



Facultat de Medicina
Departament de Microbiologia i Ecologia

Marcadores inmunológicos
de **protección** frente a **citomegalovirus** en el
trasplante alogénico de precursores
hematopoyéticos

Tesis Doctoral presentada por:

Beatriz Muñoz-Cobo Liria
Valencia, julio 2015



DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

David Navarro Ortega, facultativo adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la Licenciada **Beatriz Muñoz-Cobo Liria**, titulado **“MARCADORES INMUNOLÓGICOS DE PROTECCIÓN FRENTE A CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS”** ha sido realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisada y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Valencia, julio de 2015

Fdo. David Navarro Ortega

Me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, sin las cuales, este trabajo no hubiera sido posible.

En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. David Navarro Ortega por su dedicación, confianza y gran talento científico.

En segundo lugar, a toda la gente del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por haber colaborado tanto en mi formación como especialista como en la ejecución de esta tesis. Agradecer especialmente a mis compañeras y amigas Nuria Tormo, M^a Ángeles Clari, Elisa Costa, Dayana Bravo y Estela Giménez, por todos los momentos compartidos. Igualmente, quiero agradecer su importante colaboración en los campos de virología y biología molecular a Matilde Pastor, Julia García y Mónica Reig.

En tercer lugar, a todo el personal del Servicio de Oncología y Hematología del Hospital Clínico, por su colaboración, sin la cual no podría haberse realizado este trabajo.

A Alfredo
A mis hijos

A mis padres
A mis hermanos

Abreviaturas y acrónimos

- ACV Aciclovir
- ADN ácido desoxirribonucleico
- alo-TPH trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos
- ATG globulina antitimocítica
- CDV Cidofovir
- MHC-I complejo mayor de histocompatibilidad-I
- CMV citomegalovirus
- CTL linfocito T CD8⁺ citotóxico
- D- donante del injerto/trasplante seronegativo para CMV
- D+ donante del injerto/trasplante seropositivo para CMV
- DNAemia cantidad de ADN viral en sangre (DNA, del inglés *deoxyribonucleic acid*)
- *dt* tiempo de duplicación (del inglés, *doubling time*)
- EICH enfermedad del injerto contra el huésped
- EICHa enfermedad del injerto contra el huésped aguda
- ELISA ensayo por inmunoabsorciónligado a enzimas (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- ELISPOT Enzimoimmunospot
- FOS Foscarnet
- GCV Ganciclovir
- HLA antígenos leucocitarios humanos (del inglés, *human leukocyte antigen*)
- ICS tinción intraceular de citoquinas (del inglés, *stain intracellular citoquinas*)
- IE-1 *immediate-early protein 1* o proteína inmediato-precoz 1 de CMV
- IE-2 *immediate-early protein 2* o proteína inmediato-precoz 2 de CMV
- IFN γ interferón gamma
- IgG inmunoglobulina(s) G

- IgM inmunoglobulina(s) M
- IV intravenoso
- Kda kiloDaltons
- Kb kilopares de bases
- MMF micofenolato de mofetilo
- NK células natural killer
- NKG2A receptor inhibidor de citotoxicidad mediada por NK
- NKG2C receptor activador de citotoxicidad mediada por NK
- NK NKG2C⁺ células NK con receptor inhibidor de citotoxicidad
- PBL leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica
- PBS tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)
- PCR reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)
- PMN polimorfonucleares
- pp65 *phosphoprotein 65* o fosfoproteína 65 de CMV
- QRT-PCR PCR cuantitativa en tiempo real
- R- receptor del injerto/trasplante seronegativo para CMV
- R+ receptor del injerto/trasplante seropositivo para CMV
- SCU sangre de cordón umbilical
- SP sangre periférica
- TCD4⁺ linfocitos T CD4⁺
- TCD8⁺ linfocitos T CD8⁺
- TCD4⁺IFN γ ⁺ linfocitos T CD4⁺ productores de IFN γ
- TCD8⁺IFN γ ⁺ linfocitos T CD8⁺ productores de IFN γ
- Th linfocitos T CD4⁺ *helper* o cooperadores
- TNF α factor de necrosis tumoral alfa
- TNF β factor de necrosis tumoral beta
- TOS trasplante de órgano sólido
- TPH trasplante de precursores hematopoyéticos
- valGCV Valganciclovir
- VEB Virus del Epstein Barr
- VHS Virus del Herpes simplex
- VIH virus de la inmunodeficiencia humana

- VPN valor predictivo negativo
- VPP valor predictivo positivo

Índice

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
ÍNDICE	XIII
1) PRESENTACIÓN	15
2) INTRODUCCIÓN	19
2.1) <u>El Citomegalovirus humano (CMV)</u>	21
2.1.1) Generalidades, estructura y replicación del CMV	21
2.1.2) Patogenicidad	23
2.2) <u>CMV y el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos</u>	25
2.2.1) Aspectos clínicos de la infección por CMV en el alo-TPH.....	25
2.2.2) Factores de riesgo para el desarrollo de infección activa y enfermedad orgánica por CMV	26
2.2.3) Control inmunitario de CMV en receptores alo-TPH.....	27
2.2.4) Diagnóstico de la infección activa por CMV	28
2.2.5) Estrategias para la prevención de la enfermedad por CMV.....	29
2.2.6) Monitorización de la respuesta inmunitaria específica de CMV	30
2.2.7) Tratamiento en la infección por CMV.....	31
3) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	33
4) ARTÍCULOS ORIGINALES	37
4.1) <u>Artículo 1</u>	41
4.2) <u>Artículo 2</u>	52
4.3) <u>Artículo 3</u>	62

4.4) <u>Artículo 4</u>	69
5) RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS	77
5.1) <u>Resumen artículo 1</u>	79
5.2) <u>Resumen artículo 2</u>	82
5.3) <u>Resumen artículo 3</u>	85
5.4) <u>Resumen artículo 4</u>	88
6) RESULTADOS	91
7) DISCUSIÓN CONJUNTA	101
8) LIMITACIONES METODOLÓGICAS	113
9) CONCLUSIONES FINALES	117
10) ANEXOS	121
10.1) Anexo I.....	123
10.2) Anexo II.....	124
11) BIBLIOGRAFIA	125

1) Presentación

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

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

2) Introducción

2.1) El Citomegalovirus humano (CMV)

2.1.1) Generalidades, estructura y replicación del CMV

Citomegalovirus (CMV) es un virus que pertenece al orden de los Herpesvirales, a la familia Herpesviridae, subfamilia Betaherpesvirinae, género *Cytomegalovirus*, especie *herpesvirus humano 5* según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés International Committee on Taxonomy of Viruses)(Davison et al., 2009). El virión tiene un diámetro de unos 200 nm y está formado por tres regiones distintas: la cápside, el tegumento y la envuelta lipídica externa (Figura 1). La cápside de simetría icosaohédrica se organiza en 162 capsómeros que engloban el genoma viral (Schleiss, 2011). Rodeando la cápside se encuentra el tegumento, una capa sin estructura y amorfa formada por aproximadamente 38 proteínas virales diferentes, que generalmente se encuentran fosforiladas por lo que se les añade el prefijo *pp* (Figura 1) (Kalejta, 2008; Smith, Kosuri & Kerry, 2014). Estas proteínas son liberadas en la célula huésped donde juegan un papel crítico en el inicio de la infección (Kalejta, 2008; Smith, Kosuri, & Kerry, 2014). La proteína más abundante del tegumento es la fosfoproteína 65 (*pp65* o *ppUL83*), la cual presenta un papel fundamental en la respuesta inmunitaria por ser la diana de la respuesta innata y de la inmunidad celular (Kalejta, 2008). La capa más externa del virus es la envuelta lipídica, que contiene diferentes glicoproteínas virales. Estas glicoproteínas median en la entrada del virus en la célula hospedadora (Kalejta, 2008), y además, poseen los diferentes epítomos frente a los que se forman los anticuerpos neutralizantes (Britt & Mach, 1996).

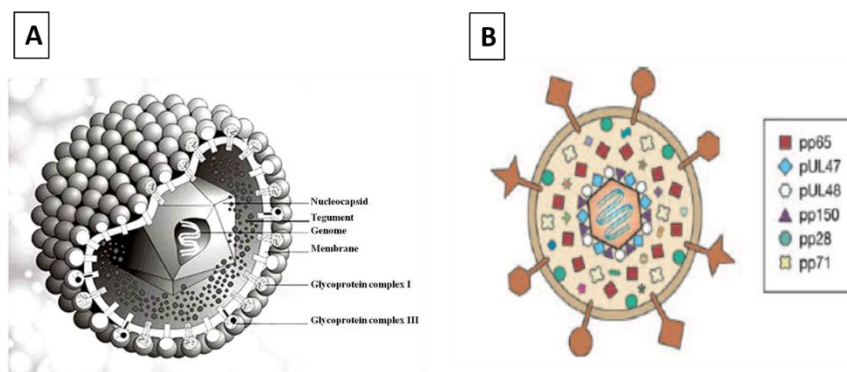


Figura 1. (A) Dibujo que representa la estructura del virión de CMV (Tomtishen, 2012) (B) Dibujo de la partícula viral infecciosa de HCMV donde se representan las abundantes proteínas del tegumento. Las diferentes formas de la superficie representan las glicoproteínas de la envuelta lipídica (Kalejta, 2008).

El CMV humano tiene una doble cadena ADN lineal de aproximadamente unos 235 kb, por lo que se le considera el herpesvirus con el genoma de mayor tamaño (Van Damme & Van Loock, 2014). Su genoma contiene una región larga (UL, del inglés unique long) y otra región corta (US, del inglés unique short), flanqueadas por una secuencia terminal (TRL y TRS) y por una secuencia interna repetida (IRL e IRS). Todas estas regiones contienen, casi por completo, todos los genes de CMV (Sanbonmatsu, Pérez, & Navarro, 2014; Van Damme & Van Loock, 2014).

Una vez el virus ha entrado en la célula se liberan las proteínas del tegumento y la nucleocápside, que se dirigirá hacia el núcleo donde liberará el ADN del virus (Sanbonmatsu et al., 2014). Tras la entrada en el núcleo, la expresión de los diferentes genes de CMV se produce en un proceso en cascada formado por tres fases distintas (Figura 2) (Sanbonmatsu et al., 2014; Schleiss, 2011; Van Damme & Van Loock, 2014). En la primera fase se expresan los genes α o IE (“immediate early”), que codifican las proteínas α o IE (“immediate early”) responsables de regular la expresión genómica de los genes virales β o “early” (Oduro, Uecker, Hagemeyer, & Wiebusch, 2012). En la segunda fase se produce la expresión de los genes β , que codifican las proteínas “early” de gran importancia en la replicación del ADN por su función enzimática (Schleiss, 2011). La expresión de los genes γ , en la tercera fase, está regulada por las proteínas “early” que codifican proteínas estructurales como las fosfoproteínas del tegumento (pp) o las glicoproteínas (gp) de la envuelta lipídica (Emery & Griffiths, 1990).

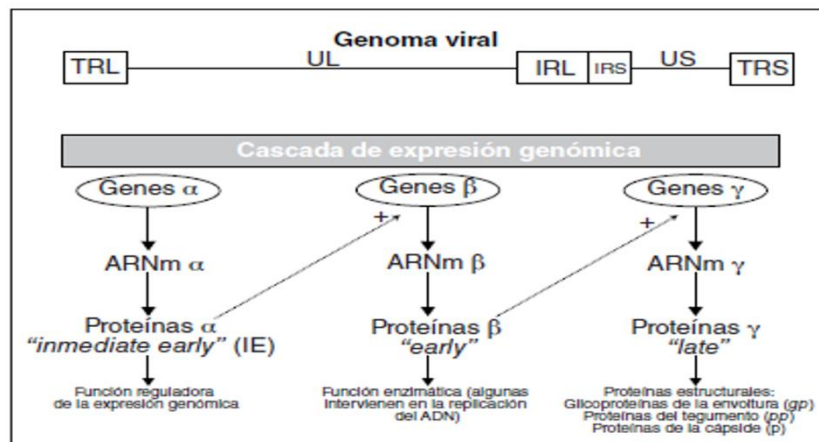


Figura 2. Esquema del genoma de citomegalovirus (CMV) y cascada de expresión genómica (Sanbonmatsu et al., 2014)

2.1.2) Patogenicidad

CMV es un virus ampliamente distribuido a nivel mundial y que presenta una seroprevalencia que puede variar entre un 30 y un 90%, en función del status socioeconómico de la población (Crough & Khanna, 2009). La adquisición de CMV está relacionada con el contacto directo con personas infectadas que excretan el virus en su saliva, orina, semen, secreciones genitales durante el parto, leche materna, o incluso, vía sanguínea a través de transfusiones de sangre o trasplantes (Forbes, 1989; Sanbonmatsu et al., 2014). Inicialmente tras el contacto, el virus se replica en las células epiteliales de las mucosas (tracto urinario, respiratorio o gastrointestinal) (Sinzger et al., 1995), exceptuando, cuando la vía de transmisión es la sanguínea (transfusión o trasplante)(Crough & Khanna, 2009). Posteriormente, mediante la infección de células endoteliales y de diferentes tipos de leucocitos (monocitos, linfocitos y neutrófilos), CMV se disemina vía sanguínea a diferentes órganos entre los que se incluyen riñón, hígado, bazo, retina, esófago, pulmones y colon, así como, las glándulas salivares (Sweet, 1999). La primoinfección en individuos inmunocompetentes normalmente es asintomática, exceptuando, algunos casos en los que se produce un síndrome mononucleósico difícil de diferenciar de la infección primaria producida por el virus Epstein-Barr (VEB)(Crough & Khanna, 2009; Sanbonmatsu et al., 2014). Tras la infección primaria, el virus establece una infección latente en progenitores mieloides (células CD34⁺) que no sólo se van a diferenciar posteriormente en monocitos, también, en otros tipos celulares como los linfocitos B, linfocitos T y leucocitos polimorfonucleares (PMN)(Sinclair & Sissons, 2006; Sinclair & Reeves, 2013). Los pacientes seropositivos pueden sufrir nuevas infecciones por CMV con cepas distintas (reinfección) o reactivaciones del virus desde su estado de latencia (infección recurrente), fomentadas por diversas circunstancias como estados de inmunosupresión, inflamación, infección o incluso estrés (Crough & Khanna, 2009; Halenius & Hengel, 2014; Ljungman, Griffiths, & Paya, 2002).

El control de la replicación viral, tanto en la infección primaria como en el estado de latencia, se va a producir por un trabajo coordinado de la inmunidad innata, humoral y celular. Como resultado de la activación de la inmunidad humoral se producirán IgMs, IgAs e IgGs frente al CMV, cuya función principal es evitar la diseminación de virus (Halenius & Hengel, 2014) mediante su interacción con las proteínas de la envoltura vírica gB, gH y el complejo gM/gN (Britt & Mach, 1996). Estos anticuerpos específicos de CMV aparecen rápidamente tras la primoinfección, persistiendo entre 2-8 meses en el caso de las IgM y de por vida en las IgG (Sanbonmatsu et al., 2014). El papel más crucial en el control inmunitario de la replicación de CMV lo tienen los linfocitos T CD8⁺, fundamentalmente los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), y

los linfocitos TCD4⁺ (Halenius & Hengel, 2014). Estas células inmunitarias controlan la replicación viral mediante la lisis directa de las células infectadas por citolisis, o bien, bloqueando su replicación con la secreción de citoquinas intracelulares como el interferón gamma (IFN- γ) y/o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Crough & Khanna, 2009).

Las células NK, clásicamente clasificadas dentro de la respuesta innata, también van a actuar junto a las CTL para conferir protección frente a CMV. En la actualidad sabemos que las células NK tienen en su superficie una serie de receptores inhibidores o activadores, encargados de reconocer las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) o moléculas similares, que van a regular la activación de las células NK funcionales (Caligury, 2008; Guma et al., 2006). La funcionalidad de las células NK también está influida por los marcadores que presenten en su superficie, como CD56 y CD16 (Caligury, 2008). Un 10% de las células NK circulantes producen gran cantidad de citoquinas, pero presentan una baja citotoxicidad. Estas células expresan en su superficie gran cantidad de moléculas CD56 (CD56^{bright}). La mayoría de las células NK circulantes presentan menor cantidad de CD56 (CD56^{dim}), relacionada con una menor producción de citoquinas y con una mayor citotoxicidad, mediante el uso de perforinas y granzimas (Caligury, 2008; Gundula, Yosuke, Deborah, Tsukasa, & Lewis, 2013).

2.2) CMV en el paciente receptor de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH)

2.2.1) Aspectos clínicos de la infección por CMV en el alo-TPH

Citomegalovirus (CMV) es causa frecuente de morbilidad y mortalidad en el marco del trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH) (Boeckh, Nichols et al., 2003). Esto es debido, en parte, a los daños directos de CMV causados por su gran citopatogenicidad, en diferentes órganos (neumonía intersticial, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, retinitis, encefalitis, o incluso enfermedad sistémica) y que se relacionan con la presencia de una elevada replicación viral (Boeckh et al., 2003; Ljungman, 2008). Una gran cantidad de los pacientes sometidos a un alo-TPH desarrollan una infección activa por CMV durante los primeros 100 días postrasplante, la cual sin tratamiento antiviral puede evolucionar a una enfermedad orgánica por CMV (Boeckh & Nichols, 2004; Solano et al., 2012). En los últimos años se ha apreciado un aumento de la incidencia de la enfermedad tardía por CMV (a partir de los 100 primeros días postrasplante). Esto se debe, fundamentalmente, al aumento de infecciones tempranas, el aumento de enfermedades orgánicas por CMV, el uso de tratamientos con depleción de células T, y la aparición de enfermedad injerto contra huésped (EICH) (Boeckh & Ljungman, 2009; Ljungman, 2008). La reconstitución inmunitaria del paciente, durante los 3 primeros meses tras el trasplante, es otro factor importante que se relaciona con la aparición de la enfermedad tardía. En consecuencia, tanto los niveles bajos de linfocitos T como la ausencia de una respuesta inmunitaria específica de CMV se asocian significativamente con un aumento de la incidencia de enfermedad tardía (Boeckh, Leisenring et al., 2003; Ozdemir et al., 2007).

CMV, también, puede ocasionar efectos indirectos, como la aparición de “superinfecciones” bacterianas o fúngicas, así como, de la enfermedad injerto contra huésped (EICH)(Ljungman et al., 2002). Estos efectos se deben a su capacidad inmunosupresora, desarrollada para facilitar su permanencia en las células huésped, y su capacidad pro-inflamatoria como resultado de la interacción del virus con el sistema inmune del huésped (Marr, Carter, Boeckh, Martin, & Corey, 2002; Nichols, Corey, Davis, & Boeckh, 2002). Hay que tener en cuenta que, probablemente, estos daños indirectos se asocien más con la presencia de niveles bajos de replicación durante largos periodos de tiempo, que con altos niveles de replicación viral.

2.2.2) Factores de riesgo para el desarrollo de la infección activa y enfermedad orgánica por CMV

En el paciente sometido a un alo-TPH existen ciertos factores de riesgo, como recibir un trasplante con depleción de células T, recibir un trasplante de un donante no relacionado y/o HLA-incompatible, la administración de globulina antitimocítica (ATG) o alemtuzumab en el régimen de acondicionamiento, el uso de micofenolato de mofetilo (MMF) en el régimen de profilaxis frente a la EICH, y la administración de altas dosis de corticoesteroides (>1mg/kg) en el tratamiento de la EICH severa (grado III-IV), que van a incrementar el riesgo a desarrollar una infección por CMV y una enfermedad orgánica (Ljungman et al., 2003). De estos, uno de los factores de riesgo más importantes para la selección de un donante es la compatibilidad de HLA (Anasetti, 2012). En la selección de donantes para un alo-TPH, lo primero que se busca es un donante HLA compatible relacionado, y si esto no es posible, se selecciona un donante HLA incompatible no relacionado (Boeckh & Nichols, 2004). Respecto al estado serológico de donante y receptor, la selección del donante va a estar determinada por la serología del receptor. De tal forma, que en el caso de que el receptor tenga una serología negativa para CMV (R-) se seleccionara un donante seronegativo (D-), con el objetivo de reducir la posibilidad de que el receptor desarrolle una infección primaria por CMV (Boeckh & Nichols, 2004; Boeckh & Ljungman, 2009). Si el receptor del trasplante es un paciente seropositivo (R+) es preferible seleccionar un donante que también lo sea (D+), ya que, en estos trasplantes D+/R+ se observan mayores niveles de células T polifuncionales específicas de CMV, que confieren un mayor nivel de protección frente al virus que en los trasplantes D-/R+ (Luo, Chang, & Huang, 2014; Zhou et al., 2009). Todo esto explica que en los trasplantes con serología D+/R+, comparado con los trasplantes D-/R+, exista una menor incidencia de reactivación por CMV, infecciones recurrentes, enfermedad orgánica, y mortalidad (Luo et al., 2014).

En relación con el régimen de acondicionamiento, el riesgo a desarrollar una infección por CMV y una enfermedad orgánica, en los primeros 100 días postrasplante, es similar en el régimen mieloablativo y no mieloablativo (Junghanss et al., 2002; Nakamae et al., 2009); sin embargo, existe un mayor riesgo a desarrollar infección tardía por CMV en aquellos pacientes que reciben un régimen no mieloablativo (Junghanss et al., 2002).

Otro factor de riesgo importante es la aparición de enfermedad de injerto contra huésped aguda (EICHa), la cual puede influir en el desarrollo de infección activa por CMV y la aparición de enfermedad orgánica por CMV, ya que, su aparición impide la recuperación de la

inmunidad de tipo T por diversos mecanismos como la inducción de la apoptosis, la inducción de producción de citoquinas inmunosupresoras, o por daño directo del timo (Luo et al., 2014).

2.2.3) Control inmunitario de CMV en receptores alo-TPH

En el control de la infección por CMV en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre existe un trabajo coordinado de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Los linfocitos TCD8⁺ específicos de CMV son el componente más importante involucrado en el control de la replicación de CMV, y por lo tanto, en la prevención de la infección activa y la enfermedad orgánica (Quinnan G. et al., 1982; Reusser, Riddell, Meyers, & Greenberg, 1991; Riddell et al., 1992). Por esto, una reconstitución de la inmunidad de células T específicas de CMV durante los primeros meses después del trasplante se relaciona con un mejor pronóstico del paciente (Espigado et al., 2014). Los antígenos más inmunodominantes frente a los que se va a dirigir la respuesta de las células TCD8⁺ específicas de CMV incluyen IE-1 (UL123), IE-2 (UL122), y pp65 (UL83) (Crough & Khanna, 2009; Quinnan G. et al., 1982; Reusser et al., 1991; Riddell et al., 1992). Se ha demostrado, en comparación con las células T monofuncionales, que las células que presentan mayor capacidad antiviral son los TCD8⁺ polifuncionales y las TCD4⁺, lo que les otorga un papel de vital importancia en el control de la infección por CMV en el paciente sometido a un alo-TPH (Krol et al., 2011; Lilleri et al., 2008; Munoz-Cobo, Gimenez et al., 2012; Zhou et al., 2009).

Junto a los linfocitos CTL, las células NK también van a contribuir al control de la infección por CMV en pacientes sometidos a un alo-TPH, aunque, su papel sigue siendo motivo de controversia. En este sentido, las células NK mayoritariamente involucradas en el control de la infección son aquellas que expresan en su superficie el dímero formado por el receptor activador C tipo lectina NKG2C y la molécula CD94 (Barron et al., 2009; Foley et al., 2012; Kuijpers et al., 2008; Lopez-Verges et al., 2011). Las células NK las podemos dividir en dos subpoblaciones en función de su fenotipo y de las funciones que llevan a cabo: las células NK CD56^{bright}/CD16^{-/low} que producen citoquinas como IFN- γ y Factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), pero que expresan bajas cantidades de perforina, y las células NK CD56^{dim}/CD16⁺ que son altamente citotóxicas (Caligury, 2008).

Respecto a la inmunidad humoral, tras la infección primaria podemos detectar en suero anticuerpos que se van a dirigir frente a diferentes proteínas de la estructural viral (Hanley & Bollard, 2014). Los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV se dirigen fundamentalmente frente a las glicoproteínas de la envuelta gB y gH o la glicoproteína

pentamérica H/gL/UL128/UL130/UL131A (Fouts, Chan, Stephan, Vandlen, & Feierbach, 2012; Lilleri, Kabanova, Lanzavecchia, & Gerna, 2012); sin embargo, no existen evidencias consistentes sobre si estos anticuerpos tienen un papel importante en el aclaramiento de la DNAemia o en la prevención de la enfermedad por CMV (Crough & Khanna, 2009).

2.2.4) Diagnóstico de la infección activa por CMV

En la respuesta humoral frente a la infección por CMV se generan anticuerpos IgM e IgG específicos de CMV. Los anticuerpos de clase IgM son los primeros en aparecer en la infección primaria e inmediatamente después aparecen los anticuerpos de clase IgG. En el trasplante alogénico, la determinación de estos anticuerpos específicos se realiza mediante el uso de técnicas serológicas, con el objetivo de conocer el estado serológico del donante y el receptor. Esta información es de gran relevancia, ya que, el estado serológico puede determinar el riesgo que existe de desarrollar una infección activa y/o una enfermedad orgánica por CMV (Boeckh & Ljungman, 2009; Luo et al., 2014).

La aparición de CMV en sangre periférica (viremia) precede, normalmente, a la aparición de los síntomas por enfermedad orgánica. En consecuencia, su detección se utiliza frecuentemente como una herramienta de diagnóstico mediante el uso de diferentes técnicas. Una de las primeras técnicas utilizadas es el cultivo celular, sin embargo, esta técnica presenta importantes inconvenientes como el tiempo de espera para la obtención de los resultados y su baja sensibilidad (Sanbonmatsu et al., 2014). Esta técnica se mejoró con el shell- vial (SV), que permite generar un diagnóstico en 18-48h mediante la inoculación de las muestras en una línea celular MRC-5 (Gerna et al., 1990; Gerna et al., 2003). El primer ensayo que detectó de forma precoz la infección activa por CMV es la antigenemia (AG), una técnica ampliamente empleada que detecta la presencia de la proteína viral *pp65* (UL83), en un número determinado de leucocitos polimorfonucleares (unos 200.000) de sangre periférica (Chee et al., 1990; Solano & D, 2010), mediante técnicas de inmunofluorescencia o técnicas inmunoenzimáticas, que utilizan anticuerpos monoclonales fijadas a un portaobjetos por citocentrifugación (Chee et al., 1990). La AG, además de detectar la viremia de forma más rápida, es más sensible que la detección de viremia (Solano & D, 2010; van der Bij et al., 1988); sin embargo, tiene algunas limitaciones como la subjetividad en la interpretación de los resultados, la falta de estandarización, o el análisis de muestras de pacientes con neutropenia (Solano & D, 2010).

Actualmente, la mayoría de centros utilizan métodos de detección de ADN viral mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR)(Sanbonmatsu et al., 2014; Solano & D,

2010), una técnica que presenta una mayor sensibilidad y especificidad que la AG (Boeckh & Ljungman, 2009). El límite de detección de esta técnica varía entre 25 y 200 copias/ml de ADN de CMV, en función del método comercial utilizado y del tipo de muestra empleado para el análisis (Boeckh et al., 2004; Solano & D, 2010). Las muestras de sangre total y plasma son las que normalmente se usan, sin embargo, este es un tema de gran controversia. Algunos autores afirman que las muestras de plasmas tienen una mayor correlación con la replicación del virus, ya que, en la determinación de la carga viral en muestras de sangre total, se cuantifica el ADN viral que se encuentra en estado de latencia en los linfocitos presentes en la muestra (Kalpoe et al., 2004; Kulkarni, Wesmoreland, & Fox, 2001); sin embargo, las cargas de CMV medidas en sangre total y plasma presentan una gran correlación (Caliendo et al., 2007; Kalpoe et al., 2004; Leruez-Ville et al., 2003). Por lo tanto, ambos tipos de muestras pueden utilizarse para la detección de infección activa por CMV en estos ensayos (Solano & D, 2010).

2.2.5) Estrategias para la prevención de la enfermedad por CMV

El uso combinado de la monitorización virológica e inmunológica de la infección activa por CMV nos permite optimizar e individualizar los tratamientos en los pacientes receptores de un alo-TPH. En este sentido, existen dos estrategias para la prevención de la enfermedad por CMV. La primera estrategia es la “profilaxis universal”, según la cual se tratan a todos los pacientes receptores de un alo-TPH. Esta profilaxis, aunque ha demostrado ser efectiva en impedir el desarrollo temprano de enfermedad por CMV, tiene ciertos inconvenientes. Es una estrategia que conduce a una mayor toxicidad por un excesivo uso de los antivirales, mayor incidencia de infecciones bacterianas o fúngicas por la neutropenia causada en los pacientes, aumenta las probabilidades de desarrollar una resistencia a los antivirales, y aumenta la incidencia de enfermedad tardía por CMV, a causa de un retraso en la reconstitución inmunitaria (Boeckh et al., 2003; Meijer, Boland, & Verdonck, 2003; Zaia, 2002). Actualmente, el tratamiento anticipado (pre-emptive) es la principal estrategia utilizada para prevenir la enfermedad orgánica por CMV. Esta estrategia consiste en la administración del tratamiento antiviral tras la detección en sangre (en muestras de plasma de o sangre total) de DNAemia de CMV por encima de unos puntos de corte establecidos por cada centro (entre 1000-10000 copias/ml en muestras de sangre y entre 100-1000 copias/ml para muestras de plasma)(Boeckh & Ljungman, 2009; Gimeno et al., 2008). No existe un consenso sobre cuál es la frecuencia óptima para realizar la monitorización virológica. Actualmente, se realiza una monitorización semanal durante los primeros 100 días postrasplante, y tras este periodo, en las visitas de control rutinario (Boeckh et al., 2003; Boeckh & Ljungman, 2009; Zaia, 2002); sin embargo, en

los pacientes con un alto riesgo a no desarrollar una reconstitución inmunitaria adecuada de células T específicas de CMV, pacientes en tratamiento con corticoides para la EICH, o los pacientes que reciben trasplantes de donantes no emparentados, o con HLA incompatible (incluidos los receptores de trasplante de sangre de cordón) la monitorización virológica se recomienda una vez a la semana hasta que se produzca la reconstitución inmunitaria (Boeckh et al., 2003; Boeckh & Ljungman, 2009). Durante los episodios de infección activa, la monitorización de DNAemia de CMV debe aumentarse a 2 veces por semana, especialmente en pacientes de riesgo. La duración del tratamiento debe mantenerse un mínimo de 15 días, tras el cual, sólo se interrumpirá con la obtención de 1 o 2 determinaciones negativas de DNA de CMV (Gimeno et al., 2008).

2.2.6) Monitorización de la respuesta inmunitaria específica de CMV

La reconstitución de la inmunidad celular tras el trasplante es crucial para el control de la replicación viral por CMV (Foster, Gottlieb, Sartor, Hertzberg, & Bradstock, 2002; Tormo et al., 2010a; Tormo et al., 2011), lo que convierte a la monitorización de la respuesta inmunitaria en una estrategia de gran utilidad, tanto en la toma de decisiones terapéuticas como en la identificación de pacientes con un alto riesgo de desarrollar una enfermedad orgánica por CMV (Ljungman, 2006). Debido a esto, en los pacientes que han sido sometidos a un alo-TPH se recomienda combinar la monitorización de la carga viral de CMV con la monitorización inmunitaria (Kotton et al., 2010). Actualmente, existen diferentes métodos de laboratorio para la cuantificación y tipificación funcional ex vivo de linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ específicos de CMV. La tinción de citoquinas intracelulares (ICS), y posterior detección por citometría de flujo, es una técnica que además de evaluar la capacidad funcional de las células T nos permite conocer su estado de diferenciación, mediante el uso de un combinado de anticuerpos monoclonales que van a reconocer proteínas intracelulares (IFN- γ y TNF- α entre otras) y de superficie (Tormo et al., 2010b; Tormo et al., 2011). El ELISPOT (enzyme-linked immunospot) es otra técnica que, también, ha demostrado ser útil para predecir el riesgo a desarrollar una infección activa por CMV aunque, a diferencia de la ICS, no diferencia entre TCD8⁺ y TCD4⁺ y sólo puede evaluar un único marcador funcional (IFN- γ o TNF- α) (Barron et al., 2009).

La cuantificación de la proteína intracelular IFN- γ ha sido ampliamente utilizada por diferentes centros, como marcador de protección de la infección activa de CMV (Ohnishi et al., 2005; Solano & D, 2010; Tormo et al., 2010b; Tormo et al., 2011); sin embargo, no existe un consenso sobre el punto de corte a partir del cual los niveles de IFN- γ se consideran protectores. Ohnishi *et al.* consideran niveles protectores de IFN- γ aquellos superiores a 1

cel/ μ l, cuantificados por la técnica ELISPOT (Ohnishi et al., 2005). Para la ICS, se ha demostrado que son un buen marcador de protección niveles de IFN- γ > 1.0 cel/ μ l y > 1.2 cel/ μ l producidos por células TCD8⁺ y TCD4⁺, respectivamente (Tormo et al., 2010b; Tormo et al., 2011).

De las técnicas que determinan la cantidad de IFN- γ , el QuantiFERON[®]-CMV es el único método comercializado y estandarizado (Fleming, Dunne, & Crowley, 2010; Kumar et al., 2009; Lochmanova et al., 2010; Walker et al., 2007). El QuantiFERON[®]-CMV mide los valores de IFN- γ , que producen los linfocitos T CD8⁺ cuando se estimulan in vitro con un cóctel de péptidos (n=21) altamente inmunogénicos incluidos en la secuencia de las proteínas del CMV IE-1, IE-2, pp65, pp50 y gB, que son presentados por moléculas HLA-I muy comunes (abarcen > 98% de la población humana); sin embargo, tiene la desventaja que no mide el IFN- γ que producen las células T CD4⁺. Este método es de gran utilidad en el marco del paciente sometido a un alo-TPH, como algunos estudios ya lo han demostrado (Fleming et al., 2010).

Las técnicas que emplean multímeros HLA-péptido, también determinan los linfocitos T específicos de CMV (Gratama et al., 2010), pero no informan de la funcionalidad de los linfocitos T y están limitadas sólo para algunos haplotipos de HLA humano, no pudiéndose aplicar a todos los pacientes (Gratama et al., 2010; Pourgheysari et al., 2009).

