βλεννογόνων και της σοβαρής λεμφοπενίας. Για το λόγο αυτό η προφυλακτική χορήγηση ακυκλοβίρης αποτελεί μια κοινή πρακτική. Τέλος, οι λοιμώξεις από μύκητες κυρίως από κάντιτα και ασπέργιλλο παρά την έγκαιρη και άμεση χορήγηση αντιμυκητιασικής αγωγής παραμένουν ένα σοβαρό πρόβλημα. Ειδικότερα η ετήσια επίπτωση της διηθητικής ασπεργίλλωσης είναι 7.3% σε λήπτες από HLA-συμβατούς συγγενείς δότες και 10.5% από ιστοσυμβατό μη συγγενή εθελοντή δότη. Η λιποσωμική Αμφοτερικίνη Β, οι αζόλες (ιτρακοναζόλη), οι εχινοκανδίνες (κασποφουγκίνη) βοηθούν τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία. (Safdar A. et al, 2007)

Στην ενδιάμεση φάση (1-6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση) οι ασθενείς παρουσιάζουν συχνά μείωση των Τ-λεμφοκυττάρων τόσο όσον αφορά τον αριθμό όσο και τη λειτουργικότητα τους με αποτέλεσμα να είναι ευαίσθητοι σε προσβολή από ιούς όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), αδενοϊός, αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV). Η προφυλακτική χορήγηση ακυκλοβίρης ή γκανσικλοβίρης βοηθά στον περιορισμό των λοιμώξεων από CMV και άλλων έρπητοιών όπως ο ιός του απλού έρπητα (HSV) και του ιού της ανεμευλογιάς-έρπητα ζωστήρα (VZV). Η ενδιάμεση φάση χαρακτηρίζεται επίσης από λοιμώξεις από πρωτόζωα όπως πνευμονία από *Pneumocystis jirovecii*. Ως εκ τούτου οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ΜΑΑΚ λαμβάνουν τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, δαψόνη ή πενταμιδίνη ως προφύλαξη.

Τέλος η καθυστερημένη φάση (6-12 μήνες μετά τη μεταμόσχευση) χαρακτηρίζεται από λοιμώξεις οφειλόμενες σε βακτήρια που φέρουν κάψα όπως ο πνευμονιόκοκκος λόγω της δυσλειτουργίας του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Επίσης είναι αρκετά συχνή και η επανενεργοποίηση του VZV με τη μορφή έρπητα ζωστήρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς που βρίσκονται σε παρατεταμένη ανοσοκατασταλτική θεραπεία λόγω χρόνιου GVHD αυξάνουν και επιμηκύνουν τον κίνδυνο αυτών των λοιμώξεων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διαφορετικές φάσεις της μεταμόσχευσης και οι μικροοργανισμοί και οι λοιμώξεις που παρατηρούνται. (Maschmeyer G, et al 2011) Πίνακας 4

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Φάση	Χρονική περίοδος	Παράγοντες κινδύνου	Λοιμώξεις
1 ^η φάση (απλαστική)	Σχήμα προετοιμασίας- Εγκατάσταση μοσχεύματος (<30 ημέρες)	Ουδετεροπενία Βλεννογονική βλάβη Κεντρικός καθετήρας	Gram-(ψευδομονάδα,εντεροβακτηριακά), Gram+(σταφυλόκοκκοι,στρεπτόκοκκοι)-βακτηραιμία, σήψη-σηπτικό shock, πνευμονία, τυφλίτιδα Cl.difficile- ψευδομεμβρανώδης κολίτις Πνευμονική ασπεργίλλωση, καντινταμία, HSV τύπου I στόματος Αναπνευστικοί ιοί (RSV, Influenza A,B Parainfluenza)
2 ^η φάση	Μετά την εγκατάσταση του Μοσχεύματος (30-100 ημέρες)	Ανεπάρκεια κυτταρικής ανοσίας Οξεία GvHD	CMV-επανενεργοποίηση,πνευμονία, εντερίτιδα Πνευμονική ασπεργίλλωση Pneumocystis jiroveci Καντιντα- ΓΕΣ, ήπαρ, σπληνας Αναπνευστικοί οί (RSV,Influenza A,B Parainfluenza) Αδενοιοί, εντεροιοί Strongyloides EBV-PTLD Toxoplasma gondii
3 ^η φάση	>100 ημέρες	Χρόνια GvHD Ανεπάρκεια κυτταρικής ανοσίας Υπογαμμασφαιριναιμία	CMV-επανενεργοποίηση,πνευμονία VZV-δερματικός και σπλαγχνικός έρπητας ζωστήρας ανεμευλογιά Μικρόβια με πολυσακχαριδική κάψα (πνευμονιόκοκκος, άλλοι στρεπτόκοκκοι, αιμόφιλος)- Παραρρινοκολπιτιδα, σηψαιμία, πνευμονία Pneumocystis jiroveci Πνευμονική ασπεργίλλωση (σε χρόνια GvHD και συνεχιζόμενη ανοσοκαταστολή) EBV-PTLD Toxoplasma gondii

PTLD : Post transplant lymphoproliferative syndrome (λεμφουπερπλαστικό σύνδρομο μετά από τη μεταμόσχευση)

Αλλαγές στα πρωτόκολλα της μεταμόσχευσης καθώς και η εφαρμογή πιο αποτελεσματικών στρατηγικών όσον αφορά την υποστηρικτική φροντίδα των ασθενών, μείωσαν την επίπτωση των λοιμώξεων σαν επιπλοκή στα πρώιμα στάδια μετά τη ΜΑΑΚ. Ωστόσο, η περίοδος κινδύνου επιμηκύνθηκε και μετατέθηκε σε μεταγενέστερο χρόνο. Για το λόγο αυτό το είδος των λοιμώξεων που προκαλούν σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα καθώς και ο

χρόνος εμφάνισης τους έχει αλλάξει. Πράγματι, η εισαγωγή προφυλακτικής φαρμακευτικής αγωγής όπως και μοριακών τεχνικών για την έγκαιρη διάγνωση και αποτροπή των λοιμώξεων τόσο πριν όσο και μετά τη μεταμόσχευση έχουν βελτιώσει πολύ την επιβίωση.(Marr K., 2012) Έτσι, σε μια μεγάλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Σιάτλ (Fred Hutchinson Cancer Research Center) έγινε σύγκριση σε περισσότερους από 2500 ασθενείς που έλαβαν άλλογενή MAAK σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους (1993-1997 και 2003-2007) και φάνηκε χαμηλότερος κίνδυνος θανάτου σχετιζόμενος με λοίμωξη τα τελευταία χρόνια.(Gooley T.et al, 2010) Παρόμοια παρατήρηση προκύπτει από μια προοπτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα κύρια παιδιατρικά μεταμοσχευτικά κέντρα της Ισπανίας (GETMON:Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in children) στην οποία μελετήθηκαν 215 παιδιά που υποβλήθηκαν σε MAAK κατά την χρονική περίοδο Ιανουαρίου 2004 με Δεκέμβριο 2006 και από την οποία συμπεραίνεται ότι υπάρχει υψηλό ποσοστό ιογενών λοιμώξεων κατά τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση ωστόσο η θνητότητα είναι χαμηλή.(Verdeguer A et al, 2011)

Παρόλο λοιπόν που οι στρατηγικές αυτές κατάφεραν να μειώσουν τις πρώιμες λοιμώξεις φαίνεται ότι τελικά ευνοούν την όψιμη ανάπτυξη αυτών. Η τοξικότητα των φαρμάκων, οι περιορισμοί της χρήσης των μοριακών τεχνικών ως εξετάσεις διαλογής, οι αλλαγές στα σχήματα προετοιμασίας (conditioning) μεταβάλλουν την επιδημιολογία των λοιμώξεων, με αυτές να συμβαίνουν μετά την εγκατάσταση του μοσχεύματος. Επιπλέον η χρήση εναλλακτικών μοσχευμάτων όπως το κινητοποιημένο περιφερικό αίμα φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένη επίπτωση καθυστερημένων λοιμώξεων κυρίως ιογενών και μυκητιασικών. Οι γνώσεις μας προέρχονται από μελέτες που αφορούν κυρίως ενήλικες και συνήθως είναι αναδρομικές μελέτες κοορτής μεμονωμένων κέντρων ή εκτιμήσεις τυχαιοποιημένων δοκιμών. (Marr K., 2012) Ωστόσο, οι αλλαγές αυτές φαίνεται να ισχύουν και στα παιδιά όπως προκύπτει από μια μεγάλη αναδρομική μελέτη στο Μέμφις (St.Jude Children's Research Hospital) όπου έγινε προσπάθεια να διαμορφωθεί ένα χρονοδιάγραμμα εμφάνισης των λοιμώξεων σε νεαρούς ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε MAAK. Μελετήθηκαν 759 ασθενείς σε μια χρονική περίοδο 20 χρόνων (Ιανουάριος 1990 με Δεκέμβριο 2009). Συμπεραίνεται ότι υπάρχει μια συνέχεια στη

χρονολογική σειρά εμφάνισης των λοιμώξεων μετά τη μεταμόσχευση, με τις μικροβιακές, τις ιογενείς και τις μυκητιασικές να είναι παρούσες σε κάθε χρονική περίοδο, κυρίως όμως σε όψιμα στάδια. Το είδος του μοσχεύματος, GVHD, το CMV status δότη/λήπτη, η μεγαλύτερη ηλικία και χρήση μη πλήρως ταυτόσημου δότη περιγράφηκαν ως ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την παραδοσιακή γνώση της αυξημένης πιθανότητας βακτηριαιμίας και καντιναιμίας στην προ εγκατάστασης του μοσχεύματος φάση, η οποία ακολουθείται από ασπεργίλλωση, λοιμώξεις από CMV και αναπνευστικούς ιούς στη μετά την εγκατάσταση του μοσχεύματος φάση και μειωμένη ευπάθεια στις λοιμώξεις στα μεταγενέστερα στάδια.(Srinivasan A. et al, 2013)

Αν και οι λοιμώξεις επιπλοκές μπορούν να εμφανιστούν και καθυστερημένα μετά τη μεταμόσχευση και δέχονται την επίδραση πολλών παραγόντων ωστόσο υπάρχουν στρατηγικές επιτήρησης και προφυλακτικά σχήματα που μειώνουν τον κλινικό κίνδυνο. Οι πιο συχνές λοιμώξεις και οι μέθοδοι πρόληψής τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Πίνακας 5

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

ΛΟΙΜΩΞΗ	ΠΡΟΛΗΨΗ
VZV,HSV	Προφύλαξη, εμβολιασμός
CMV	Προφύλαξη, προληπτικός κλινικοεργαστηριακός έλεγχος
Adenovirus	Προληπτικός κλινικοεργαστηριακός έλεγχος
Influenza	Προφύλαξη, εμβολιασμός
St. pneumonia	Προφύλαξη, εμβολιασμός
TB	Προμεταμοσχευτικός έλεγχος και θεραπεία
Aspergillois	Προφύλαξη, προληπτικός κλινικοεργαστηριακός έλεγχος
P. jiroveci	Προφύλαξη
Toxoplasmosis	Προφύλαξη
Nocardia	Προφύλαξη

1.7. CMV Λοίμωξη

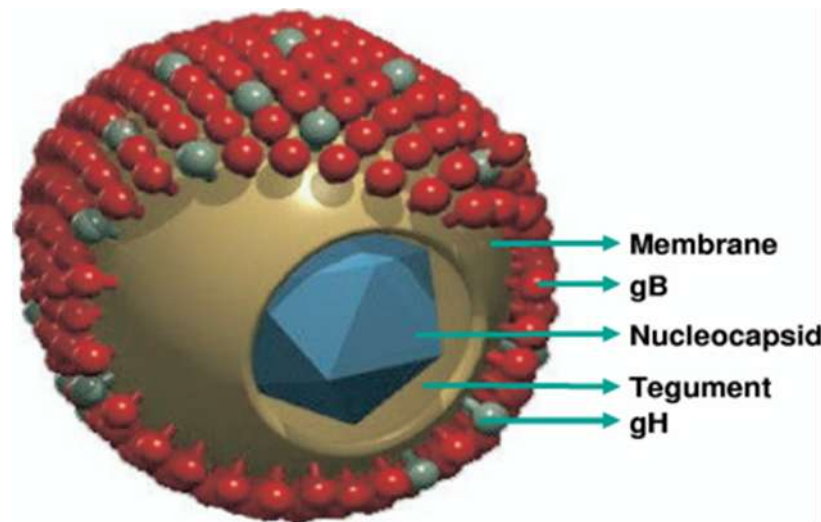
Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) έχει αναγνωρισθεί ως ένα από τα σημαντικότερα ιογενή παθογόνα στον άνθρωπο εδώ και περισσότερο από ένα αιώνα. Η ιστοπαθολογία του περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1904 αλλά ο ίδιος ο ιός απομονώθηκε το 1957 από τον Craig και συνεργάτες. Ο CMV μολύνει πολλά ανθρώπινα κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των επιθηλιακών κυττάρων των σιελογόνων αδένων εξ 'ου και η αρχική του ονομασία : ιός των σιελογόνων αδένων. Το 1960 ο Weller προσδιόρισε τον ιό ως κυτταρομεγαλοϊό βασισμένος στη διόγκωση που παρουσίαζαν τα προσβεβλημένα κύτταρα (κυτταρομεγαλία). (Plosa E. et al, 2012)

Ο CMV προκαλεί την πιο συχνή ιογενή περιγεννητική λοίμωξη στις αναπτυσσόμενες χώρες, προσβάλλοντας σχεδόν το 1% των νεογέννητων δηλαδή περίπου 40000 νεογνά το χρόνο στις ΗΠΑ. Η λοίμωξη από CMV αποτελεί επίσης την πιο συχνή αιτία μη κληρονομικής νευροαισθητήριας κώφωσης στα παιδιά (American Academy of Pediatrics, Joint Committee of Infant Hearing 2007). Επιπλέον της περιγεννητικής και της συγγενούς λοίμωξης, ο CMV είναι αίτιο σημαντικής νοσηρότητας σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς όπως είναι οι ασθενείς με HIV λοίμωξη και οι μεταμοσχευμένοι, προκαλώντας χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, πνευμονία, εντεροκολίτιδα, ηπατίτιδα και νευροπάθεια. (Steininger C et al, 2006)

Ο CMV αποτελεί μέλος της οικογένειας των ανθρώπινων ερπητοϊών με επίσημη ονομασία ανθρώπινος ερπητοϊός 5 (Human Herpes Virus 5-HHV5). Είναι ο μεγαλύτερος από όλους τους ερπητοϊούς με γονιδίωμα μεγέθους ~ 235 kb που κωδικοποιεί περίπου 165 γονίδια. (Davison A.J. et al, 2003) Ο ιός αποτελείται από ένα γραμμικό διπλής έλικας μόριο DNA μέσα σε ένα εικοσάεδρο νουκλεοκαψίδιο που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό στρώμα (υμένας). Τα στοιχεία αυτά εσωκλείονται σε μια διπλή στοιβάδα λιπιδίων η οποία περιλαμβάνει έναν αριθμό ιικών γλυκοπρωτεϊνών. Ο ώριμος ιός κυμαίνεται σε διάμετρο μεταξύ 200-300 νανόμετρα. (Mocarski E.S Jr et al, 2007, Crough T et al 2009) Η περιοχή του υμένα περιέχει το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών του ιού με μεγαλύτερη την φωσφοπρωτεΐνη του στρώματος 65 (pp65) που ονομάζεται unique long 83 (UL83). Η λειτουργία των πρωτεϊνών

αυτών διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτές που έχουν δομικό ρόλο και είναι σημαντικές στην αποδόμηση και ανασύσταση του μορίου κατά την είσοδο του στο κύτταρο και β) σε αυτές που τροποποιούν την απάντηση του κυττάρου-ξενιστή στην λοίμωξη. Τέλος η λιπιδική στοιβάδα που περιβάλλει τον υμένα περιλαμβάνει ~ 20 γλυκοπρωτείνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και διείσδυση του ιού στο κύτταρο. Αυτές περιλαμβάνουν τη γλυκοπρωτείνη B (gB), gH, gM, gN, gL και gO. (Mocarski E.S Jr et al, 2007, Varnum S.M. et al, 2004) Σχήμα 2.

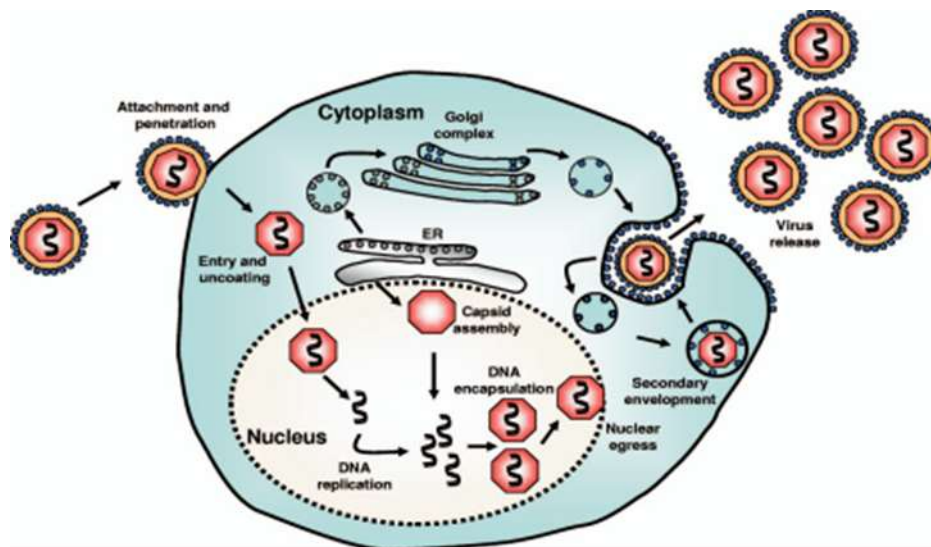
Σχήμα 2



Σχήμα 2:Τριδιάστατο μοντέλο του HCMV.Crough and Khana: Clin. Microbiol. Rev. 2009

Ο CMV πολλαπλασιάζεται *in vivo* και *in vitro* σε πολλά διαφορετικά κύτταρα-ξενιστές όπως επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του συνδετικού ιστού, ηπατοκύτταρα, διάφορους πληθυσμούς λευκοκυττάρων και αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. (Sinzger et al, 2008) Η λοίμωξη του υγιούς κυττάρου ξεκινά με την προσκόλληση στο κυτταρικό τοίχωμα και την διείσδυση στο εσωτερικό του και συνεχίζει με μια διαδοχική σύνθεση πρωτεϊνών σε 3 αλληλοκαλυπτόμενες φάσεις. (Crough T et al, 2009) Σχήμα 3

Σχήμα 3



Σχήμα 3: Ο κύκλος της ζωής του CMV στο ανθρώπινο κύτταρο. Crough and Khanna: Clin. Microbiol. Rev. 2009

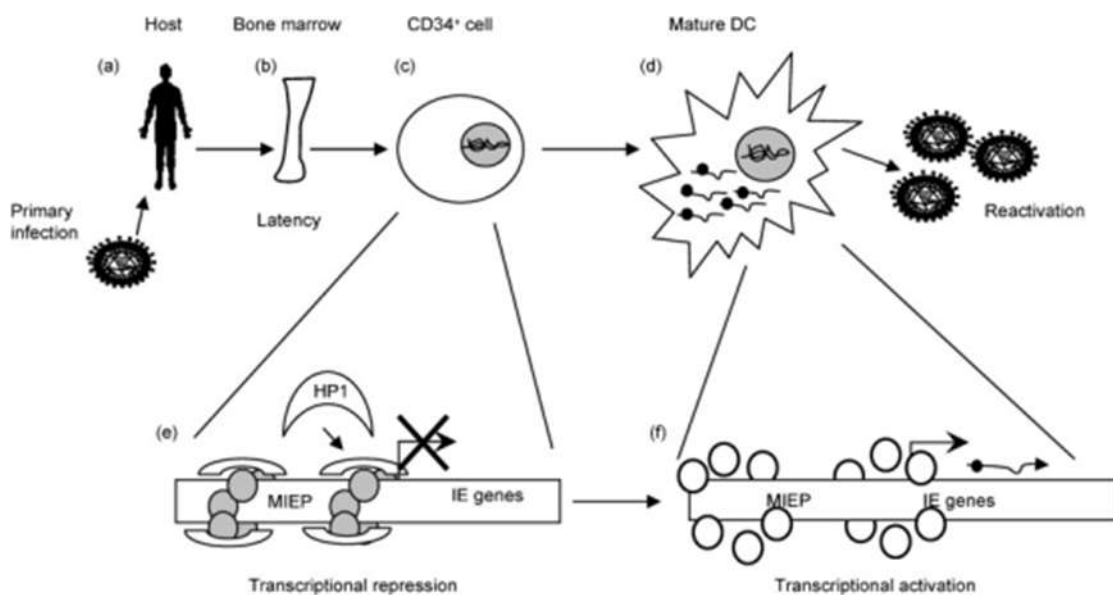
Όπως φαίνεται στο σχήμα 3 ο CMV προσκολλάται στο κύτταρο μέσω της σύνδεσης των ιικών γλυκοπρωτεϊνών σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας ακολουθεί ένωση του ιικού περιβλήματος με την κυτταρική μεμβράνη και απελευθέρωση των νουκλεοκαψιδίων στο κυτταρόπλασμα. Τα νουκλεοκαψίδια αυτά μεταφέρονται στον πυρήνα όπου και απελευθερώνεται το DNA του ιού που αποτελεί το έναυσμα για την έκφραση των γονιδίων IE1/IE2 (Immediate-early 1 / Immediate-early 2). Η αντιγραφή του ιού ακολουθείται από την παράλληλη αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η διαδικασία αυτή αφορά την εγκύστωση των αντιγράφων του DNA του ιού και τη μετατροπή τους σε καψίδια τα οποία εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί στο ενδοθηλιακό σύστημα και το σύμπλεγμα Golgi υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία με την προσθήκη των επιπλέον περιβλημάτων του για να πάρει την τελική του μορφή και να εξέλθει στο πλάσμα. (Crough T. et al, 2009) Όσον αφορά τις γλυκοπρωτεΐνες, τα σύμπλεγματα gH/gL είναι αυτά που κυρίως ευνοούν την σύνδεση με τους υποδοχείς του κυττάρου και την είσοδο του ιού και είναι δύο ειδών: το σύμπλεγμα gH/gL/gO και το σύμπλεγμα gH/gL/pUL(128,130,131A). (Wang D. et al, 2005) Η παρουσία των δύο εναλλακτικών gH/gL συμπλεγμάτων καθορίζει και τον τροπισμό του ιού προς συγκεκριμένα κύτταρα. Έτσι

όπως έχει φανεί από μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες στα στελέχη που φέρουν το σύμπλεγμα gH/gL/gO ο τροπισμός τους περιορίζεται σε κύτταρα όπως τα νευρωνικά και οι ινοβλάστες ενώ αυτά που φέρουν το σύμπλεγμα gH/gL/pUL(128,130,131A) δεν έχουν την ίδια επιλεκτικότητα και μολύνουν λευκοκύτταρα, δένδριτικά, επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και ινοβλάστες. (Ryckman B J et al, 2008) Στελέχη του CMV που έχουν απομονωθεί από ασθενείς έχει βρεθεί πως μπορούν να σχηματίζουν και τα δύο συμπλέγματα. (Baldanti F. et al, 2006) Τελευταία έχει παρατηρηθεί ότι οι απόγονοι του CMV προερχόμενοι από μόλυνση είτε ενδοθηλιακών κυττάρων είτε ινοβλαστών παρουσιάζουν διαφοροποίηση τόσο στον τροπισμό τους όσο και στον τρόπο διασποράς τους ανάλογα την προέλευση του κυττάρου ξενιστή. Η παρατήρηση αφορά κυτταροκαλλιέργειες οι οποίες μολύνθηκαν από στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς. Πιθανώς η σχετική τάση των διαφορετικών τύπων κυττάρων να απελευθερώνουν ετερογενείς πληθυσμούς του ιού να παίζει κρίσιμο ρόλο στην εδραίωση της λοίμωξης καθώς και της μεταφοράς του CMV σε νέους ξενιστές ή στο έμβρυο. (Scrivano L. et al, 2011)

Ο ιός έχει απομονωθεί από το σάλιο, τα ούρα, το σπέρμα, το μητρικό γάλα, τα κόπρανα, το αίμα και από τις κολπικές και τραχηλικές εκκρίσεις των μολυσμένων ατόμων ενώ μπορεί να μεταδοθεί από μετάγγιση μολυσμένου αίματος και με τη μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. (American Academy of Pediatrics – Red Book 2009) Η πρωτοπαθής λοίμωξη από CMV σε ένα ανοσοεπαρκές άτομο είναι συνήθως ασυμπτωματική ενώ μετά τον έλεγχο της από το ανοσοποιητικό σύστημα ο ιός παραμένει ισοβίως σε λανθάνουσα κατάσταση στον ξενιστή του και επανενεργοποιείται περιοδικά. Αυτό σημαίνει ότι τα μολυσμένα κύτταρα διατηρούν το πλήρες γονιδίωμα του ιού και έχουν την δυνατότητα να ξεκινήσουν εκ νέου την παραγωγή σε μεταγενέστερη φάση. (Reeves M. et al, 2008) Ωστόσο είναι πιθανό ότι αυτή η κλινική αδράνεια είναι μία κατάσταση στην οποία ο ιός πολλαπλασιάζεται σε πολύ χαμηλή κλίμακα που είναι κάτω από το όριο των σύγχρονων μεθόδων ανίχνευσης του ιού. (Boeckh M. et al, 2011) Το φαινόμενο αυτό αποκτά ιδιαίτερη κλινική σημασία για τους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και τους μεταμοσχευμένους καθώς κινδυνεύουν από σοβαρή νόσο. Το είδος των κυττάρων στα οποία ο ιός διανύει την λανθάνουσα περίοδο δεν

έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια ωστόσο φαίνεται να είναι τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (μονοκύτταρα και CD34+ κύτταρα). (Sinclair J. et al, 2006) Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στους προγόνους της μυελοειδούς σειράς των δενδριτικών κυττάρων το γονιδίωμα του ιού παραμένει σε αδρανή μορφή in vivo λόγω της απουσίας έκφρασης των ιικών λυτικών γονιδίων. Αντιθέτως η διαφοροποίηση των άωρων μορφών σε ώριμα κύτταρα προκαλεί ενεργοποίηση του λοιμώδους ιού ως αποτέλεσμα της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης του ιικού MIEP (major immediate-early promoter). (Sinclair J., 2008) Αυτό φαίνεται καλύτερα στο σχήμα 4 που ακολουθεί.

Σχήμα 4



Σχήμα 4: Ρύθμιση της αδράνειας του CMV με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης του MIEP.(Reeves et al 2005).

Στα αδιαφοροποίητα μυελοειδή κύτταρα γίνεται καταστολή του λυτικού μεταγραφικού προγράμματος του CMV καθώς δεν υποστηρίζεται η έκφραση των IE (immediate early) γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον λυτικό κύκλο του ιού. Η καταστολή αυτή είναι, εν μέρει, αποτέλεσμα της ειδικής τροποποίησης των ιστονών που σχετίζονται με τον ιικό MIEP και της απόδοσης μιας χρωματίνης που αποθαρρύνει την μεταγραφική δραστηριότητα. Ωστόσο η επανενεργοποίηση του CMV συνδέεται με αλλαγές στις τροποποιήσεις των ιστονών που περιβάλλουν τον MIEP και την απόδοση μιας χρωματίνης που επιτρέπει τη μεταγραφή. Ο ανασχηματισμός της χρωματίνης γίνεται ταυτόχρονα με την διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων σε ώριμες μορφές φαινόμενο γνωστό ότι προωθεί την επανενεργοποίηση του ιού in vivo. (Sinclair J., 2010)

Η επανενεργοποίηση του CMV αποτελεί σημείο κλειδί στην παθογένεια της CMV λοίμωξης. Παρατηρείται ως απάντηση σε ανοσοκαταστολή, φλεγμονή, λοίμωξη ή stress. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η επανενεργοποίηση δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, ωστόσο ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF-α) φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. (Prosch S. et al, 1995) Άλλοι παράγοντες που μπορεί να συμμετέχουν είναι οι κατεχολαμίνες του stress, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη καθώς και προφλεγμονώδεις προσταγλανδίνες μέσω της οδού του κυκλικού AMP. (Prosch S. et al, 2000)

Ο CMV είναι ευρέως διαδεδομένος στον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως. Ο επιπολασμός του CMV στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας κυμαίνεται από 45% στις ανεπτυγμένες χώρες έως 100% στις αναπτυσσόμενες. Στις ΗΠΑ ο ολικός επιπολασμός είναι ~ 50% άρα περίπου οι μισές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας βρίσκονται σε κίνδυνο πρωτοπαθούς λοίμωξης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο ιός μεταδίδεται με ευκολία στους χώρους φροντίδας παιδιών (βρεφικοί σταθμοί) κυρίως μέσω του σάλιου. Τα νήπια που μολύνονται από τον CMV μετά τη γέννηση, αποβάλλουν τον ιό με τα ούρα τους για περίπου 18 μήνες (διάρκεια 6-40 μήνες). Αντιθέτως, υγιείς ενήλικες που προσβάλλονται από CMV δεν αποβάλλουν τον ιό για περισσότερο από μερικές εβδομάδες. Το υψηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο σχετίζεται με χαμηλότερο επιπολασμό για τον CMV.