2.2.7) Tratamiento en la infección por CMV

Actualmente, disponemos de varios fármacos antivirales para combatir la infección activa y la enfermedad orgánica por CMV en pacientes receptores de alo-TPH. Los fármacos de elección, ganciclovir (GCV) y valganciclovir (valGCV), son análogos nucleosídicos que inhiben la replicación viral de CMV mediante la inhibición de la ADN polimerasa (Prichard & Kern, 2011). Para ello, primero tienen que ser fosforilados en el metabolito activo trifosfato, un proceso que se lleva a cabo por las enzimas timidina kinasa (codificada por el gen UL97) y otras kinasas celulares (Prichard & Kern, 2011). El valGCV es la forma L-éster valina del GCV, un profármaco con una buena biodisponibilidad oral, que ha demostrado ser hasta diez veces mayor que la que presenta el GCV (Prichard & Kern, 2011). Tras su administración oral, el valGCV es rápidamente absorbido e hidrolizado a GCV (Göhring, Hamprecht, & Gerhard, 2015). Los efectos adversos que más frecuentemente se puede observar asociados al uso de GCV y valGCV son la neutropenia, anemia y trombocitopenia (Solano & D, 2010), derivados su toxicidad sobre la médula ósea.

En la segunda línea de abordaje terapéutico disponemos de antivirales como cidofovir (CDV) o foscarnet (FOS), que se administran en los pacientes con una severa neutropenia o una resistencia antiviral a los antivirales de elección (Solano & D, 2010). El CDV es un análogo

nucleotídico que, a diferencia de los análogos nucleosídicos, no necesita las enzimas virales para llevar a cabo su acción antiviral. CDV es fosforilado directamente por kinasas celulares, y actúa como un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa del virus. FOS es un fármaco que se une directamente a la ADN polimerasa del virus en el lugar de unión del pirofosfato, impidiendo la liberación de éste a partir de los desoxinucleósidos trifosfato y la elongación de ADN viral. El tratamiento con estos fármacos de segunda línea puede resultar problemático, ya que, presentan una limitada biodisponibilidad oral, una potencia intermedia y una alta toxicidad (nefrotoxicidad, fundamentalmente) (Lurain & Chou, 2010; Strasfeld & Chou, 2010).

Actualmente se están desarrollando nuevos tratamientos antivirales que actúan sobre nuevas dianas del ciclo replicativo de CMV, con el fin de tener alternativas terapéuticas de menor toxicidad y mayor potencia. Uno de los más prometedores antivirales es el Maribavir, un antiviral con buenas propiedades farmacocinéticas y buena actividad frente a las cepas de CMV que presentan resistencias al GCV, cuyo mecanismo de acción se centra en inhibir la kinasa viral UL97 (Drew, Miner, Marousek, & Chou, 2006; Prichard & Kern, 2011). Entre los nuevos antivirales que actúan inhibiendo la síntesis de ADN de CMV tenemos CMX-001 y Cyclopropavir, con una mayor potencia antiviral que los fármacos de primera y segunda línea. CMX-001 es un antiviral derivado del CDV que, comparado con éste, tiene mayor actividad frente a cepas resistentes a GCV, menor toxicidad y mejor biodisponibilidad oral (Drew et al., 2006; Dropulic & Cohen, 2010; Prichard & Kern, 2011). De los antivirales con un mecanismo de acción más novel está el Letermovir (AIC246), el cual interfiere con el producto derivado del gen pUL56, bloqueando el empaquetado de su ADN viral dentro de la cápside del virus (Goldner et al., 2011; Lischka et al., 2010). Este nuevo fármaco, además, parece mostrar unas buenas características farmacocinéticas, así como, una escasa toxicidad (Lischka et al., 2010).

Una posible alternativa al tratamiento con fármacos antivirales, o incluso un complemento de esta, es el uso de la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de CMV. Inicialmente, la transferencia adoptiva se realizó en pacientes con riesgo a desarrollar enfermedad por CMV mediante la infusión de células T CD8⁺ (Riddell et al., 1992). Aunque en estos pacientes la infusión de células T CD8⁺ confería protección frente a las complicaciones relacionadas con CMV, posteriormente, se observó que los protocolos de transferencia adoptiva eran más efectivos cuando se transferían células T CD4⁺, las cuales inducían la expansión de células T CD8⁺ CTL desde sus precursores (Einsele et al., 2002). Esta terapia ha demostrado ser eficaz en el control de aquellos episodios de infección activa por CMV que no responden a la terapia antiviral convencional (Crough & Khanna, 2009; Einsele et al., 2002; Hakki et al., 2003; Riddell et al., 1992).

3) Justificación y objetivos

En la actualidad, la mayoría de centros emplean la estrategia del tratamiento antiviral anticipado guiado por PCR en tiempo real (monitorización virológica) para prevenir el desarrollo de enfermedad orgánica en el alo-TPH. Esta estrategia es muy eficaz, pero tiene como efecto indeseado la toxicidad asociada al sobretamiento de los pacientes, de modo que es potencialmente mejorable. En este sentido, existen estudios que demuestran que los análisis cinéticos de la DNAemia viral en el compartimento sistémico podrían aportar información útil en el manejo de la infección activa por el CMV (Emery et al., 2000). Por otra parte, tras el trasplante, es de vital importancia la reconstitución funcional de los linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ específicos frente al CMV para controlar la replicación de CMV (Einsele et al., 2002; Quinnan G. et al., 1982; Reusser et al., 1991; Solano & D, 2010). En este sentido, también sería útil conocer si el perfil funcional de los linfocitos TCD8⁺ tiene alguna influencia en el control de la infección viral (Krol et al., 2011; Lacey et al., 2006; Lilleri et al., 2008). Junto con los linfocitos T, las células NK podrían desempeñar un papel importante en el control de la replicación viral (Barron et al., 2009; Biron, Byron, & Sullivan, 1989; Kuijpers et al., 2008; Solano & D, 2010; Venema et al., 1994), especialmente las células NK que expresan un receptor activador de lectina tipo C (NKG2C) asociado con la molécula de superficie CD94 (Foley et al., 2012; Lopez-Verges et al., 2011).

El objetivo final de nuestro trabajo, tal y como he señalado con anterioridad, es optimar las estrategias de tratamiento antiviral anticipada para la prevención de la enfermedad orgánica en el paciente sometido a trasplante hematopoyético. En el estudio, que se presenta como compendio de 4 artículos, perseguimos los siguientes objetivos:

- (i) Determinar el valor de los estudios cinéticos de la DNAemia plasmática del CMV en el manejo de la infección por el CMV en estos pacientes.
- (ii) Analizar la cinética y funcionalidad de las células T CD8⁺ específicas de CMV durante los episodios de infección activa con objeto de determinar qué perfiles funcionales de estas células se asocian a la resolución de los episodios de infección activa.
- (iii) Estudiar las cinéticas y los niveles de las células NK NKG2C (CD56^{bright}/CD16^{-/low} y CD56^{dim}/CD16⁺) durante episodios de DNAemia viral con objeto de determinar qué perfiles funcionales de estas células se asocian a la resolución de los episodios de infección activa.
- (iv) Evaluar el papel protector de las células NK NKG2C frente al desarrollo de DNAemia viral

- (v) Comparar un método de ICS desarrollado por nuestro grupo para cuantificar la respuesta T CD8⁺IFN γ ⁺ frente al CMV con el ensayo de QuantiFERON[®]-CMV, único test comercializado a tal efecto.

4) Artículos originales

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

[Artículo 1](#)

Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. Beatriz Muñoz Cobo; Carlos Solano; Elisa Costa; Dayana Bravo; María Ángeles Clari; Isabel Benet; María José Remigia; Juan Montoro; David Navarro. Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 17 - 11, pp. 1602 - 1613. 11/2011. ISSN 1523-6536

[Artículo 2](#)

Functional Profile of Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8 β T Cells and Kinetics of NKG2C⁺NK Cells Associated With the Resolution of CMV DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. Munoz-Cobo B, Solano C, Benet, I, Costa E, Remigia M, De la Cámara JN, López J, Amat P, García-Noblejas A, Bravo D, Clari MA, y Navarro D. J.Med.Virol.84:259-267,2012.

[Artículo 3](#)

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. Clari MA, Munoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia M, Bravo D, Amat P, Navarro, D. Clin.Vaccine Immunol.2012, 19(5):791

[Artículo 4](#)

An Evaluation of the Role of NKG2C β Natural Killer Cells in Protection From Cytomegalovirus DNAemia Early Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, Garcia-Noblejas A, Navarro D. J Med Virol. 2014 May;86(5):806-11. doi: 10.1002/jmv.23742. Epub 2013 Sep 16. PubMed PMID: 24105728.

4.1) Artículo 1

Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. Beatriz Muñoz Cobo; Carlos Solano; Elisa Costa; Dayana Bravo; María Ángeles Clari; Isabel Benet; María José Remigia; Juan Montoro; David Navarro. Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 17 - 11, pp. 1602 - 1613. 11/2011. ISSN 1523-6536

Dynamics of Cytomegalovirus (CMV) Plasma DNAemia in Initial and Recurrent Episodes of Active CMV Infection in the Allogeneic Stem Cell Transplantation Setting: Implications for Designing Preemptive Antiviral Therapy Strategies

Beatriz Muñoz-Cobo,¹ Carlos Solano,^{2,3} Elisa Costa,¹ Dayana Bravo,¹ María Ángeles Clari,¹ Isabel Benet,^{2,3} María José Remigia,² Juan Montoro,² David Navarro^{1,4}

Preemptive antiviral therapy strategies for active cytomegalovirus (CMV) infection occurring in allogeneic stem cell transplant recipients should be optimized to avoid overtreatment. The current study was aimed at determining whether the analysis of the kinetics of CMV DNA load in plasma may provide useful information for the therapeutic management of active CMV infection in this setting. A total of 59 consecutive patients were included in the study, of which 40 (67.8%) developed 1 ($n = 21$) or more ($n = 19$) episodes of CMV DNAemia. The need for antiviral therapy for initial or secondary episodes of CMV DNAemia could not be predicted on the basis of the CMV DNA load value in the first plasma testing positive by polymerase chain reaction (PCR). In contrast, in the absence of antiviral therapy, an increase of ≥ 3 -fold between the baseline CMV DNA load and that measured a median of 6 days later discriminated between initial episodes eventually requiring antiviral treatment and those resolving spontaneously (sensitivity, 76.4%; specificity, 89.4%; positive predictive value, 86.6%; negative predictive value, 80.9%). This criterion was not useful for identifying recurrent episodes of CMV DNAemia that required antiviral therapy. The CMV doubling time and CMV DNA loads at the time of the first positive PCR and at initiation of preemptive therapy did not differ significantly between episodes that responded immediately to antiviral therapy from those showing a delayed response. The analysis of the dynamics of CMV DNA load in plasma in the absence of antiviral therapy allowed early recognition of episodes of CMV DNAemia that eventually needed to be treated, but did not permit prediction of the kinetics of CMV DNA clearance in response to antiviral therapy.

Biol Blood Marrow Transplant 17: 1602-1611 (2011) © 2011 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS: Cytomegalovirus (CMV), CMV DNA load in plasma, Self-resolving episodes of active CMV infection, CMV doubling time, Kinetics of CMV DNA load decline, Preemptive antiviral therapy

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is a major cause of morbidity and mortality following allogeneic stem

cell transplantation (allo-SCT) [1]. Preemptive antiviral therapy, consisting of the administration of antivirals upon detection of CMV replication in the blood compartment, has been adopted by most transplant centers as the first-choice strategy for the prevention of CMV end-organ disease [2]. In recent years, most laboratories have switched from the pp65 antigenemia assay to quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) methods for the surveillance of active CMV infection and guidance of preemptive antiviral therapy. In this setting, antiviral treatment is usually initiated when the CMV DNAemia level reaches a certain predetermined threshold (ranging from 1000 to 10,000 copies/mL in whole blood, or from 100 to 10,000 copies/mL of plasma) [2,3]. At some centers, the CMV DNA load cutoff triggering the initiation of antiviral therapy is stratified according to the individual risk of patients for developing

From the ¹Microbiology Service Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; and ⁴Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 1610.

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

Received June 27, 2011; accepted August 15, 2011

© 2011 American Society for Blood and Marrow Transplantation 1083-8791/\$36.00

doi:10.1016/j.bbmt.2011.08.014

CMV disease, and the time at which CMV DNAemia occurs [3]. Alternatively, preemptive therapy may be initiated upon a documented increase in CMV DNAemia between 2 consecutive determinations [3-5]. Although preemptive antiviral therapy regimens have been shown to effectively prevent the occurrence of CMV end-organ disease, they probably result in over-treatment [6,7].

The analysis of the dynamics of CMV replication during active CMV infection in allo-SCT recipients has been shown to be useful for predicting the risk of CMV end-organ disease and nonrelapse mortality [8-11], the likelihood of the occurrence of recurrent episodes of active CMV infection, and the kinetics of response to antiviral therapy [12,13]. Nevertheless, no practical therapeutic intervention measures have been derived from these studies. The current study was aimed at determining whether knowledge regarding the kinetics of CMV DNA load in plasma may provide useful information for the therapeutic management of active CMV infection in allo-SCT recipients. In addition, the effects of pretransplant and clinical factors on the kinetic pattern of CMV plasma DNAemia clearance in initial episodes of active CMV infection and on the incidence of recurrent episodes in this clinical setting were investigated.

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 59 consecutive patients undergoing non-manipulated T cell replete allo-SCT between January 2009 and March 2011 at the Hospital Clínico Universitario of Valencia were included in the study. Relevant clinical and demographic data of the patients are summarized in Table 1. The study was approved by the Ethics Committee, and all patients gave their informed consent to participate in the study.

Management of Active CMV Infection

Virologic monitoring of CMV infection was performed using the Abbott CMV PCR Kit (produced by Qiagen GmbH, Hilde, Germany for Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL) [4], on the m2000RT system (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). In our experience, this assay is able to reliably quantify CMV DNA loads >10 copies/mL [14]. Nucleic acid extraction was performed with the Abbott mSample preparation system DNA Kit on the m24 SP instrument (Abbott Diagnostics) using 500 µL of plasma. Virologic monitoring was performed weekly within the first 120 days following transplantation and at each scheduled patient visit thereafter. During episodes of active CMV infection, virologic monitoring was scheduled to

Table 1. Demographic and Clinical Data of the Patients

Parameter	No. of Patients (%)
Patients	59
Median age, years (range)	49 (16-71)
Sex, no. male patients/no. female patients	39/20
Underlying disease	
Acute myeloid leukemia	24 (40.6)
Non-Hodgkin's lymphoma	16 (27.1)
Acute lymphocytic leukaemia	6 (10.1)
Chronic lymphocytic leukaemia	4 (6.7)
Multiple myeloma	2 (3.3)
Myelodysplastic syndrome	2 (3.3)
Hodgkin's lymphoma	2 (3.3)
Myeloproliferative syndrome	1 (1.6)
Chronic myeloid leukaemia	1 (1.6)
Plasma cell disorders	1 (1.6)
CMV-serostatus	
D+/R+	28 (47.4)
D-/R+	22 (37.2)
D+/R-	5 (8.5)
D-/R-	4 (6.7)
Donor type	
HLA-identical sibling	28 (47.4)
Matched unrelated	20 (33.9)
Mismatched related	2 (3.4)
Mismatched unrelated	9 (15.3)
Conditioning regimen	
Nonmyeloablative	35 (59.3)
Melphalan/Fludarabine	23 (38.9)
Busulfan/Fludarabine	7 (11.8)
Melphalan/Fludarabine/Rituximab	5 (8.4)
Myeloablative	24 (40.7)
Busulfan/Cyclophosphamide	11 (18.6)
Busulfan/Fludarabine/Thiotepa/Antytimoglobulin	10 (16.9)
Busulfan/Cyclophosphamide/Antytimoglobulin	2 (3.2)
Fludarabine/Busulfan/Antytimoglobulin	1 (1.6)
Stem cell source	
Peripheral blood	50 (84.7)
Umbilical cord blood	9 (15.3)
GVHD prophylaxis	
Cyclosporin A/Methotrexate	33 (55.9)
Cyclosporin A/mycophenolate mofetil	9 (15.3)
Rapamycin + Tacrolimus	10 (16.9)
Cyclosporine A/Prednisone	3 (5.1)
Others	4 (6.7)
Acute GVHD	
Grades 0-I	36 (61.1)
Grades II-IV	23 (38.9)

D indicates donor; R, recipient; +, CMV seropositive; -, CMV seronegative.

Age is given as median (range).

be performed twice a week, although this was not done for all patients.

Patients with active CMV infection were preemptively treated with oral valganciclovir (900 mg/12 h), i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 h) or foscarnet (i.v. 60 mg/kg/12 h) upon detection of >500 CMV DNA copies/mL in the plasma. Antiviral therapy was discontinued after 2 consecutive negative PCR results obtained 3 to 7 days apart. All patients with antibodies against herpes simplex virus received acyclovir prophylaxis as follows: recipients of unrelated grafts were treated with i.v. acyclovir (750 mg/8 h) when either the patient, the donor or both were

CMV-seropositive; recipients of related grafts and CMV-seronegative patients receiving an unrelated graft from a CMV-seronegative donor were treated with oral acyclovir (800 mg/12 h). Acyclovir was administered until stable hematopoietic cell engraftment was achieved, usually around day +30.

Definitions

Active CMV infection was diagnosed upon detection of CMV DNA (any level) in 1 or more plasma specimens. Episodes of active CMV infection with only 1 specimen testing positive by PCR were considered true episodes if a different aliquot of plasma also tested positive. For data analysis, the commencement and end of a given episode of active viral infection were defined by the first positive (any level of plasma viral load) and first negative results, respectively. Only increases in CMV DNA loads ≥ 3 times the baseline levels were considered true increases, as these were above the intraassay variability of the PCR test (approximately, $0.2 \log_{10}$ for low CMV DNA values) [3]. Recurrent episodes of active CMV infection were those that occurred at least 15 days after clearance (first negative PCR) of the preceding episode. CMV end-organ disease was diagnosed and treated as previously reported [15].

Analyses of the Kinetics of CMV Plasma DNAemia

To determine the rate of virus replication, the viral doubling time (*dt*) of CMV was estimated considering for analysis the first 2 PCR positive results in the absence of antiviral treatment [16]. The *dt* was given by $dt = (t_2 - t_1) \times \log(2) / \log(q_2/q_1)$, with q_1 and t_1 being the CMV DNA load (copies/mL) at the time of the first positive PCR (in days), respectively, and q_2 and t_2 the CMV DNA load at the time of the second positive PCR, respectively. This formula assumes a constant growth rate, which occurs in the early phase of virus replication. CMV *dt* calculations were performed only for episodes in which the increase in CMV DNA load between the first and the second positive PCR determinations was ≥ 3 -fold. The kinetics of CMV DNA load clearance followed a logarithmic decay curve in most treated episodes but only in a few self-resolving episodes (see below), expressed by the equation $y_t = y_0 e^{-kt}$, where y_0 is the initial CMV DNA load, t is time from initiation of antiviral therapy (for self-resolving episodes, t is the duration of the episode), and k is the decay constant [12,17,18]. A nominal value of 9 copies/mL was arbitrarily ascribed for plasma specimens with undetectable CMV DNA load, on the basis of the actual limit of detection of the assay. CMV DNA load half-life was then calculated using the equation $\ln 2/k$.

Statistical Analysis

The data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS version 17.0 (SPSS, North Chicago, IL). Comparisons were carried out using the chi-square test for categorical variables and the nonparametric Mann-Whitney *U*-test or the Wilcoxon signed-rank test for unpaired or paired continuous data, respectively. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value $< .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Incidence of CMV Plasma DNAemia during the Study Period

Forty of 59 patients (67.8%) developed 1 ($n = 21$) or more ($n = 19$) episodes of CMV DNAemia during the study period. Three of the latter 19 patients experienced more than 2 episodes (in all, 63 episodes were detected). The patients were followed up for a median of 220 days (range: 10-375 days).

Virologic Features of Initial Episodes of CMV Plasma DNAemia

Initial episodes of CMV plasma DNAemia were detected at a median of 30 days (range: 1-90 days) after transplantation. Twenty-three out of the 40 episodes (57%) resolved spontaneously. Of these, 19 had > 1 specimen testing positive by PCR. Twelve of the remaining 17 episodes cleared following instauration of antiviral therapy. The median time to the first CMV DNA positive result was not significantly different for self-resolving or for treated episodes ($P = .930$). The CMV DNA load in plasma rapidly declined after implementation of antiviral therapy in 5 episodes (type A episodes), whereas in 12 episodes, CMV DNA load increased within the next 2 to 3 weeks following the instauration of antiviral therapy, and then progressively declined (type B episodes). Five treated episodes (type B) were still active at the time of the patient's death. As shown in Table 2, the duration of CMV DNAemia was significantly shorter for self-resolving episodes than for treated episodes ($P = .001$), irrespective of whether the latter were type A ($P = .022$) or type B ($P = .001$) episodes. The duration of type B episodes was longer than that of type A episodes, although the difference did not reach statistical significance ($P = .432$).

In most of self-resolving episodes (15 of 19 episodes with > 1 positive PCR result), either fluctuating or rather stable levels of CMV DNA loads (mean difference between samples $< 0.2 \log_{10}$ copies/mL) were observed until resolution. In the remaining 4 episodes, CMV DNA load decline did follow an exponential function (Figure 1). The CMV DNA load decay rate (k) in these episodes was lower than for treated

Table 2. Virologic Features of Initial Episodes of Cytomegalovirus (CMV) Plasma DNAemia

Type of Episode (No. of Episodes)	Initial VL (Copies/mL)	VL at Treatment (Copies/mL)	Peak VL (Copies/mL)	Duration (Days)	Virus Doubling Time (Days)	$K_{\text{decline}}/\text{Day}^{-1}$	Half-Life (Days)
Self-resolving (23)	28 (20-135)	NA	40 (25-308)	16 (3-48)	NA	0.13 (0.09-0.27)	5.57 (2.52-7.43)
Treated (17)	70 (25-216)	1,216 (523-15,244)	3,872 (676-66,329)	40.5 (18-130)	2.18 (1.04-8.76)	0.35 (0.06-0.65)	1.90 (1.06-11.50)
Treated Type A* (5)	63 (25-133)	1,455 (676-1,739)	1,455 (676-1,739)	40 (21-68)	4.45 (1.20-8.76)	0.37 (0.18-0.37)	1.87 (1.83-3.85)
Treated Type B† (12)	79 (28-216)	939 (523-15,244)	9,907 (918-66,329)	44 (18-130)	2.01 (1.04-3.10)	0.14 (0.06-0.65)	4.77 (1.06-11.50)

VL indicates CMV DNA load; NA, not applicable. Figures are given as median numbers (range). *Immediate response to antiviral therapy. †Delayed response to antiviral therapy.

episodes, though statistical significance was not reached ($P = .297$). Accordingly, the median half-life of CMV DNA load was shorter in treated episodes than in self-resolving episodes ($P = .304$). The median value of k was higher for type A than for type B episodes ($P = .422$). Thus, the median half-life of CMV DNA load was shorter in type A than in type B episodes ($P = .287$).

Analysis of Early Kinetics of CMV DNAemia for Predicting the Virologic Outcome of Initial Episodes of Active CMV Infection

The median initial CMV DNA load (first positive PCR) was significantly lower ($P = .001$) in self-resolving episodes than in those that were eventually treated. Type A and type B episodes had comparable initial CMV DNA viral loads ($P = .62$). Despite the

above findings, a cutoff value for the initial CMV DNA load reliably predicting the subsequent kinetics of CMV DNAemia could not be established, because of a high degree of overlap.

We next sought to determine whether the comparison of CMV DNA loads measured at baseline (initial viral load) and shortly thereafter (second positive PCR), a median of 6 days (range: 4-8 days) after the first positive PCR, would allow for discriminating between episodes eventually requiring antiviral treatment from those that would resolve without the need of antiviral therapy. No significant variation (<3-fold) in the CMV DNA load between measurements was observed in 17 of 19 self-resolving episodes (see Figure 2A and B). A significant increase (≥ 3 -fold) in CMV DNA load was found in 3 of 5 type A episodes and in 10 of 12 type B episodes (Figure 2C). Thus, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and

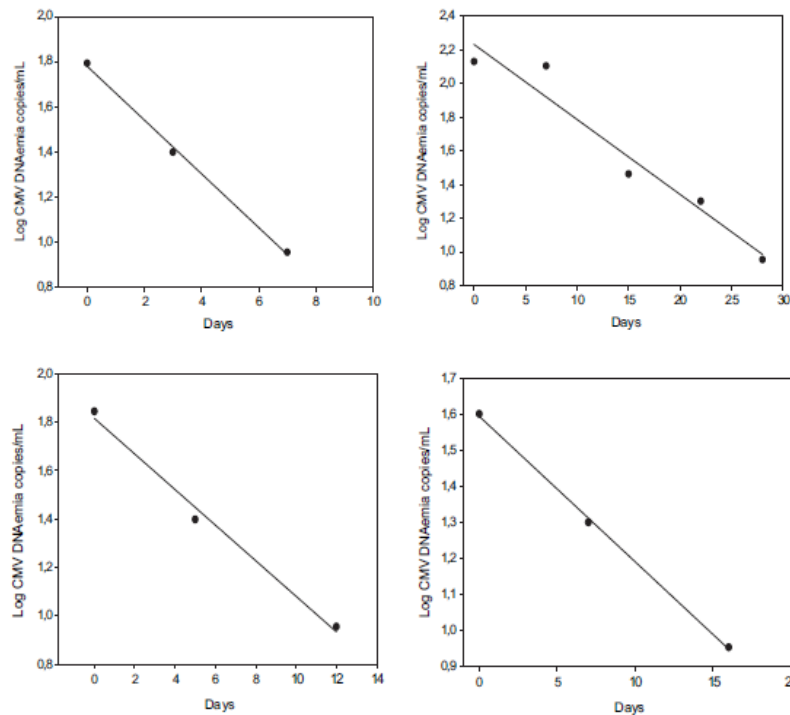


Figure 1. Initial episodes of active CMV infection that resolved spontaneously in which the kinetics of CMV plasma DNA clearance followed an exponential decay function. Black circles are data points. The line of best fit is shown. Day 0 represents the day of the first positive PCR result.

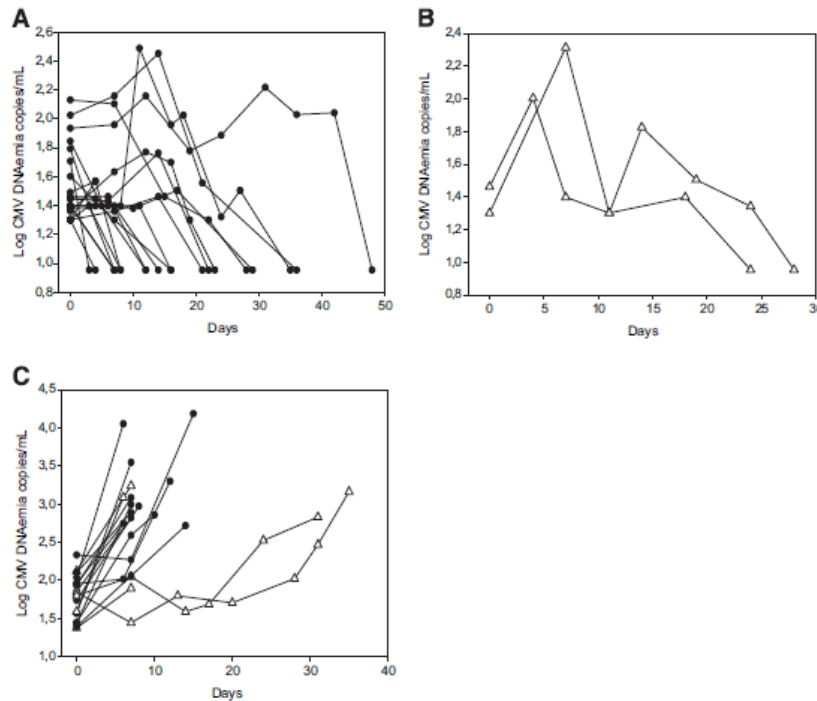


Figure 2. (A) Kinetics of CMV plasma DNAemia in initial episodes of active CMV infection that resolved spontaneously. A ≥ 3 -fold increase of CMV DNA load between the values in the first and second PCR positive specimens was documented in only 2 episodes (B). Early kinetics of CMV plasma DNAemia in initial episodes of active CMV infection that were eventually treated preemptively with antivirals ($n = 17$), before initiation of therapy (C). In 5 of these episodes (white triangles) CMV DNA load rapidly decreased following instauration of antiviral therapy in 5 episodes; in the remaining 12 episodes, a delayed response to therapy was observed (black diamonds). Day 0 represents the day of the first positive PCR result.

negative predictive value for this criterion to identify episodes that required therapeutic intervention were 76.4%, 89.4%, 86.6%, and 80.9%, respectively.

As shown in Table 2, the doubling times for CMV in the 2 self-resolving episodes in which a significant increase in CMV DNA load was documented (2.77 and 3.18) were slightly lower than for treated episodes (median, 2.18; range: 1.04-8.76). The CMV doubling time was higher for type A than for type B episodes, although the difference did not reach statistical significance ($P = .160$). In addition, the median CMV DNA load at the time of initiation of preemptive therapy was not significantly different between type A and type B episodes ($P = .743$).

Effects of Pretransplant and Clinical Factors on the Kinetic Pattern of First Episodes of CMV DNAemia

As shown in Table 3, nonsignificant tendencies to experience more frequent episodes of CMV DNAemia requiring antiviral therapy were observed in patients receiving cord blood or HLA-mismatched grafts in patients who had undergone myeloablative conditioning or in those who were treated with MMF or prednisone as a part of the graft-vs-host disease (GVHD) prophylaxis regimen. CMV D+/R+ allo-SCT recipients developed more frequently self-resolving episodes than D-/R+ or D+/R- patients, although the differ-

ence did not reach statistical significance. Likewise, a trend toward a higher incidence of episodes requiring antiviral therapy was observed in patients with a prior diagnosis of acute grade II-IV GVHD. Interestingly, episodes requiring antiviral therapy for resolution appeared to occur at a lower frequency in patients treated with rapamycin as a part of the GVHD prophylaxis regimen than in those treated with other combinations of immunosuppressive drugs.

Virologic Features of Recurrent Episodes of CMV DNAemia

Twelve of 23 patients (52.1%) experiencing an initial self-resolving episode of active CMV infection developed a recurrent episode of CMV DNAemia within the first year after transplantation. All of these 12 episodes resolved without therapeutic intervention (9 had >1 positive PCR result). The incidence of recurrent episodes of CMV DNAemia in patients who had experienced a treated episode (7 of 17 patients, 42%) was comparable to the incidence in patients with prior self-resolving episodes ($P = .905$). Nevertheless, 3 of these 7 secondary episodes required antiviral treatment (2 were type B and 1 was type A episodes). In addition, recurrent episodes of CMV DNAemia occurred with equal frequencies following type A and type B episodes ($P = 1.0$). The virologic features of recurrent episodes of CMV DNAemia are

Table 3. Effects of Pretransplant and Clinical Factors on the Occurrence of Self-Resolving or Treated Initial Episodes of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia

Factor	No. of Patients with Active CMV Infection (%)			P Value*
	Total	Self-Resolving	Treated	
CMV-serostatus				
D+/R+	21	13 (61.9)	8 (38.1)	.623
D-/R+	16	9 (56.2)	7 (43.8)	
D+/R-	3	1 (25.0)	2 (75.0)	
Type of donor and HLA match				
Related/matched	17	10 (58.8)	7 (41.2)	.388
Related/mismatched	2	0 (0.0)	2 (100.0)	
Unrelated/matched	13	9 (69.2)	4 (30.8)	
Unrelated/mismatched	8	4 (50.0)	4 (50.0)	
Stem cells source				
Peripheral blood	32	19 (59.3)	13 (40.7)	.702
Cord blood	8	4 (50.0)	4 (50.0)	
Conditioning				
Myeloablative	19	10 (52.6)	9 (47.4)	.750
Nonmyeloablative	21	13 (61.9)	8 (39.1)	
GVHD prophylaxis				
CSA + MTX	20	14 (65.0)	6 (35.0)	.123
CSA + MMF	9	4 (44.4)	5 (55.6)	
Rapamycin/Tacrolimus	7	5 (71.4)	2 (29.6)	
CSA + PDN	2	0 (0.0)	2 (100.0)	
Acute GVHD†				
Grades 0-I	25	14 (56.0)	11 (44.0)	1.0
Grades II-IV	10	5 (50.0)	5 (50.0)	

D indicates donor; R, recipient; CSA, cyclosporine A; MTX, methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; PDN, prednisone.
 *Frequency comparisons were carried out using the chi-square test (Fisher's exact test). A P value $\leq .05$ was considered statistically significant.
 †Only those cases in which acute GVHD occurred before detection of CMV DNAemia were considered for analysis.

summarized in Table 4. The duration of treated episodes was longer than that of self-resolving episodes, although statistical significance was not reached. As for first episodes, the initial CMV DNA load in recurrent episodes was significantly higher in self-resolving episodes than in treated episodes, although again, a high degree of overlap was observed. Nevertheless, in contrast to what was observed in initial episodes, variation in CMV DNA load between baseline levels and those measured in the second positive PCR did not allow for discrimination between

Table 4. Virologic Features of Recurrent Episodes of CMV Plasma DNAemia

Virologic Parameter	Type of Episode		P Value*
	Self-Resolving	Treated	
Initial VL (copies/mL)	25 (20-63)	35 (28-161)	.054
Peak VL (copies/mL)	43 (22-477)	1,012 (5674-1395)	.002
Duration (days)	19 (6-67)	34 (26-35)	.295
Day of first + PCR	96 (54-260)	160 (96-180)	.421

VL indicates CMV DNA load.
 Figures are given as median numbers (range).
 *As determined by the Mann-Whitney U-test; A P value $\leq .05$ was considered statistically significant.

episodes resolving spontaneously (Figure 3A) and those requiring antiviral therapy (Figure 3B). In fact, significant variations between measurements were observed in none out of 9 self-resolving episodes with more than 1 positive PCR result and in 1 of 3 episodes eventually treated (Figure 3B). The CMV DNA load decay rate in these episodes was a median of 0.24 day^{-1} (range: $0.16\text{-}0.59 \text{ day}^{-1}$), which corresponded to a median half-life of 2.85 days (range: 1.17-4.10 days). The kinetics of CMV DNAemia clearance for secondary episodes that resolved spontaneously did not follow an exponential decay function (not shown).