Η επαφή με παιδιά προσχολικής ηλικίας αποτελεί παράγοντα κινδύνου για CMV λοίμωξη. Αυτό γίνεται εμφανές στα ποσοστά λοίμωξης των οροαρνητικών γυναικών που εργάζονται σε παιδικούς σταθμούς τα οποία κυμαίνονται μεταξύ 10-20%, ενώ στο γενικό πληθυσμό είναι 2%. Αντίθετα δεν έχει καταγραφεί αντίστοιχα αυξημένος κίνδυνος στους εργαζόμενους στον τομέα της υγείας. (Plosa E. et al, 2009)

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτοπαθής λοίμωξη από CMV σε έναν ανοσοεπαρκή ξενιστή είναι ασυμπτωματική και σπάνια προκαλεί νόσο. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει ένα σύνδρομο λοιμώδους μονοπυρήνωσης το οποίο κλινικά δύσκολα διακρίνεται από λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr (EBV) και περιλαμβάνει πυρετό, μυαλγία, λεμφαδενοπάθεια και ηπατομεγαλία. (Gandhi M.K. et al, 2004)

Η λοίμωξη γίνεται συμπτωματική πρωτίστως όταν συμβαίνει συγγενώς, περιγεννητικά σε πρόωρα νεογνά (όχι σε τελειόμηνα) και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, όπως HIV θετικοί ασθενείς ή λήπτες μεταμόσχευσης που βρίσκονται σε ανοσοκατασταλτική αγωγή. Στον παρακάτω πίνακα 6 φαίνεται η επίδραση της CMV λοίμωξης σε διάφορους τύπους ανοσοκατασταλμένων ασθενών. (Ross S.A. et al, 2005 , Hebart H. Et al, 2004, Humar A. et al, 2006, Steininger C. et al, 2006)

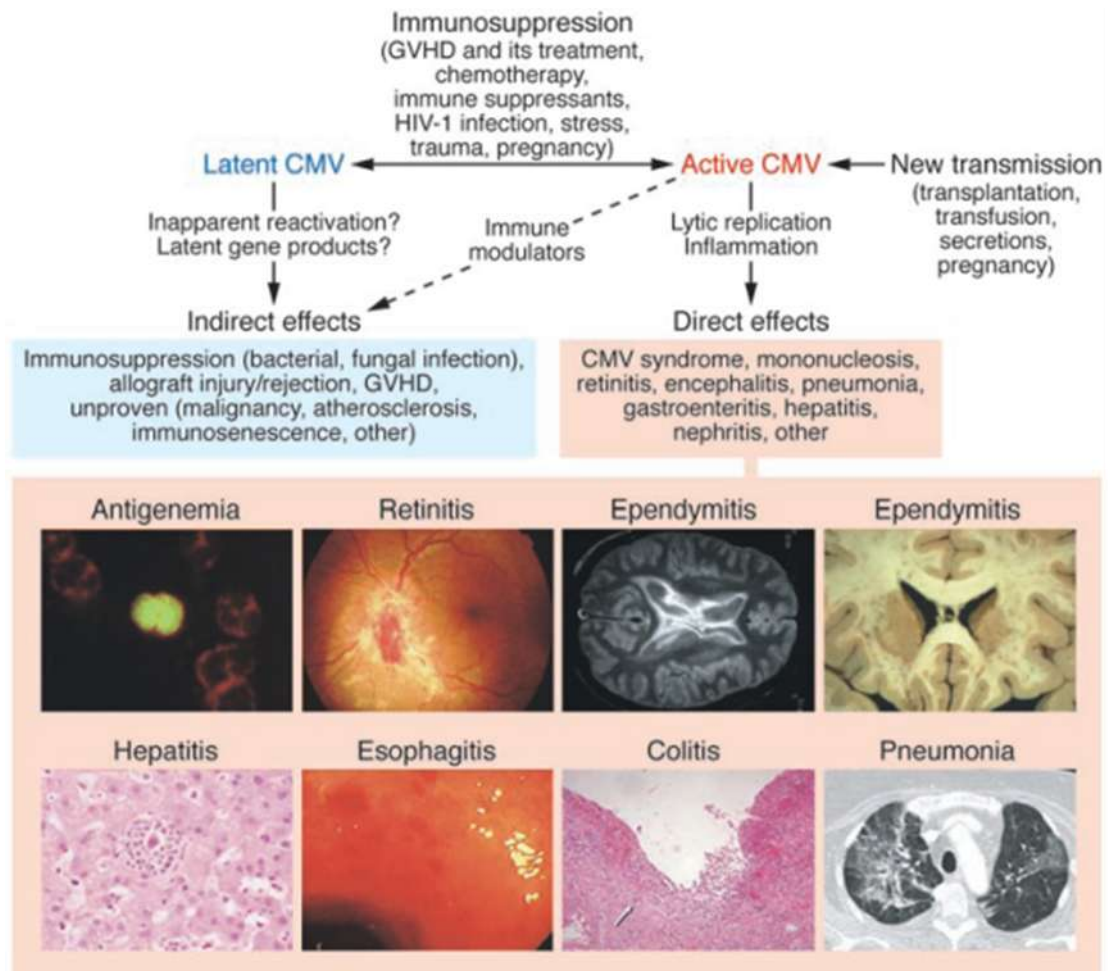
ΠΙΝΑΚΑΣ 6

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ
Έμβρυο	Πρωτοπαθής λοίμωξη της μητέρας στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης	Ίκτερος, πετέχειες, μικροκεφαλία Ηπατομεγαλία, υποτονία, σπασμοί
Λήπτης μεταμόσχευσης οργάνου	Οροθετικός δότης, οροαρνητικός δέκτης	Εμπύρετη λευκοπενία, πνευμονία, εντερίτιδα
Λήπτης μεταμόσχευσης μυελού των οστών	GVHD, μεγάλη ηλικία, οροθετικός λήπτης, αιμία	πνευμονία, εντερίτιδα, οισοφαγίτιδα, γαστρίτιδα
Ασθενής με AIDS	<100 CD4 ⁺ cells/μl, CMV οροθετικότητα	Χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, εντερίτιδα, νευρολογική νόσος

Πίνακας 6:Κλινικές εκδηλώσεις CMV λοίμωξης σε διαφορετικές κατηγορίες ασθενών

Είναι αξιοπρόσεκτο το γεγονός ότι στα εκατομμύρια χρόνια της εξέλιξης ο κυτταρομεγαλιός έχει καταφέρει να δημιουργήσει μια κατά κάποιο τρόπο «καλοήθη» σχέση με τον ξενιστή του. Η σχέση αυτή όμως βρίσκεται σε μια εύθραυστη ισορροπία με το ανοσοποιητικό του σύστημα και οποιοσδήποτε διακυμάνσεις μπορούν να οδηγήσουν σε επανενεργοποίηση και νόσο. Αν και ασυμπτωματικός ο ιός μπορεί να έχει έμμεσες επιδράσεις, πιθανόν τροποποιώντας τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είτε με επεισόδια υποκλινικών επανενεργοποιήσεων είτε με έκφραση διαφόρων γονιδίων κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας περιόδου. Από την άλλη η ανοσολογική δυσλειτουργία η οποία μπορεί να οφείλεται σε φυσικά αίτια ή να γίνεται ιατρογενώς καθώς και μια καινούργια μετάδοση του ιού οδηγούν σε ενεργό πολλαπλασιασμό του. Ο ενεργός πολλαπλασιασμός μπορεί να έχει έμμεση δράση που ανάλογα με το κλινικό υπόβαθρο να προκαλέσει βλάβη των ιστών, φλεγμονώδη αντίδραση και δυσλειτουργία πολλών οργάνων. Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 5) περιγράφονται συνοπτικά οι μηχανισμοί της CMV νόσου.(Boeckh M et al, 2011 , Limaye A P et al, 2010)

Σχήμα 5



Σχήμα 5: Μηχανισμοί CMV νόσου και άμεσες και έμμεσες επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. (Limaye A 2010)

1.8. Ορισμοί

Αναγνωρίζοντας τον ολοένα και σημαντικότερο ρόλο του CMV στην νοσηρότητα και επιβίωση των μεταμοσχευμένων ασθενών έχει γίνει τις τελευταίες δεκαετίες μεγάλη πρόοδος όσον αφορά τη διαχείριση της λοίμωξης και της νόσου. Η πρόοδος έγινε εφικτή τόσο με την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών τεχνικών όσο και με την προώθηση κλινικών δοκιμών σε νέα αντιικά φάρμακα. Για τη διευκόλυνση αυτών των ερευνητικών διεργασιών αναπτύχθηκαν ορισμοί οι οποίοι παρουσιάστηκαν το 1993 στην 4^η Διεθνή Σύνοδο για τον CMV στο Παρίσι και οι οποίοι ενημερώθηκαν το 1995 στην 5^η Διεθνή Σύνοδο για τον CMV στη Στοκχόλμη και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα σε πολλές μελέτες. (Ljungman P et al, 2002)

CMV Λοίμωξη: Ως CMV λοίμωξη ορίζεται η απομόνωση του ιού ή η ανίχνευση ιικών πρωτεϊνών, ή νουκλεϊνικού οξέος σε οποιοδήποτε σωματικό υγρό ή δείγμα ιστού.

Ιαίμια: Ως ιαίμια ορίζεται η απομόνωση του CMV με καλλιέργεια.

Αντιγοναιμία: Ως αντιγοναιμία ορίζεται η ανίχνευση CMV pp65 σε λευκοκύτταρα

DNAιμία: Ως DNAιμία ορίζεται η ανίχνευση DNA σε δείγματα πλάσματος, ολικού αίματος, μεμονωμένων λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος ή σε ηπαρινισμένα δείγματα κυρίως με τη μέθοδο PCR.

Πρωτοπαθής CMV λοίμωξη: Ορίζεται η ανίχνευση CMV λοίμωξης σε ένα άτομο το οποίο έχει προηγούμενα αναφερθεί ως οροαρνητικό για CMV. Η δευτερογενής εμφάνιση ειδικών αντισωμάτων μπορεί να γίνει δεκτή για τη διάγνωση σε έναν οροαρνητικό ασθενή με την προϋπόθεση ότι έχει αποκλειστεί η παθητική μεταφορά αντισωμάτων μέσω ανοσοσφαιρίνης ή προϊόντων αίματος.

Υποτροπιάζουσα λοίμωξη: Ορίζεται η εκ νέου ανίχνευση CMV λοίμωξης σε έναν ασθενή στον οποίο έχει προηγούμενα αναφερθεί λοίμωξη και στον δεν έχει ανιχνευθεί ο ιός για ένα διάστημα τουλάχιστον 4 εβδομάδων συστηματικά.

τικής επιτήρησης. Η υποτροπιάζουσες λοιμώξεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε επανενεργοποίησης του ιού που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση (ενδογενής) είτε σε επαναλοίμωξη (εξωγενής).

CMV νόσος τελικού οργάνου: Σε αυτή περιλαμβάνεται η CMV πνευμονία, γαστρεντερική νόσος, ηπατίτιδα, νόσος του ΚΝΣ, αμφιβληστροειδίτιδα, νεφρίτιδα, κυστίτιδα, μυοκαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα. Ορίζεται ως η παρουσία συμπτωμάτων ή/και σημείων νόσου από το εκάστοτε όργανο με τη σύγχρονη απομόνωση του ιού σε υλικό βιοψίας. Η ανίχνευση του CMV μόνο με PCR είναι ανεπαρκής καθώς μπορεί να αφορά παροδική αιμία.

CMV σύνδρομο: Ορίζεται ως η παρουσία πυρετού, κακουχίας, λευκοπενίας και θρομβοπενίας με ταυτόχρονη ανίχνευση του CMV στο αίμα.

Ανεπάρκεια μοσχεύματος: Ως ανεπάρκεια μοσχεύματος σχετιζόμενη με τον CMV χαρακτηρίζεται η σοβαρή πανκυτταροπενία, η υποπλασία του μυελού των οστών, η ανίχνευση του CMV με καλλιέργεια του μυελού των οστών σε συνδυασμό με τον αποκλεισμό της απόρριψης του μοσχεύματος, της υποτροπής της αρχικής νόσου και άλλων ιογενών λοιμώξεων (HHV-6, EBV, Parvovirus).

Τέλος, ο κυτταρομεγαλοϊός έχει συσχετιστεί στατιστικά με καταστάσεις όπως η οξεία απόρριψη του μοσχεύματος, επιδεινούμενη αθηροσκλήρυνση καθώς και από επιμόλυνση από βακτήρια ή μύκητες γνωστές ως έμμεσες δράσεις του CMV.

1.9. Η ανοσιακή απάντηση στον κυτταρομεγαλοϊό.

Η πιο εντυπωσιακή όψη της ανοσοβιολογίας του κυτταρομεγαλοϊού είναι το μέγεθος της απάντησης που αναπτύσσεται από τον ξενιστή του. Ωστόσο παρόλη την επίθεση που δέχεται από τον ξενιστή, ο ιός καταφέρνει να προσαρμοστεί με επιτυχία στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς πολυάριθμα ιικά γονίδια αλληλεπιδρούν με τη φυσική και την ειδική ανοσία. Αποτέλεσμα, ο CMV να μην εξαλείφεται ποτέ από το προσβεβλημένο άτομο. (Sylwester A W et al, 2005, Miller-Kittrell M. et al, 2009)

1.9.1 Μη ειδική ανοσία

Στα υγιή άτομα η πρωτολοίμωξη από τον CMV ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό του ιού στο βλεννογονικό επιθήλιο. Εν συνεχεία ο ιός διασπείρεται στα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, τα μονοκύτταρα και τα CD34+ κύτταρα όπου εισέρχεται σε λανθάνουσα φάση. Στη φάση αυτή η έκφραση των ιικών γονιδίων είναι μικρής κλίμακας για το λόγο αυτό υποθέτουμε ότι η ανοσολογική επιτήρηση είναι περιορισμένη. (Cheung AK et al, 2006) Ακολούθως όταν ο CMV μπαίνει στην παραγωγική φάση της λοίμωξης, ο ξενιστής αναγνωρίζει τον ιό και ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς της μη ειδικής φυσικής ανοσίας. (Isaacson MK et al, 2008) Η μη ειδική ανοσιακή απάντηση αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας και επιτρέπει στον οργανισμό να αναπτύξει γρήγορα αντιικά μέτρα. Ειδικότερα κατά την περιγεννητική περίοδο η μη ειδική ανοσία είναι πρωτίστως υπεύθυνη για την άμυνα έναντι στον CMV λόγω της ανωριμότητας της ειδικής ανοσίας. (Gibson L et al, 2007)

Η ανίχνευση των παθογόνων από τη φυσική ανοσία γίνεται με τη βοήθεια ειδικών ανοσοουποδοχέων που ονομάζονται pattern recognition receptors (PRRs). Οι Toll-like receptors (TLRs) αποτελούν τάξη των PRRs η οποία ανιχνεύει ένα μεγάλο εύρος παθογόνων στους οποίους περιλαμβάνονται βακτήρια και ιοί. (La Rossa et al, 2012) Υπάρχουν αρκετές μελέτες της ομάδας του Compton που υποδεικνύει ότι στα αρχικά στάδια της λοίμωξης ο CMV ανιχνεύεται από τον TLR-2, ο οποίος αναγνωρίζει τις γλυκοπρωτείνες επιφανείας του gB και gH και ενεργοποιεί την αρχική έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών.

(Boehme KW et al, 2006) Επιπλέον, γίνεται στρατολόγηση ειδικευμένων αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων (APCs), φαγοκυττάρων, και NK. (Isaacson MK, et al, 2008) Ειδικότερα τα NK (Natural killer) κύτταρα λειτουργούν ως σημαντικοί φρουροί του ανοσοποιητικού συστήματος και θεωρούνται ως γέφυρα μεταξύ της μη ειδικής και της ειδικής ανοσίας. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να παρέχουν γρήγορη κυτταροτοξική δράση παρόμοια με των μακροφάγων και των κοκκιοκυττάρων και η οποία δράση όπως είναι η παραγωγή IFN- γ ευθυγραμμίζεται με αυτή των T- λεμφοκυττάρων. Ο σημαντικός ρόλος των NK έχει αποδειχτεί σε μοντέλα CMV λοίμωξης σε επίμυες ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τη δράση τους στην άμυνα έναντι του CMV στον άνθρωπο. (Moretta A. et al, 2008, Crough et al, 2009)

Σε μια μελέτη σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού φάνηκε αύξηση της δραστηριότητας των NK τόσο στην πρωτολοίμωξη όσο και σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από CMV γεγονός που υποδεικνύει ότι παίζουν ρόλο στην ανάρρωση από CMV λοίμωξη. (Venema H. et al, 1994) Ενώ σε μελέτη που αφορούσε 43 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυελού των οστών και οι οποίοι παρουσίασαν επανενεργοποίηση CMV με μοιραία κατάληξη για 12 από αυτούς, φάνηκε συσχέτιση της μη ειδικής κυτταροτοξικότητας των NK με την ικανότητα ανάρρωσης από τη λοίμωξη. (Quinnan G.V.Jr et al, 1982)

1.9.2. Ειδική ανοσία

Η εδραίωση μιας ισχυρής και μακροχρόνιας ειδικής ανοσίας στα υγιή άτομα είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να ελεγχθεί μια επικείμενη επανενεργοποίηση του ιού που θα οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και σοβαρή νόσο. Αντίθετα αυτό είναι σύνηθες σε άτομα με ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα ή σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς ή σε άτομα που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία με αποτέλεσμα σοβαρή νοσηρότητα ή/και θνητότητα από CMV. (Limaye A P et al, 2006- Revello M G et al ,2006) Ο CMV είναι ικανό ανοσογόνο το οποίο πυροδοτεί ισχυρή ανοσιακή απάντηση από όλους τους κλάδους του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο ρόλος των αντισωμάτων όσον αφορά την προστασία από τον CMV έχει αμφισβητηθεί, ωστόσο μελέτες υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της χυμικής ανοσίας τόσο στον περιορισμό της διασποράς του ιού όσο και στο να περιορίζεται η σοβαρότητα της νόσου. (Gerna G. et al,2008, Jonjic S. et al, 1994) Κατά την πρωτοπαθή λοίμωξη, παράγονται στον ξενιστή αντισώματα ειδικά για διάφορες πρωτεΐνες του ιού. Τέτοιες είναι δομικές πρωτεΐνες όπως οι pp65 και pp150, γλυκοπρωτεΐνες όπως οι gB , gH και τα gH/gL πολυμερή συμπλέγματα και επίσης μη δομικές πρωτεΐνες όπως η IE1.

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν αρκετές μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους που υπογραμμίζουν τη σημασία των αντισωμάτων στην αντιμετώπιση του CMV. Σε πειράματα με χοιρίδια της Γουινέας , η παθητική ανοσοποίηση τους με αντισώματα έναντι του ιού δεν προλάμβανε την λοίμωξη ωστόσο αύξησε την επιβίωση των κουταβιών. Στους ανθρώπους, η μεταφορά αντισωμάτων από οροθετική μητέρα στο νεογνό φάνηκε να προστατεύει από τη λοίμωξη κατά τη μετάγγιση με προϊόντα αίματος από CMV θετικούς δότες. Επίσης εάν η μητέρα έχει ανοσία στον CMV προ σύλληψης τότε μεταδίδει την λοίμωξη λιγότερο συχνά από τη μητέρα με πρωτοπαθή λοίμωξη.

1.9.3 Κυτταρική ανοσία

Η απάντηση της κυτταρικής ανοσίας στη λοίμωξη από CMV είναι μεγάλη και ευρεία και αποτελεί την πιο εντυπωσιακή πλευρά της συνεχούς διάδρασης μεταξύ του ιού και του ξενιστή. Η συχνότητα των ειδικών CMV T-κυττάρων που παρατηρείται σε υγιή άτομα είναι υψηλότερη από ότι συμβαίνει με άλλους ιούς όπως ο αδενοϊός, ο ιός της γρίπης ή ο ερπητοϊός 1 και είναι παρόμοια με τη συχνότητα των ειδικών HIV T-κυττάρων που παρατηρούνται στην ενεργό HIV λοίμωξη. Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός του φαινομένου ωστόσο φαίνεται να σχετίζεται με τον περιορισμένο αλλά παρατεταμένο ιικό αναδιπλασιασμό κατά τη διάρκεια της πρωτοπαθούς λοίμωξης.

Η παρουσία των T-κυττάρων είναι πολύ σημαντική για τον περιορισμό του αναδιπλασιασμού του ιού όπως και της αποτροπής της νόσου. Ωστόσο δεν έχουν τη δυνατότητα να εξαφανίσουν τον ιο ή να περιορίσουν τη μετάδοση. Το γεγονός αυτό φάνηκε σε μελέτες ασθενών με MAAK όπως αυτές των

Ridell et al, 1992 και Walter et al, 1995 όπου η έγχυση ειδικών για τον CMV CD8+ κυττάρων από δότη συνδυάστηκε με αποτελεσματική ανοσιακή από κατάσταση και προστασία από τις επιπλοκές του CMV.

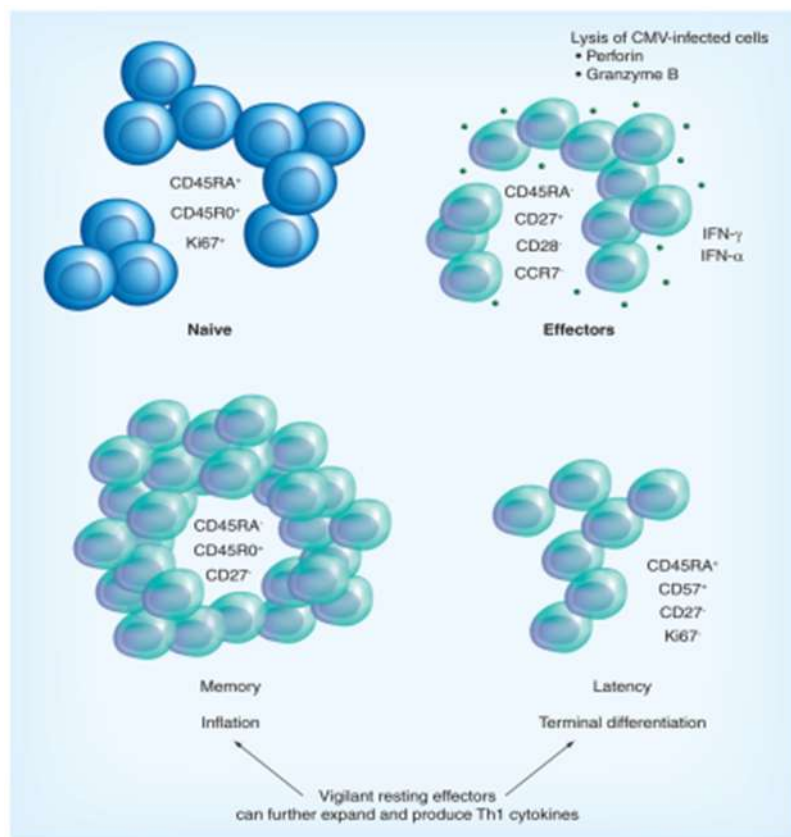
Στα άτομα τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό τα ειδικά T-κύτταρα καταλαμβάνουν περίπου το 10% των CD8+ και CD4+ στον πληθυσμό των κυττάρων μνήμης στο περιφερικό αίμα. Τα ειδικά αυτά για τον CMV κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται σε όλη τη διάρκεια της ζωής και συμβάλλουν στην παρουσία ενός σημαντικού ποσοστού κυττάρων μνήμης σε υγιή οροθετικά άτομα. (Sylwester W, et al 2005)

Τα ειδικά CD8+ T-κύτταρα για τον CMV αναγνωρίζουν μια ποικιλία δομικών, πρώιμων και καθυστερημένων αντιγόνων καθώς και κωδικοποιημένων από τον ιό ανοσοτροποποιητών όπως είναι οι γλυκοπρωτεΐνες pp28, pp50, pp150 gH, gB, unique short 2 (US2), US3, US6, US11, UL16 και UL18. Από μελέτες ερευνητών όπως οι Dunn H.S et al, 2002 αποκαλύφθηκε ότι τόσο τα CD8+ όσο και τα CD4+ κύτταρα κατευθύνονται έναντι κωδικοποιημένων από τον ιό πρωτεϊνών οι οποίες εκφράζονται στα διαφορετικά στάδια του πολλαπλασιασμού του ιού όπως η IE και πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες όπως καψιδιακές, του στρώματος και ότου καθεξής και για τις οποίες φάνηκε ότι υπάρχει συγκεκριμένη ιεραρχία. (Crough T et al, 2009)

Στους υγιείς ανθρώπους ο χρόνος της πρωτοπαθούς λοίμωξης περνά απαρατήρητος και έτσι είναι δύσκολο να προσδιοριστεί χρονικά η ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας. Για το λόγο αυτό η πλειοψηφία των παρατηρήσεων όσον αφορά τη δυναμική της CMV λοίμωξης έχει γίνει σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού οι οποίοι ήταν CMV αρνητικοί και έλαβαν μόσχευμα από CMV θετικούς δότες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των ασθενών οι οποίοι ήταν ικανοί να ελέγξουν την αρχική ιαιμία και στους οποίους ο ιός μπήκε σε λανθάνουσα φάση. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι 7 ημέρες μετά την κορύφωση του αναδιπλασιασμού του CMV ξεκινά η κυκλοφορία ειδικών για τον ιό CD4+ T-κυττάρων τα οποία συνθέτουν Th1 κυτταροκίνες όπως είναι η TNF-α και INF-γ και ακολουθεί η έξοδος στο περιφερικό αίμα των ειδικών για τον CMV CD8+ κυττάρων. Πρόκειται κατά βάση για αρχέγονα ενεργοποιημένα T-κύτταρα όπως αποκαλύπτει η ανίχνευση των ειδικών δεικτών επιφανείας και πυρήνα (CD45RA, CD45RO, Ki67). Στη συνέχεια καθώς αναπτύσσουν εκτελεστική ικανότητα αποκτούν τη δυνατότητα εγκατάστασης στους λεμφα

δένες. Εκεί ωριμάζουν και μπορούν να εκκρίνουν perforin και granzyme B, επομένως μπορούν να προκαλούν λύση των πεπτιδίων του ιού. Μετά την υποχώρηση της CMV λοίμωξης, τα ειδικά για τον ιό CD8+ T- κύτταρα εξελίσσονται σε κύτταρα μνήμης (CD45RA⁻ CD45RO⁺) χωρίς όμως να χάνουν την κυτταρολυτική τους ικανότητα. Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης τα ειδικά CD8+ T- κύτταρα αν και πλήρως διαφοροποιημένα διατηρούν την ικανότητα τους για πολλαπλασιασμό και παραγωγή Th1 κυτταροκινών γεγονός που δε συμβαίνει με άλλες ιογενής λοιμώξεις. Το ειδικό αυτό χαρακτηριστικό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της επανενεργοποίησης του ιού από την λανθάνουσα φάση. (La Rosa C. et al, 2012) Σχήμα 6

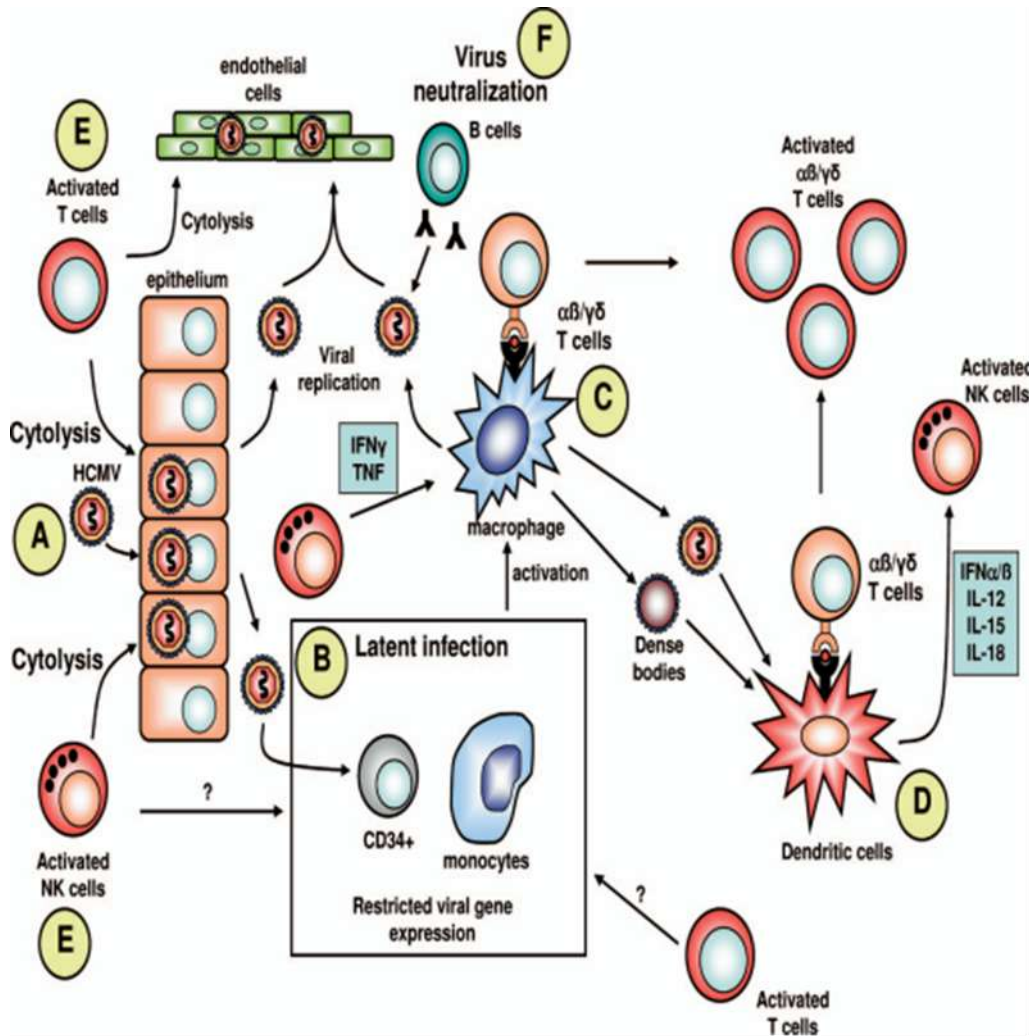
Σχήμα 6



Σχήμα 6: Τα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των ειδικών CD8+ T- κυττάρων κατά τις φάσεις της πρωτολοίμωξης, απόκτησης ανοσιακής μνήμης και της λανθάνουσας φάσης (La Rosa, 2012)

Στο παρακάτω Σχήμα 7 φαίνεται συνοπτικά η κινητοποίηση της ειδικής και της μη ειδικής ανοσίας του ανθρώπινου οργανισμού προκειμένου να αντιμετωπίσει τη CMV λοίμωξη.

Σχήμα 7



Σχήμα 7: Η αντιμετώπιση του CMV από τη φυσική και ειδική ανοσία. (Crough et al 2009).

Όπως προαναφέρθηκε, αντιμετώπος με την ευρεία γραμμή άμυνας ο CMV χρειάστηκε να αναπτύξει μηχανισμούς αντεπίθεσης προκειμένου να επιβιώσει στο εχθρικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού. Έτσι πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται στο μολυσματικό βίριο όπως pp65(UL83), pp71(UL82), pTRS1, pIRS1 ή παράγονται νωρίς μετά τη λοίμωξη όπως UL36, UL37, IE1, IE2 εμποδίζουν την έκφραση της φυσικής ανοσίας όπως είναι η προαγωγή της απόπτωσης, της παραγωγής της ιντερφερόνης και η παύση της πρωτεϊνοσύνθεσης. (McCormick A, 2008 ,Marshall E et al, 2009) Ο CMV

επίσης επεμβαίνει και στην κυτταρική ανοσιακή απάντηση. Τουλάχιστον 7 γονίδια είναι ικανά να τροποποιούν και σε μερικές περιπτώσεις να αναστέλλουν τη λειτουργία των NK κυττάρων όπως το miR-UL112. (Wilkinson GW et al, 2008) Αρκετά γονίδια προερχόμενα από την περιοχή US2-11 του ιού αποτρέπουν την παρουσίαση των πεπτιδίων του CMV στα T-κύτταρα. Επιπλέον ο CMV κωδικοποιεί χυμοκίνες καθώς και τους υποδοχείς τους όπως επίσης και κυτταροκίνες που προστατεύουν από την βλαπτική επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παραδείγματος χάριν, η cmv IL-10 η οποία είναι ταυτόσημη μόνο στο 27% με την ανθρώπινη IL-10 ωστόσο συνδέεται στους ίδιους υποδοχείς και θεωρείται ότι έχει ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση. (Beisser PS et al, 2008 , Slobedman B et al, 2009) Οι πληροφορίες αυτές προέρχονται κατά κύριο λόγο από μελέτες σε ζώα και κυτταροκαλλιέργειες.

1.10. Η CMV λοίμωξη στη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Η περίοδος που ακολουθεί την αλλογενή μεταμόσχευση χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη ανοσοκαταστολή. Για το λόγο αυτό οι μεταμοσχευθέντες βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για CMV λοίμωξη και νόσο. (Crough et al, 2009) Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, η CMV λοίμωξη μετά από MAAK είναι συχνότερα αποτέλεσμα επανενεργοποίησης του ιού που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση στον οροθετικό λήπτη παρά πρωτοπαθής λοίμωξη. Πρωτοπαθής CMV λοίμωξη συμβαίνει στο 30% των οροαρνητικών ληπτών ενώ η επανενεργοποίηση του ιού παρατηρείται στο 80% των ασθενών που είναι οροθετικοί πριν τη μεταμόσχευση. (Ljungman P., 2007) Έτσι διαπιστώνουμε ότι ο σημαντικότερος προμεταμοσχευτικός παράγοντας κινδύνου για CMV νόσο είναι η ορολογική κατάσταση (status) του δότη και του λήπτη. Συγκεκριμένα οι οροθετικοί λήπτες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ακολουθούμενοι από τους οροαρνητικούς ασθενείς που λαμβάνουν μόσχευμα από οροθετικούς δότες. Οι οροαρνητικοί λήπτες που λαμβάνουν αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από οροαρνητικούς δότες έχουν χαμηλό κίνδυνο πρωτοπαθούς λοίμωξης εφόσον λαμβάνουν CMV αρνητικά παράγωγα αίματος. (Ljungman P et al, 2010) Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν τις υψηλές δόσεις κορτικοστε

ροειδών, την οξεία και χρόνια νόσο του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD) και τη χρησιμοποίηση μερικών συμβατών ή μη συγγενών δοτών. (Boeckh M et al, 2003) Η πηγή των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και τα σχήματα προετοιμασίας για τη μεταμόσχευση φαίνεται ότι έχουν ελάχιστη επίδραση στην πιθανότητα ανάπτυξης CMV λοίμωξης και νόσου με εξαίρεση τη μεταμόσχευση με ομφάλιο αίμα η οποία συνδέεται με υψηλά ποσοστά επανενεργοποίησης του ιού και νόσου χωρίς προφυλακτική αντιική θεραπεία. (Matsumura T. et al, 2007)

Ο CMV μπορεί να προκαλέσει μια πλειάδα εκδηλώσεων, από ασυμπτωματική ιαιμία έως CMV σύνδρομο (πολλαπλασιασμός του ιού, πυρετός, συστηματικά συμπτώματα) ή/και νόσο τελικού οργάνου. (Angarone M et al, 2008)

Κατά την πρώιμη φάση μετά τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (<100 ημέρες), οι συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της CMV νόσου είναι η πνευμονίτιδα και η εντεροκολίτιδα. (Boeckh M et al, 2003) Η εισαγωγή της ειδικής αντιικής θεραπείας μείωσε δραματικά την επίπτωση της εμφάνισης της CMV λοίμωξης νωρίς μετά την μεταμόσχευση και βελτίωσε το προσδόκιμο των ληπτών που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Πράγματι η εφαρμογή της χορήγησης προληπτικής ή προφυλακτικής θεραπείας μείωσε την επίπτωση της νόσου τους τρεις πρώτους μήνες από 25-30% σε 5% στους οροθετικούς λήπτες. (Pollack M et al, 2010) Ωστόσο οι στρατηγικές αυτές σχετίζονται με σημαντική μυελοτοξικότητα με αποτέλεσμα την υπολειπόμενη επαναφορά της αιματολογικής κατάστασης του ασθενούς και αυξημένα ποσοστά διεισδυτικών μυκητιασικών λοιμώξεων που αυξάνουν την νοσηρότητα. (Crough et al, 2009)

Η εμφάνιση της όψιμης CMV νόσου (>100 ημέρες) αναδεικνύεται πλέον ως μείζων επιπλοκή και απειλεί την μακροχρόνια επιβίωση. (Boeckh M, Leisenring W et al, 2003) Επιπρόσθετα από την συμμετοχή των πνευμόνων και του γαστρεντερικού σωλήνα εκδηλώνονται εγκεφαλίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα από CMV την περίοδο αυτή. Γενικά ο διάμεσος χρόνος εμφάνισης όψιμης CMV νόσου είναι οι 169 ημέρες ενώ η θνητότητα μπορεί να φθάσει το 46%. Παράγοντες κινδύνου θεωρούνται το ιικό φορτίο, η λεμφοπενία και η ανεπάρκεια των ειδικών για τον CMV T-κυττάρων. (Boeckh et al, 2003)

Υπάρχουν λίγες μελέτες που αφορούν παιδιατρικούς ασθενείς και οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από μελέτες ενηλίκων. Από τις υπάρχουσες

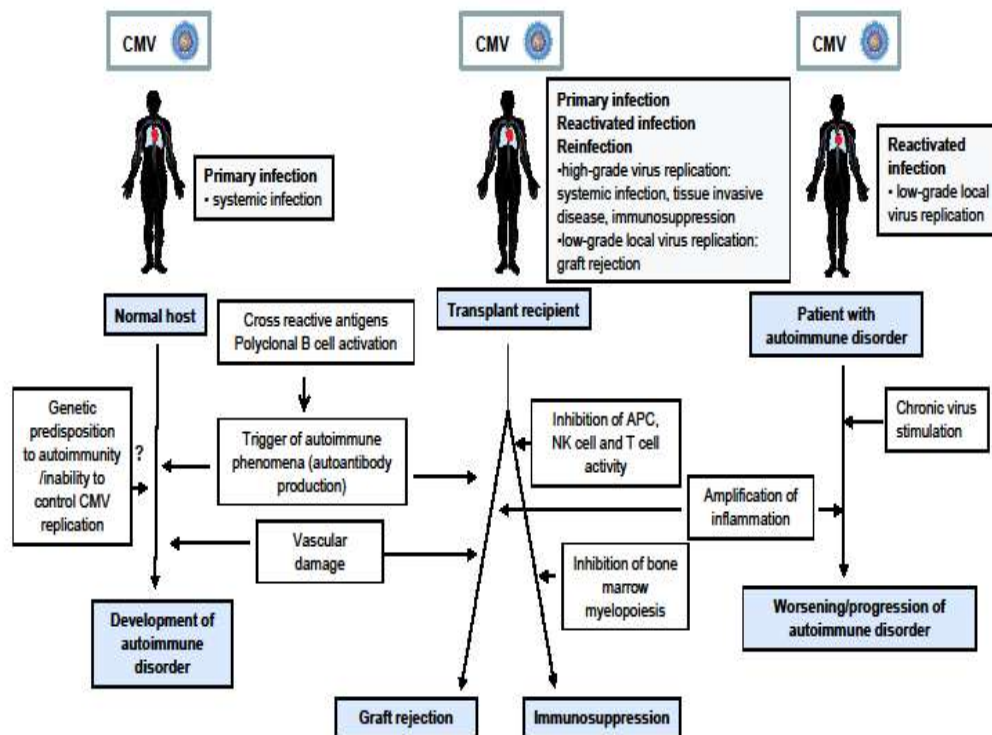
αναφορές συμπεραίνεται ότι τα παιδιά έχουν καλύτερη λειτουργία του θύμου από ότι οι ενήλικες την περίοδο μετά τη μεταμόσχευση και επίσης γρηγορότερη αποκατάσταση των CD4+ βοηθητικών T-κυττάρων παρουσία CMV λοίμωξης. (Patel SR et al, 2005 , De Vries E et al 2000) Για το λόγο αυτό συνολικά στα παιδιά η CMV λοίμωξη είναι λιγότερο συχνή με επίπτωση περίπου 24% και πιο καλοήθης σε σχέση με τους ενήλικες. (Yoon HS et al, 2009) Και σε αυτούς τους ασθενείς το ορολογικό status του λήπτη πριν τη μεταμόσχευση παραμένει ένας από τους σοβαρότερους λόγους για αντιγοναιμία από CMV.

Η CMV λοίμωξη έχει συσχετιστεί και με άλλες δυσμενείς επιπλοκές στους μεταμοσχευμένους ασθενείς όπως αυξημένα ποσοστά λοιμώξεων από μύκητες και βακτήρια, οξεία απόρριψη μοσχεύματος καθώς και δυσλειτουργία και ανεπάρκεια του μοσχεύματος, χρόνια νεφροπάθεια, αγγειοπάθεια (αορτή, στεφανιαία αγγεία), νεοπλασίες, διαβήτη. Επιπλέον σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί ενεργός πολλαπλασιασμός του ιού σε περιοχές φλεγμονής. Η παρατήρηση αυτή δε συνεπάγεται απαραίτητα αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ του CMV και της φλεγμονής. (Freeman RB, 2009) Για παράδειγμα, ενεργός πολλαπλασιασμός του CMV έχει βρεθεί στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, σε αυτοάνοσες παθήσεις όπως το σύνδρομο Sjogren και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto καθώς και σε περιοχές χρόνιας φλεγμονής όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και οι ψωριασικές πλάκες. (Soderberg-Naucleer C, 2006) Επίσης ο ιός έχει βρεθεί σε αθηρωματικές πλάκες μη ανοσοκατασταλμένων ασθενών με περιφερική αγγειακή νόσο. (Melnick JL et al, 1993) Καθώς αυτές οι καταστάσεις δεν σχετίζονται άμεσα με την εισβολή του ιού στους ιστούς ονομάζονται έμμεσες επιδράσεις της CMV λοίμωξης.

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι έμμεσες δράσεις του ιού είναι απόρροια της προσπάθειας του CMV να επιβιώσει στον ξενιστή του. Πρώτον, προκειμένου να επιβιώσει κατά την λανθάνουσα φάση χρειάζεται να αποφύγει την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Για το λόγο αυτό έχει αναπτύξει πολύπλοκους μηχανισμούς οι οποίοι παρεμβαίνουν στην ανοσιακή ενεργοποίηση και επιτήρηση. Όπως προαναφέρθηκε, οι μηχανισμοί αυτοί προκαλούν άμεσα καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή *in vitro*, παρεμβαίνουν στη διαδικασία παρουσίασης του αντιγόνου, και στη χυμική ανοσία και κατ' επέκταση καθιστούν τον οργανισμό επιρρεπή σε άλλες λοιμώξεις.

Δεύτερον, προκειμένου ο ιός να μεταφερθεί σε άλλους ξενιστές, ο πολλαπλασιασμός του ενεργοποιείται σε περιοχές φλεγμονής, γεγονός που επιτρέπει τη διασπορά του με τις εκκρίσεις που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απάντηση. Παρουσία φλεγμονής το ανοσοποιητικό σύστημα είναι προσανατολισμένο σε άλλα παθογόνα κάνοντας δυνατή την αναπαραγωγή του CMV. Καθώς ενεργοποιείται, με βάση τα ήδη γνωστά δεδομένα, ο CMV διεγείρει κυτταρικούς μηχανισμούς που επιδεινώνουν τη φλεγμονή προκειμένου να μεγιστοποιήσει τη δυνατότητα διασποράς και μετάδοσης. (Freeman RB, 2009) Έτσι παρατηρείται το παράδοξο ο CMV να παρουσιάζει κατά περίπτωση ανοσοκατασταλτική και φλεγμονώδη δράση επιβαρύνοντας τελικά τον ξενιστή του.

Σχήμα 8



Σχήμα 8: Η προκαλούμενη από τον CMV ανοσοπαθολογία σε διάφορες ομάδες απόμω- υγιή άτομα, ανοσοκατασταλμένοι-μεταμοσχευμένοι ασθενείς, ασθενείς με αυτοάνοση διαταραχή. (Varani et al 2010).

1.11. Πρόληψη και αντιμετώπιση της CMV λοίμωξης στους ασθενείς με ΜΑΑΚ.

Λαμβάνοντας υπόψη την σημαντική επίδραση της CMV λοίμωξης στους μεταμοσχευμένους ασθενείς έχει αναπτυχθεί μια σειρά μέτρων πρόληψης και αποφυγής της λοίμωξης. Κατ' αρχήν είναι σημαντικό να προσδιορίζεται το ιολογικό προφίλ του ασθενούς, ειδικότερα για τον CMV, ευθύς μόλις αυτός γίνει υποψήφιος για μεταμόσχευση. Στους υποψήφιους που είναι οροαρνητικοί για τον ιό δίνονται ασφαλή προϊόντα αίματος προκειμένου να αποφευχθεί η πρωτοπαθής λοίμωξη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται προϊόντα αίματος τα οποία έχουν υποστεί λευκαφαίρεση ή προέρχονται από CMV οροαρνητικούς δότες. (Bowden R. et al, 1995) Ιδανικά ο ασθενής που είναι CMV οροαρνητικός πριν την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών θα πρέπει να λαμβάνει μόσχευμα από οροαρνητικό δότη γεγονός το οποίο δεν είναι πάντα εφικτό. Η προφυλακτική χορήγηση της ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης (Intravenous immunoglobulin-IVIg) δεν συστήνεται καθώς δεν φαίνεται να προστατεύει αξιόπιστα τόσο στην πρωτοπαθή λοίμωξη όσο και κατά την επανενεργοποίηση του ιού σε οροθετικούς ασθενείς. (Raanani P. et al, 2008) Όσον αφορά τις προοπτικές του μέλλοντος η ανάπτυξη ενός εμβολίου αποτελεί πρωταρχικό στόχο καθώς μόνο έτσι μπορεί να ελεγχθεί η CMV λοίμωξη αποτελεσματικά. (Schleiss MR, 2008)

Υπάρχουν δύο βασικές στρατηγικές αντιμετώπισης της CMV λοίμωξης στους μεταμοσχευμένους ασθενείς: η προφυλακτική και η προληπτική θεραπεία. Και οι δύο στρατηγικές έχουν επιδείξει αποτελεσματικότητα και ασφάλεια όσον αφορά την προστασία από τη CMV νόσο μετά τη μεταμόσχευση. Η προληπτική θεραπεία έχει καταφέρει να μειώσει την επίπτωση της CMV νόσου στο 70% ενώ η προφυλακτική θεραπεία στο 60-80%.(Khalil A.C. et al, 2005, Small L.N. et al, 2006) Η προφυλακτική θεραπεία ορίζεται ως η καθιερωμένη χορήγηση ενός αντιικού παράγοντα σε όλους τους ασθενείς που βρίσκονται σε κίνδυνο. Η προληπτική θεραπεία ξεκινά με την ανίχνευση της CMV λοίμωξης ακόμη και πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τον ιό. Και οι δύο μέθοδοι έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.(Ljungman P. et al, 2011)

Η προφυλακτική θεραπεία έχει καταρχήν το πλεονέκτημα ότι με τη χρήση ενός αποτελεσματικού αντιικού φαρμάκου δεν είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση του ασθενούς. Επιπλέον, η προφύλαξη μπορεί δυνητικά να αποτρέψει τις πιθανές έμμεσες επιδράσεις μιας CMV λοίμωξης. Ωστόσο εξ ορισμού η προφύλαξη έχει ως αποτέλεσμα κάποιοι ασθενείς να λαμβάνουν θεραπεία χωρίς πραγματικά να τη χρειάζονται και να εκτίθενται σε πιθανή τοξικότητα του φαρμάκου (μυελοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα).

Η επιτυχία της προληπτικής θεραπείας στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην πρόωμη ανίχνευση του CMV στον ορό του ασθενούς. Για το σκοπό αυτό όλοι οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς παρακολουθούνται σε εβδομαδιαία βάση τουλάχιστον έως την εκατοστή μέρα μετά τη μεταμόσχευση για CMV λοίμωξη τακτική που φαίνεται να είναι αποτελεσματική. (Nichols WG. et al, 2003) Ωστόσο δεν έχει καθοριστεί η ιδανική διάρκεια και συχνότητα παρακολούθησης προκειμένου να αποτραπεί η εμφάνιση CMV λοίμωξης σε μεταγενέστερο στάδιο καθώς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ορολογικό προφίλ του ασθενούς. (Boeckh M. et al, 2009) Επιπλέον θεωρείται ότι η προληπτική θεραπεία επιτρέπει έναν περιορισμένο αναδιπλασιασμό του ιού και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ενισχύσει την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού και κατ' επέκταση την αποκατάσταση της ειδικής για τον CMV ανοσίας. Ωστόσο, αν και η ευρεία χρήση των μεθόδων PCR για την ανίχνευση του CMV DNA έστρεψε τα περισσότερα κέντρα μεταμόσχευσης στην κατεύθυνση της προληπτικής θεραπείας ωστόσο οι διαφορές στην επίδοση προσδιορισμού και στο είδος του δείγματος (ορός ή πλάσμα) δεν επιτρέπουν την καθιέρωση κοινώς αποδεκτών κατώτερων ορίων ιικού φορτίου.

Γενικά, συστήνεται η θεραπεία των ληπτών μεταμόσχευσης μέχρις ότου δεν υπάρχουν εργαστηριακά δεδομένα ενεργού πολλαπλασιασμού του ιού. Συγκεκριμένα, χορηγείται θεραπεία μέχρι ο ιός να μην είναι πλέον ανιχνεύσιμος στο αίμα για δύο συνεχόμενες εβδομάδες. (Kotton C N et al ,2010 ,Humar A et al, 2009) Στον παρακάτω πίνακα αναφέρεται συνοπτικά ο τρόπος εφαρμογής των στρατηγικών αυτών. Πίνακας 7.

Πίνακας 7

Στρατηγική Αντιμετώπισης	Πλήθυσμός Ασθενών	Χρόνος μετά MAAK	Έναρξη θεραπείας	Θεραπεία πρώτης γραμμής	Θεραπεία συντήρησης	Εναλλακτικά φάρμακα	Διάρκεια
Προληπτική	Λήπτες Αλλογενούς MAAK	<100 ημ	Αρχική αντίγνωση CMV λοίμωξης	GCV 5 mg/kgIVbid × 7–14ημ και μειούμενο ικο φορτίο	GCV 5 mg/kgIVqd	Foscarnet Valganciclovir Cidofovir	Αρνητικό τεστ για CMV και ελάχιστη θεραπεία 2–3 εβδ
	Αλλογενής MAAK ή GVHD που απαιτεί στεροειδή ή πρόιμη CMV λοίμωξη	>100 ημ	pp65 Ag ≥ 5 cells/slide ή ≥ 2 συνεχόμενες PCR θετικές/αιμία	GCV 5 mg/kgIVbid × 7–14ημ και μειούμενο ικο φορτίο	GCV 5 mg/kgIVqd	Valganciclovir Foscarnet	Αρνητικό τεστ για CMV και ελάχιστη θεραπεία 2–3 εβδ
	Αυτολογη MAAK και CMV οροθετικός ασθενής, και υψηλού κινδύνου	<100 ημ	pp65 Ag ≥ 5 cells/slide (ή οποιαδήποτε τιμή αν το μόσχευμα είναι CD34 (+/-))	GCV 5 mg/kgIVbid × 7 ημ και μειούμενο ικο φορτίο	GCV 5 mg/kgIVqd	Foscarnet Valganciclovir Cidofovir	Αρνητικό τεστ για CMV και ελάχιστη θεραπεία 2 εβδ
Προφυλακτική	Λήπτες Αλλογενούς MAAK	<100 ημ	Κατά την εγκατάσταση του μοσχεύματος	GCV 5 mg/kgIVbid × 5–7 ημ	GCV 5 mg/kgIVqd	Foscarnet Acyclovir Valacyclovir	Έως την 100 ^η ημέρα μετά τη MAAK

Συντομεύσεις: CMV, cytomegalovirus; GCV, ganciclovir; PCR, polymerase chain reaction. MAAK μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Πίνακας 7 Στρατηγικές προληπτικής και προφυλακτικής θεραπείας μετά από MAAK (P. Ljungman et al, 2011)

Όσον αφορά τα αντιικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως προφύλαξη υπάρχουν αρκετά με δράση έναντι του CMV το καθένα με τους περιορισμούς του. Ειδικότερα για τους παιδιατρικούς ασθενείς χορηγούνται προφυλακτικά υψηλές δόσεις ακυκλοβίρης (acyclovir) σε οροθετικούς ασθενείς ή σε ορο αρνητικούς ασθενείς που λαμβάνουν μόσχευμα από οροθετικό δότη. Η χρονική διάρκεια χορήγησης ξεκινά 5 μέρες προ της μεταμόσχευσης έως 100 μέρες μετά και φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο CMV λοίμωξης και διεισδυτικής νόσου καθώς και της θνησιμότητας με χαμηλή τοξικότητα. Ωστόσο όταν χρησιμοποιείται ακυκλοβίρη είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση και καταγραφή του ιικού φορτίου προκειμένου να ξεκινήσει προληπτική θεραπεία.

Η γκανσικλοβίρη (ganciclovir) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως προφύλαξη χωρίς να παρουσιάζει μεγαλύτερο πλεονέκτημα όσον αφορά τη συνολική επιβίωση . Σε όλες τις μελέτες παρατηρήθηκε σοβαρή ουδετεροπενία και για το λόγο αυτό η γκανσικλοβίρη συνδέθηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης μυκητιασικών και βακτηριακών λοιμώξεων. (Castagnola E. et al, 2004) Η βαλγκανσικλοβίρη (valganciclovir) έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χορηγηθεί από του στόματος, ωστόσο δεν υπάρχουν μελέτες χορήγησης της σε παιδιά ενώ η μη ύπαρξη του φαρμάκου σε μορφή εναιωρήματος μπορεί να είναι αιτία κακής συμμόρφωσης σε πολύ μικρούς ασθενείς. (Styczynski J et al, 2008)

Το φοσκαρνετ (foscarnet) δεν προκαλεί καταστολή του μυελού όμως παρουσιάζει σημαντική νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα για το λόγο αυτό δεν χρησιμοποιείται προφυλακτικά. Το σιντοφοβίρ (cidofovir) φαίνεται να προφυλάσσει από την ιαιμία και καθώς έχει μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής επιτρέπει την εβδομαδιαία χορήγηση ωστόσο παρουσιάζει νεφροτοξικότητα. (Bueno J et al, 2002)

Αρκετά νέα φάρμακα κατά του CMV βρίσκονται στη φάση των κλινικών δοκιμών. Τέτοια είναι το CMX001 ένα λιπιδικό παράγωγο του σιντοφοβίρ και το AIC246 που παρεμβαίνει στο τελικό στάδιο αναδιπλασιασμού του ιού. Το μαριμπαβίρ (maribavir) ένας αναστολέας της CMV UL97 κινάσης έδειξε καλά αποτελέσματα με ελάχιστη τοξικότητα σε μία μελέτη ελέγχου ωστόσο στη φάση III των κλινικών φαίνεται να είναι αναποτελεσματικό. (Boeckh et al ,2011)

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν συχνά επανενεργόποιηση του ιού είτε γιατί εμφανίζουν αντοχή στα φάρμακα είτε γιατί βρίσκονται σε βαριά ανοσοκαταστολή. Αυτοί οι ασθενείς μπορούν να ωφεληθούν από την εφαρμογή ανοσοθεραπείας με ειδικά για τον CMV κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Η θεραπεία αυτή χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό και τεχνικό εξοπλισμό που όμως δεν είναι διαθέσιμα ευρέως. (Bao L et al ,2012)

Πίνακας 8

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	ΧΡΗΣΗ
Ganciclovir (GCV) and valganciclovir (VGCV)	Νουκλεοζιτικό ανάλογο	Καταστολή μυελού, νευροψυχιατρικές διαταραχές	GCV : προφύλαξη, πρόληψη, θεραπεία CMV νόσου
Acyclovir (ACV) and Valacyclovir (VACV)	Νουκλεοζιτικό ανάλογο	Διαταραχές ΚΝΣ (τρόμος, παραισθήσεις, σπασμοί),	Προφύλαξη
Cidofovir	Νουκλεοτιδικό ανάλογο	Νεφροτοξικότητα, θρομβοκυττοπενία, οφθαλμολογικές νευρολογικές διαταραχές	Φτωχή δράση στην πρόληψη και αντιμετώπιση της CMV νόσου
Foscarnet	Πυροφωσφορικό ανάλογο	Νεφροτοξικότητα, παραισθησία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές	Φάρμακο εκλογής σε ουδετεροπενία ή αντοχή στην GCV
Maribavir (investigational)	Ενώσεις του βενζιμιδαζολικού ριβωσιδίου		Προφύλαξη και θεραπεία για CMV ανθεκτικού στην GCV
Carimune,Gamimune, Gammagard S/D, Gammar P, Polygam S/D	Ανοσοσφαιρίνες τυχαίου δότη		Ανοσοτροποποιητικό, προφύλαξη ή θεραπεία CMV νόσου σε συνδιασμό με αντικά
CytoGam	CMV υπεράνοση σφαιρίνη		Ανοσοτροποποιητικό, προφύλαξη ή θεραπεία CMV νόσου σε συνδυασμό με αντικά
CD8+ CMV CTLs	Ανοσοθεραπεία		Προφύλαξη ή πρόληψη

Συντομεύσεις: CMV, cytomegalovirus; GCV, ganciclovir, CTLcytotoxic lymphocytes

Πίνακας 8 : Θεραπεία CMV λοίμωξης (βασισμένο Jain et al. 2011)

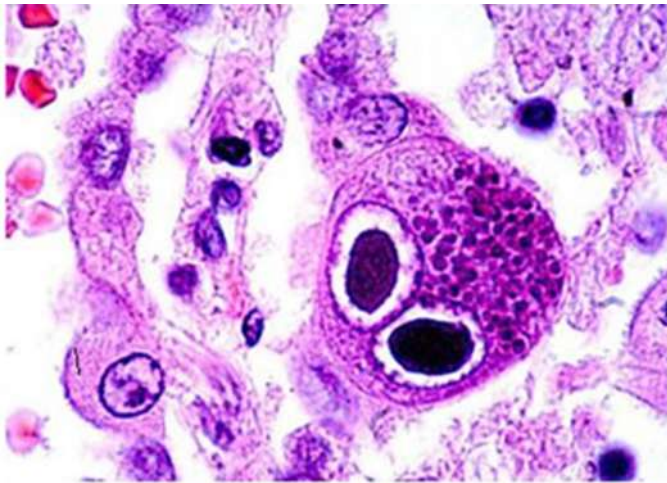
1.12. Διαγνωστική προσέγγιση CMV λοίμωξης

Η διάγνωση της CMV λοίμωξης/νόσου γίνεται είτε μέσω απομόνωσης του ιού με καλλιέργεια είτε ορολογικά μέσω ανίχνευσης του ειδικού για τον CMV αντιγόνου ή αντισώματος είτε μέσω απομόνωσης ιικού DNA με μοριακές μεθόδους από το αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά.