Effects of Pretransplant and Clinical Factors on the Incidence of Recurrent Episodes of CMV DNAemia

A trend toward a more frequent occurrence of recurrent episodes of CMV DNAemia was observed in CMV D-/R+ patients, and in the setting of unrelated/mismatched and umbilical cord blood allo-SCT. The differences, however, did not reach statistical significance (Table 5).

Kinetics of CMV Plasma DNAemia in Patients with CMV End-Organ Disease

Two patients developed CMV end-organ disease (enteritis) within the first 100 days after transplantation. Both received unrelated/HLA-matched peripheral

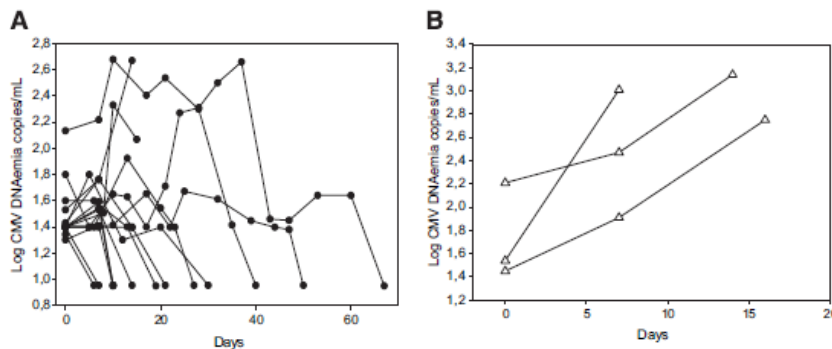


Figure 3. (A) Kinetics of CMV plasma DNAemia in recurrent episodes of active CMV infection that resolved spontaneously. (B) Kinetics of CMV plasma DNAemia in initial episodes of active CMV infection that required preemptive antiviral therapy before initiation of treatment. Day 0 represents the day of the first positive PCR result.

Table 5. Effects of Pretransplant and Clinical Factors on the Incidence of Recurrent Episodes of Cytomegalovirus (CMV) DNAemia within the Study Period

Factor	Recurrent Episode of CMV DNAemia No. of Patients (%)		P Value*
	Yes	No	
CMV-serostatus			
D+/R+	9 (42.8)	12 (57.2)	
D-/R+	10 (62.5)	6 (37.5)	
D+/R-	0 (0)	3 (100)	.111
Type of donor and HLA match			
Related/matched	8 (47.0)	9 (53.0)	
Related/mismatched	0 (0)	2 (100)	
Unrelated/matched	6 (46.1)	7 (53.9)	
Unrelated/mismatched	5 (62.5)	3 (37.5)	.655
Stem cells source			
Peripheral blood	14 (43.7)	18 (56.3)	
Cord blood	5 (62.5)	3 (37.5)	.442
Conditioning			
Myeloablative	10 (52.6)	9 (47.4)	
Nonmyeloablative	9 (42.8)	12 (57.2)	.752
GVHD prophylaxis			
CSA + MTX	10 (50.0)	10 (50.0)	
CSA + MMF	5 (55.5)	4 (45.5)	
Rapamycin/Tacrolimus	4 (57.1)	3 (42.9)	
CSA + PDN	0 (0)	2 (100)	.123
Acute GVHD†			
Grades 0-I	14 (56.0)	11 (44.0)	
Grades II-IV	7 (46.6)	8 (53.4)	.504

D indicates donor; R, recipient; CSA, cyclosporine A; MTX, Methotrexate; MMF, mycophenolate mofetil; PDN, prednisone.

*Frequency comparisons were carried out using the chi-square test (Fisher's exact test). A P value ≤.05 was considered statistically significant.

†Only those cases in which acute GVHD occurred before detection of CMV DNAemia were considered for analysis.

blood stem cell grafts, were conditioned with a nonmyeloablative regimen (fludarabine plus melphalan) and were treated with cyclosporine A and methotrexate for prophylaxis of GVHD. CMV-serostatus of donors and recipients were D+/R+ in 1 case and D-/R+ in the other. Neither of these patients developed acute GVHD (aGVHD). Both patients had low initial CMV DNAemia levels (91 and 28 copies/mL). A significant increase in CMV DNA load before initiation of antiviral therapy was observed in 1 of these episodes ($dt = 2.5$ days). Both episodes (type B) were treated with i.v. ganciclovir and had a duration of 102 and 87 days, respectively. The peak of CMV DNAemia was reached at days +21 (66,329 copies/mL) and +30 (35,431 copies/mL), respectively, after the first positive PCR result. Both patients developed a recurrent episode of CMV DNAemia.

DISCUSSION

In the current study, we took advantage of a highly sensitive real-time PCR and a relatively conservative strategy for initiation of preemptive antiviral therapy (>500 CMV DNA copies/mL in plasma) to investigate

whether the analysis of the kinetics of CMV DNAemia may yield useful information for the therapeutic management of active CMV infection in the allo-SCT setting. In our cohort, the overall rate of CMV DNAemia was exceedingly high (almost 70%), which was most likely related not only to the sensitivity of the PCR assay employed for the surveillance of CMV infection, but also to the high-risk profile of the study group. In effect, almost 50% of patients received an unrelated and/or HLA-mismatched graft, and 44% of CMV-seropositive patients received a graft from a CMV-seronegative donor. These pretransplant conditions have been consistently associated with a high incidence of active CMV infection in the allo-SCT setting [2]. More than half of the initial episodes of CMV DNAemia resolved spontaneously. The duration of self-resolving episodes of CMV DNAemia was significantly shorter than that for episodes that were eventually treated. Yet, these episodes lasted for a median of 16 days. This finding should encourage studies aimed at determining the impact of low-level CMV replication, which is permitted when initiation of antiviral treatment is delayed until a certain CMV DNAemia threshold is reached (usually between 500 to 1000 CMV DNA copies/mL), on the incidence and severity of indirect effects linked to CMV [1,2].

For most self-resolving episodes, the kinetics of CMV plasma DNA clearance did not follow a logarithmic decay curve; in fact, either fluctuating or rather stable levels of CMV DNA loads were observed until resolution. In agreement with data recently published by Buyck et al. [12], the $K_{decline}$ for CMV DNA load in episodes that resolved without antiviral therapy was lower than that observed in episodes that required antiviral treatment for resolution. Accordingly, the half-life of CMV DNA load was shorter in the former episodes. Notably, whole-blood samples were analyzed in the study by Buyck et al. [12], whereas plasma specimens were used in the current study.

First, we asked whether the initial CMV plasma DNA load value (first positive PCR result) may allow for discrimination between episodes eventually requiring antiviral therapy from those resolving without the need of antiviral treatment. If this were the case, the initiation of preemptive therapy could be anticipated, perhaps leading to a more rapid resolution of the episode and thereby minimizing the potential deleterious effects of continuous CMV replication. Even though the median initial CMV DNA load was significantly lower for self-resolving episodes than for those that required antiviral therapy for clearance, we found a high degree of overlap among values measured in both groups. It is known that the coefficient of variation of PCR assays for CMV DNA loads close to the limit of detection, as were most of the initial values in our patients, may be as high as 30% [19]. In light of the above observations, the data suggested that

a threshold value for the initial CMV DNA load reliably predicting the subsequent kinetics of CMV DNAemia is unlikely to be established, at least when using highly sensitive real-time PCR assays, such as the method employed in the current study, for monitoring of active CMV infection. In this sense, it must be noted that initial CMV DNA loads measured in this study were below the limit of detection of most commercially available real-time PCRs [2].

We next sought to determine whether the comparison between CMV DNA loads measured at baseline (initial viral load) and shortly thereafter (second positive PCR—a median of 6 days after the first positive PCR result)—would allow for identification of episodes eventually requiring antiviral treatment. We found significant increases of CMV DNA load (≥ 3 -fold) in 76% of episodes eventually requiring antiviral treatment, but in $< 10\%$ of self-resolving episodes. The use of the above criterion would have identified the episodes that eventually required antiviral treatment with a high sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values. In our cohort, this strategy would have allowed for the anticipation of the initiation of antiviral treatment in only 2 episodes (3 and 7 days), because the second CMV DNAemia value measured was above the established cutoff for initiation of antiviral therapy; nevertheless, a larger number of patients (6 of 13) would have benefited from this strategy had a higher CMV DNAemia level (1000 copies/mL) been set as the threshold for the initiation of antiviral therapy, as in other transplant centers. In light of these findings, studies designed to determine whether anticipation of preemptive therapy based on the above criterion would lead to a reduction in the cumulative dose of antivirals administered or to any clinically significant benefit are warranted. Prior studies have proposed CMV plasma DNA level increases of 174 copies/mL/day [5] or 266 copies between 2 consecutive determinations drawn a median of 7 days apart [4] to discriminate between episodes that required preemptive treatment and those that did not. These estimations, nevertheless, were made in the setting of a preemptive strategy consisting of the initiation of antiviral therapy upon detection of any level of pp65 antigenemia. In addition, Boeckh and Ljungman [3] proposed an increase of ≥ 5 -fold for initiation of preemptive therapy in low-risk allo-SCT recipients. To our knowledge, no data on the clinical efficacy and safety of such strategies have been published.

Preemptive antiviral therapy results in most cases in a rapid decline of CMV DNA load (type A episodes in the current study); nevertheless, increasing levels of CMV DNAemia early after the initiation of antiviral therapy (type B episodes in this study) are occasionally documented [20-23]. This paradoxical phenomenon has been related to a lack of prompt expansion of

functional CMV-specific T cells in response to viral replication [23]. The occurrence of episodes with a delayed response to antiviral therapy is associated with an increased risk of CMV end-organ disease [12]. Thus, early recognition of this type of episode would allow for rapid therapeutic intervention, perhaps including the use of adoptive immunotherapy, in order to reduce the risk of CMV-related morbidity. In this context, Buyck et al. [12] found a significantly higher mean growth rate and higher baseline viral load at the initiation of therapy in episodes with a delayed response to therapy with respect to those with an immediate response to therapy, whereas the initial CMV DNA load appeared to be comparable for both type of episodes. Our data partly agree with those of Buyck et al. [12]. In effect, the CMV doubling time was lower in type B than in type A episodes, although statistical significance was not reached, and the initial CMV DNA load did not differ significantly between both types of episodes. Nevertheless, in contrast to the data reported in the above study, baseline CMV DNA loads at the time of initiation of preemptive therapy did not differ significantly between both types of episodes. Thus, in our experience, the analysis of the early kinetics of CMV DNAemia did not allow us to consistently identify the episodes of active CMV infection with a delayed response to antiviral therapy. Discrepancies between our data and those of Buyck et al. [12] may be related to several factors, including the use of different specimens for CMV DNA quantification, the use of distinct CMV DNA thresholds for triggering the initiation of preemptive therapy and the extensive use of Campath-1H in their study.

Recurrent episodes of active CMV infection occurred with a comparable frequency among patients who had an initial self-resolving episode and those who developed an initial preemptively treated episode. Nevertheless, the likelihood of experiencing a secondary episode that required antiviral therapy was higher in patients who had developed a treated episode than in those who had experienced a self-resolving episode. In agreement with a previous study [12], the risk of recurrence was not associated with the rate of CMV DNA decline in primary treated episodes following initiation of therapy. As for initial episodes, the baseline CMV DNA load in secondary episodes did not allow for a prediction of the subsequent kinetics of CMV DNAemia. Nevertheless, in contrast to initial episodes, variation in CMV DNA load between baseline levels and those measured in the second positive PCR did not allow for discrimination between episodes resolving spontaneously and those requiring antiviral therapy. As ultimate control of CMV replication depends upon adequate expansion of functional CMV-specific T cells [23,24], the above finding likely reflected a more efficient and prompt T cell response in secondary episodes.

We were interested in assessing the impact of several pretransplant and posttransplant clinical factors on the kinetics of CMV DNAemia during first episodes of active CMV infection, and the incidence of recurrent episodes. Although we found no significant associations, a trend toward a higher frequency of episodes that required antiviral therapy was observed in CMV D-/R+ recipients, in patients who received umbilical cord blood or HLA-mismatched grafts, in those who received mycophenolate mofetil or prednisone (<1 mg/kg/day) as a part of the GVHD prophylaxis regimen and in patients who were treated with high doses of corticosteroids (>1 mg/kg/day) for grades II to IV GVHD. These findings were not unexpected as all the above conditions have been shown to be associated with delayed CMV-specific immune recovery [25-30]. In this context, it has previously been shown that the magnitude and promptness of the expansion of functional CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells in response to CMV replication critically determine the kinetics of CMV DNAemia clearance [23]. Interestingly, the use of rapamycin for the prevention of GVHD was clearly associated with a relatively low incidence of episodes that required antiviral treatment. The scarce number of patients treated with this drug in our cohort did not allow to draw definitive conclusions on this issue; nevertheless, this effect has been previously documented in the solid organ transplantation setting [31] and is likely because of a direct inhibitory effect of rapamycin on viral replication [32].

Delayed recovery of CMV-specific T immunity has been shown to be a significant risk factor for the development of recurrent episodes of active CMV infection in allo-SCT recipients [30,33]. In support of this view, we found that CMV D-/R+ recipients and patients who underwent unrelated/mismatched or umbilical cord blood allo-SCT tended to experience recurrent episodes of active CMV infection with higher frequencies. As mentioned above, all these pretransplant and clinical conditions have been previously documented to be associated with an impairment of CMV-specific T cell recovery.

The incidence of CMV end-organ disease in our cohort was 3.3% (2 patients), which is in accordance to data previously published by our group [4]. Unfortunately, neither the analysis of the early kinetics of CMV plasma DNAemia in the absence of antiviral therapy nor the assessment of the dynamics of CMV plasma DNA load following the instauration of antiviral treatment in these 2 episodes allowed for the anticipation of the development of CMV end-organ disease. Obviously, no definitive conclusions can be drawn from these data given the limited number of cases subjected to analysis.

This study has 2 main limitations. First, the number of patients included in the cohort may have been insufficient to assess precisely the impact of

pretransplant and clinical factors on the kinetics of CMV DNAemia. Second, there might be certain inaccuracies in the CMV DNAemia kinetics calculations because of insufficient frequency of sampling. In this respect, there is no consensus as to what should be the frequency of CMV DNA load monitoring during episodes of active CMV infection in the allo-SCT setting; our data seemed to support the idea that the schedule of once-a-week monitoring is probably safe, as long as a highly sensitive PCR is used for the surveillance of CMV infection. Nevertheless, it may also be reasonable to implement the twice-a-week schedule for high-risk patients, such as those receiving an unrelated or HLA-mismatched graft (including recipients of umbilical cord blood transplants), in whom the doubling time of CMV during the episodes of viral replication is clearly faster.

In summary, in the current study, we further characterized the dynamics of CMV DNAemia during initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allo-SCT setting. The data reported herein should be taken into consideration for the design of preemptive antiviral therapy strategies based on virologic monitoring.

ACKNOWLEDGMENTS

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

Financial disclosure. This research was supported by a grant (09/1117) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

B.M.-C., E.C., M.A.C., and D.B. did PCR analyses and assisted in the analysis of the data. C.S., I.B., M.J.R., and J.M. analyzed the data and attended the patients, D.N. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

REFERENCES

1. Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:S70-S72.
2. Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol.* 2010;5:111-124.
3. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 2009;113:5711-5719.
4. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, et al. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3311-3318.
5. Halfon P, Berger P, Khiri H, et al. Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after

- hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol.* 2011;83:490-495.
6. Ljungman P. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients? *J Clin Virol.* 2006;35:493-495.
 7. Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:865-869.
 8. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:597-605.
 9. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet.* 2000;355:2032-2036.
 10. Avetisyan G, Larsson K, Aschan J, Nilsson C, Hassan M, Ljungman P. Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:687-692.
 11. Stachel D, Kirby K, Corey L, Boeckh M. Viral load as predictor for transplant-related mortality in the era of pre-emptive therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:S46.
 12. Buyck HC, Griffiths PD, Emery VC. Human cytomegalovirus (HCMV) replication kinetics in stem cell transplant recipients following anti-HCMV therapy. *J Clin Virol.* 2010;49:32-36.
 13. Torre-Cisneros J, Caston-Osorio JJ, Martín C, et al. Impact of initial cytomegalovirus viral load on efficacy of preemptive therapy with ganciclovir in allogeneic stem cell transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:6-12.
 14. Chilet M, Aguilar G, Benet I, et al. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol.* 2010;82:1384-1391.
 15. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of HCMV infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1094-1097.
 16. Tormo N, Solano C, de la Cámara R, et al. An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:653-661.
 17. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med.* 1999;190:177-182.
 18. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis.* 2002;186:829-833.
 19. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1142-1148.
 20. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood.* 1996;88:4063-4071.
 21. Nichols WG, Corey L, Gooley T, et al. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood.* 2001;97:867-874.
 22. Gerna G, Lilleri D, Zecca M, et al. Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica.* 2005;90:526-533.
 23. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:543-549.
 24. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol.* 2010;82:1208-1215.
 25. Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. Cytomegalovirus-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:501-511.
 26. Hakki M, Riddell SR, Storek J, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood.* 2003;102:3060-3067.
 27. Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica.* 2008;93:248-256.
 28. Pourghesari B, Piper KP, McLarnon A, et al. Early reconstitution of effector memory CD4 $^{+}$ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:853-861.
 29. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood.* 2009;113:6465-6476.
 30. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011; Jan 17 [Epub ahead of print].
 31. San Juan R, Aguado JM, Lumbres C, et al. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clin Infect Dis.* 2008;47:875-882.
 32. Moorman NJ, Shenk T. Rapamycin-resistant mTORC1 kinase activity is required for herpesvirus replication. *J Virol.* 2010;84:5260-5269.
 33. Grataca JW, Boeckh M, Nakamura R, et al. Immune monitoring with iTAG MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood.* 2010;116:1655-1662.

4.2) Artículo 2

Functional Profile of Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8 β T Cells and Kinetics of NKG2C⁺NK Cells Associated With the Resolution of CMV DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. Munoz-Cobo B, Solano C, Benet, I, Costa E, Remigia M, De la Cámara JN, López J, Amat P, García-Noblejas A, Bravo D, Clari MA, y Navarro D. J.Med.Virol.84:259-267,2012.

Functional Profile of Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8⁺ T Cells and Kinetics of NKG2C⁺ NK Cells Associated With the Resolution of CMV DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

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

¹Microbiology Service Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

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

⁴Hematology Service, Hospital de la Zarzuela, Madrid, Spain

⁵Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

⁶Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁷Hematology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain

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

Immune mechanisms involved in control of cytomegalovirus (CMV) infection in the allogeneic stem cell transplantation setting have not been fully disclosed. CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells expressing IFN- γ , TNF- α , and CD107a, alone or in combination, and NKG2C⁺ NK cells were prospectively enumerated during 13 episodes of CMV DNAemia. The expansion of monofunctional and polyfunctional CD8⁺ T cells was associated with CMV DNAemia clearance. The size and functional diversity of the expanding CD8⁺ T-cell population was greater in self-resolved episodes than in episodes treated with antivirals. These differences were related to the magnitude of expansion of cognate antigen IFN- γ CD4⁺ T cells. The resolution of CMV DNAemia was associated frequently with a marked expansion of both CD56^{dim}/CD16⁺ NK cells and NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16⁻ NK cells. The data lend support to the role of polyfunctional CD8⁺ T cells in controlling CMV replication in the allogeneic stem cell transplantation setting, and suggest that NKG2C⁺ NK cells may be involved critically in the resolution of CMV DNAemia episodes. *J. Med. Virol.* **84:259–267, 2012.** © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: cytomegalovirus; CMV DNAemia; CD8⁺ T-cell response; polyfunctional CD8⁺ T cells; NK cells; allogeneic stem cell transplantation

INTRODUCTION

The effective control of cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic stem cell transplant recipients is critically dependent upon the reconstitution of functional CMV-specific T-cell immunity [Quinnan et al., 1982; Reusser et al., 1991; Riddell et al., 1992; Li et al., 1994; Einsele et al., 2002; Solano and Navarro, 2010]. In this context, not only the magnitude but also the quality of the CD8⁺ T-cell response driven by CMV replication is likely to determine the efficiency of viral clearance and the long-term protection from recurrent infections. There is increasing evidence to show that CD8⁺ and CD4⁺ T cells, which exert multiple effector functions (polyfunctional), are crucial in controlling acute and chronic viral infections [Harari et al., 2006]. Limited data are available on the functional profile of effector CMV-specific CD8⁺ T cells associated with the resolution of and the protection from active CMV infection in the allogeneic stem cell

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain; Grant number: 09/1117; Grant sponsor: Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana; Grant number: AP/029/10.

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

Accepted 13 September 2011

DOI 10.1002/jmv.22254

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

transplantation setting [Lacey et al., 2006; Lilleri et al., 2008; Zhou et al., 2009; Król et al., 2011].

Natural killer (NK) cells are believed to be critical in limiting CMV replication [Quinnan et al., 1982; Biron et al., 1989; Venema et al., 1994; Kuijpers et al., 2008; Barron et al., 2009; Solano and Navarro, 2010]. In particular, NK cells expressing the C-type lectin activating receptor NKG2C coupled with CD94 have been suggested as playing a major role in the control of CMV infection [Gumá et al., 2004, 2006; Kuijpers et al., 2008]. Two NK cell subpopulations have been defined according to their phenotype and functional capacities: CD56^{bright}CD16^{-low} NK cells that produce cytokines such as IFN- γ and TNF- β , but which show a low expression of perforin, and CD56^{dim}CD16⁺ NK cells that display a high cytotoxic potential [Caligury, 2008]. In the current study, we report on our preliminary investigations on the kinetics monofunctional and polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T cells and of NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16^{-low} and CD56^{dim}CD16⁺ NK cells during episodes of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The current study included 13 consecutive peripheral blood allogeneic stem cell transplant recipients attending the Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCU) who experienced episodes of active CMV infection within the period of April–October 2010. The relevant clinical and demographic data of the patients are summarized in Table I. The study was approved by the Ethics Committees. All patients gave their informed consent to participate in the study.

Management of Active CMV Infection

Virological monitoring of CMV infection was performed by using a plasma real-time PCR assay (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL or LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ)

as described previously [Gimeno et al., 2008; Tormo et al., 2011]. Patients with active CMV infection were treated pre-emptively with oral valganciclovir (900 mg/12 hr), i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 hr) or foscarnet (i.v. 60 mg/kg/8 hr) upon detection of >500 CMV DNA copies/ml in the plasma (Abbott assay). Antiviral therapy was discontinued after two consecutive negative PCR results.

Enumeration of Functional CMV-Specific CD8⁺ T Cells and NK Cell Subsets

Quantitation of monofunctional (IFN- γ , TNF- α , and CD107a), bifunctional (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, and TNF- α /CD107a) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific CD8⁺ T cells was performed by intracellular cytokine staining. Whole blood (0.5 ml) was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (1 μ g/ml/peptide), obtained from JPT peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of co-stimulatory mAbs to CD28 and CD49d, an anti-CD107a mAb coupled to APC, brefeldin (5 μ g/ml), and monensin (1 μ M) for 6 hr at 37°C. The cells were washed in PBS–2% FCS, lysed in BD FACS lysis solution, stained with surface markers (anti-CD8-PerCP-Cy5-5 and anti-CD3-APC-Cy7), permeabilized (BD FACS Permeabilizing solution 2), washed, and finally stained for intracellular cytokines (anti-IFN- γ -FITC and anti-TNF- α -PE). All antibodies and solutions were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA). The cells were stored at 4°C in PBS–1% formaldehyde, acquired within 4 hr in a BD FACScan to II flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) and analyzed with the program Infinicy (BD Biosciences). Negative controls (absence of peptide stimulation) were processed in parallel for all experiments. The gating strategy for enumerating the frequencies of all possible combinations of responding cells is depicted in Figure 1. The total number of each CD8⁺ T cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of CMV-specific

TABLE I. Demographic and Clinical Characteristics of Patients Who Experienced an Episode of Cytomegalovirus DNAemia

Patient	Age/sex	CMV-serostatus	Type of transplant	Conditioning regimen	GvHD prophylaxis
HCU-1	53/M	D–/R+	Matched/Unrelated	NMA	Rapamycin/Tacrolimus
HCU-2	21/M	D+/R+	Matched/Related	NMA	CSA/MTX
HCU-3	62/M	D–/R+	Matched/Unrelated	NMA	CSA/MTX
HCU-4	49/F	D–/R+	Matched/Unrelated	NMA	Rapamycin/Tacrolimus
HCU-5	62/F	D–/R+	Matched/Unrelated	NMA	Rapamycin/Tacrolimus
HCU-6	59/M	D–/R+	Matched/Unrelated	NMA	Rapamycin/Tacrolimus
HCU-7	41/M	D+/R+	Matched/Related	MA	Tacrolimus/MTX
HCU-8	27/M	D+/R–	Matched/Related	NMA	CSA/MMF
HCU-9	41/M	D+/R+	Matched/Related	MA	CSA/MTX
HCU-10	54/F	D+/R+	Matched/Related	MA	CSA/MMF
HCU-11	64/F	D+/R+	Mismatched/Related	NMA	CSA/MMF
HCU-12	31/M	D+/R+	Mismatched/Unrelated	MA	CSA/PDN
HCU-13	31/M	D+/R+	Mismatched/Related	MA	CSA/MTX

CMV, cytomegalovirus; CSA, cyclosporine A; D, donor; F, female; GvHD, graft versus host disease; M, male; MMF, micophenolate mofetil; MTX, methotrexate; MA, myeloablative; NMA, non-myeloablative/reduced intensity; PDN, prednisone; R, receptor.

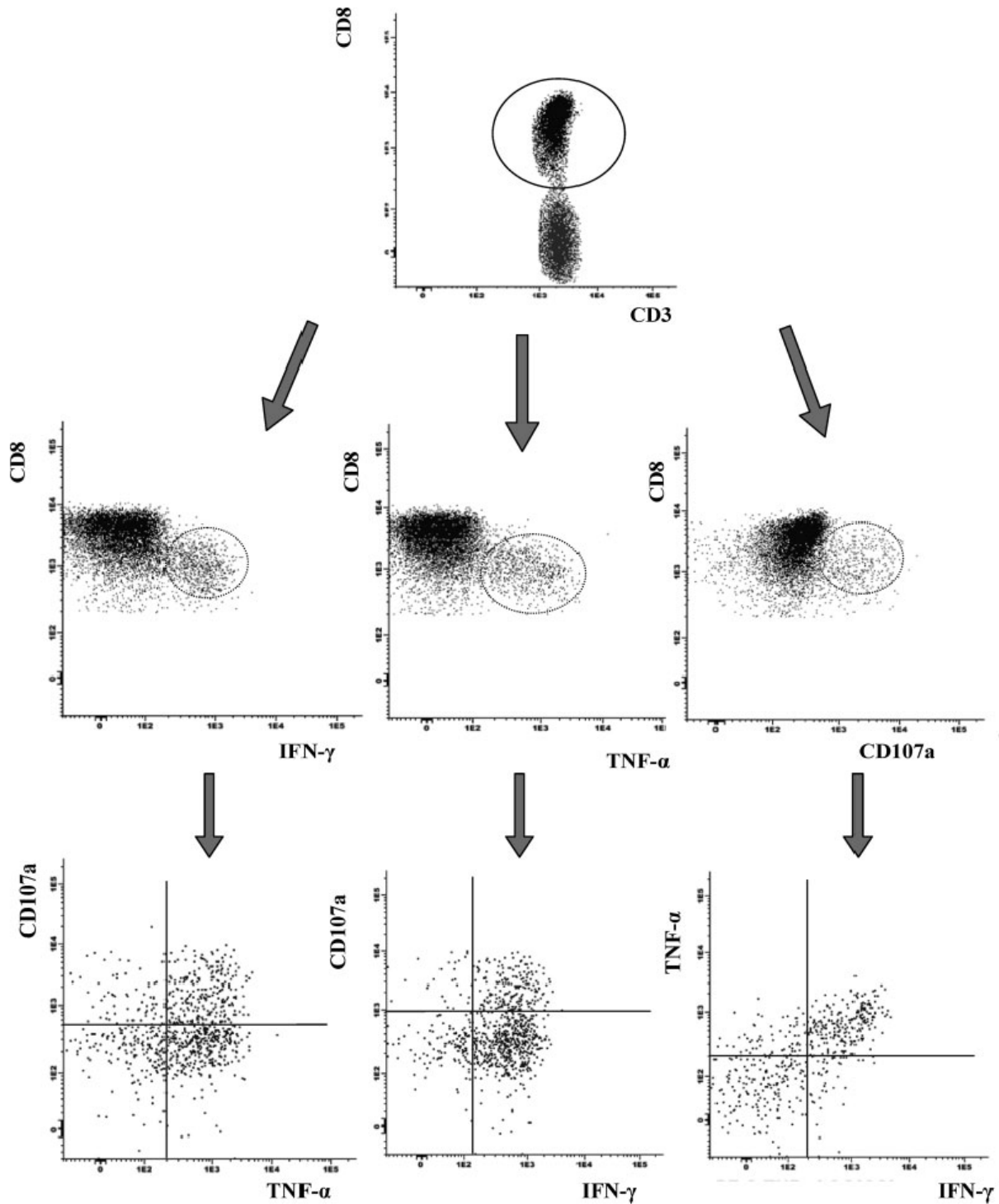


Fig. 1. Gating strategy for enumeration of monofunctional (IFN- γ , TNF- α , and CD107a), bifunctional (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, and TNF- α /CD107a) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific CD8⁺ T cells. Shown are the data for a representative CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T-cell responses in a patient with a self-resolved episode of CMV DNAemia. The cells were acquired in a BD FACScantoII flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) and analyzed with the program Infinicy (BD Biosciences). After initial gating on lymphocytes, cells were selected on the basis of CD3⁺ and CD8⁺ staining, and then further gated based on the expression of IFN- γ , TNF- α , and CD107a (circles). Boolean gating analysis was performed to enumerate frequencies of all possible combinations of responding cells.

T cells (after background subtraction) by the absolute number of CD8⁺ T cells. Specific responses were considered as those that were >0.1% for IFN- γ , TNF- α , and CD107a-expressing CD8⁺ T-cell populations. CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ -producing CD4⁺ T cells were enumerated following a procedure described previously [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010a,b, 2011].

NK cell immunophenotyping was performed in EDTA whole blood samples in a FACScantII flow cytometer (BD Biosciences). All analyses were performed with a combination of CD3-PerCP, CD16-FITC, CD56-APC, and NKG2C-PE (Clone 134591) mAbs, to gate specifically either CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{bright}/CD16⁻ or CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{dim}/CD16⁺ NK cell populations. The mAbs were purchased from BD Biosciences, except NKG2C mAb, which was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). The absolute number of each NK cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of each NK cell population by the absolute number of lymphocytes.

Immunological analyses were performed at the time of the first positive PCR result during the course of CMV DNAemia, at the time of CMV DNAemia clearance (first or second negative PCR result), and at several time points after resolution of the episode.

Statistical Analysis

The data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS version 17.0 (SPSS, North Chicago, IL). Differences between medians were compared using the Mann-Whitney *U*-test. The Spearman's rank test was used to analyze correlations between continuous variables. Two-sided exact *P*-values are reported. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Virological Features of CMV DNAemia Episodes

A total of 13 episodes of active CMV infection that developed at a median of 63.0 days after transplantation (range: 2–370 days) were analyzed (Table II). Five episodes (HCU 1–5) resolved in the absence of antiviral therapy. Five episodes resolved in the presence of antiviral therapy (HCU 6–10), and three episodes remained active at the time of the patients' deaths (two patients died due to severe graft vs. host disease, the remaining patient died due to relapse of the underlying disease), despite the administration of antiviral therapy (HCU 11–13). Patients HCU 1, 3, 8, and 11 had previously experienced one or more episodes of CMV DNAemia. Patients HCU 11 and 13 were under corticosteroid therapy (≥ 1 mg/kg/day) at the time CMV DNAemia occurred. No patient developed CMV end-organ disease during the study period.

Functional Profiles of CMV-Specific CD8⁺ T Cells During Episodes of CMV DNAemia

The kinetics of mono and polyfunctional CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T-cell populations were investigated during 13 episodes of CMV DNAemia. A total of 70 samples (median 5/patient; range: 3–9 specimens) were analyzed. The data are summarized in Table III. A substantial increase in at least two monofunctional and all bifunctional and trifunctional CD8⁺ T cells was documented in 4 out of the 5 self-resolving episodes (HCU-1, 2, 3, 5) at the time of resolution of CMV DNAemia. The expansion of CD8⁺ T cells with cytotoxic potential was particularly marked in all cases. Only CD8⁺ T cells that produced both IFN- γ and TNF- α were found to expand in the remaining self-resolved episode (HCU 4). Expansion of monofunctional,

TABLE II. Virological Features of Episodes of Cytomegalovirus DNAemia Occurring in 13 Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Patient	Day PT (1st +PCR)	Initial VL (copies/ml)	Peak VL (copies/ml)	Duration (days) ^a	Antiviral therapy
HCU-1	231	25	477	64	NA
HCU-2	37	26	35	21	NA
HCU-3	370	26	228	49	NA
HCU-4	63	58	58	14	NA
HCU-5	91	56	56	7	NA
HCU-6	48	745	1849	60	GAN
HCU-7	70	133	1379	21	VGAN
HCU-8	173	335	676	24	VGAN
HCU-9	2	39	1230	15	FOS
HCU-10	6	361	1665	12	FOS
HCU-11	42	293	3872	NR	GAN/FOS
HCU-12	11	480	11235	NR	FOS/GAN
HCU-13	120	523	898	NR	GAN

+, Positive; FOS, foscarnet; GAN, ganciclovir; NA, not administered; NR, not resolved during the study period; PT, post-transplantation; VGAN, valganciclovir; VL, plasma viral load (DNAemia).

^aTime elapsed between the day of the first positive PCR result and the day of the first negative PCR result.