Μέχρι πρόσφατα η καλλιέργεια του ιού από δείγματα αίματος ή άλλων ιστών θεωρούνταν η gold standard διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση του CMV. Ωστόσο απαιτεί εντατική εργασία και τα αποτελέσματα δεν είναι διαθέσιμα παρά μετά από δύο μέρες το ταχύτερο έως και 21 ημέρες το αργότερο. Νεότερες τεχνικές όπως η ταχεία κυτταροκαλλιέργεια σε φιάλη (shell vial technique) ανιχνεύει πρωτεΐνες του ιού με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων ωστόσο στερούνται ικανοποιητικής ευαισθησίας και δεν χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας. Όμως είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη διάγνωση της CMV πνευμονίας σε δείγμα βρογχοπνευμονικού εκπλύματος Από την άλλη, αυξημένος τίτλος IgM ή τετραπλασιασμός του τίτλου των IgG είναι συμβατός με πρόσφατη CMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς. Σημειώνεται ότι ψευδώς θετικά CMV IgM βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με λοίμωξη από EBV ή HHV6 και αυξημένο ρευματοειδή παράγοντα. (Cunha BA, 2010) Όμως η ανίχνευση των ειδικών για τον CMV αντισωμάτων (IgG και IgM) φαίνεται να είναι περισσότερο χρήσιμη στον προσδιορισμό του κινδύνου του ασθενούς για CMV λοίμωξη μετά τη μεταμόσχευση και λιγότερο στη διάγνωση της.

Τέλος, η παρουσία των χαρακτηριστικών για τον CMV παθολογοανατομικών αλλοιώσεων σε ιστικά δείγματα όπως είναι τα μεγάλα κύτταρα με τα πυρηνικά έγκλειστα που περιβάλλονται από διαυγή άλω (owl's eye) είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της διεισδυτικής νόσου ωστόσο η μέθοδος έχει χαμηλή ευαισθησία. Σχήμα 9 Για το λόγο αυτό ταχύτερες μέθοδοι όπως η ανίχνευση του αντιγόνου pp65 από λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος (ΛΠΑ) ή CMV DNA από το αίμα ή ΛΠΑ προτιμώνται σήμερα. (Jain M. et al, 2011, Ljungman et al, 2011)

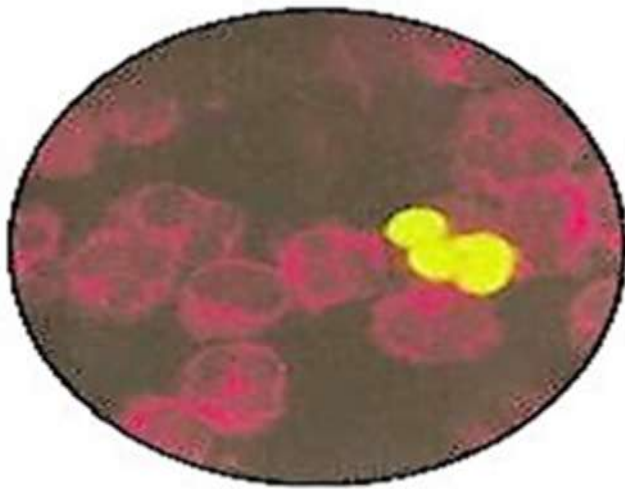
Σχήμα 9



Σχήμα 9 : Τυπικά πυρηνικά έγκλειστα (owl-eye) σε παθολογοανατομικό δείγμα πνεύμονα-χρώση αιματοξυλίνης –ηωσίνης (Danny L Wiedbrauk, PhD, Scientific Director, Virology & Molecular Biology, Warde Medical Laboratory, Ann Arbor, Michigan)

Η μέθοδος προσδιορισμού της αντιγοναιμίας στηρίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων που ανιχνεύουν το ιικό pp65 αντιγόνο το οποίο είναι μια δομική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης αναδιπλασιασμού του CMV. Η εξέταση είναι όχι μόνο ποιοτική αλλά και ποσοτική καθώς μετρά τους θετικούς για την πρωτεΐνη πυρήνες των λευκοκυττάρων μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η δοκιμασία αυτή είναι γρήγορη καθώς τα αποτελέσματα μπορούν να είναι διαθέσιμα σε λίγες ώρες (4-5 ώρες). Έχει ως μειονεκτήματα ότι είναι αρκετά περίπλοκη διαδικασία, η επεξεργασία του δείγματος πρέπει να γίνεται σύντομα μετά τη λήψη και τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον αριθμό των πολυμορφοπυρήνων που αξιολογούνται. Για παράδειγμα βρίσκονται αρκετά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ουδετεροπενικούς ασθενείς. Επιπλέον η ερμηνεία των αποτελεσμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία και την ικανότητα αυτού που μικροσκοπεί.(Ross S.A. et al, 2011, Jain M. et al, 2011) Σχήμα 10

Σχήμα 10

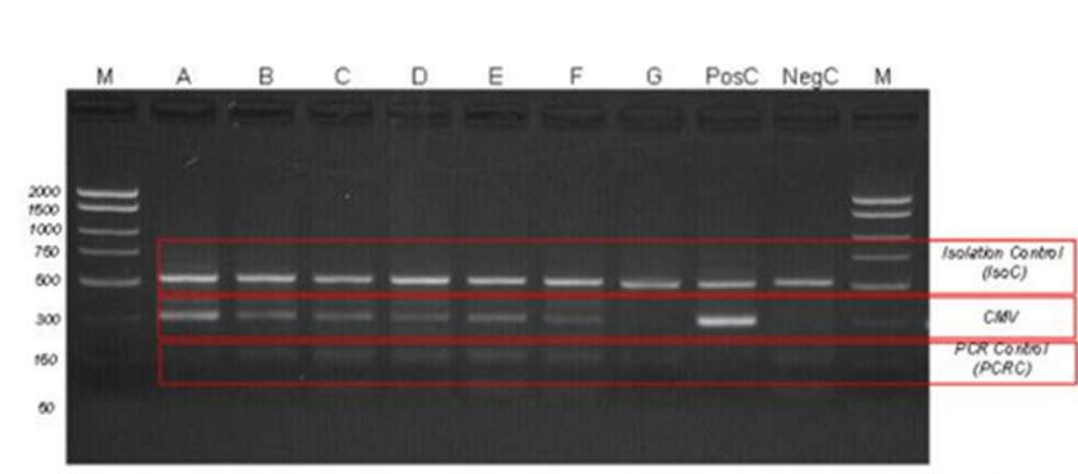


Σχήμα 10:Ανίχνευση pp65 αντίγονου στους πυρήνες πολυμορφοπυρήνων του περιφερικού αίματος (Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση του CMV και στηρίζεται στην ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων του ιού. Η τεχνική στοχεύει γονίδια που συμμετέχουν τόσο στην αντιγραφή όσο και την τελική ωρίμανση του ιού προκειμένου να ανιχνεύσει το CMV DNA και μπορεί να εφαρμοστεί σε ολικό αίμα, λευκοκύτταρα, πλάσμα, υλικό βιοψίας ιστού καθώς και ούρα,εγκεφαλονωτιαίο υγρό και βρογχοπνευμονικό έκπλυμα. Η PCR για ανίχνευση CMV DNA είναι ποιοτική ή ποσοτική. Η ποσοτική PCR (Real-Time PCR) επιτρέπει την παρακολούθηση των ανοσοκατασταλμένων ασθενών αναγνωρίζοντας αυτούς που χρειάζονται προληπτική θεραπεία έναντι του CMV καθώς και την ανταπόκριση τους σε αυτή. Σχήμα 11 Γενικά είναι μια μέθοδος ταχεία, με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία που μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Τα αποτελέσματα αποδίδονται ως αριθμός αντιγράφων ανά ml αίματος ή πλάσματος και δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το χρόνο λήψης του δείγματος. Ωστόσο είναι δαπανηρή και στερείται ενιαίου κατώτερου ορίου τιμών ιικού φορτίου καθώς δεν υπάρχει προτυποποιημένο πρωτόκολλο της μεθόδου μεταξύ των διαφόρων ερευνητικών κέντρων και εργαστηρίων. Το γεγονός οδηγεί συχνά σε υπερδιάγνωση της CMV λοίμωξης με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου και της τοξικότητας της θεραπείας. Πρόσφατα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) διέθεσε διεθνής για τον CMV προδιαγραφές ανίχνευσης γεγονός

που ευνοεί την προτυποποίηση της μεθόδου μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων. Μια άλλη μέθοδος ανίχνευσης είναι και η RT-PCR (Αντίστροφης μεταγραφάσης) όπου ανιχνεύεται ιικό mRNA σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος. Η παρουσία κυκλοφορούντος mRNA έχει συσχετιστεί με ενεργό νόσο ανεξάρτητα από την ανίχνευση ή όχι DNA. Ωστόσο, θεωρείται λιγότερο ευαίσθητη εξέταση και δεν χρησιμοποιείται πολύ συχνά. (Ross S.A. et al, 2011)

Σχήμα 11



Σχήμα 11 : Ανίχνευση CMV σε δείγμα ούρων.(Bio-synthesis Inc PCR detection kit)

1.13. Μέθοδοι ανίχνευσης ειδικής ανοσιακής απάντησης για τον CMV

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προγενέστερα, τα ειδικά για τους ιούς T-κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των λοιμώξεων μετά από αλλογενή ΜΑΑΚ. Ειδικότερα η ανάπτυξη των ειδικών για τον CMV CD4+ και CD8+ T-κυττάρων είναι απαραίτητη για το σταθερό έλεγχο της λοίμωξης ενώ η απουσία της ειδικής ανοσιακής απάντησης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο επανενεργοποίησης του ιού και υποτροπιάζοντα επεισόδια CMV λοίμωξης. (Crough et al 2009) Συγκεκριμένα το πρώτο επεισόδιο επανενεργοποίησης του ιού μετά από αλλογενή ΜΑΑΚ έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ειδικών CMV T-κυττάρων προερχόμενων από τον δότη. Ο ρόλος τους είναι είτε λειτουργικός είτε δρουν ως κύτταρα μνήμης και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με αυξημένη προστασία έναντι των υποτροπών CMV αντιγονομίας. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές σε βαριά ανοσοκατασταλμένους CMV οροθετικούς ασθενείς ή CMV οροθετικούς ασθενείς που λαμβάνουν μόσχευμα από CMV οροαρνητικό δότη, οι οποίοι δείχνουν σημαντική καθυστέρηση στην αποκατάσταση της ειδικής ανοσιακής απάντησης των T-κυττάρων και για αυτό το λόγο παρουσιάζουν επίμονη CMV ιαιμία και μεγαλύτερο κίνδυνο CMV νόσου. Επομένως η παρακολούθηση της ειδικής για τον CMV T-κυτταρικής ανοσίας είναι χρήσιμο εργαλείο στην αξιολόγηση του κινδύνου CMV λοίμωξης σε αυτούς τους ασθενείς. (Fuji Sh et al. 2013)

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές που επιτρέπουν την παρακολούθηση των ειδικών για τον CMV CD4+ και CD8+ T-κυττάρων. Η πλειοψηφία αυτών βασίζεται στην ανίχνευση της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) μετά από διέγερση ειδικών για τον CMV αντιγόνων. Συγκεκριμένα η διέγερση των T-κυττάρων γίνεται άμεσα είτε από ανοσοεπικρατούντες επιτόπους των ιικών πρωτεϊνών όπως είναι ο pp65 (ppUL83) και ο pp72 (ppUL123) ή ολόκληρο το πρωτεϊνικό αντιγόνο του ιού. Εναλλακτικά, η διέγερση επιτυγχάνεται με την επώαση ιικών πεπτιδίων ή αντιγόνων με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα. (Lazarotto T., 2010)

Η μέτρηση και αξιολόγηση της ειδικής ανοσιακής απάντησης μετά από τις συγκεκριμένες προκλήσεις γίνεται με μεθόδους όπως η χρώση ενδοκυτταρικής κυτοκίνης (intracellular cytokine staining ,ICS), δοκιμασία πολυμερών

βασισμένη στο μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex (MHC)-multimer-based assay) και οι δοκιμασίες μέτρησης της παραγόμενης IFN- γ μετά από διέγερση με ειδικά ιικά αντιγόνα όπως η ELISPOT και η QuantiFERON- CMV. Πίνακας 9

Πίνακας 9

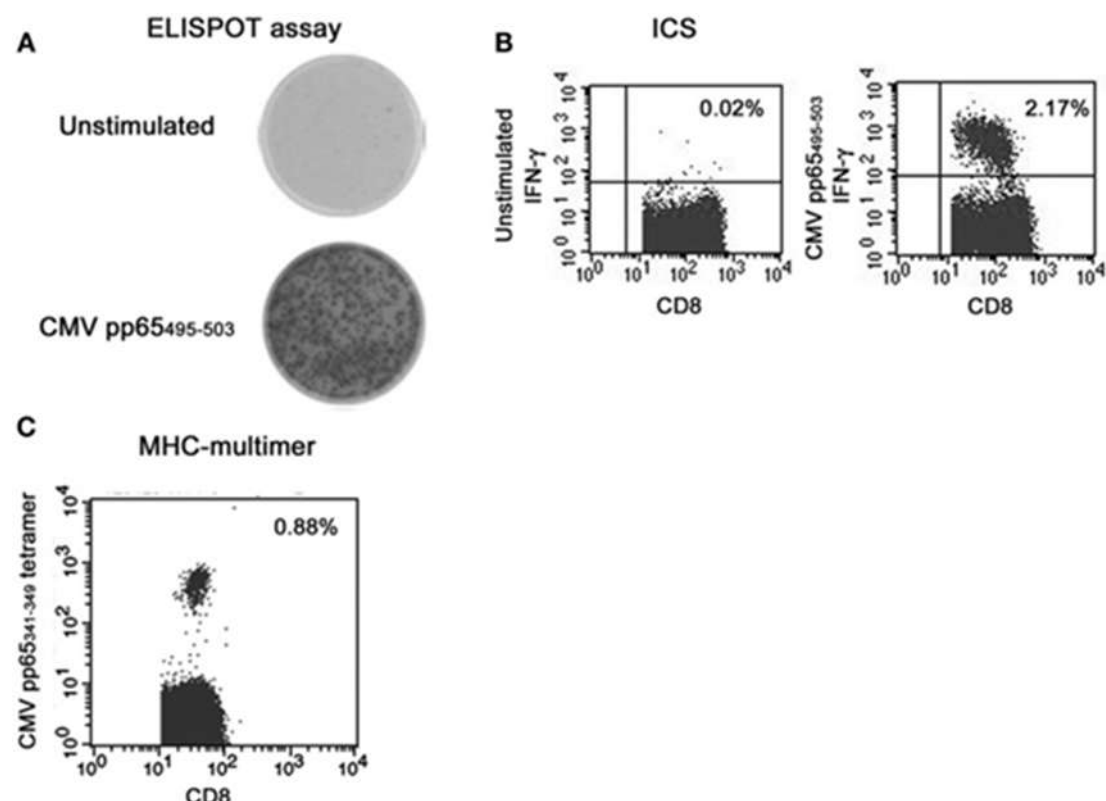
ΜΕΘΟΔΟΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Intracellular Cytokine Staining	Μικρή ποσότητα αίματος Γρήγορη μέθοδος (24 ώρες) Ταυτοποίηση απάντησης των CD8+ και CD4+	Απαραίτητη η κυτταρομετρία ροής Μη τυποποιημένη μέθοδος
MHC-multimer-based assay	Ταυτοποίηση απάντησης των CD8+ Ταχεία μέθοδος (1-2 ώρες) Μικρή ποσότητα αίματος	Απαραίτητη η κυτταρομετρία ροής Μη τυποποιημένη μέθοδος Απαραίτητη η γνώση του HLA τύπου του ασθενούς
ELISPOT	Δεν είναι απαραίτητη η κυτταρομετρία ροής Γρήγορη μέθοδος (24-30 ώρες) Προσδιορισμός απάντησης των CD8+ και CD4+	Μη τυποποιημένη μέθοδος Μεγάλη ποσότητα αίματος Αδυναμία διαφοροποίησης των CD8+ και CD4+
Quantiferon-CMV	Μικρή ποσότητα αίματος Προσδιορισμός απάντησης των CD8+	Μείωση ευαισθησίας σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς

Όπως παρατηρούμε, από τον πίνακα 9 οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Πιο αναλυτικά: η χρώση ενδοκυτταρικής κυτοκίνης (intracellular cytokine staining ,ICS), αξιολογεί τα ειδικά για τον ιο T-κύτταρα τόσο ποσοτικά όσο και σε λειτουργικό επίπεδο. Χρησιμοποιείται είτε ολικό αίμα είτε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος τα οποία διεγείρονται από ειδικά ιικά πεπτιδία ή πρωτεϊνικά θραύσματα. Τα διεγερμένα κύτταρα σηματοδοτούνται από μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον της IFN- γ . Η μέθοδος δεν περιορίζεται από τον τύπο του ανθρώπινου λεμφοκυτταρικού αντιγόνου και επιτρέπει την ταυτοποίηση των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων. Χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα αίματος (1 ml), έχει μικρό χρόνο επώασης και τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 ώρες. Η ανάγκη χρήσης κυτταρομέτρου ροής και η απουσία τυποποίησης είναι βασικά της μειονεκτήματα. Η δοκιμασία πολυμερών βασισμένη στο μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex (MHC)-multimer-based assay) χαρακτηρίζεται από την άμεση χρώση ειδικών πεπτιδίων των T-κυττάρων χρησιμοποιώντας τετραμερή ή πενταμερή MHC τάξης I. Η μέθοδος προσδιορίζει την απάντηση των CD8+ T-κυττάρων όμως καθώς ταυτοποιεί συγκεκριμένους επιτόπους πρέπει να είναι γνωστή η HLA ταυτότητα του ασθενούς. Είναι εξαιρετικά γρήγορη μέθοδος καθώς τα αποτελέσματα λαμβάνονται μέσα σε 1-2 ώρες και χρειάζεται μικρή ποσότητα αίματος (0.5-1 ml). Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο το κυτταρόμετρο ροής είναι απαραίτητο και δεν έχει τυποποιηθεί.

Η μέθοδος ELISPOT μετρά τον αριθμό των T-κυττάρων που εκκρίνουν IFN- γ σαν απάντηση σε ένα ιικό αντιγόνο. Η εκκρινόμενη IFN- γ δεσμεύεται από ένα ειδικό αντίσωμα και στη συνέχεια ποσοτικοποιείται με τη χρήση σεσημασμένου αντισώματος. Η δοκιμασία είναι σχετικά γρήγορη (24-30 ώρες), προσδιορίζει τα CD4+ και CD8+ T-κύτταρα και δεν έχει ανάγκη της χρήσης κυτταρομέτρου ροής. Επίσης υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit της μεθόδου ειδικά για τον CMV. Ωστόσο δεν μπορεί να διαφοροποιήσει μεταξύ των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων, δεν έχει προτυποποίηση και χρειάζεται αρκετή ποσότητα αίματος (7-10 ml). Η δοκιμασία QuantiFERON-CMV υπολογίζει την εκκρινόμενη IFN- γ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Είναι εύχρηστη, απαιτεί μικρή ποσότητα αίματος (3

ml) και τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μετά από 30-40 ώρες. Είναι εμπορικά διαθέσιμη και προσδιορίζει μόνο τα CD8+ T-κύτταρα. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η ευαισθησία της μειώνεται σε λεμφοπενικούς ασθενείς καθώς απαιτείται ένας ικανός αριθμός λεμφοκυττάρων προκειμένου να παραχθεί ανιχνεύσιμη IFN- γ .(Costa C et al 2012) Σχήμα 12

Σχήμα 12



Σχήμα 12: Αντιπροσωπευτικά δείγματα παρακολούθησης ειδικής ανοσιακής απάντησης στον CMV μετά από MAAK με (A) ELISPOT, (B) ICS (C) MHC-multimer (Fuji et al, 2013)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Σκοπός της μελέτης

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς σε προηγούμενες ενότητες ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) εγκαθιστά επίμονες και μακροχρόνιες λοιμώξεις στους περισσότερους ανθρώπους σε ποσοστό 50%-85%. Ο ιός αρχικά προσβάλλει τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρκετών ιστών και ύστερα από έναν λυτικό κύκλο, εγκαθιστά μια ασυμπτωματική λανθάνουσα λοίμωξη. Στην περιφερική κυκλοφορία το κύριο σημείο ανίχνευσης του CMV στη λανθάνουσα περίοδο είναι το μονοκύτταρο. Αν και οι παράγοντες που προκαλούν την επανενεργοποίηση του δεν είναι πλήρως κατανοητοί, φαίνεται ότι ελάχιστον επανενεργοποιήσεις του ιού συμβαίνουν στα υγιή άτομα. Σε περίπτωση δε ανοσοκαταστολής όπως συμβαίνει στους ασθενείς που λαμβάνουν μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (MAAK), εκτιμάται ότι το 60-70% των οροθετικών ασθενών θα εμφανίσει CMV επανενεργοποίηση τις πρώτες 100 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση, ενώ 20% αυτών θα παρουσιάσει νόσο τον πρώτο χρόνο.

Η επαρκής ανοσία έναντι των ιών προϋποθέτει την παρουσία όχι μόνο αντισωμάτων αλλά και προστατευτικών T-κυττάρων. Σειρές μελετών έχουν αποδείξει ότι τα CD8 κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και τα CMV ειδικά βοηθητικά CD4 λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της CMV λοίμωξης. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια ανοσολογικές δοκιμασίες που εξετάζουν το ρόλο των κυττοκινών όπως είναι η IFN- γ που προέρχεται από τα CMV ειδικά CD8 T-κύτταρα. Η IFN- γ είναι μια ειδική κυττοκίνη που αφορά την κυτταρική ανοσιακή απάντηση. Παράγεται από τα CD4, CD8 και $\gamma\delta$ T-κύτταρα ως απάντηση στον αντιγονικό ερεθισμό και από τα NK κύτταρα ως απάντηση στη διέγερση από την IL12. Πιστεύεται ότι η ποσοτικοποίηση των CMV ειδικών CD8 T-κυττάρων στους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς καθώς και της παραγωγής IFN- γ μπορεί να προβλέψει τον κίνδυνο CMV νόσου. Επιπρόσθετα η έκφραση της IFN- γ από τα κύτταρα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της ειδικής για τον κυτταρομεγαλοϊό κυτταρικής ανοσίας.

Το γεγονός αυτό αποκτά σημασία στους μεταμοσχευμένους με AAK στους οποίους η εφαρμογή της προληπτικής αντιϊκής θεραπείας μείωσε μεν

σημαντικά τη νοσηρότητα και τη θνητότητα από CMV ωστόσο παρουσιάζει σοβαρά μειονεκτήματα όπως:

- Καταστολή μυελού
- Καθυστέρηση της αποκατάστασης της ειδικής CMV κυτταρικής ανοσίας
- Αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καθυστερημένης CMV νόσου μετά τη λήξη της θεραπείας
- Παρατεταμένη χορήγηση αντιϊκών φαρμάκων σε ασθενείς που δεν θα εμφάνιζαν ποτέ CMV νόσο λόγω της υπερδιάγνωσης

Επομένως γίνεται κατανοητό ότι είναι επιτακτική η ανάγκη διαστρωμάτωσης των ασθενών αυτών με βάση τον ατομικό κίνδυνο ανάπτυξης νόσου. Θεωρητικά με τη βοήθεια μιας αξιόπιστης εργαστηριακής μεθόδου θα μπορούσαμε να εξατομικεύσουμε τη θεραπεία, διατηρώντας την σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπών και διακόπτοντας τη σε ασθενείς με χαμηλό κίνδυνο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και αναζητώντας μια μέθοδο που να είναι εύχρηστη, γρήγορη και να μην έχει ανάγκη χρήσης ακριβού ή εξειδικευμένου εξοπλισμού επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τη δοκιμασία QuantiFERON-CMV. Η μέθοδος αυτή είναι μια *in vitro* δοκιμασία μέτρησης της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης σε ειδικά πεπτιδικά αντιγόνα όπως προκύπτει από την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της IFN- γ .

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει μικρός αριθμός μελετών που αξιολογούν τη μέθοδο QuantiFERON-CMV και αφορούν ενήλικες ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων. (Walker S et al, 2007, Lisboa L et al, 2012) Ο αριθμός που εκτιμά την αξία της δοκιμασίας σε λήπτες αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι ακόμα μικρότερος και το δείγμα ασθενών αφορά επίσης ενήλικες. (Fleming T. et al, 2010, Tey S.K. et al, 2013) Όταν δε επικεντρωνόμαστε στον παιδιατρικό πληθυσμό που υποβάλλεται σε μεταμόσχευση AAK τα δεδομένα που τον αφορούν είναι ελάχιστα.

Επομένως στόχοι της μελέτης είναι α) η ανίχνευση της σχέσης μεταξύ του κινδύνου υποτροπών ή νόσησης από τον CMV και της αποκατάστασης της ειδικής ανοσιακής απάντησης στον CMV όπως προσδιορίζεται από τη δοκιμασία QuantiFERON-CMV σε παιδιατρικούς ασθενείς με MAAK β) η διαμόρφωση κατάλληλων συστάσεων για την ένταξη της δοκιμασίας στην διαχρονική παρακολούθηση των ασθενών αυτών με στόχο την εξατομίκευση της θεραπείας τους.

2.1. Σχεδιασμός μελέτης

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα μεταμόσχευσεων μυελού των οστών του παιδιατρικού νοσοκομείου Αγία Σοφία που στεγάζεται στην Παιδιατρική Ογκολογική Μονάδα «Μαριάνα Βαρδινογιάννη-Ελπίδα». Παιδιά με κακοήθεις και μη κακοήθεις αιματολογικές παθήσεις που υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από συγγενείς ή μη συγγενείς δότες (μυελού οστών, περιφερικού ή ομφάλιου αίματος) εντάχθηκαν προοπτικά.

Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το αν είναι φορείς του ιού τόσο ο δότης (Δ) όσο και ο λήπτης (Λ) στις ακόλουθες ομάδες:

- 1.:Δ- / Λ-
- 2.:Δ- / Λ+
- 3.:Δ+ / Λ-
- 4.:Δ+ / Λ+

Ανάλογη ήταν η ομαδοποίηση όσον αφορά τον κίνδυνο ανάπτυξης νόσου όπου ως χαμηλού κινδύνου χαρακτηρίζεται η ομάδα Δ- / Λ-, ως ενδιάμεσου κινδύνου οι ομάδες Δ+ / Λ+ και Δ+ / Λ- ενώ υψηλού κινδύνου χαρακτηρίζεται η ομάδα Δ- / Λ+.

Η παρακολούθηση της ανοσιακής αποκατάστασης των μικρών ασθενών μας έγινε με τη λήψη διαδοχικών δειγμάτων αίματος στις ακόλουθες χρονικές στιγμές : προ της μεταμόσχευσης, σύντομα μετά την μεταμόσχευση (εντός 3 ημερών), στις 30, 90, 180, 270 και 360 ημέρες μετά την μεταμόσχευση. Παράλληλα γινόταν εκτίμηση του ιικού φορτίου των ασθενών με ανίχνευση των ακόλουθων ιών : CMV, Epstein Bar virus, Adenovirus, BK virus, Human herpesvirus 6 (HHV-6) and Human herpesvirus 7 (HHV-7) σε εβδομαδιαία βάση για τις πρώτες 100 ημέρες και στη συνέχεια ανάλογα με την κλινική ένδειξη. Η παρακολούθηση της ιαιμίας έγινε από το Ινστιτούτο Παστέρ με τη χρήση in house μεθόδου αλυσιδωτής πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασισμένη στα πρότυπα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας

(ΠΟΥ) για τον CMV. Το όριο ανίχνευσης για τον ιο ορίστηκαν οι 500 copies/ml.

Όλα τα μεταμοσχευμένα παιδιά έλαβαν προφυλακτική αγωγή με χαμηλή δόση ακυκλοβίρης (250 mg/m² τρεις φορές/ημέρα) ανεξάρτητα από τη φορεία τους για τον CMV. Στην περίπτωση ανίχνευσης ιαιμίας, χορηγούνταν προληπτική θεραπεία είτε με γκανσικλοβίρη (2×5 mg/kg/ημέρα) είτε με φוסκαρνετη (2×60 mg/kg/ ημέρα) σε ασθενείς πριν την εγκατάσταση του μοσχεύματος. Η διάρκεια της προφύλαξης για τις κακοήθης αιματολογικές νόσους ήταν 6 μήνες και για τις μη κακοήθης 12 μήνες. Η διακοπή της προληπτικής αγωγής γινόταν με τη λήψη δύο διαδοχικών αρνητικών αποτελεσμάτων με τη μέθοδο PCR.

Καθώς η αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Graft- versus- host disease GVHD) αποτελεί την πιο συχνή επιπλοκή της μεταμόσχευσης όλοι οι ασθενείς λάμβαναν προφύλαξη με κυκλοσπορίνη Α και τέσσερις δόσεις μεθοτρεξάτης. Σε περίπτωση οξέως GVHD ως θεραπεία πρώτης γραμμής χρησιμοποιούνταν πρεδνιζόνη (2 mg/kg/ημέρα) με αργή μείωση ανάλογα με την κλινική ανταπόκριση του ασθενούς. Αντιστοίχως σε χρόνια GVHD χρησιμοποιούνταν πρεδνιζόνη (1-2 mg/kg/ημέρα) με αργή μείωση.

3. Μεθοδολογία

Στην παρούσα μελέτη η παρακολούθηση της ανοσιακής αποκατάστασης των μεταμοσχευμένων παιδιών έναντι στον CMV πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου QuantiFERON®-CMV. Πρόκειται για μια *in vitro* δοκιμασία η οποία χρησιμοποιεί μια ποικιλία πεπτιδίων που μιμούνται τις πρωτεΐνες του CMV με σκοπό την κυτταρική διέγερση σε ηπαρινισμένο ολικό αίμα. Τα πεπτίδια αυτά είναι σχεδιασμένα να στοχεύουν ειδικά CD8+ T-κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, Cw6 (A30,B13) HLA Τάξης I απλοτύπων οι οποίοι καλύπτουν >98% του ανθρώπινου πληθυσμού. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι άτομα που έχουν ήδη μολυνθεί από CMV περιέχουν στο αίμα τους ειδικά CD8+ T-κύτταρα που αναγνωρίζουν αυτά τα αντιγόνα. Η διαδικασία της αναγνώρισης περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης IFN- γ . Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της εκκρινόμενης IFN- γ αποτελεί τη βάση της δοκιμασίας.

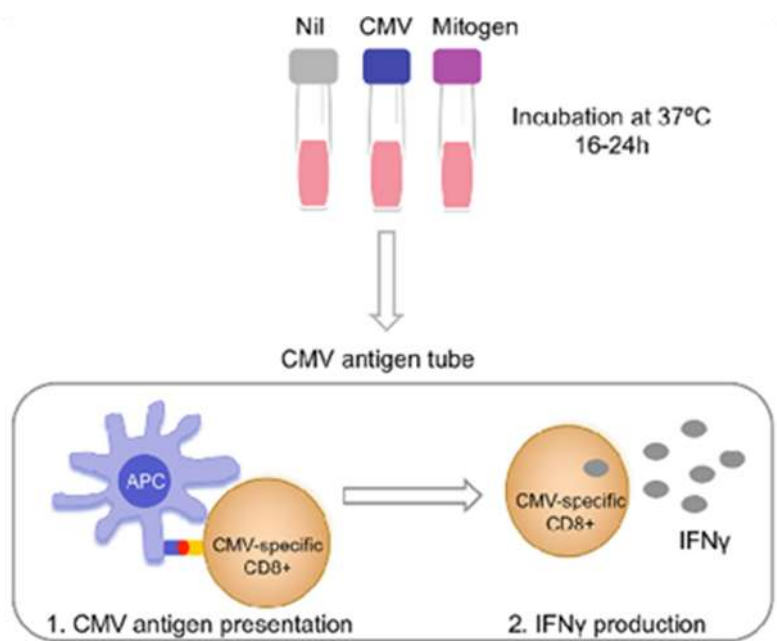
3.1. Αρχές της μεθόδου

Η μέθοδος πραγματοποιείται σε δύο στάδια: Αρχικά γίνεται συλλογή ολικού αίματος σε κάθε ένα από τα QuantiFERON®-CMV σωληνάρια συλλογής που περιλαμβάνουν ένα σωληνάριο αρνητικού QuantiFERON®-CMV ελέγχου (Nil control), ένα σωληνάριο αντιγόνου (CMV Antigen) και ένα μιτογόνου (Mitogen) που παίζει το ρόλο του θετικού ελέγχου (positive control). Σχήμα 13



Σχήμα 13: Nil Control(γκρι καπάκι), CMV Antigen (μπλε καπάκι) ,Mitogen Control (μωβ καπάκι)(Qiagen)

Στη συνέχεια τα σωληνάρια θα πρέπει να επωαστούν στους 37^o C μέσα σε 16 ώρες από τη συλλογή. Η επώαση διαρκεί 16-24 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, συλλογή του υπερκείμενου πλάσματος και τέλος μέτρηση του παραγόμενου ποσού της IFN-γ με QuantiFERON® ELISA. Σχήμα 14



Σχήμα 14: Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας Quantiferon-CMV (Qiagen)

Η δοκιμασία θεωρείται ότι έχει θετική αντίδραση (reactive) παραγόμενης IFN-γ εάν η τιμή του CMV Antigen σε IU/ml είναι μεγαλύτερη από την τιμή του Nil control. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το σωληνάριο Mitogen λειτουργεί ως θετικός έλεγχος για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η χαμηλή απάντηση στο μιτογόνο (<0.5 IU/ml) σε συνδυασμό με αρνητική αντίδραση (non-reactive) του δείγματος στο CMV αντιγόνο θεωρείται ως απροσδιόριστο αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε χαμηλό αριθμό λεμφοκυττάρων στο εξεταζόμενο δείγμα ή σε μειωμένη δραστηριότητα τους αποτέλεσμα είτε κακής τεχνικής διαχείρισης του δείγματος είτε αδυναμίας παραγωγής IFN-γ όπως συμβαίνει σε ασθενείς με πρόσφατη μεταμόσχευση μυελού ή οργάνου. Η τιμή των αποτελεσμάτων προκύπτει από την αφαίρεση της τιμής του Nil από αυτή

του μιτογόνου και του αντιγόνου αντίστοιχα. Ειδικότερα η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 10.

Πίνακας 10

CMV – Nil (IU/ml)	Mitogen-Nil (IU/ml)	QFN-CMV αποτελέσματα	Ερμηνεία αποτελεσμάτων
<0.2	≥0.5	Μη αντίδραση (Αρνητικό)	Μη ανιχνεύσιμη ανοσία έναντι του CMV
≥0.2	Οποιοδήποτε	Αντίδραση (Θετικό)	Ανιχνεύσιμη ανοσία έναντι του CMV
<0.2	<0.5	Μη προσδιορισίμο	Απροσδιόριστη ανοσιακή απάντηση στον CMV

Αναλυτικά τα βήματα της μεθόδου QuantiFERON®-CMV έχουν ως εξής :

1. Συλλογή αίματος

Συλλέγουμε 1 ml αίματος με φλεβοκέντηση σε καθένα από τα 3 QuantiFERON®-CMV σωληνάκια συλλογής αίματος τα οποία πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία μεταξύ 17–25°C κατά τη στιγμή της λήψης. Είναι σημαντικό το γέμισμα των σωληναρίων να γίνεται αργά για το λόγο αυτό κρατάμε τη βελόνα 2-3 δευτερόλεπτα μετά τη διακοπή της ροής προτού αποσύρουμε. Εάν το επίπεδο του αίματος ξεπερνά το προκαθορισμένο όριο σε οποιοδήποτε σωληνάριο λαμβάνουμε νέο δείγμα.

2. Ανακίνηση σωληναρίου

Αμέσως μετά τη λήψη, ανακινούμε τα σωληνάκια 10 φορές με τόση ένταση ώστε το αίμα να επαλείψει το εσωτερικό τους. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζουμε τη διάλυση των αντιγόνων εντός του δείγματος. Υπερβολική ανακίνηση μπορεί να προκαλέσει ρήξη της εσωτερικής γέλης και να επηρεάσει το αποτέλεσμα.

3. Επώαση

Η επώαση των δειγμάτων πρέπει να γίνεται σύντομα, εντός 16 ωρών από τη συλλογή. Τα σωληνάκια επωάζονται σε όρθια θέση στους 37°C ±1°C για 16-24 ώρες. Δεν απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες υγρασίας ή CO₂. Εάν η επώαση δεν γίνει άμεσα, συστήνεται εκ νέου ανακίνηση των σωληναρίων 10 φορές προ της εισαγωγής τους στον κλίβανο.

4. Φυγοκέντρηση

Φυγοκεντρούμε τα σωληνάκια στα 2000-3000 x g (RCF) για 15 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας χρησιμοποιούμε ήπιους χειρισμούς προκειμένου

να αποφύγουμε την ανάμειξη του πλάσματος. Το πλάσμα εντός των φυγοκεντρημένων σωληναρίων μπορεί να παραμείνει σταθερό για 28 ημέρες όταν φυλάσσεται στους 2–8°C.

5. Συλλογή πλάσματος

Η συλλογή του πλάσματος γίνεται με τη βοήθεια πιπέτας. Χρειάζεται προσοχή κατά τους χειρισμούς ώστε να αποφύγουμε την ανάμειξη του υπερκείμενου πλάσματος καθώς και τον τραυματισμό της επιφάνειας της γέλης. Εάν η QuantiFERON®-CMV ELISA πρόκειται να πραγματοποιηθεί άμεσα τότε τα δείγματα του πλάσματος μπορούν να τοποθετηθούν απευθείας στη μικροπλάκα εργασίας. Διαφορετικά τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία 2–8°C για 28 ημέρες ή κάτω από τους –20°C για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους.

6. QuantiFERON®-CMV ELISA

Η δοκιμασία QuantiFERON®-CMV είναι εμπορικά διαθέσιμη και διατίθεται από την εταιρεία Qiagen. Κάθε συσκευασία περιλαμβάνει τα εξής :

- Λωρίδες μικροπλάκας	24×8 πηγαδάκια
- Λυοφιλοποιημένη ανθρώπινη IFN-γ(standard)	1 φιαλίδιο
- Διάλυμα αραίωσης (green diluent)	1× 30 ml
- Λυοφιλοποιημένο σύζευγμα(conjugate) συμπυκνωμένο 100×	1× 0.3 ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος συμπυκνωμένο 20×	1×100 ml
-Διάλυμα ενζυμικού υποστρώματος(substrate)	1× 30 ml
- Διάλυμα ενζυμικής παύσης	1× 15 ml

3.2. Διαδικασία

1. Αφήνονται όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον μία ώρα ($22^{\circ} \text{C} \pm 5^{\circ} \text{C}$) εκτός από το conjugate.
2. Αφαιρούνται οι σειρές των βοθρίων που δεν θα χρησιμοποιηθούν και φυλάσσονται.
3. Πραγματοποιείται η ανασύσταση του standard με τελική συγκέντρωση 8 IU/ml με απεσταγμένο νερό βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Από το ανασυσταθέν standard παρασκευάζονται 4 διαλύματα IFN- γ με green diluent: Το S1 με συγκέντρωση 4 IU/ml, το S2 με συγκέντρωση 1 IU/ml, το S3 με συγκέντρωση 0.25 IU/ml και το S4 με συγκέντρωση 0 IU/ml (δηλαδή μόνο green diluent). Τα standard χρησιμοποιούνται εις διπλούν.
4. Πραγματοποιείται η ανασύσταση του conjugate με 0.3 ml απεσταγμένο νερό. Αφήνεται χωρίς ανάδευση 10 λεπτά όρθιο και 5 λεπτά ανάποδα. Στη συνέχεια αναμιγνύεται απαλά. Ακολουθεί η διάλυση της απαραίτητης ποσότητας από το ανασυσταμένο conjugate με green diluent ανάλογα με τον αριθμό των σειρών που θα χρησιμοποιηθούν.
5. Ανακινούμε τα πλάσματα πριν η διαδικασία έτσι ώστε η IFN- γ να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη.
6. Προσθέτουμε 50 μl από το αντιδραστήριο σύζευξης (conjugate) σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας εργασίας QuantiFERON-CMV ELISA με πολυκάναλη πιπέττα.
7. Στη συνέχεια προσθέτουμε 50 μl από το κάθε εξεταζόμενο δείγμα ή τα standards στα αντίστοιχα πηγαδάκια όπως φαίνεται ενδεικτικά στον παρακάτω πίνακα 11 και ανακινούμε για 1 λεπτό.

Πίνακας 11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	9N	9A	9M					
B	2N	2A	2M	S2	10N	10A	10M					
C	3N	3A	3M	S3	11N	11A	11M					
D	4N	4A	4M	S4	12N	12A	12M					
E	5N	5A	5M	S1	13N	13A	13M					
F	6N	6A	6M	S2	14N	14A	14M					
G	7N	7A	7M	S3	15N	15A	15M					
H	8N	8A	8M	S4	16N	16A	16M					

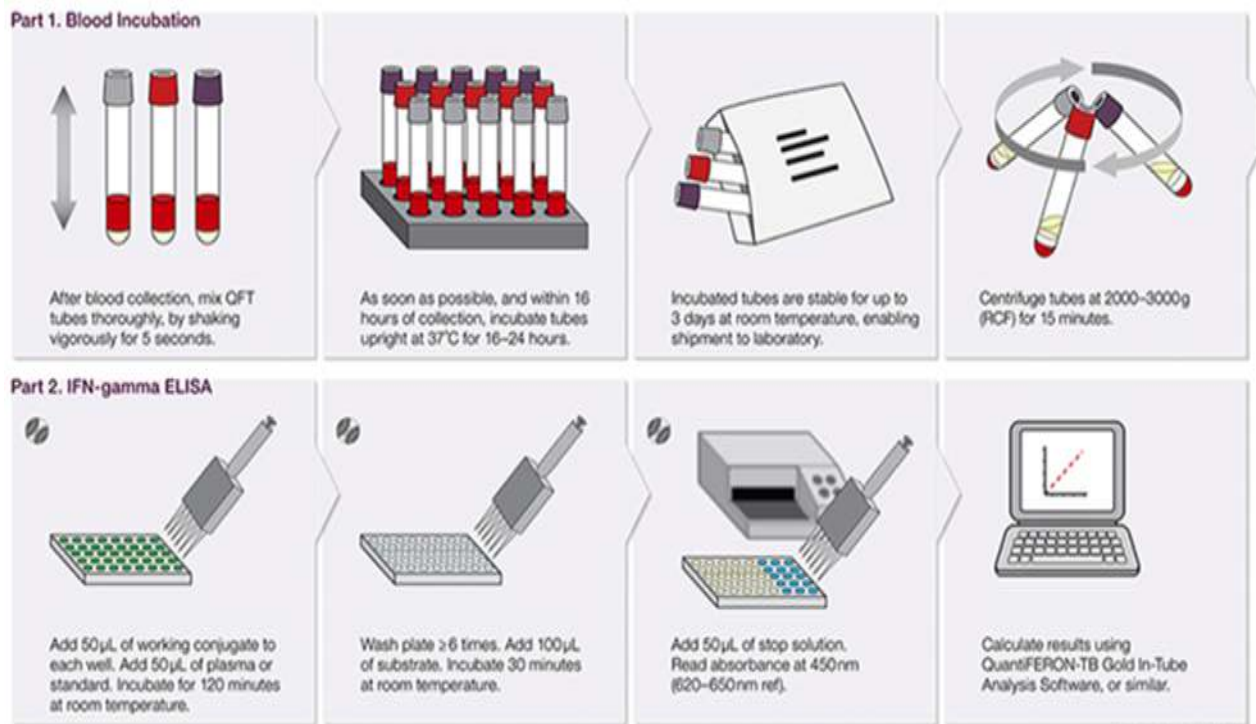
Προτεινόμενη διάταξη μικροπλάκας: S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4(Standard 4),1N(Sample1, Nil control plasma),1A (Sample 1, CMV Antigen plasma), 1M (Sample1, Mitogen control plasma).

8. Γίνεται επώαση για 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
9. Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνεται αραίωση του πλυστικού διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί πλύσιμο της πλάκας ≥ 6 φορές με 400 μl από το διάλυμα αυτό.
10. Προσθέτουμε 100 μl από το διάλυμα υποστρώματος (substrate), ανακινούμε για 1 λεπτό και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου .
11. Προσθέτουμε 50 μl από το διάλυμα παύσης(stop solution) προκειμένου να τερματίσουμε την αντίδραση και ανακινούμε για 1 λεπτό.
12. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 nm με φίλτρα αναφοράς 620–650 nm
13. Ο υπολογισμός και η ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων γίνεται με βάση το πρόγραμμα QuantiFERON®-CMV Analysis Software που παρέχεται από την εταιρεία Qiagen. Το πρόγραμμα εκτελεί τον έλεγχο ποιότητας της δοκιμασίας, δημιουργεί μια καμπύλη

για τα standards με βάση τις οπτικές τους απορροφήσεις αφαιρώντας το μηδενικό standard, Στη συνέχεια η οπτική απορρόφηση κάθε δείγματος συγκρίνεται με την καμπύλη των standards και καταυτόν τον τρόπο υπολογίζεται η συγκέντρωση της IFN- γ σε IU/ml. Το ανώτερο όριο ανίχνευσης IFN- γ ήταν 10 IU/ml. Σε περίπτωση που προέκυπταν δείγματα με τιμές IFN- γ μεγαλύτερες από το όριο αυτό γινόταν αραίωση στα αντίστοιχα CMV Antigen και Mitogen 1/10 ώστε να αυξηθεί το εύρος της ανίχνευσης στην τιμή \leq 100 IU/ml.

Σχηματικά η περιγραφή της μεθόδου παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα 15

Σχήμα 15



Σχήμα 15: Απεικόνιση της συλλογής, επώασης των δειγμάτων, αφαίρεσης του πλάσματος, εκτέλεσης διαδικασίας, μέτρησης και υπολογισμού των αποτελεσμάτων.(Qiagen)

3.3. Στατιστική ανάλυση

Η διαχείριση των δεδομένων και όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Microsoft Excel για Windows, v.2010 (Microsoft corp. Redmond, Washington, USA, 2010) και STATA για Windows, v. 8.5, (StataCorp, Texas, USA, 2006). Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή, σταθερή απόκλιση, διάμεση τιμή και εύρος τιμών για κάθε ποσοτική μεταβλητή και ως αριθμός παρατηρήσεων μαζί με το αντίστοιχο ποσοστό για κάθε ποιοτική μεταβλητή.

Για την εκτίμηση των διαφορών των ποσοστών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Fisher's exact test. Η επίπτωση της ιαιμίας από CMV εκτιμήθηκε με τη βοήθεια εκτιμήσεων αθροιστικής επίπτωσης (cumulative incidence). Οι διαφορές στην επίπτωση ιαιμίας από CMV εκτιμήθηκαν με τη χρήση της μη παραμετρικής δοκιμασίας log-rank test (Cochran-Mantel-Haenszel test).

Η εκτίμηση της προβλεπτικής ικανότητας της δοκιμασίας Quantiferon-CMV σε ό,τι αφορά την απουσία επεισοδίου ιαιμίας από CMV στους ασθενείς με προηγηθείσα επανενεργοποίηση του ιού έγινε με τη μη παραμετρική μέθοδο ανάλυσης καμπύλης ευαισθησίας και ειδικότητας - Receiver Operating Characteristic (ROC). Ως αντιπροσωπευτικό όριο διαχωρισμού (cut-off value) χρησιμοποιήθηκε η τιμή IFN- γ >0.2 IU, όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή.

Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες οι τιμές του $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

4. Αποτελέσματα

Κατά την περίοδο Μάρτιος 2010 με Ιούνιο 2012 εντάχθηκαν στην μελέτη 37 παιδιά με κακοήθεις και μη κακοήθεις αιματολογικές παθήσεις, ηλικίας 1-17 ετών τα οποία είχαν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση ανθρώπινων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ) και μελετήθηκαν προοπτικά. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 12.

Πίνακας 12

<i>Ολικός αριθμός ασθενών</i>	37
<i>Φύλο</i>	
Άρρεν	23(62%)
Θήλυ	14(38%)
<i>Διάμεση ηλικία (έτη)</i>	8.5(1-17)
<i>Νόσος</i>	
Κακοήθης	21(57%)
Μη κακοήθης	16(43%)
<i>Είδος μοσχεύματος</i>	
Μυελός οστών	26(70%)
Περιφερικό αίμα	6(16%)
Ομφάλιο αίμα	3(8%)
Μυελός οστών+ Ομφάλιο αίμα	2(6%)
<i>Τύπος Δότη</i>	
Συγγενής	19(51%)
Μη συγγενής	18(49%)

Ορολογική κατάσταση Δότη/Λήπτη	
Δ- / Λ+	12(32%)
Δ+ / Λ+	16(43%)
Δ- / Λ-	7(19%)
Δ+ / Λ-	2(6%)
Σχήμα προετοιμασίας	
TBI	
ΝΑΙ	1(3%)
ΟΧΙ	36(97%)
ΑΤG	
ΝΑΙ	32(86%)
ΟΧΙ	5(14%)
Οξεία νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή (a GVHD)	14(100%)
Δ- / Λ+	6(43%)
Δ+ / Λ+	4(28%)
Δ- / Λ-	3(21%)
Δ+ / Λ-	1(8%)
Χρόνια νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή (c GVHD)	1(3%)
CMV Ιαίμια	19(51%)
CMV Νόσος	2(5%)
Αριθμός θανάτων	8(21%)

Πίνακας 12 :Χαρακτηριστικά ασθενών με ΜΑΑΚ. Δ: δότης, Λ: λήπτης, GVHD: graft versus host disease, TBI: total body irradiation, ATG: anti-thymocyte globulins, CMV: cytomegalovirus

4.1. Παρακολούθηση CMV ιαιμίας

Κατά τη διάρκεια της μελέτης 19 από τους ασθενείς μας παρουσίασαν επανενεργοποίηση του ιού η οποία ήταν κατά κύριο λόγο ασυμπτωματική. Από αυτούς οι 9 παρουσίασαν πολλαπλά επεισόδια ιαιμίας από CMV με μέσο όρο επεισοδίων ανά ασθενή 3 (εύρος 2-5). Δύο παιδιά εμφάνισαν κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα CMV νόσου. Το πρώτο είχε απροσδιόριστη ειδική ανοσιακή απάντηση στον ιό πριν την έναρξη της νόσου, ενώ το δεύτερο παιδί εμφάνισε παροδικά θετική δοκιμασία QuantiFERON®-CMV στις 30 ημέρες μετά την μεταμόσχευση η οποία παρέμεινε αρνητική σε όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις που ακολούθησαν. Η κατανομή της CMV ιαιμίας των ασθενών ανά λογα την ορολογική τους κατάσταση φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα 13

Πίνακας 13

CMV Ορολογική κατάσταση	Δ-/Λ- (7)	Δ+/Λ+ (16)	Δ+/Λ- (2)	Δ-/Λ+ (12)
Ασθενείς με CMV ιαιμία στις 30 μ	0	5(13%)	0	6(50%)
Ασθενείς με CMV ιαιμία στις 100 μ	1(14%)	4(25%)	1(50%)	1(8%)
Ασθενείς με CMV ιαιμία στις 180 μ	0	1(6%)	0	0
Ασθενείς με CMV νόσο	0	0	0	2(16%)

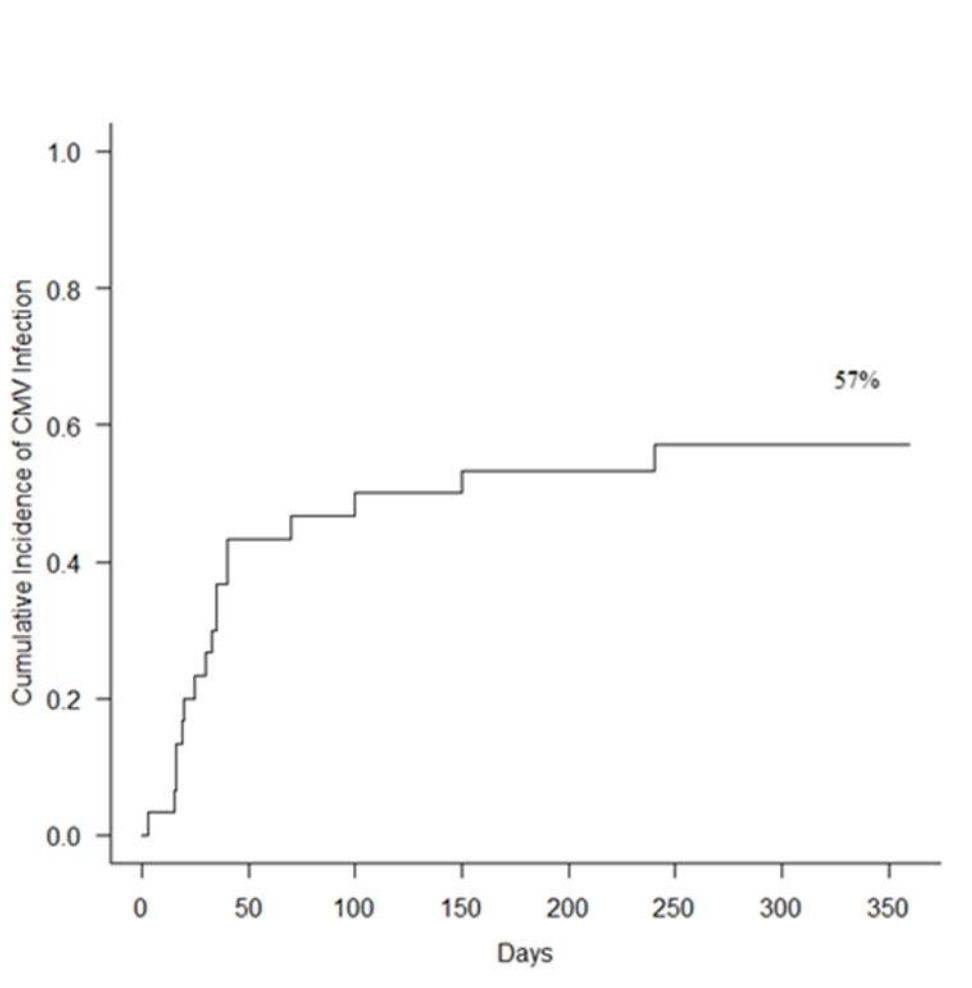
Πίνακας 13: Κατανομή επεισοδίων CMV ιαιμίας και νόσου σε παιδιατρικούς ασθενείς με MAAK. Δ: Δότης, Λ: Λήπτης, μ: μέρες .

Η αθροιστική επίπτωση (cumulative incidence) της επανενεργοποίησης του CMV ήταν 57% για τις ομάδες υψηλού (Δ- / Λ+) και ενδιάμεσου κινδύνου (Δ+ / Λ+, Δ+ / Λ-) όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 16. Η διάμεση τιμή του ιικού

φορτίου που παρουσίασαν οι ασθενείς κατά τη διάρκεια των επεισοδίων ήταν 3720 copies/ml (ενδοτεταρτημοριακό εύρος interquartile range [IQR] 2137.5 – 13000 copies/ml).

Η ομάδα Δ- /Λ- , η οποία περιελάμβανε 7 ασθενείς, αποκλείστηκε από περαιτέρω αναλύσεις ως χαμηλού κινδύνου παρόλα αυτά αναφέρεται στους πίνακες για περιγραφικούς λόγους. Ωστόσο ένας από αυτήν την ομάδα εμφάνισε ιαιμία στις 40 μέρες μετά την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο κατώτερο όριο ανίχνευσης του ιού (500 copies/ml) με τη μέθοδο PCR και έλαβε αγωγή με foscarnet. Ο συγκεκριμένος ασθενής δεν παρουσίασε εξέλιξη σε CMV νόσο, δεν ανέπτυξε ανιχνεύσιμη ειδική T-κυτταρική ανοσία ή CMV ορομετατροπή σε καμία από τις διαδοχικές μετρήσεις που ακολούθησαν.

Σχήμα 16



Σχήμα 16: Cumulative incidence της CMV λοίμωξης για τις ομάδες διάμεσου και υψηλού κινδύνου στις 360 ημέρες από την MAAK.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης μεταξύ των ορολογικά καθορισμένων ομάδων όσον αφορά την εμφάνιση ιαιμίας με τη βοήθεια του Fisher's exact test ήταν στατιστικά σημαντική ($p= 0.016$).