TABLE III. Peripheral Blood Levels of Monofunctional and Polyfunctional Cytomegalovirus (CMV) p65 and IE-1-Specific CD8⁺ T Cells During Episodes of Viral DNAemia That Resolved During the Study Period

Patient/time point (after 1st +PCR)	CMV-specific CD8 ⁺ T cells (cells/ μ l)						
	Monofunctional			Bifunctional			Trifunctional
	IFN- γ	TNF- α	CD107a	IFN- γ /CD107a	TNF- α /CD107a	IFN- γ /TNF- α	
HCU-1							
1st +PCR	2.2	1.2	0.2	0.3	0.09	5.8	2.1
1st -PCR (64)	38.5	9.6	2.9	7.0	2.6	15.8	26.3
2nd -PCR (71)	18.2	2.7	9.4	20.2	2.3	17.1	34.0
HCU-2							
1st +PCR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1st -PCR (21)	3.2	0.5	3.4	2.8	ND	0.5	0.7
2nd -PCR (24)	3.3	0.9	6.2	5.0	0.09	1.4	6.2
HCU-3							
1st +PCR	5.7	1.5	1.0	0.1	0.1	6.3	ND
2nd -PCR (56)	11.0	7.2	37.4	34.6	1.3	15.7	37.8
HCU-4							
1st +PCR	0.2	0.1	ND	ND	ND	0.06	ND
1st -PCR (14)	0.2	0.1	ND	ND	ND	0.3	ND
2nd -PCR (21)	0.3	0.1	ND	ND	ND	0.2	ND
HCU-5							
1st +PCR	0.03	0.08	0.1	0.02	0.02	0.1	0.07
1st -PCR (7)	0.2	0.2	0.3	0.1	0.05	0.4	0.4
2nd -PCR (11)	0.2	0.2	0.4	0.1	0.08	0.6	0.5
HCU-6							
1st +PCR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2nd -PCR (63)	0.5	0.2	0.8	0.2	0.3	0.5	1.2
HCU-7							
1st +PCR	0.3	0.4	ND	ND	ND	0.05	0.05
1st -PCR (21)	0.2	0.7	0.4	0.3	0.4	ND	0.7
HCU-8							
1st +PCR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1st -PCR (24)	0.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3rd -PCR (33)	2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCU-9							
1st +PCR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1st -PCR (15)	0.2	0.4	0.3	ND	ND	ND	ND
2nd -PCR (22)	0.4	0.8	0.6	ND	ND	ND	ND
3rd -PCR (29)	0.6	1.1	1.2	ND	ND	ND	ND
HCU-10							
1st +PCR	0.02	0.02	ND	ND	ND	ND	ND
1st -PCR (12)	1.8	0.9	ND	ND	ND	2.9	ND
2nd -PCR (16)	2.0	1.0	ND	ND	ND	3.6	ND

+, Positive; -, negative; ND, not detected.

bifunctional, and trifunctional CMV-specific CD8⁺ T cells was observed in two episodes treated with antivirals (HCU 6 and 7). Nevertheless, only bifunctional (IFN- γ /TNF- α) and/or monofunctional CD8⁺ T-cell subsets appeared to consistently expand in the remaining treated episodes (HCU 8–10). The number of all functional CMV-specific CD8⁺ T cells populations inversely correlated with the level of CMV DNAemia ($P \leq 0.003$, for all correlations). The magnitude of the expansion of CD8⁺ T-cell subsets was significantly greater ($P \leq 0.01$, for all comparisons) in the self-resolved episodes than in those treated with antivirals. Peak levels of the different functional CD8⁺ T-cell subsets were reached at the time of CMV DNAemia clearance or shortly thereafter (Table III). Bifunctional and/or monofunctional CMV-specific CD8⁺ T-cell responses were detected, albeit at low levels, in the three episodes of active CMV infection that

remained unresolved at the end of the study period (data not shown). No consistent expansion of any of these CD8⁺ T-cell subsets was documented. We sought to determine whether or not the qualitative and quantitative differences in CD8⁺ T-cell responses observed among self-resolved and treated episodes were related to the magnitude of expansion of cognate antigen CD4⁺ T cells. We found that the number of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ -producing CD4⁺ T cells at the time of CMV DNAemia clearance was significantly greater in the former than in the latter episodes (median 25.7 cells/ μ l; range: 1.25–116.0 cells/ μ l, and median 0.48 cell/ μ l; range: 0.29–1.60 cells/ μ l, respectively; $P = 0.024$). In addition, low level or undetectable IFN- γ CD4⁺ T-cell responses were observed in episodes that did not resolve during the study period. A significant correlation was found between the absolute number of CD8⁺ T cells that produced IFN- γ

and both the number of CD8⁺ T cells with cytotoxic potential, as measured by CD107a mobilization ($\sigma = 0.74$; $P = 0.001$), and the number of IFN- γ /TNF- α CD8⁺ T cells ($\sigma = 0.846$; $P \leq 0.001$).

Peripheral Blood Levels of NKG2C⁺ Natural Killer Cell Subsets During Episodes of CMV DNAemia

The kinetics of NKG2C⁺ CD56^{dim}/CD16⁺ and NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16⁻ NK cells were investigated during the course of 12 episodes of active CMV infection. Preliminary analyses performed at different time points after transplantation in allogeneic stem cell transplant patients with no documented CMV DNAemia showed that the number of both NKG2C⁺ NK cell subsets in blood may vary by as much as up to threefold between measurements (data not shown). Overall, the blood levels of both NK cell subsets were found to correlate significantly during the course of episodes of active CMV infection ($\sigma = 0.652$; $P = 0.001$), and they both correlated inversely with the magnitude of CMV DNAemia (-0.394 , $P = 0.002$ and -0.561 , $P = 0.001$, respectively). As shown in Table IV, a substantial increase (≥ 4 -fold) in NKG2C⁺

CD56^{dim}/CD16⁺ NK cells was noted in 3 out of 5 self-resolving episodes, and in 3 out of 4 treated episodes. A marked increase in the number of NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16⁻ NK cells was also found to occur in 2 out of 5 self-resolving episodes and in 3 out of 4 treated episodes. Peak levels of both NK cell subsets were reached at variable times after the first positive PCR result, most frequently at the time of CMV DNAemia clearance or shortly thereafter (Table IV). Contraction of the expanding NK cell populations tended to occur following CMV DNAemia clearance. No consistent expansion of either NKG2C⁺ NK cell population was observed in non-resolved episodes.

The levels of both NKG2C⁺ NK cell populations measured during episodes of CMV DNAemia were found to correlate significantly with those of trifunctional CMV-specific CD8⁺ T cells ($\sigma = 0.460$; $P = 0.001$ for NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16⁻ NK cells, and $\sigma = 0.422$; $P = 0.001$ for NKG2C⁺ CD56^{low}/CD16⁺ NK cells).

DISCUSSION

The current study demonstrated that the resolution of early or late CMV DNAemia episodes occurring in a rather heterogenous group of allogeneic stem cell transplant recipients in the absence of antiviral therapy was associated with a consistent expansion of mono and multifunctional CD8⁺ T cells. The CD8⁺ T cells with cytotoxic potential, particularly those mobilizing CD107a and producing simultaneously IFN- γ and TNF- α , were dominant among the expanded population. Only monofunctional and dual IFN- γ /TNF- α CD8⁺ T cells expanded consistently in one self-resolving episode. Resolution of CMV DNAemia in the presence of antiviral treatment was associated with distinct functional patterns of expanding CD8⁺ T cells. An increase in the number of monofunctional, bifunctional, and trifunctional CD8⁺ T cells was documented in some episodes, whereas in others only bifunctional (IFN- γ /TNF- α) and/or monofunctional CD8⁺ T-cell populations were found to expand consistently, thus suggesting that control of CMV replication in the allogeneic stem cell transplantation setting may be achieved by effector mechanisms not involving CD8⁺ T cells with cytotoxic potential, particularly in the presence of antiviral therapy. The magnitude of the expansion of polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T cells appeared to be rather comparable irrespective of the type of transplant (related vs. unrelated, matched vs. mismatched), the conditioning regimen (non-myeloablative vs. myeloablative), and the CMV-serostatus of donors and recipients (D+/R+ vs. D-/R+). Nevertheless, the limited number of patients included in the study precluded any meaningful statistical analysis on the effect of the above-mentioned pre-transplant factors on the size and polyfunctionality of the CMV-specific CD8⁺ T-cell response elicited by CMV replication. Studies addressing this issue are currently underway.

TABLE IV. Peripheral Blood Levels of NKG2C⁺ NK Cell Subsets During Episodes of Cytomegalovirus DNAemia That Resolved During the Study Period

Patient/time point (day after 1st +PCR)	NKG2C ⁺ NK cell population (cells/ μ l)	
	CD56 ^{bright} /CD16 ⁻	CD56 ^{dim} /CD16 ⁺
HCU-1		
1st +PCR	0.84	4.5
1st -PCR (64)	1.0	45.2
2nd -PCR (71)	5.5	30.0
HCU-2		
1st +PCR	13.2	16.3
2nd -PCR (24)	6.1	124.4
HCU-3		
1st +PCR	0.3	39.6
2nd -PCR (56)	4.2	54.3
HCU-4		
1st +PCR	1.1	6.0
1st -PCR (14)	3.9	21.8
2nd -PCR (21)	4.2	28.9
HCU-5		
1st +PCR	6.5	15.7
1st -PCR (7)	4.5	21.0
2nd -PCR (11)	6.7	34.1
HCU-6		
1st +PCR	2.4	9.48
2nd -PCR (63)	6.2	3.1
HCU-7		
1st +PCR	3.1	12.5
1st -PCR (21)	13.4	158.2
HCU-9		
1st +PCR	0.1	1.2
1st -PCR (15)	2.1	28.4
HCU-10		
1st +PCR	0.1	1.5
1st -PCR (12)	2.5	105.2

+, Positive; -, negative; PCR, real-time polymerase chain reaction.

Undetectable or low-level monofunctional CD8⁺ T-cell responses that did not expand in response to viral replication were observed in episodes of CMV DNAemia (HCU 11–13) that remained active at the time of the patient's death. In this context, we showed previously that the expansion of functional CMV-specific T cells was required for definitive control of CMV replication, even in patients receiving antiviral therapy [Tormo et al., 2010a,b]. Two of these patients were under high-dosage corticosteroid therapy for severe graft versus host disease. This fact may account for the limited magnitude and polyfunctionality of the CMV-specific CD8⁺ T-cell response observed in these patients, since corticosteroid therapy has been clearly demonstrated to have a dose-dependent detrimental effect on T-cell life span and T-cell functionality [Hakki et al., 2003; Widmann et al., 2008].

Adoptive transfer experiments clearly showed that the infusion of CMV-specific CD4⁺ T cells was a strong requirement for *in vivo* expansion of CMV-specific CD8⁺ cytotoxic T cells from precursors [Einsele et al., 2002]. In this context, we found that the magnitude of the expansion of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD4⁺ T cells was associated with the size and polyfunctionality of the CD8⁺ T-cell response, which is also in accordance with previous data [Harari et al., 2006]. In fact, the number of IFN- γ CD4⁺ T cells at the time of CMV DNAemia clearance was significantly greater in self-resolving episodes than in those treated pre-emptively. Furthermore, undetectable or low-level IFN- γ CD4⁺ T-cell responses were observed in episodes that remained active at the end of the study period.

The current study was not designed to assess the impact of the level of antigen exposure and antigen sensitivity on the size and quality of CMV-specific CD8⁺ T-cell responses. Both factors are known to modulate critically the polyfunctionality of CD8⁺ T cells in HIV-infected patients [Harari et al., 2004, 2006; Betts et al., 2006; Appay et al., 2008; Rehr et al., 2008; Almeida et al., 2009; Makedonas et al., 2010]. Nevertheless, the fact that CMV-specific CD8⁺ T-cell responses tended to be of higher magnitude and broader functionality in self-resolving episodes than in treated episodes (higher CMV DNA loads) pointed to an analogous effect in the allogeneic stem cell transplantation setting.

The standard in the *ex vivo* monitoring of CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses is enumerating the single-cell IFN- γ expression upon antigenic stimulation by intracellular cytokine staining or ELISOT assays [Solano and Navarro, 2010]. Doubts have been raised as to whether these measurements provide an accurate estimate of the degree of immune competence against CMV [Lacey et al., 2006; Nebbia et al., 2008; Zhou et al., 2009; Król et al., 2011]. Nevertheless, a significant correlation was found between the total number of CMV-specific CD8⁺ T cells producing IFN- γ and both the number of CD8⁺ T cells with cytotoxic potential (mono-, bi-, and trifunctional)

and the number of bifunctional (IFN- γ /TNF- α) CD8⁺ T cells during episodes of CMV DNAemia. Thus, enumeration of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells allows inference of the polyfunctionality of the expanding CD8⁺ T-cell population, and thereby may be considered as a reliable surrogate marker for effective immune responses against CMV.

NK cells are believed to be involved in limiting CMV replication and provide protection from active CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients [Quinnan et al., 1982; Biron et al., 1989; Barron et al., 2009; Solano and Navarro, 2010]. Prior studies suggested a role for the NKG2C⁺ NK cell subpopulation in the control of CMV infection [Gumá et al., 2004, 2006; Kuijpers et al., 2008]. A significant expansion was found of predominantly NKG2C⁺ CD56^{dim} CD16⁺ NK cells (with cytotoxic potential) in most episodes of CMV DNAemia that resolved during the study period, irrespective of whether antiviral treatment was implemented or not. Expansion of NKG2C⁺ CD56^{bright}CD16⁻ NK cells (potentially producing cytokines with antiviral properties but with low cytotoxic potential) was also documented in a number of episodes, although its magnitude was substantially lower than that of CD56^{dim}CD16⁺ NK cells, possibly because CD56^{bright} NK cells are found preferentially in lymph nodes [Caligury, 2008]. In contrast, no expansion of either NK cell subset was observed in non-resolved episodes. The levels of NKG2C⁺ NK cells correlated inversely with the plasma CMV DNA load, peaked most frequently at the time of CMV DNAemia clearance, and then contracted. In keeping with the above findings, the rapid expansion and long-term persistence of elevated NKG2C⁺ CD56^{dim} NK cells levels have been reported following acute Hantavirus infection in humans [Björkström et al., 2011]. A limitation of the NK cell analyses performed in the current study is that the functional capacity and the activation status of the expanding NK cell populations were not disclosed. In the study by Björkström et al. [2011], however, the expanded NK cell population exhibited polyfunctionality and failed to co-express the NKG2A inhibitory receptor. It has been shown that the *in vitro* expression of CD94/NKG2A on NKG2C⁺ NK cells occurs after a 5-day exposure to CMV-infected autologous dendritic cell cultures, and that it is associated with a loss in cytotoxicity [Sáez-Borderías et al., 2009]. Accordingly, it is likely that a large fraction of the expanded NK cell population in our patients displayed a functional antiviral phenotype, particularly in those recently activated. Further studies are warranted to gain a further insight into this issue.

NK cells may promote the development of effective antiviral CD8⁺ T-cell responses [Robbins et al., 2007]. In this context, we found a significant correlation between the levels of NKG2C⁺ NK cell populations and those of trifunctional CMV-specific CD8⁺ T cells during the episodes of CMV DNAemia, thus suggesting that the magnitude and polyfunctionality of the

CMV-specific CD8⁺ T-cell response might be influenced directly by the extent of NK cell expansion.

In summary, the current study clarified further the immune mechanisms involved in controlling CMV replication in the allogeneic stem cell transplantation setting. The data reported are preliminary and thus await further confirmation. Should the data presented hold true they may have relevant implications for the design of intervention and therapeutic strategies based on combined virological and immunological monitoring.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

- Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Sáez-Cirión A, Appay V. 2009. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8⁺ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113:6351–6360.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry A* 73:975–983.
- Barron MA, Gao D, Springer KL, Patterson JA, Brunvand MW, McSweeney PA, Zeng C, Barón AE, Weimberg A. 2009. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 49:1777–1783.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107:4781–4789.
- Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320:1731–1735.
- Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, Michaëlsson J, Malmberg KJ, Klingström J, Ahlm C, Ljunggren HG. 2011. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 208:13–21.
- Caligury MA. 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112:461–469.
- Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H. 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99:3916–3922.
- Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 46:3311–3318.
- Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104:3664–3671.
- Gumá M, Budt M, Sáez A, Brekalo T, Hengel H, Angulo A, López-Botet M. 2006. Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107:3624–3631.
- Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102:3060–3067.
- Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. 2004. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol* 34:3525–3533.
- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. 2006. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* 211:236–254.
- Król L, Stuchlý J, Hubáček P, Keslová P, Sedláček P, Starý J, Hrušák O, Kalina T. 2011. Signature profiles of CMV-specific T cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46:1089–1098.
- Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112:914–915.
- Lacey S, La Rosa C, Zhou W, Sharma MC, Martinez J, Krishnan A, Gallez-Hawkins G, Thao L, Longmate J, Spielberger R, Forman SJ, Limaye A, Zaia JA, Diamond DJ. 2006. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and immediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 194:1410–1421.
- Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. 1994. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: Correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83:1971–1979.
- Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. 2008. Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 93:248–256.
- Makedonas G, Hutnick N, Haney D, Amick AC, Gardner J, Cosma G, Hersperger AR, Dolfi D, Wherry EJ, Ferrari G, Betts MR. 2010. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog* 6:e1000798.
- Nebbia G, Mattes FM, Smith C, Hainsworth E, Kopycinski J, Burroughs A, Griffiths PD, Klenerman P, Emery VC. 2008. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4⁺ and pp65 CD8⁺ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant* 8:2590–2599.
- Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. 1982. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 307:7–13.
- Rehr M, Cahenzli J, Haas A, Price DA, Gostick E, Huber M, Kerrer U, Oxenius A. 2008. Emergence of polyfunctional CD8⁺ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J Virol* 82:3391–3404.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78:1373–1380.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257:238–241.
- Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, Zucchini N, Rupp B, Ruzsics Z, Sacher T, Tomasello E, Vivier E, Koszinowski UH, Dalod M. 2007. Natural killer cells promote early CD8⁺ T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 3: e123.
- Sáez-Borderías A, Romo N, Magri G, Gumá M, Angulo A, López-Botet M. 2009. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C⁺ NK cell function. *J Immunol* 182:829–836.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 5:111–124.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 93:1434–1436.

- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. 2010a. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 45:543–549.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, García-Noblejas A, Clari MA, Chilet M, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2010b. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: Potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol* 82:1208–1215.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2011. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46:1437–1443.
- Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. 1994. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 42:188–192.
- Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, Sester M. 2008. Levels of CMV specific CD4 $^{+}$ T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS ONE* 3:e3634.
- Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, Spielberger R, Nakamura R, Forman SJ, Zaia JA, Diamond DJ. 2009. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 113:6465–6476.

4.3) Artículo 3

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 Allogenic Stem Cell Transplant Recipients. Clari MA, Munoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia M, Bravo D, Amat P, Navarro, D. Clin.Vaccine Immunol.2012, 19(5):791



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

Maria Ángeles Clari,^a Beatriz Muñoz-Cobo,^a Carlos Solano,^{b,c} Isabel Benet,^{b,c} Elisa Costa,^a María José Remigia,^b Dayana Bravo,^a Paula Amat,^b and David Navarro^{a,d}

Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^a; Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^b; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^c; and Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^d

The performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay was compared to that of a flow cytometry intracellular cytokine staining (ICS) method for the detection of CMV-specific gamma interferon (IFN- γ)-producing CD8⁺ T-cell responses in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients and for estimations of their magnitude and functionality. A total of 90 whole-blood specimens from 23 allo-SCT recipients was analyzed by both methods. Overall, the percentage of specimens that yielded concordant results by both methods was 68.8% ($\kappa = 0.691$; 95% confidence interval [CI], 0.548 to 0.835), and the sensitivity of the QuantiFERON-CMV assay for the detection of positive IFN- γ T-cell responses (>0.2 IU/ml), taking the ICS method as the reference, was 76.3%. The magnitude of IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses to CMV-specific peptides measured with the QuantiFERON-CMV assay correlated significantly ($\sigma = 0.695$; $P = <0.001$) with that of the total IFN- γ -producing CD8⁺ T cells and dual-functional (IFN- γ /tumor necrosis factor alpha [TNF- α] [$\sigma = 0.652$; $P = <0.001$] and IFN- γ /CD107a [$\sigma = 0.690$; $P = <0.001$]) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a [$\sigma = 0.679$; $P = >0.001$]) CMV-specific CD8⁺ T-cell responses, as quantitated by ICS. In summary, the data indicated that the QuantiFERON-CMV assay is less sensitive than the ICS method for the detection of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses in the allo-SCT setting. Nevertheless, it allowed the estimation of the total and polyfunctional CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses in specimens that tested positive by both methods.

The assessment of the magnitude and the functionality of T-cell immunity against cytomegalovirus (CMV) is emerging as a clinically useful tool for the therapeutic management of CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) setting (7, 13). The monitoring of CMV-specific CD8⁺ or CD4⁺ T-cell responses may allow for the optimization of preemptive antiviral therapy regimens on an individual basis and the identification of patients who may benefit from prophylactic antiviral or adoptive T-cell transfer therapeutic strategies (1, 7, 13). In recent years, several methods have been developed for the *ex vivo* quantitation and functional characterization of T-cell responses, among which flow cytometry for surface immunophenotyping and intracellular cytokine staining (ICS) are currently considered the “gold standard” (13). The QuantiFERON-CMV assay (Cellestis Ltd., Melbourne, Australia) is a commercially available test that allows the inference of the size of the CMV-specific T-cell response by quantitating the level of gamma interferon (IFN- γ), produced mostly by CMV-specific CD8⁺ T cells, upon the stimulation of whole blood with a number of immunogenic peptides mapped within IE-1, IE-2, pp65, pp50, and gB and restricted by several widespread HLA-I haplotypes (17). The performance of the QuantiFERON-CMV assay has been assessed mostly in the solid-organ transplant (SOT) setting (see reference 4 for a review). Recently reported data, although preliminary, lend support to the suitability of the QuantiFERON-CMV assay for the monitoring of the CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses in allo-SCT recipients (2). Nevertheless, it is largely unknown how

this method compares to ICS assays for such a purpose. In previous studies, we reported the development and clinical utility of an ICS assay for the quantitation of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells (11, 12, 14–16). The assay was found to reliably predict protection from the development of CMV DNAemia in allo-SCT recipients, and it was recently used in the setting of a novel strategy for the guidance of preemptive antiviral therapy based on combined virological and immunological monitoring (12). In the current study, we compared the performance of the QuantiFERON-CMV assay with that of our ICS method for the detection and quantitation of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses in allo-SCT recipients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and specimens. A total of 90 whole-blood samples, obtained from 23 nonconsecutive patients (median age, 53 years [range, 20 to 71 years]; 16 males and 7 females) who underwent peripheral blood ($n = 20$)

Received 19 November 2011 Returned for modification 1 February 2012

Accepted 23 February 2012

Published ahead of print 29 February 2012

Address correspondence to David Navarro, david.navarro@uv.es.

M.A.C. and B.M.-C. contributed equally to the present work.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/CVI.05633-11

or umbilical cord blood ($n = 3$) allo-SCT at the Hospital Clínico Universitario de Valencia, Spain, between February 2010 and June 2011, was analyzed in this study. The underlying diseases of the patients were acute myeloid leukemia ($n = 10$), non-Hodgkin's lymphoma ($n = 7$), chronic lymphocytic leukemia ($n = 2$), multiple myeloma ($n = 2$), or myelodysplastic syndrome ($n = 1$). The types of transplant were related/matched ($n = 10$), unrelated/matched ($n = 9$), unrelated/mismatched ($n = 3$), and related/mismatched ($n = 1$). The conditioning regimen was nonmyeloablative ($n = 17$) or myeloablative ($n = 6$), and the paired CMV serostatuses of the donors (D) and recipients (R) were D⁺/R⁺ ($n = 9$), D⁻/R⁺ ($n = 9$), D⁺/R⁻ ($n = 2$), and D⁻/R⁻ ($n = 3$). The study was approved by the Ethics Committees. All patients gave their informed consent to participate in the study.

CMV serology. The CMV serological testing of the donors and recipients was performed by use of the DiaSorin Liaison CMV IgG assay (DiaSorin, Saluggia, Italy) according to the recommendations of the manufacturer.

CMV plasma DNAemia quantitation. The CMV DNA load in the plasma was quantitated by real-time PCR (Abbott CMV PCR kit; produced by Qiagen GmbH, Hilde, Germany, for Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL). The PCRs were performed by using the m2000RT system (Abbott Molecular, IL), as previously described (3). The DNA extractions were performed by using 500 μ l of plasma on an m24 SP instrument (Abbott Diagnostics, IL).

Enumeration of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells. The quantitation of the total numbers of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells and selectively bifunctional (IFN- γ /tumor necrosis factor alpha [TNF- α] and IFN- γ /CD107a) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells was performed by ICS. Whole blood (0.5 ml) was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of the pp65 and IE-1 CMV proteins (1 μ g/ml/peptide), obtained from JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of costimulatory monoclonal antibodies (MAbs) to CD28 and CD49d, an anti-CD107a MAb coupled with allophycocyanin (APC), brefeldin (5 μ g/ml), and monensin (1 μ M) for 6 h at 37°C. The cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS)-2% fetal calf serum (FCS), lysed in BD FACS lysis solution, stained with surface markers (anti-CD8-peridinin chlorophyll protein [PerCP]-Cy5-5 and anti-CD3-APC-Cy7), permeabilized (BD FACS permeabilizing solution 2), washed, and finally stained for intracellular cytokines (anti-IFN- γ -fluorescein isothiocyanate [FITC] and anti-TNF- α -phycoerythrin [PE]). All antibodies and solutions were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA). The cells were stored at 4°C in PBS-1% formaldehyde, acquired within 4 h with a BD FACSantoII flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA), and analyzed with the software program Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain). The negative controls (absence of peptide stimulation) were processed in parallel for all experiments. The total number of each CD8⁺ T-cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of CMV-specific T cells (after background subtraction) by the absolute number of CD8⁺ T cells. Specific responses were considered those that were >0.1% for each population. CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells were enumerated in parallel by using the BD Fastimmune kit (BD-Becton Dickinson and Company Biosciences, San Jose, CA) as previously described (11, 12, 14–16) but employing the BD FACSantoII flow cytometer and the software program Infinicyt for the analyses. The levels of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (total number) measured by the two above-described procedures were comparable (data not shown).

QuantIFERON-CMV assay. The QuantIFERON-CMV assay (Cellestis Ltd., Melbourne, Australia) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1-ml aliquots of heparinized whole blood were collected into three QuantIFERON-CMV collection tubes, one containing a number of CMV immunogenic peptides (CMV antigen), another with no peptides (nil control), and the other containing a polyclonal

TABLE 1 Detection of cytomegalovirus-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells by ICS and the QuantIFERON-CMV assay in whole-blood specimens from allogeneic stem cell transplant recipients

Result of ICS method (no. of specimens)	No. of specimens with QuantIFERON-CMV assay result of:		
	Positive	Negative	Indeterminate
Positive (55)	42	10	3
Negative (35)	1	20	14

stimulating antigen (phytohemagglutinin) (mitogen control). The tubes were shaken vigorously for 5 s and then incubated for 18 to 24 h at 37°C. The supernatants were then harvested, and the levels of IFN- γ were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A standard curve was generated for each run. The results of the assay were interpreted according to the criteria established by the manufacturer: (i) nonreactive at <0.2 IU/ml (CMV minus nil) and ≥ 0.5 IU/ml (mitogen minus nil), (ii) reactive at ≥ 0.2 IU/ml (CMV minus nil) and any value of mitogen minus nil, and (iii) indeterminate at <0.2 IU/ml (CMV minus nil) and <0.5 IU/ml (mitogen minus nil). According to the manufacturer, indeterminate results are not interpretable.

Statistical analysis. The data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS, version 17.0 (SPSS, North Chicago, IL). Differences between the medians were compared by using the Mann-Whitney U test. Spearman's rank test was used to analyze correlations between continuous variables. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

A total of 90 blood samples from 23 allo-SCT recipients was analyzed by ICS and by the QuantIFERON-CMV assay. The data are summarized in Table 1. Fifty-five samples (61.1%) from 17 patients had CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses detectable by ICS; of these, 42 samples (76.3%) from 13 patients were reactive (>0.2 IU/ml), and 13 samples (from 4 patients) yielded negative ($n = 10$) or indeterminate ($n = 3$) results by the QuantIFERON-CMV assay. As shown in Fig. 1, specimens that tested positive by the QuantIFERON-CMV assay displayed significantly higher ($P = 0.001$) numbers of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells, as measured by ICS, than those that tested negative or indeterminate. As shown in Table 1, 35 specimens from six patients lacked detectable CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses, as determined by ICS. Of these, only one sample yielded a positive result by the QuantIFERON-CMV assay (2.5 IU/ml). All patients (and/or their donors) with negative results by the QuantIFERON-CMV assays throughout the study period displayed at least one HLA-I specificity able to present one of the immunogenic peptides included in the QuantIFERON-CMV assay pool (data not shown). A large number of specimens gave indeterminate results by the QuantIFERON-CMV assay ($n = 17$; 18.8%); most of these samples ($n = 14$) had no detectable CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses, as measured by ICS. Overall, the percentage of specimens that yielded concordant results by both methods was 68.8% ($\kappa = 0.691$; 95% confidence interval [CI], 0.548 to 0.835), and the sensitivity of the QuantIFERON-CMV assay for the detection of positive IFN- γ T-cell responses, as determined by ICS, was 76.3%. Three specimens that tested positive by the ICS assay displayed IFN- γ levels within the range of >0.1 to <0.2 IU/ml in the QuantIFERON-CMV assay. Thus, a decrease of the cutoff level for a positive result to >0.1 IU/ml resulted in a slight increase in the sensitivity of the

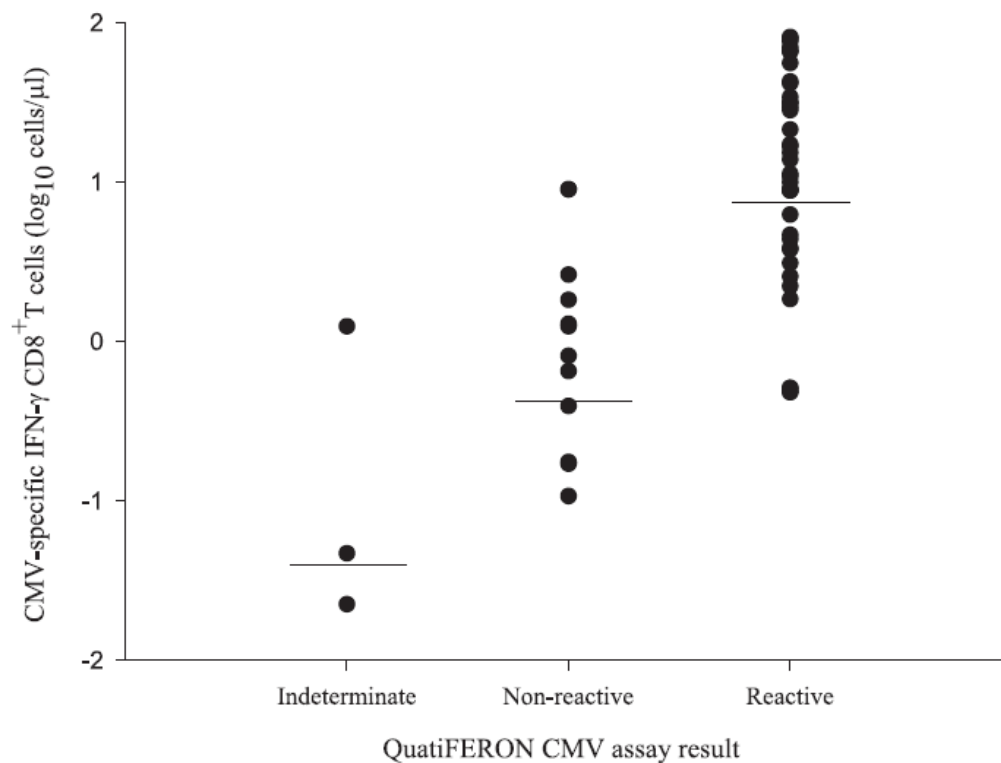


FIG 1 Number of cytomegalovirus pp65/IE-1-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (total) enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining (ICS) of specimens that tested positive, negative, or intermediate by the QuantiFERON-CMV assay. The data are given as log₁₀ values; each dot represents a single measurement, and the bars represent median values.

QuantiFERON-CMV assay (81.8%). Of note was the fact that 15 out of the 42 specimens that tested positive by the QuantiFERON-CMV assay gave optical density values above the upper limit of quantification of the assay and thus had to be further diluted in order to determine precisely the levels of IFN- γ .

We next assessed to what extent the QuantiFERON-CMV assay allowed size and functional diversity estimations of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses, as determined by ICS. For this, we performed an analysis of the correlation of the levels of IFN- γ measured by the QuantiFERON-CMV assay with the number of different functional populations of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells quantitated by the ICS assay for 42 specimens that showed detectable responses by both methods. Note that 20 out of these 42 specimens were obtained during episodes of nontreated ($n = 11$ from 3 patients) or ganciclovir-treated ($n = 9$ from 2 patients) CMV plasma DNAemia. In addition, the remaining 22 specimens were obtained from eight patients who had a prior episode of CMV DNAemia. As shown in Fig. 2, the magnitude of the IFN- γ responses to the CMV-specific peptides measured with the QuantiFERON-CMV assay was significantly correlated ($\sigma = 0.695$; $P = <0.0001$) with that quantitated by ICS for the total IFN- γ -producing CD8⁺ T cells. Furthermore, the IFN- γ levels determined by the QuantiFERON-CMV assay were also significantly correlated with the number of dual-functional ($\sigma = 0.652$ and $P = <0.001$ for IFN- γ /TNF- α ; $\sigma = 0.690$ and $P = <0.0001$ for IFN- γ /CD107a) and trifunctional ($\sigma = 0.679$ and $P = <0.0001$ for IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific CD8⁺ T cells.

DISCUSSION

The QuantiFERON-CMV assay is the only commercially available method for the measurement of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses. This assay was previously evaluated with SOT and allo-SCT recipients (2, 4, 5, 8, 10, 17, 18). Preliminary data supported the clinical utility of this method for the assessment of the risk of late-onset CMV end-organ disease in SOT recipients (5) and for the prediction of the occurrence of CMV DNAemia in allo-SCT patients (2). Nevertheless, information on how the QuantiFERON-CMV assay correlates with ICS methods for estimations of the magnitude and assessments of the functionality of CMV-specific CD8⁺ T-cell responses in transplant recipients is still scarce. In the current study, we compared the performance of the QuantiFERON-CMV assay with that of an ICS method developed by our group that has been proven to be clinically useful in the management of active CMV infection in the allo-SCT setting (11, 12, 14–16). Overall, we found both methods to yield concordant qualitative results for around 70% of specimens. This finding was not entirely unexpected, as 18 out of the 21 peptides included in the CMV tube of the QuantiFERON-CMV assay map within pp65 ($n = 15$) and IE-1 ($n = 3$). When the results of the QuantiFERON-CMV assay were interpreted as indicated by the manufacturers (positive responses if IFN- γ levels were >0.2 IU/ml), the sensitivity of the assay, considering the ICS method as the reference assay, was 76.37%. The sensitivity of the assay slightly improved (81.8%) when the cutoff threshold for

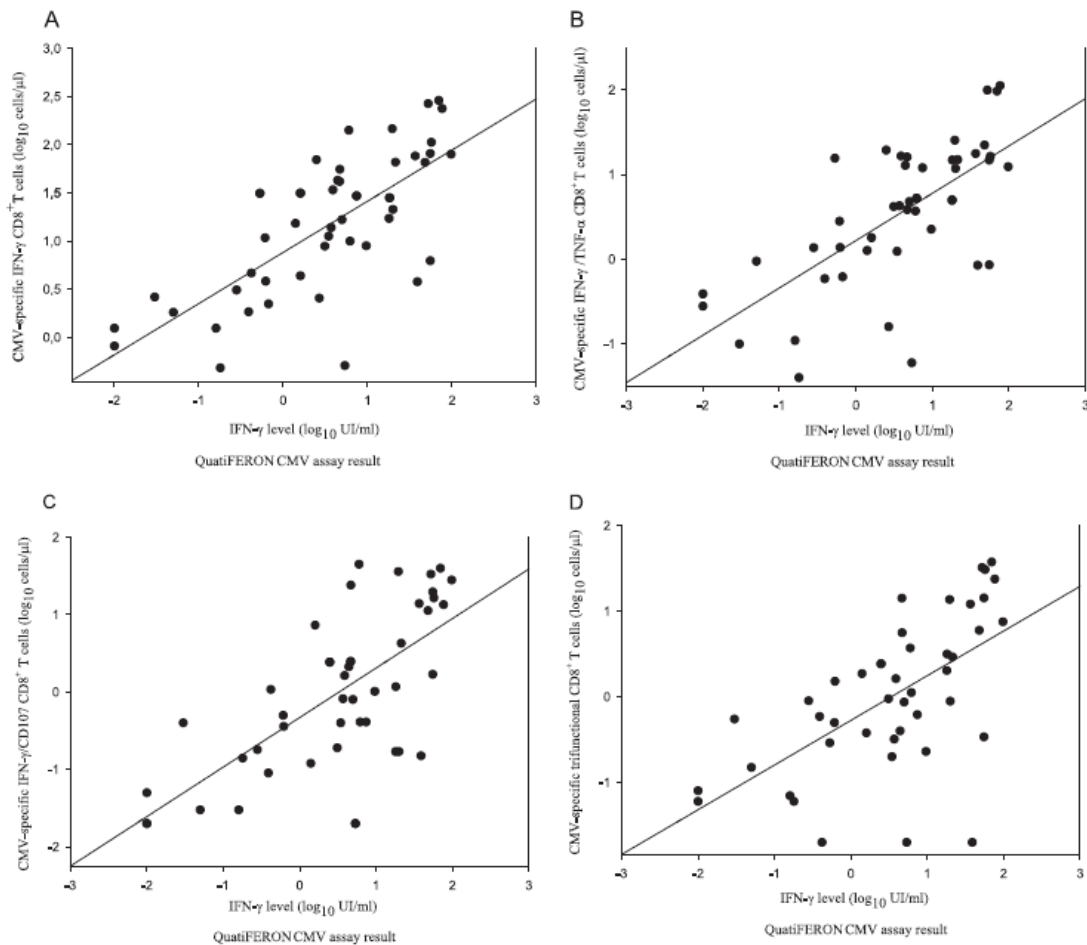


FIG 2 Correlation between the number (\log_{10}) of pp65/IE-1-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining (ICS) and IFN- γ levels (\log_{10}) measured by the QuantiFERON-CMV assay. The data for 42 whole-blood specimens (from 13 allogeneic stem cell transplant recipients) that tested positive by both methods are depicted. (A) Total number of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells; (B) dual-IFN- γ /TNF- α CD8⁺ T cells; (C) dual-IFN- γ /CD107a CD8⁺ T cells; (D) trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CD8⁺ T cells.

positive IFN- γ responses was lowered to 0.1 IU/ml, as previously suggested (5). All patients (and/or their donors) who tested negative by the QuantiFERON-CMV assay throughout the study period displayed at least one HLA-I variant included among the specificities covered by the test. The specificity of the QuantiFERON-CMV assay approached 100%. In fact, there was only one specimen that gave a positive result by the QuantiFERON-CMV assay (2.5 IU/ml) but that tested negative by the ICS method; this could have been a false-positive result, since a follow-up specimen obtained 3 days later from the same patient tested negative by both assays. The QuantiFERON-CMV assay gave a large number of indeterminate results. This observation is in keeping with previously reported data (2). Most of the specimens that yielded indeterminate results (14 out of 17) and those that tested negative had undetectable CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses, as measured by ICS.

The levels of IFN- γ measured by the QuantiFERON-CMV assay were found to correlate significantly with the total number of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells quantitated by the ICS assay. This observation is in accordance with the data reported in a recent study in which the QuantiFERON-CMV assay was

compared to an ICS method using a library of CMV peptides mapped within pp65 as the stimulating antigen (2).

Recent data seem to favor the idea that polyfunctional rather than monofunctional CMV-specific CD8⁺ T cells, in particular those with the ability to produce cytokines with antiviral properties, such as IFN- γ and TNF- α , and to simultaneously display cytotoxic activity (cells expressing CD107a), are crucial for protection from and the resolution of episodes of active CMV infection in the allo-SCT setting (6, 10, 19). The QuantiFERON-CMV assay cannot distinguish between different functional CD8⁺ T-cell populations producing IFN- γ in response to CMV replication. In this context, we were interested to assess to what extent the QuantiFERON-CMV assay could allow the estimation of levels of CMV-specific polyfunctional IFN- γ -producing CD8⁺ T cells. We found that IFN- γ levels determined by the QuantiFERON-CMV assay significantly correlated with the number of CMV-specific dual-functional (IFN- γ /TNF- α and IFN- γ /CD107a) and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CD8⁺ T cells. It should be stressed that the above-described correlations were observed in a very precise virological setting, i.e., in patients with an ongoing

episode of active CMV infection or in patients who had recently resolved an episode of CMV DNAemia. In this context, we observed that the expansion and contraction of monofunctional and polyfunctional CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses elicited by CMV replication followed different kinetic patterns and also showed wide variations on an individual basis (9). It is thus likely that the ability of the QuantiFERON-CMV assay to accurately estimate the size of CMV-specific polyfunctional IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses may ultimately depend on the past and current status of CMV replication. The current study has two main limitations: first, both assays are not entirely comparable, as they are of distinct natures and, most importantly, employ different stimulating antigens (Table 2), and second, the ICS method taken as the reference standard for the measurement of CMV-specific CD8⁺ T-cell responses in the current study lacked extensive interlaboratory validation. Despite these limitations, we are convinced that studies to compare the performance of the QuantiFERON-CMV assay with that of ICS methods with proven reliability to assess and quantitate CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses conferring protection against CMV infection are of major clinical interest.

Table 2 summarizes the characteristics, advantages, and limitations of the QuantiFERON-CMV assay and the ICS method developed by our group. In summary, the data presented here indicated that the QuantiFERON-CMV assay, although less sensitive than our ICS method, allowed the estimation of total and polyfunctional CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cell responses in specimens that tested positive by both methods. We wonder whether the use of overlapping pp65 and IE-1 peptide pools in the QuantiFERON-CMV assay instead of a mix of immunogenic CMV peptides would increase the sensitivity of the method. Further studies should be undertaken to confirm our observations and, most importantly, to assess the clinical utility of the QuantiFERON-CMV assay in this setting. In this context, it seems to be essential to establish threshold levels of IFN- γ associated with protection from or the resolution of episodes of active CMV infection and CMV end-organ disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Matilde Pastor and Amanda Mataix for their technical assistance. The QuantiFERON-CMV assay reagents were kindly provided by Alere (Barcelona, Spain).

This research study was supported by a grant (09/1117) from the FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

REFERENCES

1. Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. 2007. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 40:865–869.
2. Fleming T, Dunne J, Crowley B. 2010. 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.* 82:433–440.
3. Gimeno C, et al. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3311–3318.
4. Giulieri S, Manuel O. 2011. QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 11:17–25.
5. Kumar D, et al. 2009. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovi-

TABLE 2 Characteristics, advantages, and limitations of the ICS method used in the current study and the QuantiFERON-CMV assay for evaluation of CMV-specific T-cell immunity

Method	Specimen/vol (ml)	Time (h) to available results	CMV antigens tested	Knowledge of HLA genotype	Differentiation		Functional analysis of T cells	Phenotypic analysis of T cells	Major advantages	Major limitations
					between CD8 ⁺ and CD4 ⁺ T cells	Yes				
ICS	Whole blood/1	8–10	Two peptide pools consisting of 15-mer overlapping peptides spanning the entire sequences of pp65 and IE-1	Not necessary	Yes	Yes	Yes	Yes	High sensitivity, precise enumeration of CMV-specific T cells, proven clinical utility	Lack of standardization, need for access to a flow cytometer
QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay	Whole blood/3	24–48	21 peptides mapped with IE-1, IE-2, pp65, pp50, and gB and restricted by several widespread HLA-I variants (HLA-A1, -A2, -A3, and -A24 and HLA-B7, -B8, -B27, -B35, -B44, and -B52)	Not necessary	No (detects mostly CD8 ⁺ T cells)	Yes (IFN- γ only)	No	Highly standardized, can be performed in any center, simple to perform	Suboptimal sensitivity (76%, taking ICS as the reference procedure and a threshold of 0.2 IU/ml, as recommended by the manufacturer), high percentage (~20%) of indeterminate specimens, need for dilution of ~30% of positive samples for precise quantitation, lack of studies demonstrating clinical utility in the allo-SCT setting	

Clari et al.

- rus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 9:1214–1222.
6. Lacey S, et al. 2006. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and immediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 194:1410–1421.
 7. Ljungman P. 2006. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients. *J. Clin. Virol.* 35:493–495.
 8. Lochmanova A, et al. 2010. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant. Proc.* 42:3574–3577.
 9. Muñoz-Cobo B, et al. 2012. Functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells and kinetics of NKG2C+ NK cells associated with the resolution of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Med. Virol.* 84:259–267.
 10. Nebbia G, et al. 2008. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 8:2590–2599.
 11. Solano C, et al. 2008. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
 12. Solano C, et al. 2011. Immunological monitoring for guidance of pre-emptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: a pilot experience. *Transplantation* 92:e17–e20.
 13. Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol.* 5:111–124.
 14. Tormo N, et al. 17 January 2011, posting date. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* [Epub ahead of print.] doi:10.1038/bmt.2010.330.
 15. Tormo N, et al. 2010. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 45:543–549.
 16. Tormo N, et al. 2010. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J. Med. Virol.* 82:1208–1215.
 17. Walker S, et al. 2007. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9:165–170.
 18. Westall GP, Mifsud NA, Kotsimbos T. 2008. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8:1749–1754.
 19. Zhou W, et al. 2009. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 113:6465–6476.

4.4) Artículo 4

An Evaluation of the Role of NKG2C β Natural Killer Cells in Protection From Cytomegalovirus DNAemia Early Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, Garcia-Noblejas A, Navarro D. J Med Virol. 2014 May;86(5):806-11. doi: 10.1002/jmv.23742. Epub 2013 Sep 16. PubMed PMID: 24105728.

An Evaluation of the Role of NKG2C⁺ Natural Killer Cells in Protection From Cytomegalovirus DNAemia Early Following Allogeneic Stem Cell Transplantation

Beatriz Muñoz-Cobo,¹ Estela Giménez,¹ Carlos Solano,^{2,3} Rafael de la Cámara,⁴ José Nieto,⁵ Javier López,⁶ Paula Amat,² Ana Garcia-Noblejas,⁴ and David Navarro^{1,7*}

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

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

⁴Hematology Service, Hospital de La Princesa, Madrid, Spain

⁵Hematology Service, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain

⁶Hematology Service, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

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

The role of natural killer (NK) cells in affording protection against human cytomegalovirus (CMV) in allogeneic stem cell transplant recipients is largely unknown. The current study was aimed at determining whether NKG2C⁺ NK cells confer protection from CMV DNAemia early following transplantation in patients lacking mono and polyfunctional CMV pp65 and IE-1-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses, as measured by flow cytometry for intracellular cytokine staining. Fourteen out of the 36 patients included in this study developed CMV DNAemia between days +30 and +60 after transplant. Three patients did so after day +60. Peripheral blood levels of CD56^{bright}CD16^{-/low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells measured at day +30 and at day +60 in patients who had or had not subsequent CMV DNAemia did not differ significantly. In addition, no significant correlation was found between CD56^{bright}CD16^{-/low} ($\sigma = -0.229$; $P = 0.39$) and CD56^{dim}CD16⁺ ($\sigma = -0.285$; $P = 0.28$) NKG2C⁺ NK-cell levels and initial plasma CMV DNA loads. In summary, the data presented do not support a direct implication of NKG2C⁺ NK cells in preventing the development of CMV DNAemia or modulating the magnitude of CMV replication at early stages during episodes of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant patients with unreconstituted CMV-specific T-cell responses. *J. Med. Virol.* 86: 806–811, 2014. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: cytomegalovirus (CMV); NK cells; allogeneic stem cell transplantation; CMV DNAemia; NKG2C NK cells

INTRODUCTION

Protection from active systemic cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic stem cell transplant recipients is critically dependant upon adequate reconstitution of functional CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells [Solano and Navarro, 2010]. Recovery of the natural killer (NK) cell population occurs earlier than that of T cells following allogeneic stem cell transplantation, and its functionality is rather unaffected by immunosuppressive regimens targeting T cells [Seggewiss and Einsele, 2010]. It is thus likely that functional NK cells may contribute crucially in

Grant sponsor: FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); Grant number: 09/1117.

The authors declare no conflict of interest.

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

Accepted 12 July 2013

DOI 10.1002/jmv.23742

Published online 16 September 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

affording protection from the development of CMV DNAemia early after transplant, specially in patients with unreconstituted CMV-specific T-cell responses. There are scant data published on this issue. Recent studies have shown that the expansion of NK cells expressing the C-type lectin activating receptor NKG2C coupled with CD94 associates with clearance of CMV viremia in this clinical setting [Kuijpers et al., 2008; López-Vergès et al., 2011; Foley et al., 2012; Muñoz-Cobo et al., 2012]. The current study was aimed at investigating whether peripheral levels of CD56^{bright}CD16^{-/low} NKG2C⁺ NK cells, that produce cytokines such as IFN- γ , or TNF- β , but show a low expression of perforin, and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells, which display a high cytotoxic potential [Seggewiss and Einsele, 2010], measured at days +30 and +60 after transplant correlate with protection from CMV DNAemia occurring within 100 days following allogeneic stem cell transplantation in patients lacking detectable CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ producing T-cell responses, which have been shown to play a crucial role in protection from active CMV infection in this clinical setting [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011; Muñoz-Cobo et al., 2012].

MATERIALS AND METHODS

Patients

The patients included in the current study (n = 36, see their demographic and clinical characteristics in Table I) belonged to a larger cohort of patients (n = 112) who underwent allogeneic stem cell transplantation between 2010 and 2012 at the participating hospitals. The inclusion criteria in this study were the following: (1) CMV seropositivity of donor, recipient or both; (2) undetectable CMV pp65/IE-1-specific monofunctional (IFN- γ , TNF- α , and CD107a), bifunctional (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, and TNF- α /CD107a), and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CD8⁺ T cells and IFN- γ producing CD4⁺ T-cell responses at the time of first immunological monitoring (around day +30), as determined by intracellular cytokine staining, following a published protocol [Tormo et al., 2011; Muñoz-Cobo et al., 2012]; (3) Absence of detectable CMV DNAemia earlier than the day of the first immunological monitoring.

Management of Active CMV Infection

Virological monitoring of CMV infection was performed by using a plasma real-time PCR assay (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, IL, or LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ) as described previously [Tormo et al., 2011]. Patients with active CMV infection were pre-emptively treated with oral valganciclovir (900 mg/12 hr), i.v. ganciclovir (5 mg/kg/12 hr), or foscarnet (i.v. 60 mg/kg/12 hr) as reported previously [Tormo et al., 2011].

TABLE I. Demographic and Clinical Characteristics of Patients

Parameter	No of patients (%)
Patients	36 (100)
Sex	
Male	24 (66.7)
Female	12 (33.3)
Underlying disease	
Acute myeloid leukemia	11 (30.6)
Non-Hodgkin's lymphoma	9 (25)
Myelodysplastic syndrome	5 (13.9)
Acute lymphocytic leukemia	4 (11.1)
Chronic lymphocytic leukemia	3 (8.3)
Hodgkin's lymphoma	2 (5.6)
Aplastic anemia	2 (5.6)
HLA matching	
Matched	28 (77.8)
Mismatched	8 (22.2)
Donor type	
Related	23 (63.9)
Unrelated	13 (36.1)
Stem cell source	
Peripheral blood	29 (80.5)
Umbilical cord blood	4 (11.1)
Bone marrow	3 (8.3)
Conditioning regimen	
Non-myeloablative	20 (55.6)
Myeloablative	16 (7.1)
GvHD prophylaxis	
Cyclosporin A/methotrexate	28 (77.8)
Cyclosporin A/mycophenolate mofetil	2 (5.6)
Others	6 (16.7)
CMV serostatus	
D+/R+	16 (44.4)
D-/R+	14 (38.9)
D+/R-	6 (16.7)
Acute GvHD	
0-I	23 (63.9)
II-IV	13 (36.1)

Median age of patients was 46 years (range 15–67 years). CMV, cytomegalovirus; D, donor; GvHD, graft versus host disease; R, recipient.

Immunological Analyses

Quantitation of monofunctional (IFN- γ , TNF- α , and CD107a), bifunctional (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, and TNF- α /CD107a), and trifunctional (IFN- γ /TNF- α /CD107a) CMV-specific CD8⁺ T cells was performed by intracellular cytokine staining as described previously [Muñoz-Cobo et al., 2012]. Briefly, Whole blood (0.5 ml) was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (1 μ g/ml/peptide), obtained from JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g/ml of co-stimulatory mAbs to CD28 and CD49d, an anti-CD107a mAb coupled to APC, brefeldin (5 μ g/ml), and monensin (1 μ M) for 6 hr at 37°C. The cells were washed in PBS–2% FCS, lysed in BD FACS lysis solution, stained with surface markers (anti-CD8-PerCP-Cy5-5 and anti-CD3-APC-Cy7), permeabilized (BD FACS Permeabilizing solution 2), washed, and finally stained for intracellular cytokines (anti-IFN- γ -

FITC and anti-TNF- α -PE). All antibodies and solutions were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA). The cells were stored at 4°C in PBS-1% formaldehyde, acquired within 4 hr in a BD FACScan-toII flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) and analyzed with the program Infinicity (BD Biosciences). Negative controls (absence of peptide stimulation) were processed in parallel for all experiments. Specific responses were considered as those that were >0.1% for IFN- γ , TNF- α , and CD107a-expressing CD8⁺ T-cell populations. CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ -producing CD4⁺ T cells were enumerated by intracellular cytokine staining as described previously [Tormo et al., 2011].

NK cell immunophenotyping was performed in EDTA whole blood samples in a FACScan II flow cytometer (BD Biosciences) as reported previously [Muñoz-Cobo et al., 2012]. All analyses were performed with a combination of CD3-PerCP, CD16-FITC, CD56-APC, and NKG2C-PE (Clone 134591) mAbs, to specifically gate either CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{bright}/CD16⁻ or CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{dim}/CD16⁺ NK cell populations. The mAbs were purchased from BD Biosciences, except NKG2C mAb, which was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). The absolute number of each NK cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of each NK cell population by the absolute number of lymphocytes. Immunological analyses were performed at days +30 and +60 after transplant.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 20.0). Comparisons were carried out using the non-parametric Mann-Whitney U-test for unpaired continuous data, and Fisher's exact test for categorical variables. The Spearman rank test was used for analysis of correlation between continuous variables. A P-value (two-tailed) <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Fourteen out of the 36 patients included in the current study developed CMV DNAemia between days +30 and +60 (median, 48 days; range, 28–61 days). Three patients did so after day +60 (median, 70 days; range, 65–81 days). None of these patients had CMV end-organ disease. In this small cohort, patients with or without CMV DNAemia did not differ significantly in terms of the type of transplant, the source of stem cells, the conditioning regimen, the CMV serostatus of the donor, the prophylaxis regimen for the prevention of graft versus host disease or in the incidence of severe acute graft versus host disease (Table II).

Peripheral blood CD56^{bright}CD16^{-/low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells were enumerated following the gating strategy depicted in Figure 1. As shown in Table III, the absolute numbers of both NKG2C⁺ NK

TABLE II. Demographic and Clinical Characteristics of Patients With or Without CMV DNAemia

Variable	CMV DNAemia		P-Value ^a
	Yes (n = 17)	No (n = 19)	
Sex			0.81
Male	11 (45.8)	13 (54.2)	
Female	6 (50)	6 (50)	
Underlying disease			0.19
Acute myeloid leukemia	5 (45.5)	6 (54.5)	
Non-Hodgkin's lymphoma	5 (55.6)	4 (44.4)	
Myelodysplastic syndrome	3 (60.0)	2 (40.0)	
Acute lymphocytic leukemia	3 (100.0)	0 (0.0)	
Chronic lymphocytic leukemia	1 (33.3)	2 (66.7)	
Hodgkin's lymphoma	0 (0.0)	3 (100.0)	
Aplastic Anemia	0 (0.0)	2 (100.0)	
Donor type			0.55
Related	10 (43.5)	13 (56.5)	
Unrelated	7 (53.8)	6 (46.2)	
HLA matching			0.86
Matched	13 (46.4)	15 (53.6)	
Mismatched	4 (50.0)	4 (50.0)	
Stem cell source			0.98
Cord blood	2 (50.0)	2 (50.0)	
BM	2 (50.0)	2 (50.0)	
SP	13 (46.4)	15 (53.6)	
Conditioning regimen			0.96
Myeloablative	7 (46.7)	8 (53.3)	
Non-myeloablative	10 (47.6)	11 (52.4)	
GvHD prophylaxis			0.39
Cyclosporin A/methotrexate	14 (50.0)	14 (50.0)	
Cyclosporin A/mycophenolate mofetil	0 (0.0)	2 (100.0)	
Others	3 (50.0)	3 (50.0)	
CMV serostatus			0.24
D+/R+	8 (50.0)	8 (50.0)	
D+/R-	1 (16.7)	5 (83.3)	
D-/R+	8 (57.1)	6 (42.9)	
Acute GvHD			0.20
0-I	9 (39.1)	14 (60.9)	
II-IV	8 (61.5)	5 (38.5)	

CMV, cytomegalovirus; D, donor; GvHD, graft versus host disease; R, recipient.
^aFisher exact test.

cell populations measured at day +30 (range, 25–45 days) and at day +60 (range, 55–80 days) in patients who had or had not subsequent CMV DNAemia did not differ significantly. Of note the fact that CMV-seropositive patients receiving an allograft from CMV-seropositive donors were equally represented in both groups (P=0.7). In the current study, patients receiving an allograft from a CMV-seropositive donor tended to display higher peripheral levels of both NKG2C⁺ NK-cell populations than those receiving it from a CMV-seronegative donor, although statistical significance was not reached (Table IV).

Next, it was investigated whether peripheral blood counts of both NK-cell populations at day +30 did correlate inversely with initial plasma CMV DNA loads, whose magnitude appear to reflect the viral doubling time [Cromer et al., 2013]. The data are shown in Figure 2. No significant correlation was found for

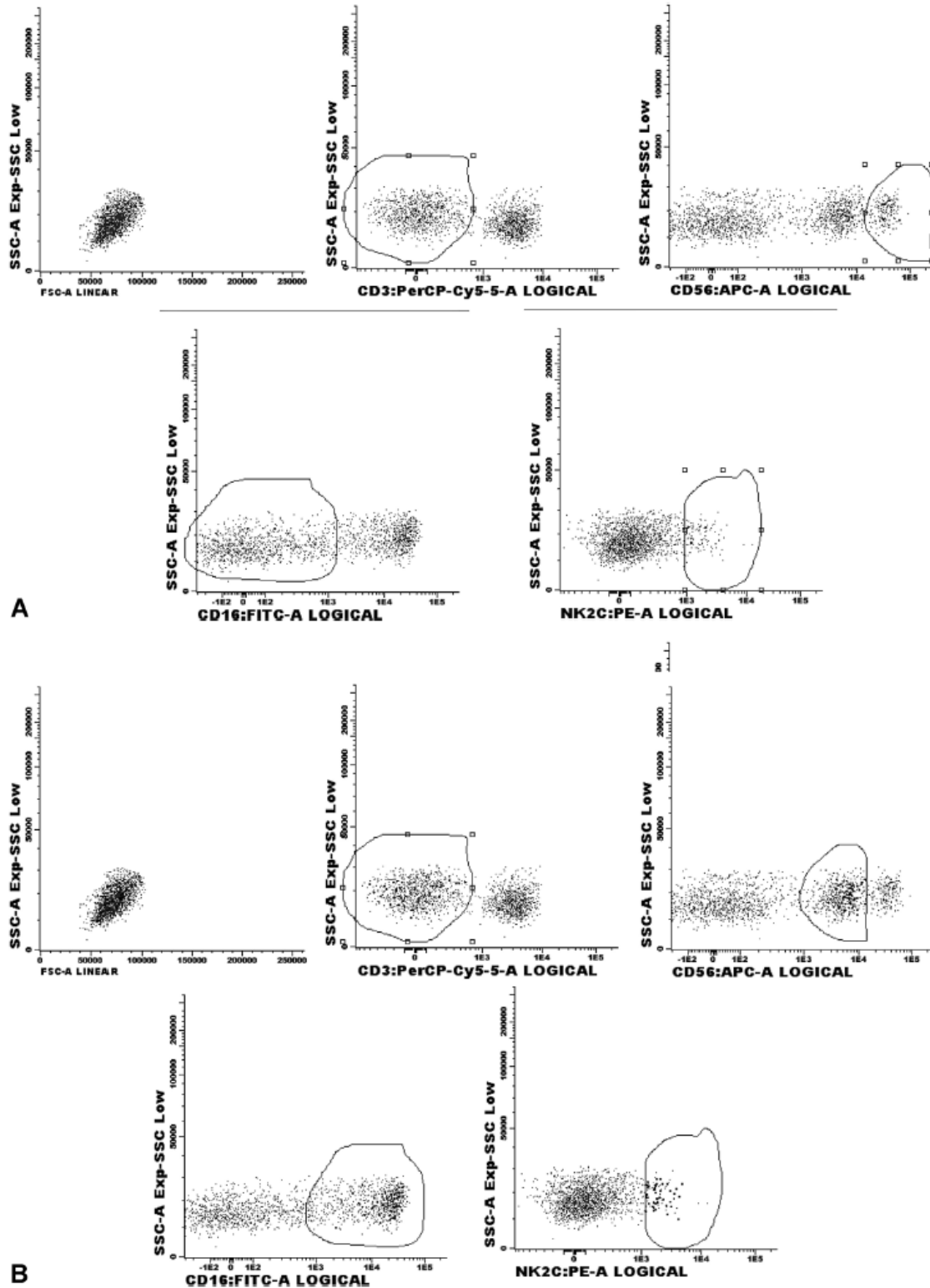


Fig. 1. Gating strategy for enumeration of NKG2C⁺ NK cells. The analyses were performed with a combination of CD3-PerCP, CD16-FITC, CD56-APC, and NKG2C-PE moAbs, to specifically gate either CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{bright}/CD16⁻ (A) or CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{dim}/CD16⁺ (B) NK cell populations. The absolute number of each NK cell subpopulation was calculated by multiplying the corresponding percentage of each NK cell population by the absolute number of lymphocytes.

TABLE III. Peripheral Blood Levels of NKG2C⁺ NK Cells in Patients With or Without CMV DNAemia Lacking Detectable CMV pp65 and IE-1-Specific CD8⁺ and CD4⁺ T-Cell Responses

Days after allo-SCT	NKG2C ⁺ NK cell subset (cells/ μ l)	CMV DNAemia		P-Value ^a
		Yes	No	
+30 ^b	NKCD56 ^{bright+} CD16 ⁻	3.19 (0.00–17.92)	1.71 (0.03–6.37)	0.53
	NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺	10.98 (0.12–144)	6.07 (0.49–390)	0.63
+60 ^c	NKCD56 ^{bright+} CD16 ⁻	0.47 (0.01–1.23)	1.71 (0.48–5.60)	0.08
	NK CD56 ^{dim+} CD16 ⁺	1.99 (0.13–2.67)	6.65 (0.87–27.20)	0.12

CMV, cytomegalovirus; Allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; NK, natural killer cells.

^aDifferences between medians were compared using the Mann–Whitney *U*-test (two independent variables). Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

^bNumber of patients with immunological data: With CMV DNAemia (*n* = 13), without CMV DNAemia (*n* = 23).

^cNumber of patients with immunological data: With CMV DNAemia (*n* = 3), without CMV DNAemia (*n* = 9).

either CD56^{bright}CD16^{-low} (*P* = 0.39) or CD56^{dim}CD16⁺ (*P* = 0.28) NKG2C⁺ NK-cell populations.

DISCUSSION

Direct evidence that IFN- γ -producing CD16⁺CD94-NKG2C⁺ NK cells can effectively control human CMV infection in the absence of T cells and without antiviral therapy was first provided by Kuijpers et al. [2008]. It was shown subsequently that the resolution of CMV viremia in allogeneic stem cell transplant recipients was associated with an expansion of this NK-cell population [López-Vergès et al., 2011; Foley et al., 2012; Muñoz-Cobo et al., 2012]. Whether these functional NK-cell subsets mediate protection against the development of active CMV infection is currently unknown. In the current study the potential role of CD56^{bright}CD16^{-low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells in conferring protection from the development of CMV DNAemia early following transplant was investigated. In order to delineate precisely the individual contribution of NK cells, a stringent criterium of patient's enrollment was adopted, that is, only patients lacking detectable mono and polyfunctional CMV pp65 and IE-1-specific T-cell responses were included. This decision was made with the knowledge that this would restrict dramatically the number of eligible patients, and thus would pose some difficulties in drawing firm conclusions. Finally, 36 patients were selected from a much larger cohort of patients. No significant differences were observed between patients with or without CMV DNAemia regarding the levels of both NKG2C⁺ NK-cell popula-

tions in peripheral blood at either day +30 or +60 after transplant. It must be underlined that this was not related to the percentage of CMV-seropositive patients receiving an allograft from CMV seropositive in both groups, which was comparable. This is of relevance provided that NK cells expressing the activating NKG2C receptor are highly enriched in CMV-infected individuals [Gumá et al., 2004]. In addition, peripheral blood counts of both NK-cell populations at day +30 did not correlate inversely with initial plasma CMV DNA loads, which appear to be directly related to the viral doubling time [Cromer et al., 2013]. In a previous study, Barron et al. [2009] showed that reconstitution of functional NK cell responses (IFN- γ producing) to CMV was associated with a lower incidence of CMV DNAemia within the first 180 days after transplantation. The data presented in this study seem to be in conflict with those reported by Barron et al. [2009]. There are two main differences between the two studies, which may account for this apparent discrepancy: (1) The NK-cell population subjected to analysis (CD16⁺/CD56⁺/CD69⁺/IFN- γ vs. NKG2C⁺ NK cells, respectively), and (2) notably, that none of the patients in the current study had detectable mono or polyfunctional CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses against CMV pp65 and IE-1, whereas in the Barron et al.'s cohort [2009] most of patients who reconstituted functional NK-cell responses did also display detectable lymphocyte proliferative responses, so that the individual contribution of NK cells and CD4⁺ T cells in affording protection against CMV DNAemia could not be ascertained.

TABLE IV. Peripheral NKG2C⁺ NK-Cell Levels at Day 30 After Transplant According to the Donor Cytomegalovirus Serostatus

NKG2C ⁺ cell subset	Donor CMV serostatus		P-Value ^a
	D+ (<i>n</i> = 21)	D- (<i>n</i> = 14)	
NK CD56 ^{bright+} CD16 ⁻ (cell/ μ l)	2.56 (0.00–17.92)	1.52 (0.07–9.69)	0.97
NK CD56 ^{low+} CD16 ⁺ (cell/ μ l)	10.50 (0.00–17.92)	5.79 (0.39–144.00)	0.74

CMV, cytomegalovirus; NK, natural killer cells.