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο στα παιδιά που είχαν υποβληθεί σε MAAK η ιολογική επιτήρηση περιλάμβανε εκτός από τον CMV και άλλους ιούς. Μεταξύ των ασθενών που διαπιστώθηκε επανενεργοποίηση του CMV ανιχνεύθηκαν επίσης EBV σε 5 από αυτούς καθώς επίσης και BKV σε 2 και Adenovirus σε 1 ασθενή.

4.2. Παρακολούθηση της ειδικής CMV ανοσιακής απάντησης

Η συνολική περίοδος παρακολούθησης της ειδικής ανοσιακής απάντησης για τον CMV ήταν 12 μήνες για 25 από τους ασθενείς μας ενώ για τους υπόλοιπους 12 ο χρόνος παρακολούθησης ήταν μικρότερος (1-6 μήνες). Αυτό ήταν αποτέλεσμα είτε θανάτου (8 ασθενείς) είτε απόρριψης του μοσχεύματος (4 ασθενείς). Συνολικά συλλέχθηκαν 207 δείγματα αίματος QuantiFERON-CMV με μέσο όρο 5 δειγμάτων ανά ασθενή (εύρος 2-7).

Προ της μεταμόσχευσης έγιναν μετρήσεις με QuantiFERON-CMV σε 34 από τους ασθενείς. Από αυτούς, οι 17 είχαν αρνητικό αποτέλεσμα (46%), 5 είχαν θετικό (13.5%) και 12 είχαν απροσδιόριστο (32.4%). Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της μετρούμενης CMV κυτταρικής ανοσίας (CMI) πριν τη μεταμόσχευση και της επανενεργοποίησης του ιού στις 30 ημέρες μετά ($p=0.72$)

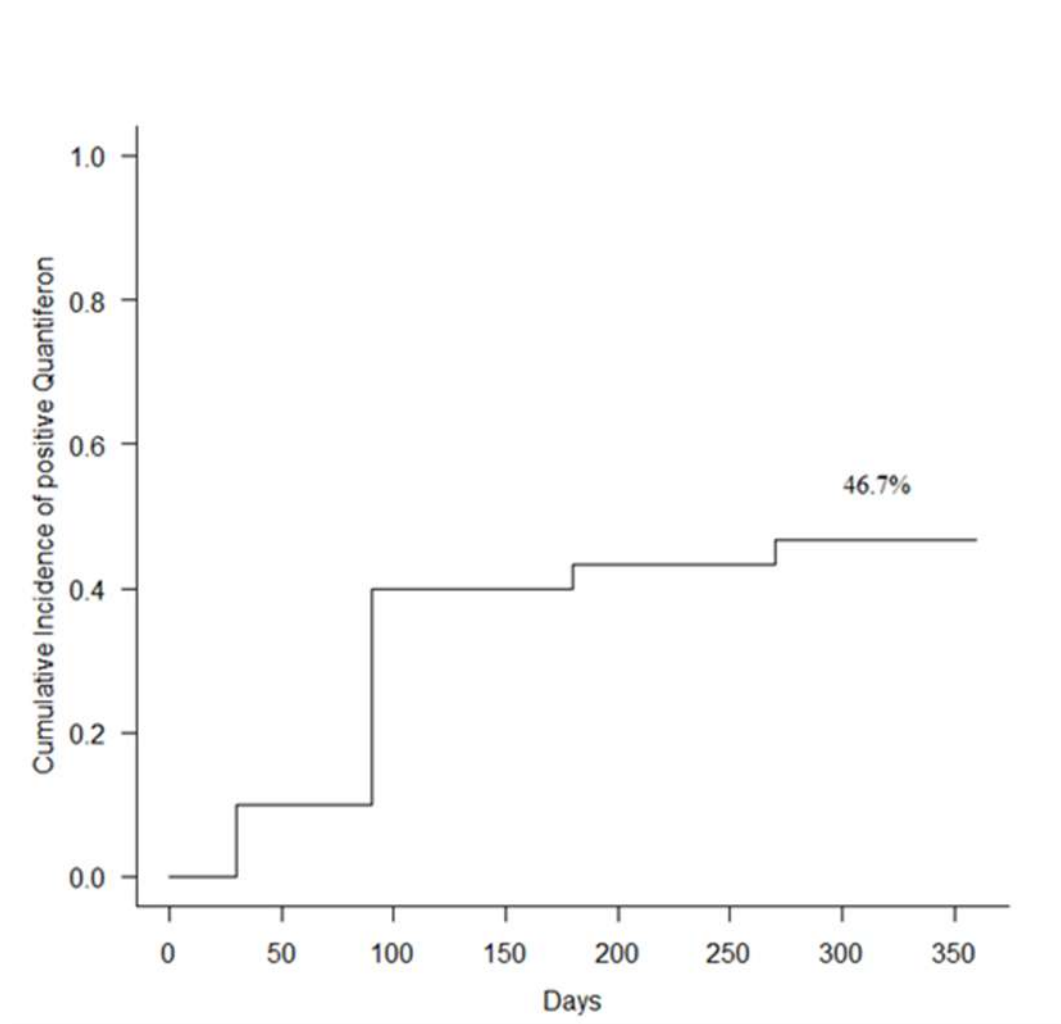
Στο σύνολο των ληφθέντων δειγμάτων αίματος το ποσοστό των απροσδιορίστων αποτελεσμάτων QuantiFERON-CMV ήταν 27% (56/207). Από αυτά πάνω από τα μισά (58.9%) μετρήθηκαν μέσα σε 1-3 μέρες από τη MAAK (33/56).

Στους 12 μήνες που διήρκησε η μελέτη, δεκαπέντε από τους ασθενείς μας αποκατέστησαν σταθερή ειδική για τον CMV ανοσία σε μέση τιμή χρόνου 82 ημερών. Η αθροιστική επίπτωση των θετικών QuantiFERON-CMV αποτελεσμάτων ήταν 46.7% όπως φαίνεται στο σχήμα 1. Στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών μόνο ένας παρουσίασε υποτροπή CMV ιαμίας ενώ στην ομάδα με τα αρνητικά/απροσδιόριστα QuantiFERON-CMV αποτελέσματα, οι ασθενείς βίωσαν περισσότερα του ενός επεισόδια υποτροπών. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση έγινε σε δύο ασθενείς οι οποίοι ανέπτυξαν σταθερή ειδική ανοσία χωρίς όμως να προηγηθεί ανιχνεύσιμη ιαμία από CMV. Η ορολογική κατάσταση των συγκεκριμένων ασθενών ήταν Δ+/Λ+ και Δ-/Λ+ .

Η μέση διάρκεια της ιαμίας για αυτούς που είχαν θετικά QuantiFERON-CMV αποτελέσματα ήταν 14 ημέρες ενώ για αυτούς με αρνητικά 23 ημέρες και από τη μεταξύ τους σύγκριση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα

($p=0.24$). Αντίστοιχα και η διάμεση διάρκεια ιαιμίας που εκτιμήθηκε με Mann-Whitney U test ήταν 21 μέρες (7,56) για τους ασθενείς με αρνητικό QuantiFERON-CMV και 21 μέρες (7,49) για αυτούς με θετικό QuantiFERON-CMV ($p=0.43$).

Σχήμα 17

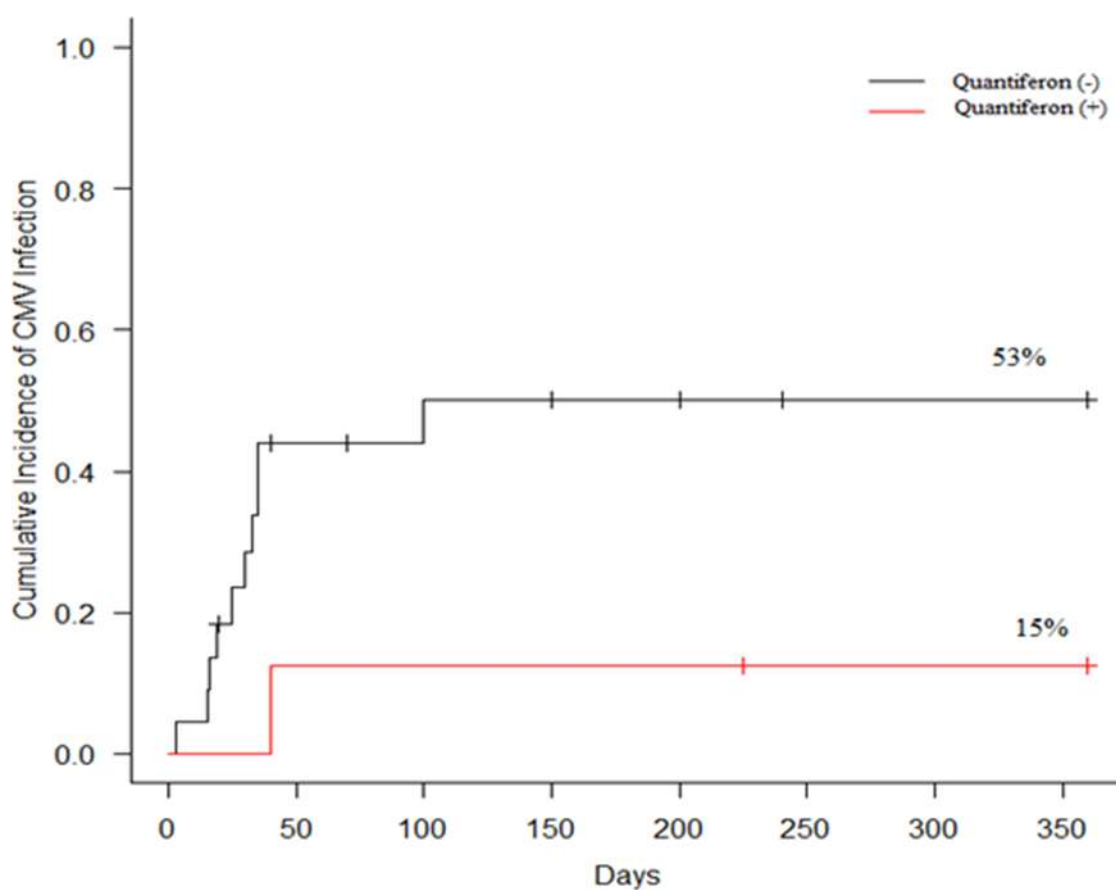


Σχήμα 17: Cumulative incidence της ειδικής για τον CMV ανοσίας (θετικό Quantiferon-CMV test) έως 360 ημέρες μετά την MAAK.

Μελετώντας την ομάδα που ανέπτυξε σταθερή ειδική ανοσία βρέθηκε ότι σε αυτή η αθροιστική επίπτωση της επαναδραστηριοποίησης του CMV ήταν σαφώς χαμηλότερη από την αντίστοιχη της ομάδας που δεν ανέπτυξε ειδική ανοσία (15% versus 53%; $p=0.023$). Σχήμα 18

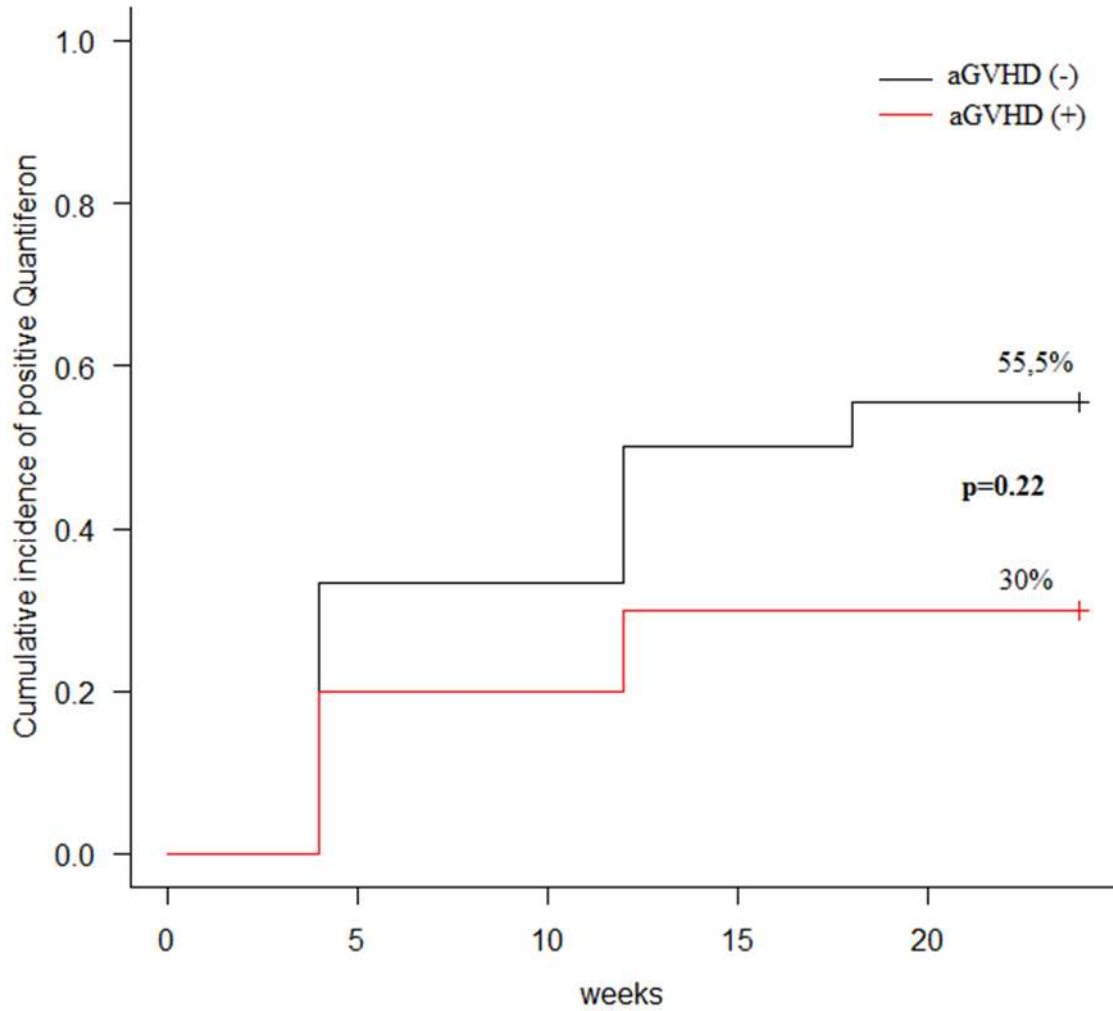
Η παρουσία της οξείας νόσου έναντι μοσχεύματος (a GVHD) δεν φάνηκε να επηρεάζει την ανοσιακή αποκατάσταση των ασθενών έναντι του CMV στην παρούσα μελέτη. (30% versus 55.5%; $p=0.22$). Σχήμα 19

Σχήμα 18



Σχήμα 18: Είναι φανερό η σχέση μεταξύ της σταθερής ειδικής για τον CMV ανοσίας και της CMV λοίμωξης όπου η cumulative incidence είναι χαμηλότερη (15%) στους ασθενείς θετικά Quantiferon-CMV αποτελέσματα (κόκκινη γραμμή)

Σχήμα 19



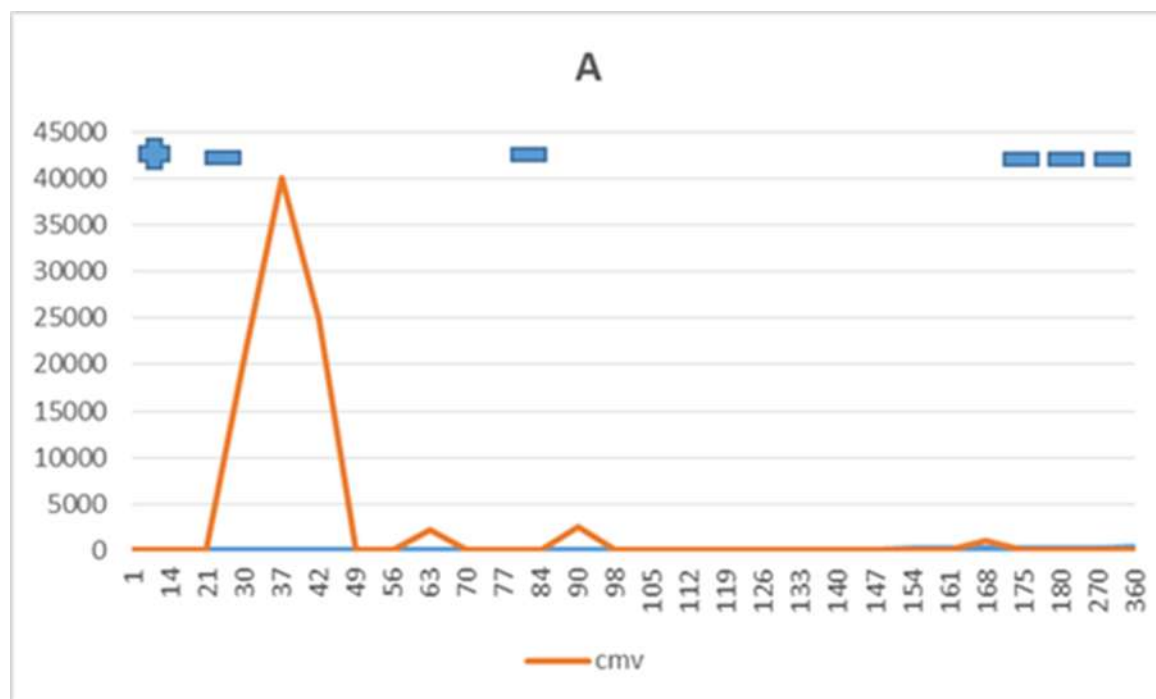
Σχήμα 19: Η αποκατάσταση της ειδικής ανοσιακής απάντησης στον CMV δεν επηρεάζεται από την παρουσία GVHD στον εξεταζόμενο πληθυσμό. (κόκκινη γραμμή)

Προκειμένου να αναδειχθεί ο τρόπος με τον οποίο συσχετίζονται η ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας μετά τη μεταμόσχευση με την ενεργοποίηση του ιού στους μεταμοσχευμένους ασθενείς παραθέτουμε 3 περιπτώσεις παιδιών με ΜΑΑΚ από τη μελέτη μας. Σχήμα 20

1^η περίπτωση

Ο πρώτος ασθενής (Σχήμα 20Α) αφορούσε αγόρι 9,5 ετών με απλαστική αναιμία και ανήκε στην ομάδα Δ+/Λ+, ο οποίος έλαβε μόσχευμα μυελού των οστών από μη συγγενή δότη. Παρουσίασε ένα θετικό αποτέλεσμα QuantiFERON-CMV προ μεταμόσχευσης και στη συνέχεια αρνητικά αποτελέσματα σε όλες τις μετρήσεις που ακολούθησαν. Το αγόρι εμφάνισε πολλαπλά υποτροπιάζοντα επεισόδια επανενεργοποίησης του ιού για τα οποία έλαβε παρατεταμένη αγωγή με ganciclovir και foscarnet, καθώς και aGVHD το οποίο αντιμετωπίστηκε με κορτιζόνη. Ο ασθενής κατέληξε ένα χρόνο αργότερα.

Σχήμα 20Α

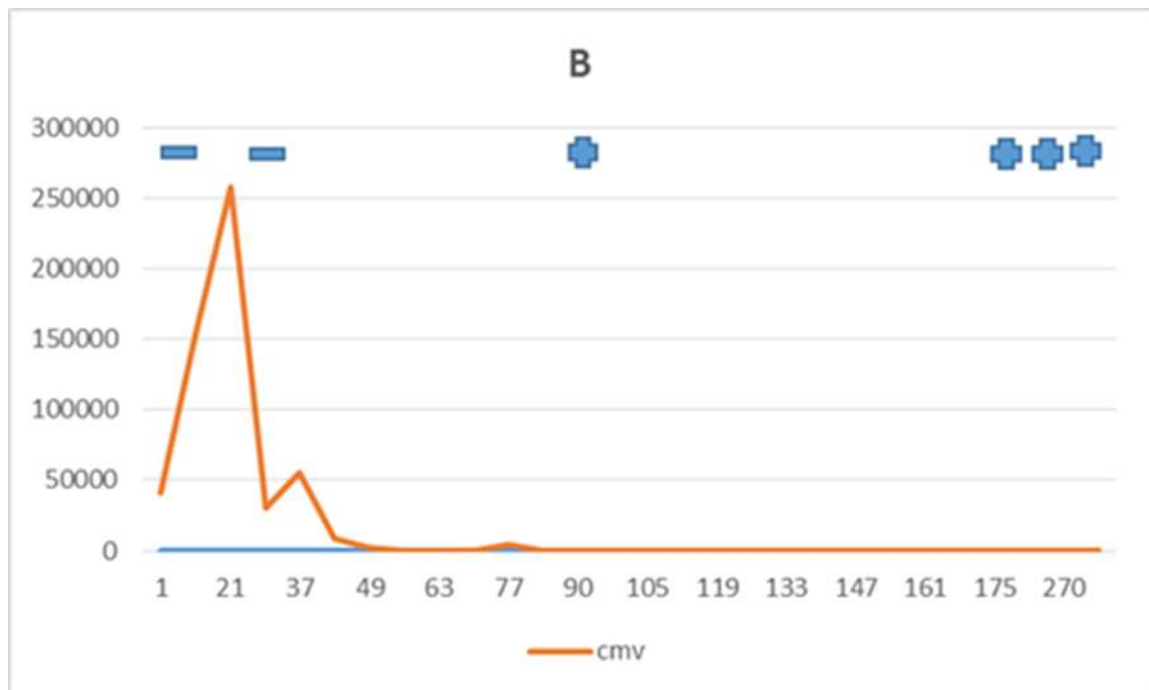


Σχήμα 20Α: Αγόρι με απλαστική αναιμία με υποτροπιάζοντα επεισόδια CMV ιαιμίας σε συνδυασμό με τα διαδοχικά αρνητικά αποτελέσματα QuantiFERON-CMV. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τα ιικά φορτία. (+) θετικό QuantiFERON-CMV, (-) αρνητικό QuantiFERON-CMV

2^η περίπτωση

Ο δεύτερος ασθενής (Σχήμα 20B) αφορούσε ένα 5 μηνών με σύνδρομο Wiskott-Aldrich και άνηκε στην ομάδα Δ+/Λ+ ο οποίος έλαβε μόσχευμα μυελού των οστών από μη συγγενή δότη. Στις μετρήσεις QuantiFERON-CMV που πραγματοποιήθηκαν προ της μεταμόσχευσης και στην ενωρίς φάση μετά από αυτή είχε αρνητικά αποτελέσματα. Την περίοδο αυτή εμφάνισε επανειλημμένα επεισόδια αιμίας τα οποία αντιμετωπίστηκαν με foscarnet. Ωστόσο μετά την 90^η μέρα της μεταμόσχευσης παρουσίασε σταθερά θετικά αποτελέσματα και δεν εμφάνισε νέα επεισόδια αιμίας.

Σχήμα 20B

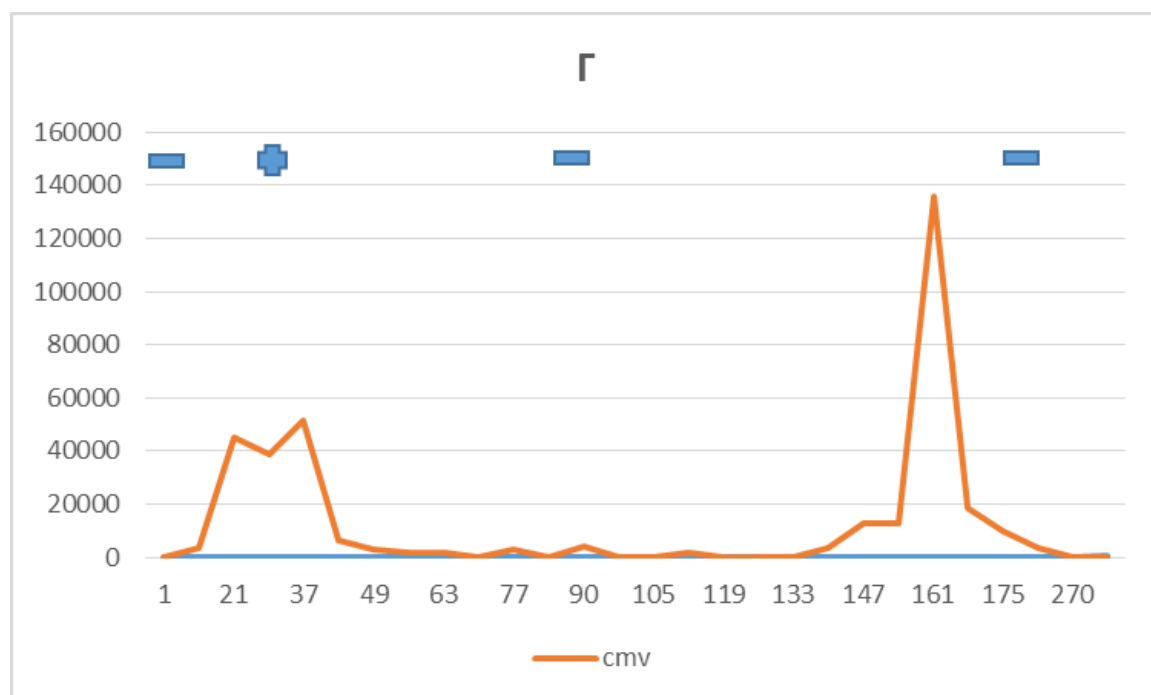


Σχήμα 20B: Αγόρι με σύνδρομο Wiskott-Aldrich το οποίο μετά την εγκατάσταση θετικών Quantiferon-CMV αποτελεσμάτων δεν παρουσίασε ξανά επεισόδια αιμίας. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τα ιικά φορτία. (+) θετικό Quantiferon-CMV, (-) αρνητικό Quantiferon-CMV

3^η περίπτωση

Ο τρίτος ασθενής (Σχήμα 20Γ) ήταν ένα 17 μηνών αγόρι με ανοσοανεπάρκεια και άνηκε στην ομάδα Δ-/Λ+ και έλαβε ομφαλοπλακουντιακό μόσχευμα από μη συμβατό δότη. Ο ασθενής παρουσίαζε διαδοχικά αρνητικά αποτελέσματα QuantiFERON-CMV σε όλες τις μετρήσεις εκτός από μια παροδική θετική μέτρηση που έγινε στις 30 ημέρες από τη μεταμόσχευση. Το αγόρι υπέφερε από υποτροπιάζοντα επεισόδια CMV ιαιμίας με χαρακτηριστική δικόρυφη κατανομή με τα χαμηλότερα ιικά φορτία να παρατηρούνται μετά το θετικό QuantiFERON-CMV την 30η μέρα. Την 175η ημέρα μετά την μεταμόσχευση παρουσίασε απόρριψη του μοσχεύματος, όπου και είχε εκ νέου υποτροπή CMV λοίμωξης με υψηλότερα ιικά φορτία.

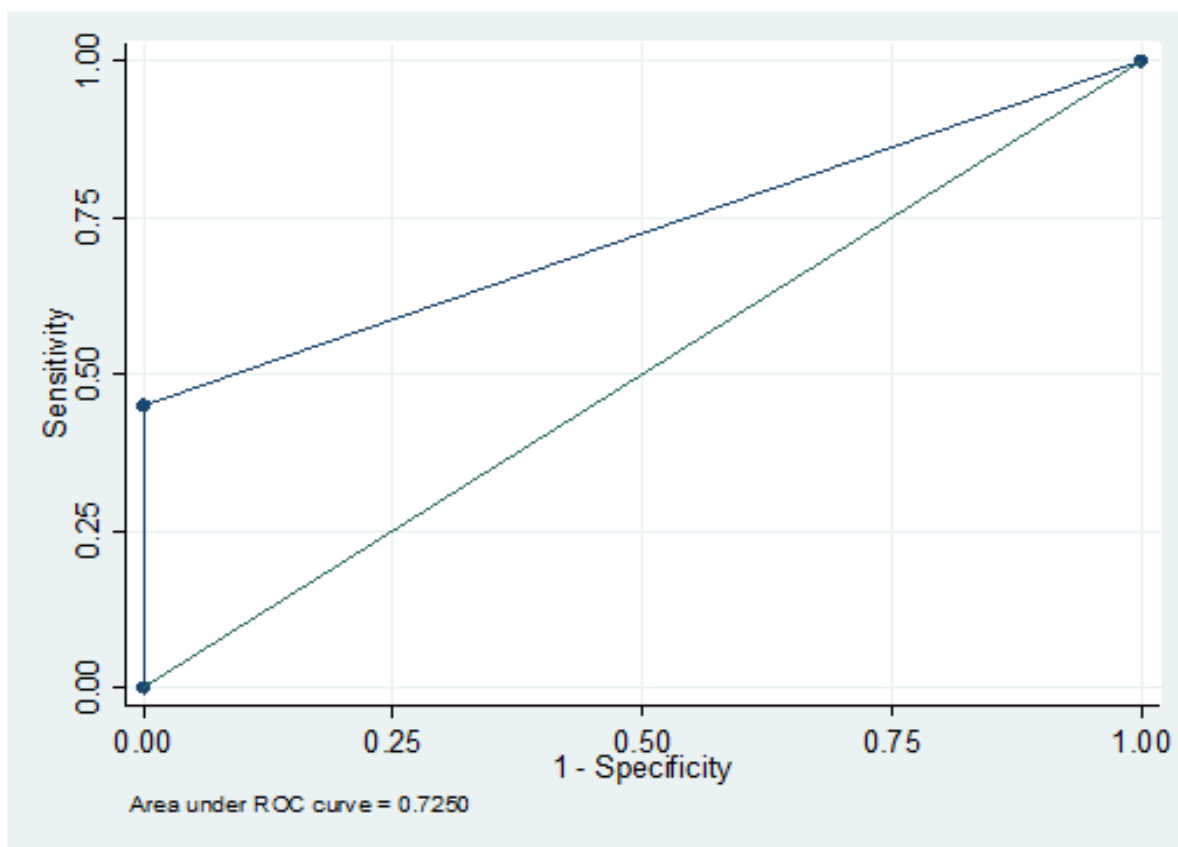
Σχήμα 20Γ



Σχήμα 20Γ: Αγόρι με ανοσοανεπάρκεια το οποίο μετά από μια θετική Quantiferon-CMV μέτρηση στις 30 μέρες από τη ΜΑΑΚ δεν κατάφερε να εγκαταστήσει σταθερή ειδική ανοσία και την 175^η μέρα απέρριψε το μόσχευμα. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τα ιικά φορτία. (+) θετικό Quantiferon-CMV, (-) αρνητικό Quantiferon-CMV.