^aDifferences between medians were compared using the Mann–Whitney *U*-test (two independent variables). Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

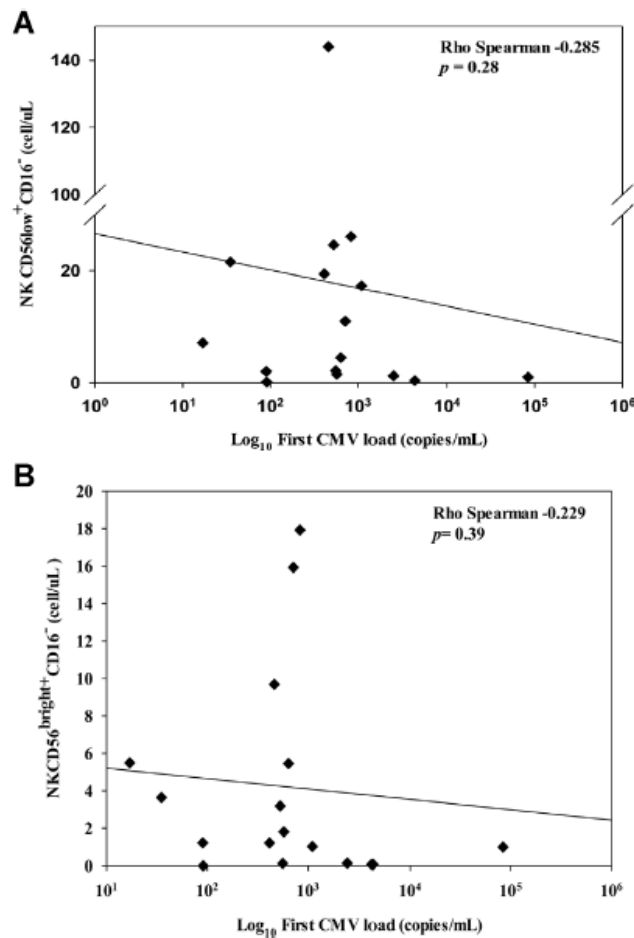


Fig. 2. Correlation between peripheral blood levels of CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{bright}/CD16⁻ (A) or CD3⁻/NKG2C⁺/CD56^{dim}/CD16⁺ (B) measured at day +30 and initial plasma CMV DNA loads in patients with CMV DNAemia.

The current study has several limitations which do not allow to draw definitive conclusions. First, the scarce number of patients analyzed. Second, it can not be ruled out that CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses against CMV proteins other than pp65 and IE-1, which may also contribute in the protection against active CMV infection, were present in the patients included in the current study; However, it was shown previously that protection from the occurrence of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients is related directly to the recovery of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ and CD4⁺ T above certain thresholds [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011]; Third, the functional capacity and the activation status of the NKG2C⁺ NK cell populations was not investigated.

In summary, the data presented do not support a direct implication of NKG2C⁺ NK cells in preventing the development of CMV DNAemia or modulating the magnitude of CMV replication at early stages during

episodes of active systemic infection in allogeneic stem cell transplant patients lacking detectable monofunctional and polyfunctional CMV pp65 and IE-1-specific T-cell responses; This conclusion must be viewed with caution as it is based on rather preliminary data. Thus, further studies including a larger cohort of patients are needed to provide a definitive answer on this issue.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dayana Bravo, María José Remigia, and Juan Montoro for their technical assistance. Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

REFERENCES

- Barron MA, Gao D, Springer KL, Patterson JA, Brunvand MW, McSweeney PA, Zeng C, Barón AE, Weinberg A. 2009. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 49:1777–1783.
- Cromer D, Tey SK, Khanna R, Davenport MP. 2013. Estimating cytomegalovirus growth rates by using only a single point. *J Virol* 87:3376–3381.
- Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, Lopez-Vergès S, Lanier LL, Weisdorf D, Miller JS. 2012. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119:2665–2674.
- Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104:3664–3771.
- Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. 2008. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112:914–915.
- López-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang SM, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. 2011. Expansion of a unique CD57⁺NKG2^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14725–14732.
- Muñoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia MJ, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, García-Noblejas A, Bravo D, Clari MA, Navarro D. 2012. Functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells and kinetics of NKG2C⁺ NK cells associated with the resolution of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol* 84:259–267.
- Seggewiss R, Einsele H. 2010. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: An update. *Blood* 115:3861–3868.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 5:111–124.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Jarque I, Calabuig ML, García-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of CMV-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active CMV infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, García-Noblejas A, Muñoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro D. 2011. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁽⁺⁾ and CD4⁽⁺⁾ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46:1437–1443.

5) Resumen de los artículos

En virtud del artículo 7.2 del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, se presentan a continuación los resúmenes de los 4 artículos compendiados en esta tesis doctoral.

5.1) Resumen artículo 1

Título:

Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. Beatriz Muñoz Cobo; Carlos Solano; Elisa Costa; Dayana Bravo; María Ángeles Clari; Isabel Benet; María José Remigia; Juan Montoro; David Navarro. Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 17 - 11, pp. 1602 - 1613. 11/2011. ISSN 1523-6536.

Introducción:

El tratamiento antiviral anticipado ha sido adoptado, por la mayoría de centros que realizan trasplantes, como estrategia de elección en la prevención de la enfermedad orgánica por CMV (Solano & D, 2010). En condiciones normales, el tratamiento antiviral se inicia cuando los niveles de DNAemia de CMV alcanzan un umbral determinado (entre 1000-10000 copias/ml en sangre total o 100-10000 copias/ml en plasma) (Boeckh & Ljungman, 2009; Solano & D, 2010). En algunos centros, el punto de corte de la DNAemia de CMV se puede estratificar en función del riesgo individual de cada paciente a desarrollar enfermedad por CMV (Boeckh & Ljungman, 2009), y alternativamente, cuando se documente un aumento de la DNAemia de CMV entre 2 determinaciones consecutivas (Boeckh & Ljungman, 2009; Gimeno et al., 2008; Halfon et al., 2011). En receptores de alo-TPH, el análisis de la dinámica de replicación de CMV durante la infección activa es una herramienta útil para predecir la aparición de enfermedad orgánica por CMV y la mortalidad directamente atribuible, la aparición de episodios recurrentes, y la cinética de CMV en respuesta al tratamiento antiviral (Avetisyan, Aschan, Hagglund, Ringden, & Ljungman, 2007; Buyck, Griffiths, & Emery, 2010; Emery et al., 2000; Gor et al., 1998; Stachel, Kirby, Corey, & Boeckh, 2008; Torre-Cisneros et al., 2010).

Objetivos:

Determinar la utilidad del estudio de la cinética de la DNAemia plasmática en el manejo de la infección por el CMV en el paciente receptor de un alo-TPH

Investigar el efecto de las condiciones pretrasplante y clínicas de los pacientes sobre la cinética de aclaramiento de la DNAemia viral en los episodios primarios y recurrentes de infección activa viral.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron 59 pacientes sometidos a un alo-TPH sin depleción de células T, entre enero de 2009 y marzo de 2011, atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La monitorización virológica de la infección por CMV, se realizó usando un kit de PCR para CMV de Abbott (Gimeno et al., 2008) capaz de cuantificar de manera fiable, según nuestra experiencia, cargas de DNA de CMV > 10 copias/ml (Chilet et al., 2010). La infección por CMV fue monitorizada semanalmente, durante los primeros 120 días postrasplante, y posteriormente, en cada visita programada. Durante los episodios de infección activa por CMV la monitorización virológica se realizó dos veces a la semana, aunque no en todos los pacientes. El tratamiento anticipado se inició con valGCV oral (900 mg/12 h) ó GCV i.v. (5 mg/kg/12 h) ó FOS i.v. (60 mg/kg/12h), tras la detección de > 500 copias/ml de DNA de CMV en plasma. El tratamiento anticipado se retiró tras dos resultados negativos consecutivos de la PCR, obtenidos con una diferencia de 3-7 días. Todos los pacientes con anticuerpos frente a virus herpes simplex (VHS) recibieron profilaxis con aciclovir (ACV), hasta que se estabilizó el injerto de células hematopoyéticas (alrededor del día +30 postrasplante).

La infección activa por CMV se diagnosticó tras la detección de cualquier nivel de DNA de CMV en 1 o más muestras de plasma. De los episodios en los que sólo existía 1 muestra positiva, se consideraron episodios reales aquellos en los que el análisis de diferentes alícuotas de la misma muestra daban un resultado positivo. Para el análisis de los datos, el inicio y el final de un episodio fueron definidos por la primera PCR positiva (cualquier valor de carga viral) y el primer resultado negativo, respectivamente. Sólo se consideraron verdaderos aumentos de carga de DNA de CMV a aquellos ≥ 3 veces los niveles basales, ya que, estos valores están por encima de la variabilidad intraensayo de la prueba de PCR utilizada (aproximadamente $0.2 \log_{10}$ para cargas bajas de DNA de CMV) (Boeckh & Ljungman, 2009). Se definieron como episodios recurrentes de infección activa aquellos que aparecieron al menos 15 días después del final del

episodio anterior. La enfermedad orgánica por CMV se diagnosticó y trató según las indicaciones previamente publicadas (Ljungman et al., 2002).

El ratio de replicación viral se calculó con el tiempo de duplicación (dt) de CMV, para lo cual se tuvieron en consideración los 2 primeros resultados positivos de PCR en ausencia de tratamiento antiviral (Tormo et al., 2009). Para el cálculo del dt se utilizó la fórmula $dt = (t_2 - t_1) \times \log(2) / \log(q_2/q_1)$, la cual asume un ratio de crecimiento constante que ocurre durante la fase inicial de la replicación. Los cálculos del dt sólo se realizaron en aquellos episodios en los que el aumento de DNAemia de CMV, entre la primera y la segunda determinación positiva, era ≥ 3 veces. La cinética de aclaramiento de la carga de DNA de CMV, expresada con la ecuación $y_t = y_0 e^{-kt}$, siguió una cinética logarítmica en la mayoría de los episodios que recibieron tratamiento, pero sólo en unos pocos episodios que resolvieron solos (Buyck et al., 2010; Emery, Cope, Bowen, Gor, & Griffiths, 1999; Humar, Kumar, Boivin, & Caliendo, 2002). Un valor de 9 copias/ml, se asignó arbitrariamente para las muestras de plasma con una carga de DNA de CMV indetectable. La vida media de la carga de DNA de CMV se calculó usando la ecuación $\ln 2/k$.

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico SPSS, versión 17.0. Las comparaciones se llevaron a cabo usando el test chi-cuadrado para variables categóricas y el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o el test de Wilcoxon para los datos continuos no apareados y apareados, respectivamente. Los valores de P que se aportaron son los de la exacta bilateral. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $P < 0.05$.

Conclusión:

El análisis de las cinéticas de DNAemia por CMV no nos permitieron identificar consistentemente los episodios de infección activa viral que presentaron una respuesta retrasada al tratamiento antiviral.

Las condiciones pretrasplante y clínicas postrasplante del paciente no influyen significativamente en la cinética de DNAemia plasmática en episodios iniciales o recurrentes de infección activa viral.

5.2) Resumen artículo 2

Título:

Functional Profile of Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8 β T Cells and Kinetics of NKG2C⁺NK Cells Associated With the Resolution of CMV DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. Munoz-Cobo B, Solano C, Benet, I, Costa E, Remigia M, De la Cámara JN, López J, Amat P, García-Noblejas A, Bravo D, Clari MA, y Navarro D. J.Med.Virol.84:259-267,2012.

Introducción:

El control de la replicación de CMV en los pacientes alo-trasplantados depende fundamentalmente de la reconstitución de las células T específicas de CMV (Einsele et al., 2002; Quinnan G. et al., 1982; Reusser et al., 1991; Solano & D, 2010). Existen indicios que demuestran que las células TCD8⁺ y TCD4⁺, con múltiples funciones efectoras (polifuncionales), son cruciales en el control de la infección viral aguda y crónica (Harari et al., 2006). Hasta el momento, no existe mucha información sobre la influencia del perfil de las células funcionales T CD8⁺ específicas de CMV en la resolución y protección de infecciones activas por CMV, en el marco del trasplante de alogénico de células madre (Krol et al., 2011; Lacey et al., 2006; Lillieri et al., 2008; Zhou et al., 2009).

Las células NK también tienen un papel muy importante en el control de la replicación viral de CMV (Barron et al., 2009; Biron et al., 1989; Kuijpers et al., 2008; Solano & D, 2010; Venema et al., 1994), en concreto aquellas que expresan un receptor activador de lectina tipo C (NKG2C) asociado con la molécula de superficie CD94 (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006; Kuijpers et al., 2008). En función del fenotipo y sus funciones, se definen dos subpoblaciones de células NK: células NK CD56^{bright}/CD16^{-/low}, que producen citoquinas como IFN- γ y TNF- β pero que expresan bajas cantidades de perforina, y las células NK CD56^{dim} CD16⁺, que son altamente citotóxicas (Caligury, 2008).

Objetivo:

Analizar la cinética de las células T CD8⁺ específicas de CMV (pp65/IE-1), monofuncionales y polifuncionales, y de las células NK (CD56^{bright}/CD16^{-/low} y CD56^{dim}/CD16⁺) durante los episodios de DNAemia de CMV en pacientes receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron 13 pacientes receptores de trasplante alogénico de células madre atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, entre abril y octubre del año 2010.

La monitorización virológica de la infección por CMV se realizó mediante una prueba de PCR a tiempo real en muestras de plasma (Gimeno et al., 2008; Tormo et al., 2011). Los pacientes que desarrollaron episodios de infección activa se trataron de forma anticipada con valganciclovir oral (900 mg/12 h) ó ganciclovir i.v. (5 mg/kg/12 h) ó foscarnet i.v. (60 mg/kg/12h) tras la detección de > 500 copias/ml de DNA de CMV en plasma. El tratamiento anticipado se retiró tras la obtención de dos resultados de PCR negativos de forma consecutiva.

La cuantificación del número total de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ (T CD8⁺ IFN- γ ⁺) específicas de CMV y la selección de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ bifuncionales (IFN- γ /Factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] y IFN- γ /CD107a) y trifuncionales (IFN- γ / TNF- α /CD107a), se realizó mediante la tinción de citoquinas intracelulares. Para ello, se estimularon simultáneamente 0.5 ml de sangre entera heparinizada con dos sets de pentadecapéptidos (15-meros) solapados, que abarcan las secuencias completas de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV, en presencia de anticuerpos monoclonales co-estimulantes frente a CD28 y CD49d, un anticuerpo frente a CD107a marcado con alofocianina, y monensina durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron, lisaron, y tiñeron las moléculas de superficie con anticuerpos marcados (anti-CD8-PerCP-Cy5.5 y anti-CD3-APC-Cy7). Una vez teñidas las moléculas de superficie, las células se permeabilizaron, lavaron, y finalmente se tiñeron las citoquinas intracelulares con anticuerpos marcados (anti-IFN γ -FITC, y anti- TNF- α -PE). Las células se almacenaron en una solución de paraformaldehído al 1%, y se analizaron en las 4 horas siguientes con un citómetro de flujo. Como controles negativos se procesaron muestras sin estimulación peptídica, que se analizaron en paralelo en todos los ensayos. El número total de células T CD8⁺ de cada subpoblación, se calculó multiplicando el porcentaje correspondiente de células T específicas de CMV por el recuento absoluto de linfocitos T CD8⁺. Las respuestas fueron consideradas específicas para valores > 0.1% en todos los tipos de células (Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010a; Tormo et al., 2010b).

La inmunofenotipificación de las células NK se realizó en muestras de sangre total con EDTA en un citómetro de flujo. Todos los análisis se realizaron con una combinación de anticuerpos monoclonales (CD3-PerCP, CD16-FITC, CD56-APC y NKG2C-PE), para seleccionar específicamente las poblaciones de células NK CD3⁻/ NKG2C⁺/ CD56^{bright}/ CD16⁻ o CD3⁻/

NKG2C⁺/ CD56^{dim}/ CD16⁺. El número absoluto de cada subpoblación de células NK se calculó multiplicando el porcentaje correspondiente de la subpoblación de células NK por el recuento absoluto de linfocitos.

Los análisis inmunológicos se realizaron en diferentes momentos de la infección activa por CMV: en el momento del primer resultado de PCR positiva, durante el curso de la DNAemia por CMV, en el momento de aclaramiento de la DNAemia (1ª o 2ª PCR negativa), y varias veces después de la resolución del episodio.

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico SPSS, versión 17.0. Las diferencias entre las medianas se compararon con el test de la U de Mann-Whitney. El test del coeficiente de Spearman se empleó para el análisis de la correlación entre variables continuas. Los valores de *P* que se aportaron son los de la exacta bilateral. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $P < 0.05$.

Conclusión:

La expansión de las células T CD8⁺ mono y polifuncionales, T CD4⁺, y de las dos subpoblaciones de células NK NKG2C⁺ analizadas se asocian con la resolución de los episodios de DNAemia de CMV en el marco del alo-TPH.

5.3) Resumen artículo 3

Título:

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. Clari MA, Munoz-Cobo B, Solano C, Benet I, Costa E, Remigia M, Bravo D, Amat P, Navarro, D. Clin.Vaccine Immunol.2012, 19(5):791

Introducción:

La evaluación de la magnitud y la funcionalidad de la inmunidad de células T frente a CMV está emergiendo como una herramienta útil en el marco del alo-TPH (Ljungman, 2006; Solano & D, 2010). Esta monitorización inmunológica de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de CMV nos podría permitir optimizar los regímenes de tratamiento antiviral anticipado individualmente, así como, identificar a los pacientes que podrían beneficiarse de otras estrategias de tratamiento, como la profilaxis antiviral o la transferencia adoptiva (Avetisyan et al., 2007; Ljungman, 2006; Solano & D, 2010). Actualmente, la citometría de flujo, para determinación de inmunofenotipos de superficie y de citoquinas intracelulares, es el “Gold standard” para la caracterización funcional de la respuesta inmunitaria de células T (Solano & D, 2010). Esta prueba predice de forma fiable la protección a desarrollar una DNAemia por CMV en receptores de alo-TPH, y ha sido utilizada como una nueva estrategia para guiar en el tratamiento antiviral anticipado mediante la combinación de la monitorización virológica e inmunológica (Solano et al., 2011).

El ensayo QuantiFERON[®]-CMV es un test comercial que permite inferir el tamaño de la repuesta de células T específicas de CMV. Para ello, se cuantifica el IFN γ producido tras la estimulación de muestras de sangre completa con un cocktail de péptidos inmunogénicos presentes en la secuencia de las proteínas virales IE-1, IE-2, pp65, pp50 y gB, los cuales se encuentran restringidos para varios haplotipos HLA-I comunes en la población (Walker et al., 2007). Hasta el momento, el QuantiFERON[®]-CMV sólo ha sido evaluado en el marco del trasplante de órgano sólido (TOS). Recientemente, se ha comenzado a aportar información sobre la idoneidad de este ensayo en la monitorización de la respuesta de células T CD8⁺IFN γ ⁺ en pacientes receptores de alo-TPH (Fleming et al., 2010).

Objetivo:

Comparar el ensayo de QuantiFERON®-CMV con nuestro método de tinción de citoquinas intracelulares para la detección y cuantificación de respuestas celulares T CD8⁺IFN γ ⁺ específicas de CMV en receptores de alo-TPH.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se analizaron 90 muestras de sangre total obtenidas de 23 pacientes receptores de alo-TPH, entre febrero de 2010 y junio de 2011, atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

La detección del estatus serológico de los donantes y los receptores se realizó mediante la determinación de anticuerpos IgG frente a CMV con el test de Diasorin Liaison.

La monitorización virológica de la infección por CMV se realizó mediante la cuantificación de ADN de CMV por una prueba de PCR a tiempo real en muestras de plasma (Gimeno et al., 2008; Tormo et al., 2011).

La cuantificación del número total de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ específicas de CMV, y la selección de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ bifuncionales (IFN- γ /TNF- α y IFN- γ /CD107a) y trifuncionales (IFN- γ / TNF- α /CD107a) se llevó a cabo por citometría de flujo para detección de citoquinas intracelulares teñidas, como se ha descrito en el artículo 2 de la presente tesis doctoral.

El ensayo de QuantiFERON®-CMV se realizó según las instrucciones del fabricante. Una alícuota de 1 ml de sangre total se recolectó en los 3 tubos de recogida de QuantiFERON®-CMV: el tubo de antígenos de CMV, el tubo del control nulo y el tubo del mitógeno. Durante 5 segundos los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron de 18-24 horas a 37°C. Tras centrifugación, se recolectó el plasma, y los niveles de IFN- γ se midieron mediante la técnica de inmunoanálisis ELISA. Para cada ensayo se realizó una curva patrón. Los resultados del ensayo se interpretaron según las recomendaciones del fabricante: (i) No reactivo para valores < 0,2 IU/ml (antígenos del CMV menos el control nulo) y \geq 0,5 IU/ml (mitógeno menos el control nulo) (ii) Reactivo para valores \geq 0,2 IU/ml (antígenos del CMV menos el control nulo) y cualquier valor de mitógeno menos el control nulo (iii) Indeterminado para valores < 0,2 IU/ml (antígenos del CMV menos el control nulo) y < 0,5 IU/ml (mitógeno menos el control nulo). De acuerdo con el fabricante, los resultados indeterminados no se interpretaron.

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del paquete estadístico SPSS, versión 17.0. Las diferencias entre las medianas se compararon con el test de la U de Mann-Whitney. El

test del coeficiente de Spearman se empleó para el análisis de la correlación entre variables continuas. Los valores de P que se aportaron son los de la exacta bilateral. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $P < 0.05$.

Conclusión:

El ensayo de QuantiFERON-CMV, aunque menos sensible que la ICS, se correlaciona bien con éste y permite estimar la polifuncionalidad de la respuesta de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas de CMV.

5.4) Resumen artículo 4

Título:

An Evaluation of the Role of NKG2C⁺ Natural Killer Cells in Protection From Cytomegalovirus DNAemia Early Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, Garcia-Noblejas A, Navarro D. J Med Virol. 2014 May; 86(5):806-11. doi: 10.1002/jmv.23742. Epub 2013 Sep 16. PubMed PMID: 24105728.

Introducción:

La protección frente a la infección activa por CMV en pacientes receptores de alo-TPH depende fundamentalmente de una reconstitución adecuada de células funcionales TCD8⁺ y TCD4⁺ específicas de CMV (Solano & D, 2010). Tras un trasplante alogénico de células madre, las células NK se recuperan muy pronto y su funcionalidad no se ve afectada por los tratamientos inmunosupresores usados contra las células T (Seggewiss & Einsele, 2010). Por lo tanto, es posible que las células NK contribuyan en la protección frente al desarrollo de DNAemia temprana por CMV. En el marco del paciente sometido a un alo-TPH, las poblaciones de células NK asociadas con el aclaramiento de la viremia son aquellas que expresan los receptores NKG2C, junto con la molécula de superficie CD94 (Foley et al., 2012; Lopez-Verges et al., 2011; Munoz-Cobo, Solano et al., 2012).

Objetivo:

Estudiar si los niveles en sangre periférica de las poblaciones de células NK NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16^{-/low} y NKG2C⁺ CD56^{dim}/CD16⁺ permiten predecir la protección frente a la DNAemia del CMV en pacientes sin respuesta de células T productoras de IFN- γ detectable.

Metodología:

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron un total de 36 pacientes, incluidos en una cohorte de 112 pacientes reclutada entre los años 2010-2012, sometidos a un alo-TPH en los siguientes hospitales: Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital La Princesa de Madrid, Hospital Morales Meseguer de Murcia, y Hospital Ramón y

Cajal de Madrid. Los pacientes se seleccionaron según los siguientes criterios de inclusión: (i) Serología positiva frente a CMV del donante, receptor, o ambos; (ii) Tener una respuesta indetectable de células TCD8⁺ monofuncionales (IFN- γ , TNF- α , y CD107a), bifuncionales (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, y TNF- α /CD107a), y trifuncionales (IFN- γ /TNF- α /CD107a) frente a las proteínas específicas de CMV pp65 e IE-1 y de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ en el momento de la primera determinación para la monitorización inmunológica (alrededor del día + 30 postrasplante); (iii) Ausencia de DNAemia de CMV detectable antes de la primera muestra para la monitorización inmunológica.

La monitorización virológica de la infección activa por CMV se llevó a cabo mediante una PCR a tiempo real en muestras de plasma (Tormo et al., 2011). Los pacientes que desarrollaron episodios de infección activa se trataron de forma anticipada con valGCV oral (900 mg/12 h) ó GCV i.v. (5 mg/kg/12 h) ó FOS i.v. (60 mg/kg/12h), tras la detección de > 500 copias/ml de DNA de CMV en plasma. El tratamiento anticipado se retiró tras la obtención de dos resultados de PCR negativos de forma consecutiva.

La monitorización inmunológica se realizó mediante la cuantificación de las células T CD8⁺ monofuncionales (IFN- γ , TNF- α , y CD107a), bifuncionales (IFN- γ /TNF- α y IFN- γ /CD107a), trifuncionales (IFN- γ / TNF- α /CD107a), y las células TC4⁺ IFN- γ ⁺ específicas de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV (Tormo et al., 2011). Además, se realizó la inmunofenotipificación de las células NK en muestras de sangre total con EDTA. Los procesos de cuantificación de células T y la inmunofenotipificación de las células NK se llevaron a cabo los días +30 y +60 mediante citometría de flujo, como se describe en el artículo 2 de la presente tesis doctoral.

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del paquete estadístico SPSS, versión 20.0. Las comparaciones para variables continuas no apareadas se realizaron con el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, y con el test de Fisher para variables categóricas. El test del coeficiente de Spearman se empleó para analizar la correlación entre variables continuas. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Conclusión:

No existe una implicación directa de las células NK NKG2C⁺ en la prevención del desarrollo de DNAemia de CMV, o en la modulación de la magnitud de la replicación de CMV, en estadios tempranos de la infección activa en pacientes receptores de alo-TPH en los que no se detecta una respuesta de células T detectable frente a las proteínas pp65 e IE-1 específicas de CMV.

6) Resultados

Los resultados de los 4 artículos incluidos en la tesis doctoral se exponen a continuación en orden cronológico:

Artículo 1

Un total de 40 pacientes (67.7%), de los 59 incluidos en el estudio, desarrollaron 1 o más (n=19) episodios de DNAemia por CMV durante el periodo de estudio. De estos 19 pacientes, 3 desarrollaron más de 2 episodios (se detectaron 63 episodios en total). Los pacientes fueron monitorizados una mediana de 220 días.

Los episodios iniciales de DNAemia de CMV en plasma se detectaron con una mediana de 30 días postrasplante. Veintitrés de los 40 episodios (57%) se resolvieron espontáneamente. De estos, 19 episodios tuvieron más de una muestra positiva por PCR. Doce de los 17 episodios restantes aclararon su DNAemia tras la instauración del tratamiento antiviral. La mediana de tiempo para la primera determinación de DNA de CMV positiva no fue significativamente diferente para los episodios que se resolvieron solos respecto a los que necesitaron tratamiento antiviral ($P = 0.930$). La carga de DNA de CMV disminuyó rápidamente tras la administración del tratamiento antiviral en 5 episodios (episodios tipo A), sin embargo, en 12 episodios la carga de DNA de CMV aumentó durante las 2-3 semanas posteriores al inicio del tratamiento, tras lo cual disminuyó progresivamente (episodios tipo B). Cinco de los episodios que recibieron tratamiento (tipo B) permanecieron activos en el momento de la muerte de los pacientes. La duración de la DNAemia por CMV fue significativamente más corta en los episodios que resolvieron solos que en los recibieron tratamiento ($P = 0.001$), independientemente de si estos eran tipo A ($P = 0.022$) o tipo B ($P = 0.001$). La duración de los episodios tipo B fue mayor que los de tipo A, aunque no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.432$) (Tabla 2).

En la mayoría de los episodios que se resolvieron solos (15 de 19 episodios con > 1 resultado de PCR positivo) se observaron fluctuaciones o niveles estables de carga de DNA de CMV (diferencia media entre las muestras < $0.2 \log_{10}$ copias/ml) hasta el momento de su resolución. En los 4 episodios restantes, la carga de DNA de CMV disminuyó siguiendo una función exponencial (Figura 1). La velocidad de eliminación (k) de la carga de DNA de CMV en estos episodios fue menor que en los episodios que recibieron tratamiento, aunque no se alcanzó significación estadística ($P = 0.297$). En consecuencia, la mediana de la vida media de la DNAemia de CMV fue menor en los episodios tratados que en los que resolvieron solos ($P = 0.304$). Los episodios tipo A mostraron una mediana de k mayor que en los episodios tipo B ($P = 0.422$). Por lo que, la mediana de la vida media de la DNAemia de CMV fue más corta en los episodios tipo A que en los episodios tipo B ($P = 0.287$).

En el análisis de las cinéticas tempranas de DNAemia de CMV, la mediana del valor de la carga inicial de DNA de CMV (primera PCR positiva) fue significativamente más baja ($P = 0.001$) en los episodios que resolvieron solos que en los que recibieron tratamiento. Los episodios tipo A y tipo B tuvieron cargas iniciales de DNA de CMV comparables ($P = 0.62$). A pesar de estos resultados, es difícil establecer un punto de corte del valor de la carga inicial que prediga la cinética que seguirá la DNAemia de CMV, debido a la existencia de un alto grado de solapamiento.

En la comparación de los valores de las cargas iniciales de DNA de CMV (1ª PCR positiva) con las medidas poco tiempo después (2ª PCR positiva), no se observaron variaciones significativas (< 3 veces) en 17 de los 19 episodios que resolvieron solos (Figura 2A y 2B). Un aumento significativo (≥ 3 veces), de los valores de las cargas de DNA de CMV, se observaron en 3 de 5 episodios tipo A y en 10 de 12 episodios tipo B (Figura 2C). Por lo tanto, los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, y VPN para este criterio de identificación de aquellos episodios que necesitaron tratamiento antiviral fueron 76.4%, 89.4%, 86.6%, y 80.9%, respectivamente. En los 2 episodios restantes que se resolvieron solos, se registró un aumento significativo entre la carga inicial de DNA de CMV y el segundo valor positivo. En estos, los dt de CMV fueron ligeramente más altos (2.77 y 3.18) que en los episodios que se trataron (mediana de 2.18; rango: 1.04-8.76). El dt de CMV fue mayor para los episodios tipo A que para los tipo B, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.160$). Además, la mediana de la carga de DNA de CMV en el inicio de tratamiento anticipado no fue significativamente diferente entre los episodios tipo A y tipo B ($P = 0.743$).

No se observó una mayor tendencia a experimentar episodios de DNAemia por CMV, que necesitaran tratamiento antiviral, en pacientes receptores de sangre de cordón, receptores de injertos HLA no compatibles, pacientes con un acondicionamiento mieloablativo o pacientes en el tratamiento para la profilaxis de EICH recibieron MMF o prednisona. Receptores de alo-TPH con serología frente a CMV D+/R+ desarrollaron con mayor frecuencia episodios que se resolvieron solos, que los pacientes con serología D-/R+ o D+/R-, aunque, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. Del mismo modo, se observó una mayor tendencia a tener episodios que requerían tratamiento antiviral en pacientes con diagnóstico previo de EICH grado II-IV. Los pacientes tratados con rapamicina, como parte del régimen de profilaxis de EICH, tuvieron episodios tratados con menor frecuencia que con otras combinaciones de fármacos inmunosupresores.

Doce de los 23 pacientes (52.1%) con un primer episodio de infección activa por CMV que resolvió sin tratamiento, desarrollaron un episodio recurrente de infección activa por CMV durante el primer año postrasplante. Estos 12 episodios se resolvieron solos, sin tratamiento. La incidencia de aparición de episodios recurrentes de DNAemia de CMV, en pacientes con episodios previos resueltos con tratamiento (7 de 17, 42%), fue comparable a la de aquellos que se resolvieron solos ($P = 0.905$).

Tres, de estos 7 episodios, necesitaron tratamiento antiviral (2 tipo B y 1 tipo A). La frecuencia de aparición de episodios recurrentes en los episodios tipo A y B fue la misma ($P = 1.0$). La duración de los episodios tratados fue mayor que los que se resolvieron solos, aunque, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

Igual que ocurrió en los primeros episodios de infección activa, la carga inicial de DNA de CMV en los episodios recurrentes fue significativamente mayor en los episodios que resolvieron solos que en los que recibieron tratamiento, aunque de nuevo, se observó un alto grado de solapamiento. Sin embargo, en los episodios recurrentes, las variaciones de carga de DNA de CMV, entre la primera y la segunda PCR positiva, no nos permitieron discriminar los episodios que resolvieron solos (0 de 9) (Figura 3A) de los que necesitaron tratamiento (1 de 3) (Figura 3B). Las cinéticas de aclaramiento de DNAemia de CMV en los episodios recurrentes resueltos de forma espontánea no disminuyeron siguiendo una función exponencial.

Se observó una mayor tendencia a la aparición de episodios recurrentes de DNAemia por CMV en pacientes con serologías D-/R+ para CMV, receptores de injerto no relacionado/incompatible y en pacientes cuya fuente de células madre fue la sangre de cordón umbilical (SCU). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 5).

Dos pacientes desarrollaron enfermedad orgánica por CMV (enteritis), durante los primeros 100 días tras el trasplante. Ambos recibieron trasplantes no relacionados/HLA-incompatibles, de células madre de sangre periférica (SP), con un acondicionamiento del trasplante no mieloablativo (fludarabina más melfalan), y ciclosporina A y metrotexato, como tratamiento profiláctico de la EICH. El serostatus de ambos pacientes frente a CMV fueron D+/R+ y D-/R+. Las cargas iniciales de DNAemia de CMV, para los dos pacientes, fueron bajas (91 y 28 copias/ml). Un aumento significativo de la carga de DNA de CMV antes del inicio del tratamiento antiviral se observó en unos de estos episodios ($dt = 2.5$ días). Los dos episodios (tipo B) se trataron con GCV i.v. y tuvieron una duración de 102 y 87 días, respectivamente. El pico de DNAemia se alcanzó a los días + 21 (66,329 copias/mL) y +30 (35,431 copias/mL), respectivamente, después de la primera PCR positiva. Ambos pacientes desarrollaron un episodio recurrente de DNAemia por CMV.

Artículo 2

Se analizaron un total de 13 episodios de infección activa de CMV, que se desarrollaron con una mediana de 63 días (rango: 2-370 días) tras el trasplante (Tabla 3). De estos 13 episodios 5 (HCU 1-5) se resolvieron en ausencia de tratamiento antiviral, 5 se resolvieron con tratamiento antiviral (HCU 6-10), y 3 continuaban con la infección activa por CMV en el momento de su muerte (2 murieron por EICH y el otro por una recaída de la enfermedad subyacente) a pesar de la administración del

tratamiento antiviral (HCU 11-13). Los pacientes HCU 1, 3, 8, y 11 tuvieron previamente uno o más episodios de DNAemia por CMV. Los pacientes HCU 11 y 13 llevaban tratamiento con corticoesteroides (≥ 1 mg/kg/día) en el momento de la DNAemia de CMV. Ningún paciente desarrolló enfermedad orgánica por CMV durante el periodo de estudio.