Προκειμένου να υπολογιστεί η προβλεπτική αξία της δοκιμασίας QuantiFERON-CMV για την εμφάνιση ιαιμίας από τον κυτταρομεγαλοϊό έγινε ανάλυση ROC (Receiver operating characteristic analysis) σε όλους τους ασθενείς που βρίσκονταν σε κίνδυνο υποτροπών. Η ανάλυση επέδειξε περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under curve AUC) 0.725. Χρησιμοποιήθηκε το όριο ανίχνευσης της IFN- γ >0.2 IU όπως έχει δοθεί από την κατασκευάστρια εταιρεία το οποίο είχε ευαισθησία 45% και ειδικότητα 100% στην πρόβλεψη των ασθενών να εμφανίσουν υποτροπές ιαιμίας από CMV. Σχήμα 21

Σχήμα 21

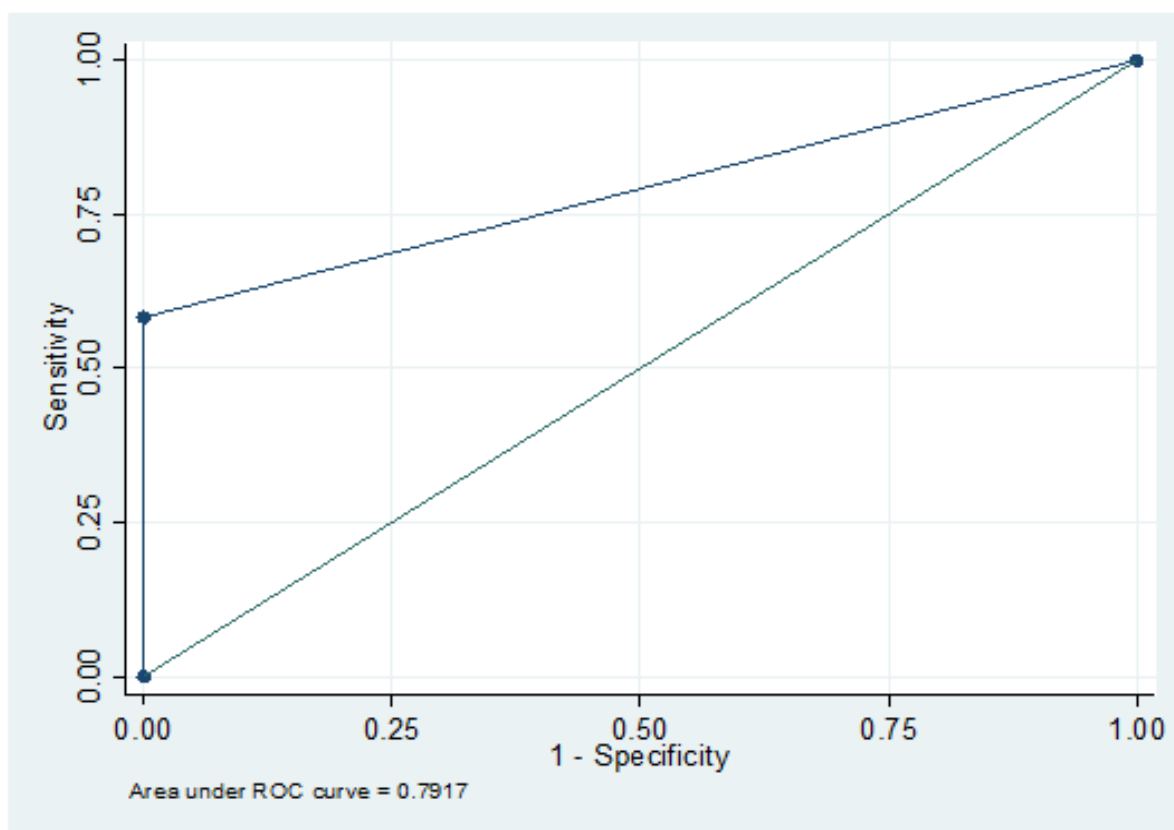


Σχήμα 21: Receiver operating characteristic (ROC) καμπύλη που περιγράφει τις διαγνωστικές παραμέτρους της δοκιμασίας Quantiferon-CMV στους ασθενείς με MAAK με κίνδυνο υποτροπών. Area under the curve=0.725, SE 0.057

Στη συνέχεια απομονώσαμε τους ασθενείς που είχαν ένα τουλάχιστον επεισόδιο επανενεργοποίησης του ιού και υπολογίσαμε την προβλεπτική αξία της δοκιμασίας για την μη εμφάνιση ιαιμίας από CMV για αυτήν την ομάδα. Η ROC ανάλυση χρησιμοποιώντας το όριο ανίχνευσης IFN- γ >0.2 IU, επέδειξε AUC 0.791 και ευαισθησία 58.3% και ειδικότητα 100% στην πρόβλεψη απουσίας ιαιμίας στους ασθενείς με προηγμένα επεισόδια CMV ιαιμίας.

Σχήμα 22

Σχήμα 22



Σχήμα 22: Receiver operating characteristic (ROC) καμπύλη που περιγράφει τις διαγνωστικές παραμέτρους της δοκιμασίας Quantiferon-CMV στην ανίχνευση αρνητικής ιαιμίας στους ασθενείς με MAAK με κίνδυνο υποτροπών. Area under the curve=0.791

5. Συζήτηση

Η αξιολόγηση της ειδικής κυτταρικής ανοσιακής απάντησης παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορους τομείς της ιατρικής διάγνωσης και παρακολούθησης των ασθενών, στην ανάπτυξη των εμβολίων και γενικότερα στην εξέλιξη της επιστημονικής έρευνας (Kern F et al, 2006). Σε αυτή την προοπτική μελέτη αναδείχθηκε η κλινική χρησιμότητα της δοκιμασίας QuantiFERON®-CMV στην εκτίμηση του κινδύνου ιαμίας σε έναν πληθυσμό 37 παιδιατρικών ασθενών μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Βασικό εύρημα αυτής της κοορτής ήταν ότι η αθροιστική επίπτωση (cumulative incidence) της CMV ιαμίας ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε ασθενείς με εδραιωμένη ανοσιακή απάντηση με τη δοκιμασία QuantiFERON®-CMV ($p=0.023$). Πράγματι, η ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας σε αυτούς τους ασθενείς φάνηκε να μειώνει τον κίνδυνο υποτροπών της CMV λοίμωξης. Στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών μόνο ένας παρουσίασε ένα επεισόδιο υποτροπής CMV ιαμίας, ενώ στην ομάδα με τα αρνητικά/απροσδιόριστα QuantiFERON®-CMV αποτελεσματα έλαβαν χώρα περισσότερα του ενός επεισόδια. Το εύρημά μας συμφωνεί με υπάρχοντα δεδομένα σε πληθυσμούς ενηλίκων ασθενών, που υποστήριξαν ότι η ανάκτηση ειδικών CD4+ και CD8+ T-κυττάρων ή αντίθετα η έλλειψή τους είχε άμεση συσχέτιση με τον έλεγχο και την προστασία από τον CMV μετά τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων (Crough T et al, 2007, Manuel O et al, 2013) ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. (Tey S-K et al, 2013, Krawczyk A et al, 2018)

Όσον αφορά τη συχνότητα της CMV λοίμωξης στον εξεταζόμενο πληθυσμό παρατηρήθηκε ιαμία σε παραπάνω από τους μισούς ασθενείς (19/37). Οι 17 από αυτούς ήταν οροθετικοί λήπτες (Λ+) εκ των οποίων οι 10 έλαβαν μόσχευμα από οροθετικό δότη (Δ+) και οι υπόλοιποι 7 από οροαρνητικό δότη (Δ-). Μόνο δύο ήταν οροαρνητικοί (Λ-) οι οποίοι έλαβαν ο ένας μόσχευμα από δότη θετικό και ο άλλος από αρνητικό (Δ-). Όπως αναμενόταν, η επίπτωση της επανενεργοποίησης του ιού ήταν αυξημένη κυρίως στους οροθετικούς λήπτες ανεξαρτήτως της ορολογικής κατάστασης του δότη. Πράγματι εννέα από αυτούς εμφάνισαν πολλαπλά επεισόδια ιαμίας ενώ μόνο δυο ανέπτυξαν

νόσο από CMV χάριν κυρίως της στενής παρακολούθησης και έγκαιρης παρέμβασης. Το εύρημα μας αυτό έρχεται να επιβεβαιώσει αντίστοιχα δεδομένα προηγούμενων μελετών όπου η ορολογική CMV ταυτότητα του λήπτη προ της μεταμόσχευσης ήταν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ιαιμίας από CMV (Yoon HS et al, 2009, Patel SR et al, 2005) και την επίπτωση της να είναι υψηλότερη στους οροθετικούς λήπτες (George B et al, 2010).

Βέβαια και οι 19 ασθενείς με ιαιμία έλαβαν προληπτική θεραπεία βάσει του πρωτοκόλλου το οποίο προέβλεπε χορήγηση θεραπείας όταν ο ιός ανιχνευόταν στο ελάχιστο όριο των 500 copies / ml. Επομένως η ιαιμία τους υποχώρησε κατόπιν αντιικής αγωγής και δεν είναι δυνατόν να προβλεφθούν οι πιθανές επιπλοκές που συνδέονται με την επίδραση του ιού σε αυτούς. Γενικά στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνητών όσον αφορά το όριο του ιικού φορτίου πέρα από το οποίο πρέπει να ξεκινάει η προληπτική θεραπεία, το οποίο κυμαίνεται από 600 έως 10.000 copies / ml (Boeckh M et al, 2009, Kotton CN et al, 2013). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η υποκλινική CMV ιαιμία είναι συνήθης στους μεταμοσχευμένους ασθενείς, είναι πιθανό ότι ασθενείς με χαμηλά ιικά φορτία εξουδετερώνουν τον ιό χωρίς θεραπεία αφού όμως πρώτα έχουν εγκαταστήσει ειδική CMV ανοσιακή απάντηση. Αυτό φάνηκε στη μελέτη των Lisboa L και συνεργατών που πραγματοποιήθηκε σε λήπτες συμπαγών οργάνων, όπου οι ασθενείς με χαμηλά ιικά φορτία (διάμεση τιμή 1140 copies/ml) και θετική QuantiFERON®-CMV παρουσίασαν αυτόματη υποχώρηση της ιαιμίας σε ποσοστό 92.3%.

Ενδιαφέρουσα δική μας παρατήρηση έγινε σε δύο παιδιά, τα οποία ανέπτυξαν σταθερή ειδική ανοσία χωρίς όμως να προηγηθεί ανιχνεύσιμη ιαιμία από CMV. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε αδιαφοροποίητα προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το θύμο αδένιο ο οποίος έχει μεγαλύτερη αναγεννητική ικανότητα στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Επιπλέον στην περίπτωση του ασθενή Δ+/Λ+ θα μπορούσε να αποδίδεται σε Τ-κύτταρα μνήμης προερχόμενα από τον δότη ενώ στην περίπτωση του δεύτερου ασθενούς που ήταν Δ-/Λ+ από τα εναπομείναντα κύτταρα μνήμης του λήπτη. (Guerin V et al 2010)

Στην παρούσα μελέτη μόνο ένας ασθενής που ανήκε στην ομάδα Δ-/Λ- παρουσίασε ένα μοναδικό επεισόδιο ιαιμίας από CMV στο κατώτερο όριο ανίχνευσης του ιού. Εκτιμώντας αναδρομικά αυτό το μη αναμενόμενο αποτέλεσμα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μεμονωμένο γεγονός χωρίς κλινικές επιπτώσεις και για αυτό το λόγο θεωρήθηκε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Πράγματι ο ασθενής αυτός δεν ανέπτυξε ποτέ ειδική για τον ΙΟ ανοσία και παρέμεινε αρνητικός σε όλες τις ακόλουθες μετρήσεις.

Βασική διαπίστωση από την εφαρμογή της δοκιμασίας QuantiFERON®-CMV ήταν ότι η εξέλιξη της ειδικής για τον CMV ανοσίας είναι δυναμική κυρίως στα πρώιμα στάδια μετά την MAAK. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν ένα ή περισσότερα αρνητικά ή απροσδιόριστα αποτελέσματα με την πλειονότητα των απροσδιόριστων (58.9%) να ανευρίσκονται νωρίς μετά την μεταμόσχευση (1-3 μέρες) σε 32 από τους 33 ασθενείς που ελέγχθηκαν. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της προϋπάρχουσας ανοσοκαταστολής από την υποκείμενη νόσο ή την παρατεταμένη και εντατική χημειοθεραπεία πριν τη μεταμόσχευση σε συνδυασμό με την εφαρμογή ανοσοκατασταλτικού σχήματος προετοιμασίας όπως η αντι-θυμική σφαιρίνη (ATG), μέχρις ώτου να γίνει η εγκατάσταση του μοσχεύματος

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία στους ασθενείς με MAAK η αποκατάσταση των Τ-κυττάρων γίνεται μέσω δυο μονοπατιών, ένα θυμοεξαρτώμενο (παραγωγή θυμοκυττάρων) και ένα ανεξάρτητο από τον θύμο (αδιαφοροποίητα Τ-κύτταρα προερχόμενα από το μόσχευμα). (Surh CD et al, 2008) Έχει φανεί ότι τα παιδιά έχουν καλύτερη λειτουργία του θύμου αδένος και οι παιδιατρικοί CMV θετικοί λήπτες παρουσιάζουν γρηγορότερη αποκατάσταση των CD8+ Τ-κυττάρων όπως και των CD4+ σε σχέση με τους αντίστοιχους ενήλικες ασθενείς. (Renard C et al, 2011) Οι ιστοί τους αναγεννιούνται γρηγορότερα από τους ενήλικες μετά από την προπαρασκευαστική χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Τέλος τα παιδιά είναι πιθανότερο να λάβουν αναλογικά μεγαλύτερες δόσεις αιμοποιητικών κυττάρων κατά την μεταμόσχευση καθώς οι δότες τους είναι συχνότερα ενήλικες. Ως εκ τούτου, η ανοσοκαταστολή που παρατηρείται στα παιδιά μετά από μεταμόσχευση

αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι λιγότερο σοβαρή από ότι στους ενήλικες. (Yoon HS et al, 2009) Επιπρόσθετα η συνολική επίπτωση της CMV επανενεργοποίησης είναι σημαντικά χαμηλότερη με ποσοστά που κυμαίνονται από 11% έως 40% σε σχέση με τους ενήλικες με τα αντίστοιχα ποσοστά να είναι μεταξύ 60% με 70%. (Crisinel PA et al 2013, Hakki M et al 2003)

Από αρκετές μελέτες φαίνεται ότι η ανοσιακή αποκατάσταση μπορεί να καθυστερήσει λόγω της επίδρασης της οξείας ή χρόνιας νόσου μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD). (Seggewiss R et al, 2010) Ωστόσο στους παιδιατρικούς ασθενείς που εξετάστηκαν σε αυτή την κοορτή η παρουσία GVHD δεν επηρέασε δυσμενώς την ειδική για τον CMV ανοσία. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την εργασία των Hakki και συνεργατών όπου αναφέρεται ότι η καθυστέρηση της ανάκτηση της T-κυτταρικής ανοσίας σχετιζόταν με παράγοντες όπως οι χαμηλοί αριθμοί CD4+ και CD8+ κυττάρων, τη χρησιμοποίηση μυελού των οστών ως πηγή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και τη χρήση υψηλών δόσεων στεροειδών. (Hakki M et al, 2003)

Γενικά, ο αριθμός των μελετών όπου γίνεται αξιολόγηση της T-κυτταρικής ανοσίας μέσω της δοκιμασίας QuantiFERON®-CMV είναι περιορισμένος και κυρίως αφορά ενήλικους μεταμοσχευμένους ασθενείς. Σε μια από αυτές των Walker S. και συνεργατών εκτιμήθηκε η αντιστοιχία της δοκιμασίας με τους τίτλους αντισωμάτων για τον CMV σε 37 υγιείς εθελοντές και βρέθηκε συμφωνία σε ποσοστό 97% (36/37). Στη συνέχεια οι ερευνητές εφάρμοσαν την QuantiFERON®-CMV σε 25 λήπτες συμπαγών οργάνων που αποτελούνταν από 17 οροθετικούς και 8 οροαρνητικούς ασθενείς. Βρέθηκε ότι και οι 17 οροθετικοί λήπτες είχαν θετική δοκιμασία QuantiFERON®-CMV γεγονός που δείχνει την ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση της ειδικής ανοσίας στα άτομα που έχουν προηγούμενη έκθεση στον ιό (Walker S. et al, 2007). Ο Kumar και συνεργάτες πραγματοποίησαν μετρήσεις με τη μέθοδο QuantiFERON®-CMV προ μεταμόσχευσης καθώς και μια φορά το μήνα για διάστημα 3 μηνών μετά από μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου σε 108 ενήλικες ασθενείς οι οποίοι ήταν υψηλού κινδύνου για CMV νόσο. Βρέθηκε ότι

στους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στο τέλος της προφυλακτικής αγωγής, η επίπτωση της εμφάνισης καθυστερημένης CMV λοίμωξης ήταν χαμηλότερη από εκείνους με αρνητικό αποτέλεσμα. (Kumar D et al, 2009)

Η κλινική σημασία της μεθόδου αξιολογήθηκε και σε ενήλικες με αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων όπου 41 ασθενείς με MAAK τέθηκαν σε εβδομαδιαία ανοσολογική παρακολούθηση μεταξύ της 3^{ης} και της 14^{ης} εβδομάδας μετά τη μεταμόσχευση καθώς και στους 6 και 12 μήνες. Στη μελέτη αυτή ο διάμεσος χρόνος ανάκτησης της ειδικής για τον CMV ανοσίας ήταν 59 μέρες και η επίπτωση της επανενεργοποίησης του ιού ήταν χαμηλότερη στους ασθενείς που ανέπτυξαν ειδική ανοσία σε σχέση με αυτούς που δεν ανέπτυξαν. (Tey S-K et al, 2013) Σε μια πρόσφατη πιλοτική μελέτη σε 25 παιδιατρικούς αυτή τη φορά λήπτες αλλογενούς MAAK, εκ των οποίων οι 16 εμφάνισαν CMV ιαιμία, κατέδειξε ότι οι τέσσερις ασθενείς με το θετικό αποτέλεσμα QuantiFERON®-CMV δεν παρουσίασαν υποτροπιάζοντα επεισόδια CMV ιαιμίας μετά από μια αρχική επανενεργοποίηση του ιού. Αντίθετα οι πέντε από τους οκτώ ασθενείς με αρνητικό QuantiFERON®-CMV και οι τρεις ασθενείς με απροσδιόριστο QuantiFERON®-CMV εμφάνισαν συχνές υποτροπές. (Lee SM et al, 2017)

Στα αποτελέσματά μας επιλέχθηκαν τρία παραδείγματα ασθενών που αντικατοπτρίζουν την χρησιμότητα της μεθόδου QuantiFERON®-CMV στην κλινική πράξη. Ο πρώτος ασθενής ανέπτυξε σταθερή ειδική ανοσία για τον ιό την 90^η ημέρα μετά την μεταμόσχευση και έκτοτε δεν εμφάνισε επεισόδιο ιαιμίας. Αντίθετα, ο δεύτερος ασθενής, που δεν κατάφερε ποτέ να παρουσιάσει ανοσιακή απάντηση έναντι στον CMV, υπέφερε από υποτροπιάζοντα επεισόδια ιαιμίας και έλαβε αντιική αγωγή για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα. Ανάλογη ήταν και η πορεία του τρίτου ασθενούς, που αν και αρχικά εμφάνισε θετικό αποτέλεσμα νωρίς μετά τη μεταμόσχευση, ωστόσο αυτό ήταν παροδικό και στη συνέχεια είχε σταθερά αρνητική δοκιμασία QuantiFERON®-CMV με συχνές υποτροπές ιαιμίας με υψηλά ιικά φορτία.

Όπως έχουμε προαναφέρει υπάρχουν και εναλλακτικές μέθοδοι για την εκτίμηση της CMV CMI, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρώση ενδοκυτταρικής κυτο

κίνης (intracellular cytokine staining, ICS), δοκιμασία πολυμερών βασισμένη στο μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex (MHC)-multimer-based assay) και τη δοκιμασία μέτρησης της παραγόμενης IFN- γ μετά από διέγερση με ειδικά ιικά αντιγόνα, όπως η ELISPOT. Ωστόσο είναι πιθανό ανάλογα με την εργαστηριακή μέθοδο που επιλέγουμε για τις μετρήσεις μας να λαμβάνουμε και διαφορετικά αποτελέσματα. (Kotton CN, et al, 2010) Ο Abate και συνεργάτες εφάρμοσαν σε μια κοορτή 120 ενήλικων ληπτών νεφρού τις μεθόδους ELISPOT και QuantiFERON®-CMV και έγινε σύγκριση της προγνωστικής τους αξίας στην εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης της ιαιμίας με την ανάλυση ROC. Οι επιδόσεις τους ήταν AUC 0.62 και AUC 0.66 αντίστοιχα ενώ η σύγκριση συνδυαστικά των δύο μεθόδων προκάλεσε μέτρια αύξηση της AUC της τάξης του 0.67 (Abate D et al 2013). Σε άλλη εργασία, η οποία έγινε σε ενήλικες λήπτες αλλογενούς MAAK προκύπτει ότι η QuantiFERON®-CMV είναι σχετικά λιγότερο ευαίσθητη σε σχέση με την μέθοδο ICS με ευαισθησία ανίχνευσης θετικών για την IFN- γ απαντήσεων 76.3%. Βέβαια η εργασία αυτή έχει τον περιορισμό ότι σαν μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ICS του συγκεκριμένου εργαστηρίου, η οποία στερείται ευρείας επικύρωσης. (Clari MA et al, 2012)

Σε μια διαφορετική μελέτη από τον Abate και συνεργάτες, 31 παιδιατρικοί λήπτες αλλογενούς MAAK παρακολουθήθηκαν ανοσολογικά για ένα περίπου χρόνο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISPOT. Η μέθοδος είχε καλή επίδοση στον προσδιορισμό του κινδύνου ή προστασίας από την CMV ιαιμία (ROC analysis, AUC 0.82). (Abate D. et al, 2012) Στην παρούσα μελέτη η ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας QuantiFERON®-CMV για όλους τους ασθενείς υψηλού κινδύνου σύμφωνα με την ανάλυση ROC ήταν επίσης καλή (AUC 0.725), κάνοντας χρήση μόνο του κατώτερου ορίου ανίχνευσης που δίνεται από τον κατασκευαστή (>0.2 IU/ml). Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το αντίστοιχο εύρημα της προαναφερθείσας μελέτης των Abate και συνεργατών, οι οποίοι χρησιμοποίησαν τη μέθοδο ELISPOT σε έναν παρόμοιο πληθυσμό παιδιατρικών ασθενών γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι οι συγκεκριμένες τεχνικές αποδίδουν καλύτερα στα παιδιά. (Abate D. et al, 2012)

Η επιλογή της δοκιμασίας QuantiFERON®-CMV για την εκτίμηση της ανοσιακής απάντησης στους δικούς μας παιδιατρικούς ασθενείς με MAAK έγινε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια. Είναι εύκολη στην εκτέλεση της, καθώς ο απαραίτητος εξοπλισμός είναι διαθέσιμος σε κάθε εργαστήριο και δεν χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον, είναι καλά τυποποιημένη και εμπορικά διαθέσιμη ενώ η λήψη των αποτελεσμάτων γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τέλος, είναι η μόνη από τις μεθόδους παρακολούθησης των ειδικών T-κυττάρων που έχει άδεια χρήσης ως διαγνωστικού μέσου σε μεταμοσχευμένους ασθενείς.

Στα μειονεκτήματα της περιλαμβάνεται το γεγονός ότι αξιολογείται η κυτταρική απάντηση των CD8+ και όχι των CD4+, καθώς είναι γνωστό ότι και οι δύο πληθυσμοί κυττάρων είναι απαραίτητοι για την πλήρη αποκατάσταση της ανοσίας έναντι στον CMV. (Foster AE et al 2002, Castagnola E et al, 2004) Νεότερα δεδομένα ωστόσο φαίνεται να υποστηρίζουν την άποψη ότι πολυλειτουργικά ειδικά για τον CMV CD8+ T-κύτταρα, που εκκρίνουν αντιικές κυτοκίνες, όπως IFN- γ και TNF- α , ενώ παράλληλα έχουν κυτταροτοξική δράση (με την έκφραση CD107a), παίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στην προστασία όσο και την αντιμετώπιση της ενεργούς CMV λοίμωξης σε ασθενείς με MAAK. (Nebbia G, et al. 2008, Zhou W, et al. 2009) Στην εργασία των Clari και συνεργατών σε μεταμοσχευμένους ασθενείς με MAAK και ενεργό λοίμωξη, φάνηκε ότι η έκφραση της IFN- γ βάσει της QuantiFERON®-CMV προέρχεται από πολυλειτουργικά CD8+ T-κύτταρα, αν και δεν διαχωρίστηκαν σαφώς οι πληθυσμοί των κυττάρων. (Clari MA et al, 2012) Άλλο ένα μειονέκτημα είναι ότι στη μέθοδο QuantiFERON®-CMV περιλαμβάνονται και αξιολογούνται μόνο 22 HLA επίτοποι, γεγονός που σημαίνει ότι δεν καλύπτονται οι περιπτώσεις σπάνιων HLA απλοτύπων και ενδέχεται να λαμβάνουμε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. (Giuleri S et al, 2011) Πάντως σε μελέτες που αφορούν υγιείς εθελοντές η QuantiFERON®-CMV φαίνεται να έχει πολύ καλή συσχέτιση με τις ορολογικές δοκιμασίες με ευαισθησία που κυμαίνεται από 82% έως 97% και ειδικότητα 100%. (Kumar D et al,2009 , Walker S et al, 2007)

Βασικό κλινικό ερώτημα κατά την χάραξη στρατηγικής διαχείρισης των ασθενών μετά τη ΜΑΑΚ είναι ο προσδιορισμός κατάλληλου χρονοδιαγράμματος ανοσολογικής παρακολούθησης σε συνδυασμό με την ιολογική παρακολούθηση. Η απάντηση αυτού του ερωτήματος θα μπορούσε να διευκολύνει την αντιμετώπιση των επιπλοκών και κατ' επέκταση να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Στην παρούσα εργασία παρατηρήσαμε ότι τα περισσότερα επεισόδια CMV αιμίας προέκυψαν μεταξύ της 30^{ης} και της 90^{ης} ημέρας μετά τη μεταμόσχευση. Ωστόσο, ο σχεδιασμός την μελέτης μας περιλάμβανε μετρήσεις την 30^η και την 90^η μέρα αλλά καμία στο ενδιάμεσο διάστημα. Επιπλέον, οι ασθενείς που ανέπτυξαν σταθερή ειδική ανοσία ήταν χαμηλού κινδύνου για την επανενεργοποίηση του ιού. Τέλος δεν παρατηρήθηκε αιμία από CMV μετά την 180^η μέρα μετά την μεταμόσχευση (όψιμη CMV λοίμωξη).

Επομένως, πιστεύουμε ότι θα ήταν χρήσιμο και πρακτικό, η ανοσιακή επιτήρηση με τη μέθοδο QuantiFERON®-CMV να γίνεται ξεκινώντας την 30^η μέρα μετά την μεταμόσχευση και να επαναλαμβάνεται ανά 14 μέρες μέχρις ότου να λάβουμε 3 συνεχόμενα θετικά αποτελέσματα. Η διαστρωμάτωση των ασθενών για τον κίνδυνο CMV αιμίας θα μπορούσε να γίνει με βάση την σταθερότητα της ειδικής ανοσίας. Οι χαμηλού κινδύνου ασθενείς θα μπορούσαν να ακολουθούν ένα λιγότερο εντατικό πλάνο παρακολούθησης, όσον αφορά τις μετρήσεις με QuantiFERON®-CMV, την επιτήρηση για πιθανή επανενεργοποίηση του ιού και την προφυλακτική θεραπεία. Αντίθετα οι υψηλού κινδύνου ασθενείς, δηλαδή αυτοί με σταθερά αρνητικά/απροσδιόριστα αποτελέσματα QuantiFERON®-CMV ή παροδικά θετικά σε μια από τις μετρήσεις, θα μπορούσαν να υποβάλλονται σε στενότερο έλεγχο και εντατική αντιική θεραπεία.

Οι περιορισμοί στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής αφορούν κυρίως τον σχετικά μικρό αριθμό ασθενών που συμμετείχαν, οι οποίοι προέρχονται από ένα παιδιατρικό μεταμοσχευτικό κέντρο. Στις λίγες αντίστοιχες με την δική μας μελέτες έχουν ανακοινωθεί παρόμοιοι αριθμοί παιδιατρικών ασθενών. Το μειονέκτημα αυτό θα μπορούσε να ξεπεραστεί με πολυκεντρικές μελέτες και προοπτική μακροχρόνια παρακολούθηση των συμμετεχόντων. Επιπλέον, στον πληθυσμό μελέτης συμπεριλαμβάνεται ένας ικανός αριθμός ασθενών με

μη κακοήθεις παθήσεις γεγονός που συμβάλει στην ετερογένεια εμφάνισης της συνολικής διαταραχής της κυτταρικής ανοσίας, για παράδειγμα λόγω διαφορετικής εφαρμογής ανοσοκαταστολής προ μεταμόσχευσης. Ένας άλλος περιορισμός αφορά την ετερογένεια των μοσχευμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (μυελός των οστών, ομφάλιο αίμα, κινητοποιημένα περιφερικά κύτταρα), καθώς δυνητικά έχουν διαφορετική δυναμική αποκατάστασης της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης στον CMV. Επιπρόσθετα από τα 37 παιδιά που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, σε 12 δεν συλλέχθηκαν όλες οι μετρήσεις, λόγω θανάτου (8 ασθενείς) ή απόρριψης του μοσχεύματος (4 ασθενείς) σε διάστημα μικρότερο από 12 μήνες (1-6 μήνες). Τέλος, θα μπορούσαν να έχουν χρησιμοποιηθεί υγιείς μάρτυρες ως ομάδα ελέγχου κυρίως για την αξιολόγηση της πιθανότητας ψευδώς αρνητικών QuantiFERON®-CMV αποτελεσμάτων .

6. Συμπεράσματα

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι μια σωτήρια και αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση μίας πλειάδας ασθενών με κακοήθειες και μη παθήσεις. Δεν είναι όμως άμοιρη σοβαρών επιπλοκών με προεξάρχουσες τις λοιμώξεις στις οποίες ο κυτταρομεγαλοϊός παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο. Στο πέρασμα των δεκαετιών έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη διαχείριση των μεταμοσχευμένων ασθενών που αφορά στην προετοιμασία, στην επιλογή του μοσχεύματος, στην εφαρμογή κατάλληλου σχήματος ανοσοκαταστολής και στην ανάπτυξη νέων αντιικών φαρμάκων. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών αυτών. Οι προσπάθειες πλέον επικεντρώνονται στην διαστρωμάτωση των ασθενών βάσει κινδύνου επανενεργοποίησης του ιού και στην εξατομίκευση της θεραπείας, η οποία προσαρμόζεται αναλόγως.

Σε αυτή την κοορτή παιδιατρικών ασθενών με MAAK, η θετική QuantiFERON®-CMV συσχετίστηκε με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής CMV ιαιμίας, αντιστα κλώντας σαφώς την αποκατάσταση της κυτταρικής ανοσίας για τον CMV. Επιπλέον, βάσει των αποτελεσμάτων της κοορτής μας, καταλήξαμε σε πρόταση ένταξης της QuantiFERON®-CMV στο καθιερωμένο πρόγραμμα παρακολούθησης των ασθενών. Ελέγχοντας με ακρίβεια την κυτταρική ανοσία στον CMV σε κρίσιμες στιγμές της πορείας του ασθενούς, ιδίως μεταξύ 30^{ης} και 90^{ης} ημέρας μετά τη μεταμόσχευση, μπορούν να προκύψουν πολλαπλά οφέλη. Συγκεκριμένα μπορεί να μειωθεί η ανάγκη των συχνών αιμοληψιών και εργαστηριακών εξετάσεων, η παρατεταμένη χρήση αντιικών φαρμάκων και να αποτραπεί η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών CMV. Κατά συνέπεια, ενσωματώνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου QuantiFERON®-CMV στην παρακολούθηση και θεραπεία, μπορούν να εξατομικευθούν οι συμβατικές πρακτικές μειώνοντας την έκθεση σε αντιικά φάρμακα για τους περισσότερους ασθενείς, αλλά και να διακριθούν ποιοι ασθενείς θα μπορούσαν να ωφεληθούν από άλλες θεραπείες όπως είναι η ανοσοθεραπεία.

7. Περίληψη

Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΑΚ) αποτελεί καίρια και σωτήρια θεραπεία για την πλειονότητα των παιδιών που πάσχουν από κακοήθεις και μη κακοήθεις αιματολογικές παθήσεις. Ωστόσο όπως συμβαίνει και με τους ενήλικες, οι παιδιατρικοί μεταμοσχευμένοι ασθενείς βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο νόσου από επανενεργοποίηση του CMV. Αυτό είναι αποτέλεσμα τόσο του ανώριμου ανοσοποιητικού τους συστήματος όσο και της κατασταλτικής θεραπείας που ακολουθεί την μεταμόσχευση. Πράγματι η CMV λοίμωξη μπορεί όχι μόνο να προκαλέσει σοβαρή νόσο με προσβολή πολλών οργάνων όπως αμφιβληστροειδοπάθεια, γαστρεντερίτιδα, εγκεφαλίτιδα, ηπατίτιδα, πνευμονίτιδα, μυοκαρδίτιδα αλλά και επιπλοκές όπως βακτηριακές και μυκητιασικές λοιμώξεις, απόρριψη μοσχεύματος και νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD). Αρκετές μελέτες που έχουν γίνει κυρίως σε ενήλικες μεταμοσχευμένους ασθενείς έδειξαν ότι η αποκατάσταση της ειδικής για τον CMV T-κυτταρικής ανοσίας σχετίζεται με τον έλεγχο και την προστασία έναντι του ιού. Επομένως μετρώντας την κυτταρική ανοσιακή απάντηση στον CMV των ασθενών αυτών θα μπορούμε να υπολογίσουμε τον κίνδυνο για CMV λοίμωξη και να εφαρμόσουμε εξατομικευμένες στρατηγικές διαχείρισης. Στην παρούσα φάση υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές ανοσολογικές δοκιμασίες για την παρακολούθηση της ειδικής για τον CMV ανοσιακής απάντησης για τους μεταμοσχευμένους ασθενείς. Όμως, είναι ακριβές, δεν είναι ευρέως διαθέσιμες και συχνά απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό ενώ επίσης δεν είναι προτυποποιημένες.

Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε προοπτικά τη χρησιμότητα στην κλινική πράξη της παρακολούθησης της ειδικής για τον CMV ανοσιακής απάντησης με τη δοκιμασία QuantiFERON®-CMV (QIAGEN), στην πρόβλεψη ιαιμίας από CMV σε παιδιά που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Στη μελέτη συμμετείχαν 37 παιδιά που έλαβαν αλλογενή ΜΑΑΚ τη διετία 3/2010-6/2012. Η ανίχνευση της ιαιμίας από CMV γινόταν εβδομαδιαία με real time PCR . Η παρακολούθηση της ανοσιακής αποκατάστασης γινόταν με τη δοκιμασία QuantiFERON®-CMV προ μεταμόσχευσης, νωρίς μετά την μεταμόσχευση, στις 30, 90, 180, 270 και 360 ημέρες μετά την μεταμόσχευση. Η επίπτωση της ιαιμίας από CMV ήταν 51% (19/37) με τα μισά επεισόδια να

συμβαίνουν μέσα στις ≤ 30 μέρες από τη μεταμόσχευση. Δεκαπέντε ασθενείς παρουσίασαν σταθερή ειδική ανοσία στον CMV σε ένα μέσο χρονικό διάστημα 82 ημερών. Η αθροιστική επίπτωση (cumulative incidence) της επανενεργοποίησης του CMV στους ασθενείς που ανέπτυξαν ειδική για τον ιό ανοσία ήταν χαμηλότερη σε σχέση με αυτούς που δεν ανέπτυξαν (15% έναντι 53%; $p=0.023$). Για την εκτίμηση της προβλεπτικής αξίας της μεθόδου στην εμφάνιση ιαιμίας από CMV έγινε στατιστική ανάλυση ROC (receiver operating characteristic) όπου ανέδειξε περιοχή κάτω από την καμπύλη 0.725.

Συμπερασματικά, σε αυτή την κοορτή παιδιατρικών ασθενών με MAAK, η θετική QuantiFERON®-CMV συσχετίστηκε με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής CMV ιαιμίας, αντανakλώντας σαφώς την αποκατάσταση της κυτταρικής ανοσίας για τον CMV. Η μέθοδος αυτή αποδείχθηκε αξιόλογη στην αναγνώριση παιδιατρικών ασθενών MAAK σε υψηλό κίνδυνο για CMV ιαιμία. Ως εκ τούτου θα μπορούσε να ενισχύσει την καθιερωμένη επιτήρηση και την διαστρωμάτωση του κινδύνου για τον CMV μετά την μεταμόσχευση. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με εδραιωμένη ανοσιακή απάντηση στον CMV βάσει της μεθόδου θα μπορούσαν να υποβάλλονται σε λιγότερο εντατικά σχήματα παρακολούθησης και εξατομικευμένα προγράμματα προφυλακτικής αγωγής.

8. Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a life-saving procedure for children suffering from malignant and non malignant diseases. Pediatric hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients are at high risk for cytomegalovirus (CMV) reactivation due to their immature immune system and therapy following transplantation. Indeed, not only can CMV infection cause severe and multi-organ disease such as retinitis, gastroenteritis, encephalitis, hepatitis, pneumonitis, myocarditis, but it is also associated with the development of bacterial or fungal infections, graft rejection or graft-versus-host-disease (GVHD). Several studies mostly in adult transplant recipients have demonstrated that reconstitution of CMV specific T-cell immunity is associated with control and protection against CMV. Therefore, measuring a patient's CMI response to CMV may help determine the risk of CMV infection as well as individualize management strategies. At present, several immunological assays are available for monitoring CMV-specific T-cell-mediated immune responses in transplant recipients. However, they are expensive, often require laboratory expertise, and are neither widely available nor standardized.

In this study, the clinical utility of monitoring CMV-specific cell mediated immunity to predict CMV viremia in pediatric HSCT patients using the QuantiFERON®-CMV (QIAGEN) test was investigated prospectively. Thirty seven pediatric allogeneic HSCT recipients were enrolled from 3/2010-6/2012. CMV viremia was detected via weekly real time PCR. The QuantiFERON®-CMV test was conducted pre-transplant, early after transplantation, 30, 90, 180, 270 and 360 days post-transplantation. The incidence of CMV viremia was 51% (19/37) with half of the episodes within ≤ 30 days post-transplant. Fifteen patients showed stable CMV-specific immunity at an average time of 82 days. The cumulative incidence of CMV reactivation in patients who developed CMV-specific immunity was lower than those who did not (15% versus 53%; $p=0.023$). The receiver operating characteristic (ROC) statistical analysis showed that the area under curve was 0.725 in predicting viremia for QuantiFERON®-CMV test.

In conclusion, in this cohort of HSCT pediatric patients, positive QuantiFERON®-CMV was associated with a low risk of recurrent CMV viremia, accurately reflecting CMV CMI recovery. The QuantiFERON®-CMV assay was a valuable method for identifying pediatric HSCT patients at high risk for CMV viremia. This assay could complement the monitoring and stratification of CMV risk of pediatric patients post-transplantation. Therefore, pediatric patients with positive CMV CMI tests might benefit from less intense surveillance and individualized prophylactic treatment plans.

9. Συντομογραφίες

ΜΑΑΚ: μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

ΜΟ: μυελός των οστών

ΚΠΑ: κινητοποιημένο περιφερικό αίμα

ΟΑ: ομφάλιο αίμα

ΟΛΛ: οξεία λεμφογενής λευχαιμία

ΟΜΛ: οξεία μυελογενής λευχαιμία

ΧΜΛ: χρόνια μυελογενής λευχαιμία

ΜΔΣ: μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

G-CSF: Granulocyte- colony stimulating factor

NK: natural killers

GVL: graft versus leukemia effect

GVHD: graft versus host disease

HLA: human leucocyte antigen

MHC: major histocompatibility complex

MIEP: major immediate-early promoter

EFS: event-free survival

CMI: cell mediated immunity

PRRs: pattern recognition receptors

TLRs: toll-like receptors

APCs: antigen presenting cells

TNF- α : tumor necrosis factor- α

IFN- γ : interferon- γ

CMV: cytomegalovirus

EBV: epstein-Barr virus

IVIg: intravenous immunoglobulin

PCR: polymerase chain reaction

ICS: intracellular cytokine staining

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ROC: receiver operating characteristic analysis

AUC: area under curve

10. Βιβλιογραφία

Abate D, Cesaro S, Cofano S, et al. Diagnostic utility of human cytomegalovirus-specific T-cell response monitoring in predicting viremia in pediatric allogeneic stem-cell transplant recipients. *Transplantation* 2012 Mar 15;93(5):536-542.

Abate D, Saldan A, Mengoli C et al. Comparison of Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot and CMV Quantiferon Gamma Interferon-Releasing Assays in Assessing Risk of CMV Infection in Kidney Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 2013;51(8): 2501-2507

Angarone M, Ison MG. Prevention and Early Treatment of Opportunistic Viral Infections in Patients With Leukemia and Allogeneic Stem Cell Transplantation Recipients. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2008;6(2):191-199

Antoine C, Muller S, Cant A et al. Long term survival and transplantation of hematopoietic stem cells for immynodeficiencies: report of the European experience 1968-1999. *Lancet* 2003 ; 361 :553-560

Baldanti F, Paolucci S, Campanini G, Sarasini A, Percivalle E, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus UL131A, UL130 and UL128 genes are highly conserved among field isolates. *Arch Virol.* 2006 Jun;151(6):1225-33

Bao L , Cowan M, Dunham K, Horn B et al. Adoptive Immunotherapy with CMV Specific Cytotoxic T Lymphocytes for Stem Cell Transplant Patients with Refractory CMV Infections. *J Immunother.* 2012 April ; 35(3): 293–298.

Beisser PS, Lavreysen H, Bruggeman CA, Vink C. Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325 :221–242.

Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* ,2009;7(23):5711-5719

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

Boeckh, M., W. Leisenring, S. R. Riddell, R. A. Bowden, M. L. Huang, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood.* 2003; 101:407–414.

Boeckh M, Fries B, Nichols WG. Recent advances in the prevention of CMV infection and disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2004 Jun;8 Suppl 5:19-27.

Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 2011 May;121(5):1673-80.

Bueno J, Ramil C, Green M. Current management strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection in pediatric transplant recipients. *Pediatr Drugs* 2002;4: 279-290

Bollard CM, Huls MH, Buza E, Weiss H, Torrano V et al. Administration of latent membrane protein 2-specific cytotoxic T lymphocytes to patients with relapsed Epstein-Barr virus-positive lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006;6:342–347

Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*. 2006; 177(10):7094–7102

Borgmann A, von Stackelberg A, Hartmann R, Ebell W, Klingebiel T, Peters C et al. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003; 101: 3835–3839.

Bowden R, Cays M, Schoch G, et al. Comparison of filtered blood (FB) to sero-negative blood products (SB) for prevention of cytomegalovirus (CMV) infection after marrow transplant. *Blood*. 1995; 86:3598–603

Cavazzano-Calvo M, Friedrich W, Fischer A. HSCT for children with severe combined immunodeficiencies (SCID). *EBMT Handbook 2008*, Chapter 40 p.537-543

Castagnola E, Cappelli B, Erba D, Rabagliati A, Lanino E, Dini G. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children. *Hum Immunol* 2004; 65:416–422

Cheung AK, Abendroth A, Cunningham AL, Slobedman B. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood*. 2006;108(12):3691–3699.

Clari MÁ, Muñoz-Cobo B, Solano C, Benet I, et al. Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific gamma interferon-producing CD8(+) T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 May;19(5):791-6

Copelan EA. Hematopoietic stem cell transplantation. *N Eng J Med* 2006; 354(17) : 1813-16

Costa C, Saldan A, Cavallo R. Evaluation of virus-specific cellular immune response in transplant patients. *World J Virol.* 2012 Dec 12;1(6):150-3.

Crisinel PA ,Duval M et al. Risk of cytomegalovirus infection and disease after umbilical cord blood transplantation in children. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2013 24(1):11-15

Crough T, Fazou C et al. Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid organ transplant recipients and its relationship with the antigen specific CD8+ T cell response. *J Virol* 2007 81(20):11538-11542

Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1):76-98

Cunha BA. Cytomegalovirus pneumonia: community-acquired pneumonia in immunocompetent hosts. *Infect Dis Clin North Am.* 2010 Mar;24(1):147-58

Cwynarski K, Roberts IA, Lacobelli S et al. Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children. *Blood* 2003; 102 :1224-1231

Danziger-Isakov L, Heeger PS. Clinical utility of measuring T- cell immunity to CMV transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(5):987-988

Davies JK, Cuinan EC. Un update on the management of severe idiopathic aplastic anemia in children. *Br J Haematol* 2007; 136(4) :549-564

Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol.* 2003 Jan;84(Pt 1):17-28

Dunn, H. S., D. J. Haney, S. A. Ghanekar, P. Stepick-Biek, D. B. et al. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J. Infect. Dis.* 2002; 186:15–22.

Fleming T, Dunne J, Crowley B Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-Cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish hospital. *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):433-40.

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

Freeman R. B. Jr. The 'Indirect' Effects of Cytomegalovirus Infection. *American Journal of Transplantation* 2009; 9: 2453–2458

Fuji SH, Kapp M, Einsele M. Monitoring of pathogen-specific T-cell immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology* 2013;4:1-6

Gandhi, M K., Khanna R.. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect. Dis* 2004;4:725–738

George B, Pati N et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) infection remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis* 2010; 12(4):322-9.

Gerna G, Lilleri D. Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes* 2006; 13:4

Gerna G, Sarasini A, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol.* 2008; 89(Pt 4):853–865

Gibson BE, Wheatley K, Hann IM, Stevens RF, Webb D, Hills RK et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005; 19: 2130–2138.

Gibson L, Dooley S, Trzmielina S, et al. Cytomegalovirus (CMV) IE1- and pp65-specific CD8+ T cell responses broaden over time after primary CMV infection in infants. *J Infect Dis.* 2007; 195(12):1789–1798

Giulieri S, Manuel O. Quantiferon-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(1):17-25

Godley LA, van Besien K. The next frontier for stem cell transplantation: finding a donor for all. *JAMA.* 2010 Apr 14;303(14):1421-2.

Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2010 ; 363(22):2091–2101

Guerin V, Dalle J H, Pedron B et al. Cellular immunity parameters associated with spontaneous control in children who underwent transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2010; 45 :442-449.

Hakki M, Riddell RS, Storek J. et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 2003;102:3060-3067.

Hebart, H., Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* 2004. ; 65:432–436.

Humar A. Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am. J. Transplant.* 2006 6:262–274.

Humar A., Snyderman D. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2009, 9:S78-86.

Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325:85–100.

Jain M, Duggal S, Das Chugh T. Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(8):571-579.

Jonjic, S., I. Pavic, B. Polic, I. Crnkovic, P. et al. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* 1994;179:1713–1717.

Kern F, LiPira G, Gratama JW, Manca F, Roederer M: Measuring Ag-specific immune responses: understanding immuno-pathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer. *Trends Immunol* 2005,26:477-84.

Khana R. Immune monitoring of infectious complications in transplant patients: an important step towards improved clinical management. *J Clin Microbiol* 2018;56(4): 1-6

Kumar D, Chernenko S, Moussa G et al. Cell mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(5):1214-1222.

Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010;89 (7):779-795.

Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2013;96 (4):333-360.

Kalil A.C., Levitsky J., Lyden E., et al. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann. Intern. Med.* 2005, 134:870-80.

Krawczyk A., Ackermann J et al. Assessing the risk of CMV reactivation and reconstitution of antiviral immune response post bone marrow transplantation by the Quantiferon-CMV assay and real time PCR. *Journal of Clinical Virology* 2018 99-100;61-66

Ladenstein R, Potschger U, Hartman O, Pearson AD, Klingebiel T, Castel V et al. 28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (Suppl 2): S118–S127.

Lazzarotto T. The best practices for diagnosis and monitoring of CMV infection in immunocompromised patients. HAART correlated pathologies and other 2010; 9 : 290-298

La Rosa C , Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol.* 2012 ; 7(3): 279–293.

Lochmanova A., Lochman I, Tomaskova H et al. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2010;42(9): 3574-3577

Locatelli F, Zecca M, Messina C, Rondelli R, Lanino E, Sacchi N et al. Improvement over time in outcome for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission given hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Leukemia* 2002; 16: 2228–2237.

Locatelli F, Giorgiani G, Di-Cesare-Merlone A, Merli P, Sparta V, Moretta F. The changing role of stem cell transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jun;41 Suppl 2:S3-7

Locatelli F, Rocha V, Reed W et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease . *Blood* 2003 ; 101: 2137-2143

Lee SM, Kim Y-J, Yoo KH et al. Clinical Usefulness of Monitoring Cytomegalovirus-Specific Immunity by Quantiferon-CMV in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Ann Lab Med* 2017;37:277-281.

Lisboa L, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* 2012;93 (2):195-200

Lilleri D, Gerna G, Fornara C. et al. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2006;108: 1406-1412

Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: Pathogen or bystander? *Rev Med Virol*.2010;20(6):372–379

Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, et al. Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2006; 81(12):1645–1652

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of HCMV infection and disease in transplant recipients. *Clin Infec Dis* 2002; 34:1094-1097

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

Ljungman P. CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42(suppl 1):S70

Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Jun; 24(2):319-37.

Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, Einsele H, Gaspar HB, Gratwohl A, Passweg J, Peters C, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Sureda A, Tichelli A, Velardi A, Niederwieser D; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Feb;45(2):219-34

Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011 February; 25(1): 151–169.

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Distinction between CD8+ and CD4+ T cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997 ; 89 : 3700-3707

Manuel O, Hussain S et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high risk solid organ transplant recipients:a multicenter cohort study. *CID* 2013;56(6):817-24

Marks D, Khattry N, Cummins M, Goulden N, Green A, Harvey J et al. Haploidentical stem cell transplantation for children with acute leukaemia *Br J Haematol* 2006; 134: 196–201.

Marr KA. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:265-70.

Marshall EE, Geballe AP. Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(9):609–619.

Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1007–1013.

Matsumura T, et al. Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(5):577–583.

Maschmeyer G , Ljungman P. Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Principles and Practice of Cancer Infectious Diseases, Current Clinical Oncology*,2011. Chapter 2.

Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, Locatelli F, Fischer A, Egeler RM, Or R, Peters C, Ortega J, Veys P, Bordigoni P, Iori AP, Niethammer D, Rocha V, Dini G; Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Jan;39(2):89-99.

Miller-Kittrell M, Sparer TE. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virol J.*2009; 6:4.

Melnick JL, Adam E, Debakey ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1993; 14(Suppl. K): 30–38.

Mocarski, E. S., Jr., T. Shank, and R. F. Pass. 2007. Cytomegaloviruses, p.2701–2772. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

McCormick AL. Control of apoptosis by humancytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325:281–295

Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008; 15(2):226–233

Nebbia G, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4 and pp65 CD8 T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2008; 8:2590 –2599.

Nichols WG, Price TH, Gooley T, et al. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products. *Blood.* 2003; 101(10):4195–200.

Osgood EE, Riddle MCC, Mathew TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusion and intravenous marrow: case report. *Ann Intern Med* 1939; 13:357

Patel SR, Ridwan RU, Ortin M. Cytomegalovirus reactivation in pediatric hematopoietic progenitor transplant : A retrospective study on the risk factors and efficacy of treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27:411-415

Plosa EJ, Esbenshade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2012 Apr;33(4):156-63;

Pollack M, et al. An international comparison of current strategies to prevent herpesvirus and fungal infections in hematopoietic cell transplant recipients [published online ahead of print August 7, 2010]. *Biol Blood Marrow Transplant.* doi:10.1016/j.

Prosch, S., K. Staak, J. Stein, C. Liebenthal, T. et al.. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappa B. *Virology* 1995; 208:197–206

Prosch, S., C. E. Wendt, P. Reinke, C. Priemer, M. et al.. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 2000 ;272:357–365

Quinnan, G. V., Jr., N. Kirmani, A. H. Rook, J. F. Manischewitz, L. Jackson, et al .Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 1982. ; 307:7–13.

Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Immunoglobulin prophylaxis in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis . *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(S1):S46.

Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325:297-313

Riddell, S. R., Watanabe KS , Goodrich JM, Li CR, et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; 257:238–241.

Renard C, Barlogis V, Mialou V. et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol* 2011;152:322-330

Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Fabbri E, Gerna G. Preconceptional primary human cytomegalovirus infection and risk of congenital infection. *J Infect Dis.* 2006; 193(6):783-787.

Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jan;41(2):207-14.

Ross, S. A., Boppana S.B. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin. Pediatr. Infect. Dis* 2005. 16:44–49.

Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol.* 2008 Jan;82(1):60-70

Safdar A, Rodriguez GH, De Lima MJ et al .Infections in 100 cord blood transplantations. *Medicine(Baltimore)* 2007 ; 86 : 324-333

Scheinberg P. Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation .*Hematology Am Soc Hematology Educ Program* 2012 ; 2012 :292-300

Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D et al. Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol.* 2006 Dec 20;24(36):5742-9

Scrivano L1, Sinzger C, Nitschko H, Koszinowski UH, Adler B. HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS Pathog.* 2011 Jan 13;7(1):e1001256.

Surh CD and Sprent J. Homeostasis of naïve and memory T cells. *Immunity* 2008; 29:848-862

Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; 115(19); 3861-3868

Schleiss MR. Cytomegalovirus vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;3 25:361–382.

Sinclair J.,Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 2006 ; 87:1763–1779

Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol.* 2008 Mar;41(3):180-5.

Sinclair J. Chromatin structure regulates human cytomegalovirus gene expression during latency, reactivation and lytic infection. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar-Apr;1799(3-4):286-95.

Sinzger C1, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325:63-83

Small L.N., Lau J., Snyderman D.R. Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 43:869-80

Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006; 259: 219–246

Steininger C, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 2006 ; 37 :: 1-9

Slobedman B, Barry PA, Spencer JV, Avdic S, Abendroth A. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol.* 2009;83(19):9618–9629.

Srinivasan A, Wang C, Srivastava DK, Burnette K, Shenep JL, Leung W, Hayden RT. Timeline, epidemiology, and risk factors for bacterial, fungal, and viral infections in children and adolescents after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Jan;19(1):94-101

Storek J, Wells D, Dawson MA, et al. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2001 ; 98 :489-491.

Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 May;8(5):583-97

Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.*2005; 202(5):673–685.

J Styczynski and L Gil on behalf of the EBMT Paediatric Diseases Working Party. Prevention of infectious complications in pediatric HSCT. *Bone Marrow Transplantation* (2008) 42, S77–S81

Thomas ED, Blume KG. Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5(6) : 341-346

Tey S-K, Kennedy GA, Cromer D et al. Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using Quantiferon-CMV® Assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications. *PLoS ONE* 2013;8(10):e74744

Tomblyn M, Chiller T , Einsele H, Gress R, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 October ; 15(10): 1143–1238.

Trigg ME. Hematopoietic stem cells *Pediatrics*. 2004 Apr;113 (4 Suppl): 1051-1057.

Varani S , Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* 2011, 2:6 doi:10.1186/2042-4280-2-6

Varnum, S.M.D.N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K.J. et al Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol* 2004.78:10960–10966

Venema, H., A. P. van den Berg, C. van Zanten, W. J. van Son, et al. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol*. 1994; 42:188–192.

Verdeguer A1, de Heredia CD, González M, Martínez AM, Fernández-Navarro JM, Pérez-Hurtado JM, Badell I, Gómez P, González ME, Muñoz A, Díaz MA; GETMON: Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in Children. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Jan;46(1):119-24.

Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 18153–18158.

Walker S, Fazou C, Crough T et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus specific CD8+ T-cell responses using Quantiferon-CMV . *Transpl. Infect. Dis*. 2007; 9(2),165-170

Walter E. A., Greenberg P. D., Gilbert M. J., Finch R. J. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med*. 1995;333:1038–1044

Wilkinson GW, et al. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol*. 2008;41(3):206–212.

Yoon HS, Lee JH, Choi ES et al. Cytomegalovirus infection in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation at a single center: A retrospective study of the risk factors. *Pediatr Transpl* 2009;13:898-905

Zhou W, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009; 113:6465– 6476.