En los 13 episodios de estudiaron la cinética de las poblaciones celulares T CD8⁺ mono y polifuncionales específicas frente a las proteínas pp65 e IE-1 de CMV. Se analizaron un total de 70 muestras, con una mediana por paciente de 5 muestras y un rango de 3-9 muestras (Tabla 3). En 4 de los 5 episodios que se resolvieron solos (HCU-1, 2, 3, 5) se apreció un aumento sustancial de al menos 2 poblaciones de células T CD8⁺ monofuncionales, y de todas las poblaciones bifuncionales y trifuncionales en el momento de la resolución de la DNAemia de CMV. En todos estos casos se desarrolló una importante expansión de células T CD8⁺ con potencial citotóxico. Sólo en uno de los episodios que se resolvió sin tratamiento (HCU-4), únicamente se observó una expansión de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ y TNF- α . En dos de los episodios que se trataron con antivirales para su resolución (HCU-6 y 7) se observó una expansión de células T CD8⁺ monofuncionales, bifuncionales y trifuncionales específicas de CMV. Sin embargo, en los otros 3 episodios que recibieron tratamiento antiviral (HCU 8-10) sólo se expandieron poblaciones T CD8⁺ bifuncionales (IFN- γ /TNF- α) y/o monofuncionales. Los niveles de DNAemia de CMV se correlacionaron inversamente con el número de todas las poblaciones de células T CD8⁺ específicas de CMV ($P \leq 0.003$, para todas las correlaciones). La magnitud de la expansión de las poblaciones de células T CD8⁺ fue significativamente mayor ($P \leq 0.001$, para todas las comparaciones) en los episodios resolvieron solos, que en los episodios que necesitaron tratamiento antiviral. Los picos de los valores de las diferentes poblaciones de células T CD8⁺ se alcanzaron cuando se produjo el aclaramiento de la DNAemia de CMV o poco tiempo después (Tabla 3). En 3 de los episodios de infección activa se detectaron respuestas celulares T CD8⁺ bifuncionales y/o monofuncionales específicas de CMV al finalizar el periodo de estudio, aunque a niveles muy bajos, sin ninguna expansión consistente de alguna de estas poblaciones. Además, en este estudio se trató de determinar si había una relación entre las diferencias cualitativas y cuantitativas en las poblaciones celulares T CD8⁺, entre los episodios que recibían tratamiento y los que no, con la magnitud de la expansión de células T CD4⁺. Respecto a esto, observamos que el número de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ frente a los antígeno pp65 e IE-1 específicos de CMV, en el momento de aclaramiento de la DNAemia de CMV, era significativamente mayor en los episodios que resolvían solos que en los que recibían tratamiento (mediana de 25.7 cels/ μ l; rango: 1.25-116.0 cels/ μ l y mediana de 0.48 cels/ μ l; rango: 0.29-1.60 cels/ μ l respectivamente; $P= 0.024$). Además, en los episodios que no se resolvieron durante el periodo de estudio se observaron respuestas muy bajas o no detectables de células CD4⁺ IFN- γ ⁺. Se observó una correlación significativa entre el número absoluto de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ y el número de

células T CD8⁺ con potencial citotóxico, medidas por la movilización de CD107a ($\sigma= 0.74$; $P= 0.001$) y por el número de células T CD8⁺ IFN- γ /TNF- α ($\sigma= 0.864$; $P\leq 0.001$).

La cinética de las células NK NKG2C⁺ CD56^{dim} /CD16⁺ y CD56^{bright} /CD16⁻ se investigó en el curso de 12 episodios de infección activa por CMV. En unos análisis preliminares realizados en diferentes momentos tras el trasplante alogénico de células madre, en pacientes que no presentaron DNAemia por CMV, se mostró que el número de ambas poblaciones de células NK NKG2C⁺ podía variar hasta 3 veces entre las determinaciones realizadas. En general, se observó una correlación significativa entre ambos niveles de poblaciones de células NK en sangre durante los episodios de infección activa por CMV ($\sigma= 0.652$; $P\leq 0.001$), y además, ambas poblaciones de células NK NKG2C⁺ /CD56^{dim} /CD16⁺ y CD56^{bright} /CD16⁻ se correlacionaron inversamente con la magnitud de DNAemia ($\sigma= -0.394$, $P= 0.002$ y $\sigma= -0.561$, $P= 0.001$, respectivamente). Un aumento importante, de hasta 4 veces, se observó en la población de células NK NKG2C⁺ CD56^{dim} /CD16⁺, en 3 de los 5 episodios que resolvieron solos. Un marcado aumento en el número de células NK NKG2C⁺ CD56^{bright} /CD16⁻. Se observó en los 2 episodios restantes que resolvían solos, y en 3 de los 4 episodios que recibieron tratamiento. Los picos de los valores de ambas poblaciones de células NK se alcanzaron en diferentes momentos tras la primera determinación de PCR positiva, aunque más frecuentemente en el momento de aclaramiento de la DNAemia de CMV o poco tiempo después (Tabla 4). Una vez alcanzados estos picos, se apreció una tendencia a que la contracción de la expansión de ambas poblaciones de células NK ocurriera tras el aclaramiento de la DNAemia de CMV. En los episodios que no se resolvieron, no se observó una expansión consistente de ninguna de las dos poblaciones de células NK. En el análisis de la correlación entre las dos poblaciones celulares de NK NKG2C⁺ y las células T CD8⁺ específicas de CMV se observó una correlación significativa ($\sigma= 0.460$; $P\leq 0.001$ para NKG2C⁺ CD56^{bright} /CD16⁻ y $\sigma= 0.422$; $P\leq 0.001$ para NKG2C⁺ CD56^{dim} /CD16⁺).

Artículo 3

Un total de 90 muestras de sangre, obtenidas de 23 pacientes sometidos a alo-TPH, se analizaron por ICS y por el ensayo QuantiFERON-CMV. Cincuenta y cinco muestras (61,1%), obtenidas de 17 pacientes, tuvieron respuestas detectables de células T CD8+IFN- γ + específicas de CMV por la técnica ICS. De estas, 42 muestras (76,3%) de 13 pacientes fueron reactivas, y 13 muestras de 4 pacientes fueron negativas (n=10) o indeterminadas (n=3) con el ensayo QuantiFERON-CMV (Tabla 1). Las muestras reactivas en el ensayo del QuantiFERON-CMV mostraron valores de células T CD8+IFN- γ + específicas de CMV significativamente mayores

Resultados

($P= 0,001$), comparados con los valores obtenidos por ICS, que los que dieron resultados negativos o indeterminados (Figura 1). Treinta y cinco muestras de 6 pacientes no mostraron respuestas detectables de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas de CMV por la técnica ICS. De estas, sólo 1 muestra fue reactiva por el ensayo QuantiFERON-CMV (2,5 IU/ml) (Tabla 1). Todos los pacientes con resultados negativos por el ensayo de QuantiFERON-CMV mostraron al menos un HLA-1 específico capaz de presentar uno de los péptidos inmunogénicos incluidos en el ensayo QuantiFERON-CMV. Un gran número de muestras fueron indeterminadas por el ensayo QuantiFERON-CMV ($n=17$; 18%), la mayoría de estas muestras ($n=14$) no tuvieron respuestas detectables por ICS. En general, el porcentaje de muestras que dieron resultados concordantes por ambos métodos fue del 68,8%, y la sensibilidad del ensayo de QuantiFERON-CMV para la detección de respuestas celulares T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas de CMV, comparado con los determinados por ICS, fue del 76,3%. Tres muestras con resultados positivos por ICS mostraron valores de IFN- γ entre $> 0,1$ y $< 0,2$ IU/ml. En estos casos, una disminución en el punto de corte para los resultados reactivos a valores $> 0,1$ IU/ml hubiera incrementado la sensibilidad de la prueba de QuantiFERON-CMV a un 81,1%. Es importante mencionar que 15 de las 42 muestras cuyo resultado fue positivo por QuantiFERON-CMV, dieron valores de densidad óptica por encima del límite superior de cuantificación de la prueba. Estas muestras tuvieron que ser diluidas para poder determinar con precisión los valores de IFN- γ .

Para evaluar como permitía estimar la respuesta celular T CD8⁺IFN- γ ⁺ el ensayo de QuantiFERON-CMV, se hizo un análisis de correlación de los niveles de IFN- γ medidos por QuantiFERON-CMV con los niveles de las diferentes poblaciones funcionales de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ cuantificadas por ICS en las 42 muestras que mostraron respuestas detectables por ambos métodos. Hay que tener en cuenta, que 20 de las 42 muestras se obtuvieron durante episodios de DNAemia en plasma sin tratamiento ($n=11$ de 3 pacientes) o tratados con ganciclovir ($n=9$ de 2 pacientes). Las 22 muestras restantes se obtuvieron de 8 pacientes que tuvieron previamente un episodio DNAemia por CMV. La magnitud de la respuesta de IFN- γ frente a péptidos específicos de CMV medidos por el ensayo de QuantiFERON-CMV se correlacionó significativamente ($\sigma =0.695$; $P = <0.0001$) con la cuantificada por ICS para el total de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ (Figura 2). Además, los niveles de IFN- γ medidos por el ensayo de QuantiFERON-CMV se correlacionaron significativamente con el número de células T CD8⁺ específicas de CMV bifuncionales ($\sigma =0.652$ y $P = <0.001$ para IFN- γ / TNF- α ; $\sigma =0.690$ y $P = <0.0001$ para IFN- γ /CD107a) y trifuncionales ($\sigma =0.679$ y $P = < 0.0001$ para IFN- γ / TNF- α /CD107a).

Artículo 4

Catorce de los 36 pacientes incluidos en el estudio desarrollaron DNAemia de CMV entre los días +30 y +60 postrasplante (mediana de 48 días; rango: 28-61 días). Tres pacientes desarrollaron la DNAemia posterior al día +60 (mediana de 70 días; rango: 65-81 días). Ninguno de estos pacientes desarrolló enfermedad orgánica por CMV. No hubo diferencias significativas en el tipo de trasplante, la fuente de células madre, el régimen de acondicionamiento, el serostatus frente a CMV del donante, el régimen de profilaxis para la prevención de la EICH o en la incidencia de la EICH entre los pacientes de esta pequeña cohorte, con o sin DNAemia de CMV (Tabla 2).

El número absoluto de las subpoblaciones de células NK NKG2C⁺ (CD56^{bright}/CD16^{-/low} y CD56^{dim} CD16⁺), cuantificadas en sangre periférica (Figura 1), medidas los días +30 (rango: 25-45 días) y +60 (rango: 55-80 días) en pacientes con o sin DNAemia de CMV no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). Es importante el hecho que los pacientes CMV seropositivos que recibieron un alo-TPH de donantes CMV seropositivos estaban representados en ambos grupos por igual ($P= 0.7$). Además, los pacientes que recibieron un alo-TPH de un donante CMV seropositivo tendían a tener niveles más altos de ambas subpoblaciones de células NKG2C⁺ que aquellos que recibían el trasplante de un donante CMV seronegativo, aunque no se encontró significación estadística (Tabla 4).

No se obtuvo ninguna correlación inversamente proporcional significativa entre las poblaciones de células NK NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16^{-/low} y CD56^{dim} CD16⁺ con la carga inicial de DNA de CMV ($P= 0.39$ y $P= 0.28$, respectivamente) en el día + 30 (Figura 2).

7) Discusión con junta

La infección por CMV es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, en el paciente sometido a un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. En esta tesis doctoral se ha realizado un trabajo, mediante el compendio de 4 publicaciones, con el fin de mejorar el manejo de la infección por CMV en el paciente receptor de un alo-TPH.

En el **primer artículo** de esta tesis doctoral se investigó si la cinética de la DNAemia de CMV aportaba información útil en el manejo de la infección en el paciente receptor de alo-TPH, y además, si las condiciones pretrasplante y los factores clínicos tenían algún efecto sobre la cinética de aclaramiento de la DNAemia por CMV en los episodios iniciales y en la incidencia de episodios recurrentes. Para esto, nos aprovechamos de una PCR real-time de alta sensibilidad junto con una estrategia relativamente conservadora para iniciar el tratamiento antiviral anticipado (≥ 500 copias/mL). En nuestra cohorte, la tasa global de DNAemia por CMV fue casi de un 70% debido a la sensibilidad de la PCR, y también, al grupo de pacientes de alto riesgo (50% recibieron injerto no relacionado/HLA incompatible y un 40 % D-/R+) seleccionado para el estudio. Más de la mitad de los episodios de nuestro estudio se resolvieron solos, y aun así, presentaron una mediana de duración del episodio de 16 días. En este sentido, es posible que los niveles bajos de replicación viral durante periodos de tiempo prolongados puedan tener impacto en la incidencia y la gravedad de los efectos indirectos asociados al CMV (Ljungman, 2008; Solano & D, 2010).

Lo primero que evaluamos en este artículo fué si el valor de la primera carga de CMV en plasma en los episodios de infección activa diferenciaba entre los episodios que necesitaban tratamiento antiviral para su resolución y los que se resolvían por sí mismos sin tratamiento. Si esto fuera así, el inicio del tratamiento anticipado podría adelantarse, conduciendo a una resolución más rápida del episodio, y de este modo, minimizar el efecto perjudicial de una replicación continua de CMV. Aunque los valores de la carga inicial en los pacientes que resolvieron solos fueron significativamente más bajos, que los obtenidos en los pacientes tratados, no pudimos tenerlos en consideración debido a la existencia de un alto grado de solapamiento entre ellos. Esto se debe a que el valor del coeficiente de variación de las pruebas de PCR para determinar cargas de DNA de CMV cercanas al límite de detección, como la mayoría de los valores iniciales en nuestros pacientes, tendrían que ser superiores al 30% (Boeckh et al., 2004). Por lo tanto, mientras se usen pruebas de PCR real-time de alta sensibilidad para monitorizar infecciones activas por CMV, va a ser muy difícil establecer un valor umbral inicial de carga de CMV que nos permita predecir la cinética posterior de la DNAemia de CMV. En este sentido, es importante resaltar, que las cargas iniciales obtenidas en

este estudio se encontraban por debajo del límite de detección en la mayoría de PCR real-time comerciales disponibles (Solano & D, 2010).

A continuación, tratamos de determinar si la comparación entre cargas de DNA de CMV basales (cargas iniciales) y las medidas poco tiempo después (2ªPCR positiva), con una mediana de 6 días entre las dos determinaciones, nos permitía identificar aquellos episodios que necesitarían tratamiento antiviral. En un 76% de los episodios que recibieron tratamiento antiviral encontramos aumentos significativos (≥ 3 veces) de carga de DNA de CMV, mientras que, en los episodios que se resolvieron solos aumentaba en menos de un 10% de los casos. En nuestra cohorte, esta estrategia sólo nos habría permitido anticipar el inicio del tratamiento en 2 episodios (con una anticipación del tratamiento de 3 y 7 días), ya que, en el resto de episodios el segundo valor de DNAemia de CMV se encontraba por encima de punto de corte para iniciar el tratamiento antiviral. Sin embargo, un gran número de pacientes (6 de 13) se habrían beneficiado de esta estrategia, si se hubiera establecido un punto de corte de DNAemia de CMV mayor (1000 copias/mL) como umbral para iniciar el tratamiento antiviral. Diferentes estudios han propuesto valores de incremento de la carga viral entre ambas determinaciones, para diferenciar los episodios que necesitarían tratamiento de los que se resolverían solos. Algunos de ellos proponen aumentos de 174 copias/mL (Halfon et al., 2011) o 266 copias/mL (Gimeno et al., 2008), entre dos determinaciones consecutivas con una mediana de 7 días de diferencia, aunque estas estimaciones se realizaron en el marco de una estrategia anticipada donde se iniciaba el tratamiento antiviral tras la detección de cualquier nivel de antigenemia *pp65*. En otro estudio, Boeckh and Ljungman (Boeckh & Ljungman, 2009) proponen un aumento ≥ 5 veces entre la primera y la segunda determinación, para iniciar el tratamiento anticipado en receptores de alo-TPH de bajo riesgo. Sin embargo, en ninguna de las estrategias de tratamiento propuestas en los estudios mencionados, se ha evaluado ni la eficacia ni la seguridad.

Como observamos en nuestros resultados, una porción de los episodios de DNAemia de CMV que recibieron tratamiento antiviral anticipado, sufrieron disminuciones rápidas de la carga viral de CMV tras su instauración (Episodios tipo A), mientras que, otros sufrieron aumentos iniciales de la carga viral tras el inicio del tratamiento (Episodios tipo B)(Boeckh et al., 1996; Gerna et al., 2005; Nichols et al., 2001; Tormo et al., 2010a). Este fenómeno se relaciona con una falta de la expansión de las células T funcionales específicas de CMV en respuesta a la replicación viral (Tormo et al., 2010). El descubrimiento temprano de los pacientes que van a desarrollar episodios con una respuesta retardada al tratamiento, es de gran relevancia clínica, ya que, nos permitiría minimizar la morbilidad asociada a enfermedad orgánica mediante una

rápida intervención terapéutica, o incluso, con el uso de la inmunoterapia adoptiva (Buyck et al., 2010). En este contexto, Buyck et al. observaron que en los episodios con una respuesta retrasada al tratamiento (Episodios B en el estudio) existía una tasa de crecimiento media significativamente mayor, junto con una mayor carga viral en el momento de inicio del tratamiento, mientras que, las cargas iniciales eran comparables en ambos tipos de episodios. Lo que nosotros observamos en nuestro estudio está parcialmente de acuerdo con lo que dicen Buyck et al. De acuerdo con ellos, el *dt* de CMV fue más bajo en los episodios tipo B que en los A, aunque no encontramos diferencias significativas, y la carga inicial del episodio de DNAemia de CMV no difiere significativamente entre ambos tipos de episodios. Sin embargo, en contraste con la información aportada por Buyck et al., en nuestro estudio las cargas virales en el momento de inicio del tratamiento antiviral no difieren significativamente entre ambos tipos de episodios. Por lo que, en nuestra experiencia, el análisis de las cinéticas tempranas de DNAemia por CMV no nos permitieron identificar, de forma consistente, aquellos episodios de infección activa por CMV que presentarían una respuesta retrasada al tratamiento antiviral. Estas discrepancias, entre ambos estudios, se pueden relacionar con varios factores como el uso de diferentes tipos de muestras para la cuantificación de DNA de CMV, el uso de diferentes puntos de corte de DNA de CMV para el inicio del tratamiento antiviral anticipado, y el uso excesivo de Campath-1H en su estudio.

En nuestro estudio, la frecuencia de aparición de episodios recurrentes de infección activa por CMV es comparable, entre pacientes que tuvieron episodios iniciales que resolvían solos y los que necesitaron tratamiento antiviral para su resolución. Sin embargo, la probabilidad de experimentar un segundo episodio, que necesitara tratamiento antiviral, fue mayor en los pacientes que recibieron tratamiento para la resolución del primer episodio de infección activa. De acuerdo con el estudio de Buyck et al., el riesgo de recurrencia no se asoció con el ratio de eliminación de la carga de DNA de CMV de los primeros episodios de infección activa tras el inicio de la terapia. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en los episodios iniciales, la variación de la carga viral entre la primera y la segunda determinación positiva de PCR no nos permitieron discriminar entre los episodios que se resolvían solos de los que necesitaban tratamiento. A pesar de todos estos datos, no debemos olvidar, que la replicación de CMV va a depender en última instancia la adecuada expansión de las células T específicas de CMV (Tormo et al., 2010a; Tormo et al., 2010b), y respecto a esto, en nuestro estudio observamos una respuesta más eficiente y temprana en los episodios secundarios.

En el paciente sometido a alo-TPH es muy importante tener en consideración las condiciones pretrasplante y los factores clínicos. En este sentido, evaluamos el impacto que

tenían en la cinética de DNAemia de CMV durante los primeros episodios de infección por CMV y en la incidencia de las recurrencias. Aunque no pudimos encontrar asociaciones significativas, observamos una mayor tendencia a la aparición de episodios que necesitaban tratamiento antiviral en receptores D-/R+, pacientes que recibían SCU o HLA-incompatible, en aquellos que recibían MMF o prednisona para la profilaxis de la EICH, y pacientes que recibían altas dosis de corticoesteroides (> 1mg/kg/día) para el tratamiento de la EICH de grado II-IV. Todos estos descubrimientos no fueron inesperados, ya que, todas estas condiciones ya se han relacionado previamente con una recuperación retrasada de la inmunidad específica de CMV (Foster et al., 2002; Hakki et al., 2003; Lilleri et al., 2008; Pourgheysari et al., 2009; Tormo et al., 2011; Zhou et al., 2009). Tanto la magnitud como la rapidez de la expansión de células funcionales T CD8+ y CD4+ específicas de CMV, en respuesta a la replicación de CMV, va a determinar de forma crítica la cinética de aclaramiento de la DNAemia de CMV (Tormo et al., 2010a). También se asoció, de manera interesante, el uso de Rapamicina para la prevención de la EICH con una incidencia más baja de episodios que necesitaban tratamiento antiviral, aunque el escaso número de pacientes que se trataron con este fármaco en nuestra cohorte no nos permitió sacar conclusiones definitivas en este asunto; sin embargo, este efecto ya se ha documentado previamente en el marco del TOS (San Juan, Aguado, & Lumbreras, 2008) y puede ser producido por el efecto inhibitorio de la replicación viral que posee la rapamicina (Moorman & Shenk, 2010). En cuanto a la influencia de los factores clínicos en la incidencia de episodios recurrentes, observamos una mayor tendencia a desarrollar infecciones recurrentes por CMV en los pacientes receptores de alo-TPH con serología D-/R+ y en aquellos que recibían un trasplante no relacionado/HLA-incompatible o cuya fuente de células madre era la SCU. Todas estas condiciones, como ya hemos comentado en los episodios iniciales, están relacionadas con una disfunción de la recuperación de células T específicas de CMV (Solano & D, 2010).

En nuestra cohorte, sólo tuvimos dos pacientes con enfermedad orgánica por CMV. Desafortunadamente, ni el análisis de cinéticas tempranas de DNAemia de CMV en ausencia de tratamiento antiviral ni la determinación de la dinámica de la carga de CMV tras la instauración del tratamiento en estos dos episodios nos permitió anticipar el desarrollo de enfermedad orgánica por CMV. Obviamente, no es posible sacar conclusiones de esta información con un número tan bajo de casos para analizar.

Una vez analizadas las cinéticas de DNAemia de CMV, y dada la importancia que supone la reconstitución de la inmunidad de células T para el control efectivo de la infección por CMV, decidimos que era de gran relevancia estudiar no sólo la magnitud de la expansión inmunitaria, sino también, la calidad de la misma frente a la replicación por CMV. En el

segundo artículo se demuestra que la resolución temprana o tardía de los episodios de DNAemia de CMV, en ausencia de tratamiento antiviral, se asoció con una expansión de las células TCD8⁺ mono y polifuncionales. Entre las cuales, la población de células TCD8⁺ con potencial citotóxico, particularmente aquellas que movilizaban el CD107a y simultáneamente producían IFN- γ /TNF- α , fue la dominante. Únicamente, en uno de los episodios resuelto sin tratamiento se observó, que la expansión de células TCD8⁺ se restringía a poblaciones monofuncionales y bifuncionales IFN- γ /TNF- α . En los pacientes que recibieron tratamiento antiviral, la resolución de DNAemia de CMV se asoció con diferentes patrones de células T CD8⁺ funcionales. En algunos episodios se pudo observar un aumento del número de células T CD8⁺ monofuncionales, bifuncionales, y trifuncionales, mientras que, en otros sólo se expandieron de manera importante poblaciones bifuncionales (IFN- γ /TNF- α) y/o poblaciones monofuncionales. Toda esta información sugiere que el control de la replicación de CMV, en pacientes trasplantados, se puede lograr por mecanismos efectores que no están involucrados con la respuesta citotóxica de las células T CD8⁺, particularmente en presencia de tratamiento antiviral. En relación a los datos clínicos, aunque el número limitado de pacientes impide análisis estadísticamente significativo, la magnitud de la expansión de células T CD8⁺ polifuncionales específicas de CMV parece ser comparable independientemente del tipo de trasplante (relacionado/no relacionado, compatible/incompatible), el régimen de acondicionamiento (mieloablativo /no mieloablativo), y el serostatus frente a CMV del donante y el receptor.

En los episodios que permanecieron activos hasta el momento de su muerte, se observaron respuestas de células T CD8⁺ monofuncionales indetectables o muy bajas. Este hecho, como ya se ha comentado anteriormente, está relacionado con la falta de expansión de células T CD8⁺ funcionales necesarias para la replicación de CMV, incluso en los pacientes que reciben tratamiento antiviral (Tormo et al., 2010a; Tormo et al., 2010b). Es importante resaltar, que dos de los pacientes cuya infección por CMV permanecía activa en el momento de su muerte, se les administraba tratamiento con corticosteroides a altas dosis para la EICH. Este hecho, puede influir en la magnitud y polifuncionalidad de la respuesta inmunitaria de células CD8⁺, ya que, la terapia con corticoides tiene un efecto perjudicial dosis-dependiente en el tiempo de vida de las células T y en su polifuncionalidad (Hakki et al., 2003; Widmann et al., 2008).

Como ya se ha observado en otros estudios, la transferencia adoptiva ha demostrado que la infusión de células T CD4⁺ específicas de CMV es un importante requerimiento para la expansión in vivo de las células T CD8⁺ (Einsele et al., 2002). En este contexto, se ha observado

que la magnitud de la expansión de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicas de los péptido *pp65* e IE-1 de CMV se asociaba con el tamaño y la polifuncionalidad de la respuesta de células T CD8⁺, lo cual va en consonancia con información publicada por otros autores (Harari et al., 2006). De hecho, el número de células T CD4⁺, en el momento del aclaramiento de la DNAemia por CMV, era significativamente mayor en los episodios que resolvían solos que en los recibían tratamiento antiviral anticipado. Además, en los episodios que permanecieron activos en el momento de finalización del periodo de estudio se observaron respuestas indetectables o muy bajas de células CD4⁺ IFN- γ ⁺.

En el paciente con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se sabe que el nivel de exposición al antígeno y su sensibilidad modulan críticamente la polifuncionalidad de las células T CD8⁺ (Almeida et al., 2009; Appay, van Lier, Sallusto, & Roederer, 2008; Betts et al., 2006; Harari, Vallelian, & Pantaleo, 2004; Makedonas et al., 2010; Rehr et al., 2008). En nuestro estudio, observamos que hay un efecto análogo en el marco del trasplante alogénico de células madre, ya que, la respuesta de células T CD8⁺ específicas de CMV tienden a ser más elevadas y con una funcionalidad más amplia en los episodios que resuelven solos que en los que fueron tratados (pacientes con altas de cargas de DNA de CMV).

El estándar en la monitorización *ex vivo* de respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas de CMV es la cuantificación de células que expresan IFN- γ , tras la estimulación con el antígeno, mediante la ICS o ensayos de ELISOT (Solano & D, 2010). Respecto a esto, se han planteado dudas sobre si realmente estas mediciones proporcionan una estimación exacta del grado de respuesta inmune frente a CMV (Krol et al., 2011; Lacey et al., 2006; Nebbia et al., 2008; Zhou et al., 2009); sin embargo, nosotros hemos encontrado una correlación significativa del número de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺, con el número de células T CD8⁺ con potencial citotóxico (mono, bi, y trifuncionales), y el número de células T CD8⁺ bifuncionales (IFN- γ /TNF- α) durante los episodios de DNAemia de CMV. Por lo tanto, la cuantificación de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ permite inferir la polifuncionalidad de la expansión de las poblaciones de células T CD8⁺, y de esta manera se puede considerar como un marcador subrogado de la efectividad de la respuesta inmune frente a CMV.

Diferentes estudios avalan que las células NK limitan la replicación de CMV y proporcionan protección frente a la infección activa de CMV en receptores de alo-TPH (Barron et al., 2009; Biron et al., 1989; Quinnan G. et al., 1982; Solano & D, 2010). Además, también se ha sugerido que la subpoblación de células NK NKG2C⁺ tienen un rol en el control de la infección activa por CMV (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006; Kuijpers et al., 2008). En este contexto, observamos que en la mayoría de episodios que se resolvían durante el periodo de estudio, independientemente si llevaban tratamiento

o no, presentaban una expansión significativa de la subpoblación de células NK NKG2C⁺ CD56^{dim}/CD16⁺ (con potencial citotóxico). En alguno de estos episodios, también documentamos una expansión de la subpoblación de células NK NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16⁻ (potencialmente productoras de citoquinas con propiedades antivirales, pero con bajo potencial citotóxico), aunque con una magnitud más baja que la población CD56^{dim}/CD16⁺ (posiblemente, porque las células NK CD56^{bright} se encuentran preferiblemente en los ganglios linfáticos)(Caligury, 2008). En contraste con esto, no se observó ninguna expansión de las subpoblaciones de células NK en los episodios que no se resolvieron. Respecto a la cinética de las células NK, observamos que los niveles de células NK NKG2C⁺ se correlacionaban inversamente con la carga de DNAemia de CMV en plasma, presentando los niveles más altos en el momento del aclaramiento de la DNAemia de CMV y reduciéndose posteriormente. De acuerdo con nuestra información, Björkström et al. documentaron la existencia de una rápida expansión de un elevado número de células NK NKG2C⁺ CD56^{dim}, que persistía a largo plazo en infecciones en humanos por Hantavirus.

Las células NK, además, son capaces de promover el desarrollo de una respuesta efectiva antiviral de las células T CD8⁺ (Robbins et al., 2007). En este contexto, nosotros encontramos una correlación significativa entre los niveles de poblaciones celulares NK NKG2C⁺ y las células T CD8⁺ trifuncionales específicas de CMV durante los episodios de infección activa, lo cual sugiere que la magnitud y polifuncionalidad de la respuesta de células T CD8⁺ específicas de CMV está influenciada directamente por la expansión de las células NK.

Para conocer de una forma más precisa la influencia de la expansión de las poblaciones celulares de NK en la protección frente al desarrollo de una infección por CMV, en el **cuarto artículo** de esta tesis doctoral, se investigó el potencial que tenían las células NK NKG2C⁺ CD56^{bright}/CD16^{-/low} y CD56^{dim} CD16⁺ para conferir protección frente al desarrollo de una DNAemia de CMV temprana tras el trasplante. En la cohorte seleccionada para el estudio, sólo se incluyeron aquellos pacientes, que no presentaron una respuesta detectable de células T mono y polifuncionales específicas para las proteínas *pp65* e *IE-1* específicas de CMV. Esta estricta selección se realizó con el fin de conocer el papel individual de las células NK, aun sabiendo, que con esta decisión dispondríamos de un número muy bajo de pacientes para obtener unas firmes conclusiones. En el análisis de las dos subpoblaciones de células NK NKG2C⁺, medidas en sangre periférica los días +30 y +60 tras el trasplante, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con o sin DNAemia de CMV y los niveles de ambas subpoblaciones. Este hecho no se relacionó con el porcentaje de pacientes CMV seropositivos que recibieron un injerto de donantes CMV seropositivos (Guma et al., 2004) en ambos grupos, que fue comparable. Además, los niveles periféricos de ambas poblaciones de células NK no se

correlacionaron inversamente con la carga inicial de DNA de CMV en plasma en el día +30 (relacionada con el tiempo de duplicación viral) (Cromer, Tey, Khanna, & Davenport, 2013). En un estudio previo, Barron et al. (2009) mostraron que la reconstitución de células NK funcionales, productoras de IFN- γ , frente a CMV se asociaba con una baja incidencia de DNAemia de CMV en los 180 primeros días tras el trasplante. La información obtenida en nuestro estudio está en desacuerdo con lo afirmado por Barron et al. (2009). Existen principalmente dos diferencias entre los dos estudios que pueden explicar estas discrepancias: (1) la población de células NK analizadas en nuestro estudio fueron aquellas que expresaban el receptor activador NKG2C, mientras que en el estudio de Barron et al. utilizaron la población NK CD16⁺/CD56⁺/CD69⁺/IFN- γ , y (2) en nuestra cohorte, ninguno de los pacientes incluidos presentó una respuesta detectable de células TCD4⁺ mono o polifuncionales, ni TCD4 específicos de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV, mientras que, en la cohorte de Barron et al. (2009) la mayoría de pacientes que presentaron una reconstitución de las células NK también mostraron una respuesta detectable de linfocitos proliferativos. Por lo que, la contribución individual de las células NK y de las células TCD4⁺, en la protección de la DNAemia de CMV podría no estar confirmada en el estudio elaborado por Barron et al. Con todo esto, parece evidente concluir que no existe una implicación directa de las células NK NKG2C⁺ en la prevención de la infección ni en el control de la replicación de CMV.

Por último, en el **tercer artículo** de la presente tesis doctoral comparamos el ensayo del QuantiFERON-CMV (único método comercializado-marca CE- para medir la respuesta de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas de CMV) con nuestra técnica de ICS. Este ensayo ya ha sido anteriormente evaluado en otros estudios realizados en el marco de pacientes sometidos a TOS y alo-TPH (Fleming et al., 2010; Giulieri & Manuel, 2011; Kumar et al., 2009; Lochmanova et al., 2010; Nebbia et al., 2008; Walker et al., 2007; Westall, Mifsud, & Kotsimbos, 2008). En estos estudios, los datos obtenidos respaldan la utilidad clínica de este método, para evaluar el riesgo de inicio tardío de enfermedad orgánica por CMV en receptores de TOS (Kumar et al., 2009) y para predecir la aparición de DNAemia por CMV en pacientes sometidos a alo-TPH (Fleming et al., 2010). Sin embargo, no se dispone de mucha información de la correlación del ensayo de QuantiFERON-CMV con los métodos de ICS, para estimar la magnitud y la funcionalidad de la respuesta celular CD8⁺IFN- γ ⁺ específica de CMV en receptores de alo-TPH. En este artículo, comparamos la realización del ensayo de QuantiFERON-CMV con el método ICS diseñado por nuestro grupo, que ha demostrado ser clínicamente útil en el manejo de la infección activa por CMV en el marco del alo-TPH (Solano et al., 2008; Solano et al., 2011; Tormo et al., 2010a; Tormo et al., 2010b; Tormo et al., 2011). En términos generales, se

observó que ambos métodos aportaron resultados cualitativamente concordantes en torno a un 70% de las muestras. Este descubrimiento no fue del todo inesperado, ya que, 18 de los 21 péptidos incluidos en el tubo de antígenos de CMV estaban mapeados dentro de las secuencias de las proteínas *pp65* (n=15) e *IE-1* (n=3). Cuando se interpretaron los resultados del ensayo de QuantiFERON-CMV, según las instrucciones del fabricante (respuestas reactivas para niveles de IFN- γ >0.2 IU/ml), la sensibilidad de la prueba fue del 76.37%. Todo esto, considerando como método de referencia la ICS. La sensibilidad de la prueba hubiera mejorado ligeramente (81.8%), si el punto de corte para respuestas de IFN- γ positivas se hubiera bajado a 0.1 IU/ml, como sugieren algunos autores (Kumar et al., 2009). En nuestro estudio, todos los pacientes (y/o sus donantes) que dieron un resultado negativo en el ensayo del QuantiFERON-CMV, a lo largo del periodo de estudio, presentaron al menos una variante de HLA-I de entre las incluidas en el ensayo. La especificidad del ensayo QuantiFERON-CMV se aproximó al 100%. De hecho, sólo una muestra cuyo resultado era positivo con el QuantiFERON-CMV (2.5 IU/ml) resultaba negativa por ICS. Este resultado podría considerarse un falso positivo, ya que, en un seguimiento de las muestras del mismo paciente obtenidas 3 días después, el resultado fue negativo por ambos métodos. Del ensayo de QuantiFERON-CMV se obtuvieron un gran número de resultados indeterminados (Fleming et al., 2010). La mayoría de estas muestras que dieron resultados indeterminados (14 de 17), mostraron una respuesta indetectable de células CD8⁺IFN- γ ⁺ medidas por ICS. Los niveles de IFN- γ medidos por el ensayo de QuantiFERON-CMV se correlacionaron significativamente con el número total de células CD8⁺IFN- γ ⁺ cuantificadas por ICS. En este punto, nuestros resultados están de acuerdo con la información publicada por Fleming et al., en la que también comparan el ensayo de QuantiFERON-CMV con la ICS usando como antígeno estimulador una librería de péptidos solapados que cubren la secuencia completa de *pp65*.

Estudios recientes parecen estar a favor de la idea de que las células TCD8⁺ polifuncionales, en lugar de las monofuncionales, que producen citoquinas con propiedades antitumorales (IFN- γ y TNF- α) y con actividad citotóxica (células que expresan CD107a), son cruciales para la protección y la resolución de episodios de infección activa por CMV en el marco del alo-TPH (Lacey et al., 2006; Nebbia et al., 2008; Zhou et al., 2009). A pesar de que, el ensayo de QuantiFERON-CMV no diferenciana entre poblaciones de células CD8⁺IFN- γ ⁺ en respuesta a la replicación de CMV, evaluamos en qué medida este ensayo podía estimar los niveles de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ polifuncionales. En este sentido, descubrimos que los niveles de IFN- γ , medidos por el QuantiFERON-CMV, se correlacionaban significativamente con el número de poblaciones de células T CD8⁺ bifuncionales (IFN- γ / TNF- α y IFN- γ /CD107a) y trifuncionales

(IFN- γ / TNF- α /CD107a). Es importante destacar, que estas correlaciones se observaron en un marco virológico muy concreto: pacientes con episodios de infección activa por CMV en curso o resueltos. En este contexto, se observó que la expansión y la contracción de las respuestas celulares TCD8⁺IFN- γ ⁺ monofuncionales y polifuncionales específicas de CMV fueron provocadas en respuesta a la replicación de CMV con diferentes patrones cinéticos y con amplias variaciones individuales, como se explicó en el artículo 1; Por lo tanto, es probable que la habilidad del QuantiFERON-CMV, para estimar con precisión el tamaño de la respuesta celular TCD8⁺IFN- γ ⁺ polifuncional específica de CMV, pueda depender en última instancia de la replicación de CMV tanto en el pasado como en el momento de estudio.

8) Limitaciones metodológicas

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

Limitaciones del artículo 1

En el artículo 1 estudiamos las cinéticas de los primeros episodios de infección activa y en las recurrencias en pacientes sometido a alo-TPH, y evaluamos el impacto de los factores clínico y pretrasplante. Este estudio presenta principalmente dos limitaciones:

- El número de pacientes incluidos en la cohorte puede haber sido insuficiente, para evaluar con precisión el impacto de los factores pretrasplante y clínico en la cinética de DNAemia de CMV
- Pueden haber inexactitudes en los cálculos de las cinéticas de DNAemia por CMV, debido a una frecuencia insuficiente de muestreo. Respecto a esto, no existe un consenso sobre cuál debería ser la frecuencia de monitorización de las cargas de DNA de CMV, durante los episodios de infección activa por CMV en el marco del alo-TPH. Nuestros datos parecen apoyar la idea de que una monitorización semanal es seguro, siempre y cuando, se use una PCR de alta sensibilidad para la vigilancia de la infección por CMV. Sin embargo, podría ser razonable aumentar a 2 muestras a la semana para aquellos pacientes de alto riesgo (trasplantes de SCU no relacionados/HLA-incompatibles), en los cuales el *dt* durante los episodios es claramente más rápido.

Limitaciones del artículo 2

En el artículo 2 estudiamos la cinética de las células TCD8⁺ (mono y polifuncionales) y las subpoblaciones de células NK NKG2C⁺ (CD56^{dim}/CD16⁺ y CD56^{bright}/CD16⁻), en relación con la DNAemia de CMV en pacientes sometidos a un alo-TPH. Las limitaciones que observamos en este estudio fueron las siguientes:

- El número limitado de pacientes incluidos en el estudio impide cualquier análisis estadístico significativo, sobre el efecto de los factores pretrasplante en el tamaño y la polifuncionalidad de la respuesta celular T CD8⁺ específica de CMV en respuesta a la DNAemia de CMV.
- En nuestro análisis de las células NK no se estudió su capacidad funcional ni su estatus de activación. En el estudio de Björkstom et al, sin embargo, la células NK expandidas eran polifuncionales y no expresaron el receptor inhibitor NKG2A. Se ha demostrado que la expresión in vitro de CD94/ NKG2A en células NK NKG2C⁺ aparece tras la exposición de 5 días a cultivos de células dendríticas autólogas infectadas con CMV, asociadas con una pérdida de

citotoxicidad (Saez-Borderias et al., 2009). Por lo tanto, es probable que una gran fracción de las poblaciones de células NK que se expanden en nuestros pacientes exhiban un fenotipo funcional antiviral.

Limitaciones del artículo 3

En el artículo 3 comparamos el ensayo de QuantiFERON-CMV con la técnica ICS en la determinación de respuestas celulares T CD8⁺IFN- γ ⁺. Este estudio tuvo dos limitaciones importantes:

- Ambas pruebas no fueron totalmente comparables, ya que, son técnicas metodológicas distintas y, más importante, emplean diferentes antígenos estimuladores (Tabla 2).
- La técnica ICS tomada como referencia para medir respuestas celulares T CD8⁺IFN- γ ⁺, carecía de una validación exhaustiva interlaboratorios.

A pesar de estas limitaciones, estamos convencidos de que la comparación del ensayo de QuantiFERON-CMV con métodos de ICS, presenta una fiabilidad probada para evaluar y cuantificar respuestas celulares T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas de CMV.

Limitaciones del artículo 4

En el artículo 4 estudiamos el papel que tienen las células NK en la protección de la DNAemia de CMV, durante los primeros 100 días tras el trasplante alogénico de células madre. En este estudio encontramos dos importantes limitaciones:

- El número de pacientes incluidos en la cohorte del estudio fue escaso, ya que, sólo se seleccionaron los pacientes sin respuesta de células T frente a CMV. Este estricto criterio, fue adoptado para definir la contribución individual de las células NK, lo cual, restringe drásticamente el número de pacientes elegidos.
- No se puede descartar que las células TC8⁺ y TCD4⁺ respondieran frente a otras proteínas de CMV que no fueran pp65 e IE1, presentes en los pacientes incluidos en el estudio. Sin embargo, se ha demostrado que la protección, frente a la aparición de la DNAemia de CMV en receptores de alo-TPH, está relacionada directamente con la recuperación de células TC8⁺ y TCD4⁺ específicas de las proteínas pp65 e IE-1 de CMV por encima de ciertos umbrales (Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011).
- En este estudio no se estudiaron la capacidad funcional y el estatus de activación de las poblaciones de células NK NKG2C⁺.

9) Conclusiones finales

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

1. El análisis de la cinética precoz de DNAemia plasmática del CMV no nos permiten anticipar de forma consistente la dinámica de resolución de estos episodios tras la administración del tratamiento antiviral.
2. La expansión de las células T CD8⁺ mono y polifuncionales, T CD4⁺, y células NK NKG2C⁺ se asocia con la resolución de los episodios de DNAemia del CMV.
3. No existe una implicación directa de las células NK NKG2C⁺ en la prevención del desarrollo de DNAemia del CMV o en la modulación de la magnitud de la replicación del CMV durante los episodios de infección activa.
4. El ensayo de QuantiFERON-CMV, aunque presenta una menor sensibilidad que la ICS desarrollada por nuestro grupo, se correlaciona aceptablemente con ésta y permite estimar la polifuncionalidad de las respuestas de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas frente a las proteínas virales pp65 e IE-1.

10) Anexos

10.1) Anexo I

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

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, redacto el siguiente informe con el fin de justificar mi situación como segunda firmante en el artículo 3 de la presente tesis doctoral. La mayor parte del trabajo realizado en esta tesis doctoral (obtención de resultados, análisis, y su interpretación) ha sido realizados por mí, doctoranda de esta tesis; sin embargo compartí estas responsabilidades con M.A. Clari en el tercer estudio, tal y como puede acreditar el director de esta tesis doctoral. Por razones de “política” de grupo, MA Clari figuró como primer firmante.

Beatriz Muñoz-Cobo Liria

Doctoranda

_____ a ____ de _____ de _____

10.2) Anexo II

ESCRITO DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL

El factor de impacto de las revistas en las que se han publicado los artículos compendiados en esta tesis doctoral se encuentran en la siguiente tabla por orden cronológico

Artículo	Revista	Año de publicación	Factor de Impacto
1	American society for Blood and Marrow Transplantation	2011	3.873
2	Journal of Medical Virology	2012	2,373
3	Clinical and Vaccine Immunology	2012	2,466
4	Journal of Medical Virology	2014	2,217

Dr David Navarro Ortega

Catedrático, Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología i Ecología,

Universidad de Valencia

_____ a _____ de _____ de _____

11) Bibliografia

References

- Almeida, J. R., Sauce, D., Price, D. A., Papagno, L., Shin, S. Y., Moris, A., . . . Appay, V. (2009). Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*, *113*(25), 6351-60. doi:10.1182/blood-2009-02-206557 [pii] 10.1182/blood-2009-02-206557
- Anasetti, M. D. (2012). What are the most important donor and recipient factors affecting the outcome of related and unrelated allogeneic transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol*, *21*(4), 691-97. doi:10.1016/j.beha.2008.10.002.
- Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F., & Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry A*, *73*(11), 975-83. doi:10.1002/cyto.a.20643
- Avetisyan, G., Aschan, J., Hagglund, H., Ringden, O., & Ljungman, P. (2007). Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*, *40*(9), 865-9. doi:10.1038/sj.bmt.1705825 [pii] 10.1038/sj.bmt.1705825
- Barron, M. A., Gao, D., Springer, K. L., Patterson, J. A., Brunvand, M. W., McSweeney, P. A., . . . Weinberg, A. (2009). Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, *49*(12), 1777-83. doi:10.1086/648423
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., . . . Koup, R. A. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, *107*(12), 4781-9. doi:10.1182/blood-2005-12-4818 [pii] 10.1182/blood-2005-12-4818
- Biron, C. A., Byron, K. S., & Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, *320*(26), 1731-5. doi:10.1056/NEJM198906293202605

- Boeckh, M., Gooley, T. A., Myerson, D., Cunningham, T., Schoch, G., & Bowden, R. A. (1996). Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: A randomized double-blind study. *Blood*, *88*(10), 4063-71.
- Boeckh, M., Huang, M., Ferrenberg, J., Stevens-Ayers, T., Stensland, L., Nichols, W. G., & Corey, L. (2004). Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, *42*(3), 1142-8.
- Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S. R., Bowden, R. A., Huang, M. L., Myerson, D., . . . Corey, L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: Importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*, *101*(2), 407-14. doi:10.1182/blood-2002-03-0993 2002-03-0993 [pii]
- Boeckh, M., & Ljungman, P. (2009). How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, *113*(23), 5711-9. doi:blood-2008-10-143560 [pii] 10.1182/blood-2008-10-143560
- Boeckh, M., & Nichols, W. G. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*, *103*(6), 2003-06.
- Boeckh, M., Nichols, W. G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J. R., & Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*, *9*(9), 543-58. doi:S1083879103002878 [pii]
- Britt, W. J., & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, *39*(401), 5-6.

- Buyck, H. C., Griffiths, P. D., & Emery, V. C. (2010). Human cytomegalovirus (HCMV) replication kinetics in stem cell transplant recipients following anti-HCMV therapy. *J Clin Virol*, *49*(1), 32-6. doi:S1386-6532(10)00262-3 [pii] 10.1016/j.jcv.2010.06.018
- Caliendo, A. M., Ingersoll, J., Fox-Canale, A. M., Pargman, S., Bythwood, T., Hayden, M. K., . . . Lurain, N. S. (2007). Evaluation of real-time PCR laboratory-developed tests using analyte-specific reagents for cytomegalovirus quantification. *J Clin Microbiol*, *45*(6), 1723-7. doi:JCM.02558-06 [pii] 10.1128/JCM.02558-06
- Caligury, M. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, *112*, 461.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., . . . Martignetti, J. A. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, *154*, 125-69.
- Chilet, M., Aguilar, G., Benet, I., Belda, J., Tormo, N., Carbonell, J. A., . . . Navarro, D. (2010). Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol*, *82*(8), 1384-91. doi:10.1002/jmv.21825
- Cromer, D., Tey, S. K., Khanna, R., & Davenport, M. P. (2013). Estimating cytomegalovirus growth rates by using only a single point. *J Virol*, *87*(6), 3376-81. doi:JVI.02821-12 [pii] 10.1128/JVI.02821-12
- Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, *22*(1), 76-98, Table of Contents. doi:22/1/76 [pii] 10.1128/CMR.00034-08
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., . . . Thiry, E. (2009). The order herpesvirales. *Arch Virol*, *154*(1), 171-7. doi:10.1007/s00705-008-0278-4

- Drew, W. L., Miner, R. C., Marousek, G. I., & Chou, S. (2006). Maribavir sensitivity of cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir, cidofovir or foscarnet. *J. Clin. Virol.*, *37*(2), 124-27.
- Dropulic, L. K., & Cohen, J. I. (2010). Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.*, *88*(5), 610-19.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, H., Sinzger, C., Riegler, S., Löeffler, J., . . . Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, *99*, 3916.
- Emery, V. C., Cope, A. V., Bowen, E. F., Gor, D., & Griffiths, P. D. (1999). The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med*, *190*(2), 177-82.
- Emery, V. C., & Griffiths, P. D. (1990). Current status review molecular biology of cytomegalovirus. *71*, 905-13.
- Emery, V. C., Sabin, C. A., Cope, A. V., Gor, D., Hassan-Walker, A. F., & Griffiths, P. D. (2000). Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet*, *355*(9220), 2032-6. doi:S0140-6736(00)02350-3 [pii] 10.1016/S0140-6736(00)02350-3
- Espigado, I., de la Cruz-Vicente, F., BenMarzouk-Hidalgo, O. J., Gracia-Ahufinger, I., Garcia-Lozano, J. R., Aguilar-Guisado, M., . . . Perez-Romero, P. (2014). timing of CMV-specific effector memory T-cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation *Transpl Int*, *27*, 1253-62. doi:10.1111/tri.12406.
- Fleming, T., Dunne, J., & Crowley, B. (2010). 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*, 82(3), 433-40.

doi:10.1002/jmv.21727

Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., . . . Miller, J. S. (2012).

Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665-74. doi:blood-2011-10-386995 [pii] 10.1182/blood-2011-10-386995

Forbes, B. (1989). Acquisition of cytomegalovirus infection: An update *Clin Microbiol Rev*, , 204-16.

Foster, A. E., Gottlieb, D. J., Sartor, M., Hertzberg, M. S., & Bradstock, K. F. (2002). Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 8(9), 501-11. doi:S1083879102500112 [pii]

Fouts, A. E., Chan, P., Stephan, J. P., Vandlen, R., & Feierbach, B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti-cytomegalovirus (anti-CMV) neutralizing antibody response in CMV hyperimmune globulin. *Journal of Virology*, 86(13), 7444-47.

Gerna, G., Baldanti, F., Percivalle, E., Zavattoni, M., Campanini, G., & Revello, M. G. (2003). Early identification of human cytomegalovirus strains by the shell vial assay is prevented by a novel amino acid substitution in UL123 IE1 gene product. *J Clin Microbiol*, 41(9), 4494-5.

Gerna, G., Lilleri, D., Zecca, M., Alessandrino, E. P., Baldanti, F., Revello, M. G., & Locatelli, F. (2005). Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*, 90(4), 526-33.

- Gerna, G., Revello, M. G., Percivalle, E., Zavattoni, M., Parea, M., & Battaglia, M. (1990). Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J Clin Microbiol*, *28*(12), 2681-8.
- Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernandez-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., . . . Navarro, D. (2008). Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol*, *46*(10), 3311-8. doi:JCM.00797-08 [pii] 10.1128/JCM.00797-08
- Giulieri, S., & Manuel, O. (2011). QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn*, *11*(1), 17-25. doi:10.1586/erm.10.109
- Göhring, K., Hamprecht, K., & Gerhard, J. (2015). Antiviral drug- and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *13*, 153-59.
- Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., & Lischka, P. (2011). The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J. Virol.*, *85*(20), 10884-93.
- Gor, D., Sabin, C., Prentice, H. G., Vyas, N., Man, S., Griffiths, P. D., & Emery, V. C. (1998). Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: Relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplant*, *21*(6), 597-605. doi:10.1038/sj.bmt.1701139
- Gratama, J. W., Boeckh, M., Nakamura, R., Cornelissen, J. J., Brooimans, R. A., Zaia, J. A., . . . Southwick, P. C. (2010). Immune monitoring with iTAg MHC tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem

- cell transplant recipients: A prospective multicenter study. *Blood*, *116*(10), 1655-62. doi:10.1182/blood-2010-03-273508 [pii] 10.1182/blood-2010-03-273508
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., & Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, *104*(12), 3664-71. doi:10.1182/blood-2004-05-2058 2004-05-2058 [pii]
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*, *107*(9), 3624-31. doi:10.1182/blood-2005-09-3682 [pii] 10.1182/blood-2005-09-3682
- Gundula, M., Yosuke, K., Deborah, W., Tsukasa, N., & Lewis, L. (2013). NK cells: Walking three paths down memory lane *Trends Immunol*, *34*(6), 251-58. doi:10.1016/j.it.2013.02.005.
- Hakki, M., Riddell, S. R., Storek, J., Carter, R. A., Stevens-Ayers, T., Sudour, P., . . . Boeckh, M. (2003). Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*, *102*(8), 3060-7. doi:10.1182/blood-2002-11-3472 2002-11-3472 [pii]
- Halenius, A., & Hengel, H. (2014). Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int*, *2014*, 472978. doi:10.1155/2014/472978
- Halfon, P., Berger, P., Khiri, H., Martineau, A., Penaranda, G., Merlin, M., & Faucher, C. (2011). Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol*, *83*(3), 490-5. doi:10.1002/jmv.21996
- Hanley, P. J., & Bollard, C. M. (2014). Controlling cytomegalovirus: Helping the immune system take the lead. *Viruses*, *6*(6), 2242-58. doi:10.3390/v6062242 [pii] 10.3390/v6062242

- Harari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, P. A., Du Pasquier, R. A., & Pantaleo, G. (2006). Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev*, *211*, 236-54. doi:IMR395 [pii] 10.1111/j.0105-2896.2006.00395.x
- Harari, A., Vallelian, F., & Pantaleo, G. (2004). Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*, *34*(12), 3525-33. doi:10.1002/eji.200425324
- Humar, A., Kumar, D., Boivin, G., & Caliendo, A. M. (2002). Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis*, *186*(6), 829-33. doi:JID020412 [pii] 10.1086/342601
- Junghanss, C., Boeckh, M., Carter, R. A., Sandmaier, B. M., Maris, M. B., Maloney, D. G., . . . Storb, R. (2002). Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood*, *99*(6), 1978-85.
- Kalejta, R. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbial Mol Biol Rev*, *72*, 249-16.
- Kalpoë, J. S., Kroes, A. C., de Jong, M. D., Schinkel, J., de Brouwer, C. S., Beersma, M. F., & Claas, E. C. (2004). Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol*, *42*(4), 1498-504.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., . . . Humar, A. (2010). International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*, *89*, 779-95.

- Krol, L., Stuchly, J., Hubacek, P., Keslova, P., Sedlacek, P., Stary, J., . . . Kalina, T. (2011). Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, *46*(8), 1089-98. doi:bmt2010261 [pii] 10.1038/bmt.2010.261
- Kuijpers, T. W., Baars, P. A., Dantin, C., van den Burg, M., van Lier, R. A., & Roosnek, E. (2008). Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*, *112*(3), 914-5. doi:112/3/914 [pii] 10.1182/blood-2008-05-157354
- Kulkarni, A., Wesmoreland, D., & Fox, J. D. (2001). Molecular-based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*, *7*, 179-86.
- Kumar, D., Chernenko, S., Moussa, G., Cobos, I., Manuel, O., Preiksaitis, J., . . . Humar, A. (2009). Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, *9*(5), 1214-22. doi:AJT2618 [pii] 10.1111/j.1600-6143.2009.02618.x
- Lacey, S. F., La Rosa, C., Zhou, W., Sharma, M. C., Martinez, J., Krishnan, A., . . . Diamond, D. J. (2006). Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and intermediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis*, *194*(10), 1410-21. doi:JID36844 [pii] 10.1086/508495
- Leruez-Ville, M., Ouachee, M., Delarue, R., Sauget, A. S., Blanche, S., Buzyn, A., & Rouzioux, C. (2003). Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol*, *41*(5), 2040-6.
- Lilleri, D., Kabanova, A., Lanzavecchia, A., & Gerna, G. (2012). Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *J. Clin. Immunol.*, *32*(6), 1324-31.

- Lilleri, D., Fornara, C., Chiesa, A., Caldera, D., Alessandrino, E., & Gerna, G. (2008). Human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica*, *93*, 248.
- Lischka, P., Hewlett, G., Wunberg, T., Baumeister, J., Paulsen, D., Goldner, T., . . . Zimmermann, H. (2010). In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246. *Antimicrobial Agents Chemother.*, *54*(3), 1290-97.
- Ljungman, P. (2006). Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients. *J Clin Virol*, *35*(4), 493-5. doi:S1386-6532(05)00322-7 [pii] 10.1016/j.jcv.2005.10.017
- Ljungman, P. (2008). CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, *42 Suppl 1*, S70-S72. doi:bmt2008120 [pii] 10.1038/bmt.2008.120
- Ljungman, P., Brand, R., Einsele, H., Frassoni, F., Niederwieser, D., & Cordonnier, C. (2003). Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: An EBMT megafile analysis. *Blood*, *102*(13), 4255-60. doi:10.1182/blood-2002-10-3263 2002-10-3263 [pii]
- Ljungman, P., Griffiths, P., & Paya, C. (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, *34*(8), 1094-7. doi:CID011275 [pii] 10.1086/339329
- Lochmanova, A., Lochman, I., Tomaskova, H., Marsalkova, P., Raszka, J., Mrazek, J., . . . Grundmann, M. (2010). Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc*, *42*(9), 3574-7. doi:S0041-1345(10)01277-7 [pii] 10.1016/j.transproceed.2010.07.101
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., . . . Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human

- cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36), 14725-32. doi:1110900108 [pii] 10.1073/pnas.1110900108
- Luo, X. H., Chang, Y. J., & Huang, X. J. (2014). Improving cytomegalovirus-specific T cell reconstitution after haploidentical stem cell transplantation *Journal of Immunology Research*, 2014 doi:10.1155/2014/631951
- Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol.Rev.*, 23(4), 689-712.
- Makedonas, G., Hutnick, N., Haney, D., Amick, A. C., Gardner, J., Cosma, G., . . . Betts, M. R. (2010). Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog*, 6(3), e1000798. doi:10.1371/journal.ppat.1000798
- Marr, K. A., Carter, R. A., Boeckh, M., Martin, P., & Corey, L. (2002). Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: Changes in epidemiology and risk factors. *Blood*, 100(13), 4358-66.
- Meijer, E., Boland, G. J., & Verdonck, L. F. (2003). Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin Microbiol Rev*, 16, 647-57.
- Moorman, N. J., & Shenk, T. (2010). Rapamycin-resistant mTORC1 kinase activity is required for herpesvirus replication. *J Virol*, 84(10), 5260-9. doi:JVI.02733-09 [pii] 10.1128/JVI.02733-09
- Munoz-Cobo, B., Gimenez, E., Solano, C., de la Camara, R., Nieto, J., Lopez, J., . . . Navarro, D. (2012). An evaluation of the role of NKG2C+ natural killer cells in protection from cytomegalovirus DNAemia early following allogeneic stem cell transplantation. *J Med Virol*, 86(5), 806-11. doi:10.1002/jmv.23742
- Munoz-Cobo, B., Solano, C., Benet, I., Costa, E., Remigia, M. J., de la Camara, R., . . . Navarro, D. (2012). Functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells and kinetics of

- NKG2C+ NK cells associated with the resolution of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*, 84(2), 259-67. doi:10.1002/jmv.22254
- Nakamae, H., Kirby, K. A., Sandmaier, B. M., Norasetthada, L., Maloney, D. G., Maris, M. B., . . . Boeckh, M. (2009). Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(6), 694-703. doi:S1083-8791(09)00123-2 [pii] 10.1016/j.bbmt.2009.02.009
- Nebbia, G., Mattes, F. M., Smith, C., Hainsworth, E., Kopycinski, J., Burroughs, A., . . . Emery, V. C. (2008). Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant*, 8(12), 2590-9. doi:AJT2425 [pii] 10.1111/j.1600-6143.2008.02425.x
- Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Drew, W. L., Miner, R., Huang, M., . . . Boeckh, M. (2001). Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood*, 97(4), 867-74.
- Nichols, W. G., Corey, L. C., L., Davis, C., & Boeckh, M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: Evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J. Infect. Dis.*, 185(3), 273-82.
- Oduro, J., Uecker, R., Hagemeyer, C., & Wiebusch, L. (2012). Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by cyclin A2-dependent kinase activity. *Journal of Virology*, 86(17), 9369-83. doi:10.1128/JVI.07181-11
- Ohnishi, M., Sakurai, T., Heike, Y., Yamazaki, R., Kanda, Y., Takahue, Y., . . . Kawakami, Y. (2005). Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked

- immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br.J.Haematol.*, 131(4), 472-79.
- Ozdemir, E., Saliba, R. M., Champlin, R. E., Couriel, D. R., Giralto, S. A., de Lima, M., . . . Komanduri, K. V. (2007). Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 40(2), 125-36. doi:1705699 [pii] 10.1038/sj.bmt.1705699
- Pourgheysari, B., Piper, K. P., McLarnon, A., Arrazi, J., Bruton, R., Clark, F., . . . Moss, P. A. (2009). Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 43(11), 853-61. doi:bmt2008403 [pii] 10.1038/bmt.2008.403
- Prichard, M. N., & Kern, E. R. (2011). The search for new therapies for human cytomegalovirus infections. *Virus Res*, 157(212), 21. doi:10.1016/j.virusres.2010.11.004.
- Quinnan G., J., Kirmani, N., Rook, A. H., Manischewitz, J. F., Jackson, L., Moreschi, G., . . . Burns, W. H. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*, 307(1), 7-13. doi:10.1056/NEJM198207013070102
- Rehr, M., Cahenzli, J., Haas, A., Price, D. A., Gostick, E., Huber, M., . . . Oxenius, A. (2008). Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *J Virol*, 82(7), 3391-404. doi:JVI.02383-07 [pii] 10.1128/JVI.02383-07
- Reusser, P., Riddell, S. R., Meyers, J. D., & Greenberg, P. D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*, 78(5), 1373-80.

- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., & Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257(5067), 238-41.
- Robbins, S. H., Bessou, G., Cornillon, A., Zucchini, N., Rupp, B., Ruzsics, Z., . . . Dalod, M. (2007). Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 3(8), e123. doi:07-PLPA-RA-0192 [pii] 10.1371/journal.ppat.0030123
- Saez-Borderias, A., Romo, N., Magri, G., Guma, M., Angulo, A., & Lopez-Botet, M. (2009). IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol*, 182(2), 829-36. doi:182/2/829 [pii]
- San Juan, R., Aguado, J., & Lumberras, C. (2008). Impact of current trasnplantation mangement on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clinical Infection Disease*, 47, 875.
- Sanbonmatsu, S., Pérez, M., & Navarro, J. M. (2014). Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32(supl 1), 15-22.
- Schleiss, M. R. (2011). Congenital cytomegalovirus infection: Molecular mechanisms mediating viral pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets*, 11(5), 449-65. doi:BSP/ ID DT /E-Pub/-00036-11-5 [pii]
- Seggewiss, R., & Einsele, H. (2010). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: An update. *Blood*, 115(19), 3861-8. doi:blood-2009-12-234096 [pii] 10.1182/blood-2009-12-234096
- Sinclair, J. H., & Reeves, M. B. (2013). Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells. *Viruses*, 5(11), 2803-24. doi:v5112803 [pii] 10.3390/v5112803

Sinclair, J. H., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus *Journal of General Virology*, 87, 1763-79. doi:10.1099/vir.0.81891-0

Sinzger, C., Grefte, B., Plachter, A. S., Gouw, T., Hauw, T., & Jahn, G. (1995). **Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues.** *Biomed Res Int*, 76(4), 741-50.

Smith, R. M., Kosuri, S., & Kerry, J. A. (2014). Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*, 6(2), 582-605. doi:v6020582 [pii] 10.3390/v6020582

Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Camara, R., Lopez, J., . . . Navarro, D. (2008). Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*, 93(9), 1434-6. doi:haematol.12880 [pii] 10.3324/haematol.12880

Solano, C., Benet, I., Remigia, M. J., de la Camara, R., Munoz-Cobo, B., Costa, E., . . . Navarro, D. (2011). Immunological monitoring for guidance of preemptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: A pilot experience. *Transplantation*, 92(4), e17-20. doi:10.1097/TP.0b013e318224f263 00007890-201108270-00020 [pii]

Solano, C., & D, N. (2010). Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virology*, (5), 111-124.

Solano, C., Munoz-Cobo, B., Gimenez, E., Remigia, M. J., Amat, P., Clari, M. A., . . . Navarro, D. (2012). Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: Clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant*, 48(7), 1010-2. doi:bmt2012286 [pii] 10.1038/bmt.2012.286

- Stachel, D., Kirby, K., Corey, L., & Boeckh, M. (2008). Viral load as predictor for transplant-related mortality in the era of pre-emptive therapy. *Bone Marrow Transplant*, *41*
- Strasfeld, L., & Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin. North Am*, *24*(2), 413-37.
- Sweet, C. (1999). The pathogenicity of cytomegalovirus *FEMS Microbiology Reviews*, *23*, 457-82.
- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Camara, R., . . . Navarro, D. (2010a). Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*, *45*(3), 543-9. doi:bmt2009172 [pii] 10.1038/bmt.2009.172
- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Nieto, J., de la Camara, R., Garcia-Noblejas, A., . . . Navarro, D. (2010b). Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: Potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol*, *82*(7), 1208-15. doi:10.1002/jmv.21799
- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Nieto, J., de la Camara, R., Lopez, J., . . . Navarro, D. (2011). Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, *46*(11), 1437-43. doi:bmt2010330 [pii] 10.1038/bmt.2010.330
- Tormo, N., Solano, C., de la Camara, R., Garcia-Noblejas, A., Cardenoso, L., Clari, M. A., . . . Navarro, D. (2009). An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, *16*(5), 653-61. doi:S1083-8791(09)00587-4 [pii] 10.1016/j.bbmt.2009.12.003

- Torre-Cisneros, J., Caston-Osorio, J. J., Martin, C., Rivero, A., Doblas, A., Rojas, R., . . . Torres, A. (2010). [Impact of initial cytomegalovirus viral load on efficacy of preemptive therapy with ganciclovir in allogeneic stem cell transplant recipients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(1), 6-12. doi:S0213-005X(09)00182-7 [pii] 10.1016/j.eimc.2009.01.010
- Van Damme, E., & Van Loock, M. (2014). Functional annotation of human cytomegalovirus gene products: An update. *Front Microbiol*, 5, 218. doi:10.3389/fmicb.2014.00218
- van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W. J., Tegzess, A. M., & The, T. H. (1988). Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol*, 26(12), 2531-5.
- Venema, H., van den Berg, A. P., van Zanten, C., van Son, W. J., van der Giessen, M., & The, T. H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol*, 42(2), 188-92.
- Walker, S., Fazou, C., Crough, T., Holdsworth, R., Kiely, P., Veale, M., . . . Khanna, R. (2007). Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis*, 9(2), 165-70. doi:TID199 [pii] 10.1111/j.1399-3062.2006.00199.x
- Westall, G. P., Mifsud, N. A., & Kotsimbos, T. (2008). Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant*, 8(8), 1749-54. doi:AJT2294 [pii] 10.1111/j.1600-6143.2008.02294.x
- Widmann, T., Sester, U., Gartner, B. C., Schubert, J., Pfreundschuh, M., Kohler, H., & Sester, M. (2008). Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One*, 3(11), e3634. doi:10.1371/journal.pone.0003634

Bibliografia

Zaia, J. (2002). Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation.

Clin. Infect Dis., 35, 999-1004.

Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S. F., Palmer, J. M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., . . . Diamond, D. J.

(2009). Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction

CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*, 113(25), 6465-76. doi:blood-

2009-02-203307 [pii] 10.1182/blood-2009-02-203307