

UNIVERSITAT de VALÈNCIA



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

DOCTORADO EN MEDICINA

**INFECCIÓN ACTIVA POR EL CITOMEGALOVIRUS (CMV) EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES
HEMATOPOYÉTICOS: INVESTIGACIÓN DE NUEVOS FACTORES
BIOLÓGICOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL RIESGO Y ANÁLISIS
INTEGRAL DE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS QUE LA
PREVIENEN Y CONTROLAN**



Estela Berenice Giménez Quiles

Director: David Navarro Ortega

Enero 2016

UNIVERSITAT de VALÈNCIA



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

DOCTORADO EN MEDICINA

**INFECCIÓN ACTIVA POR EL CITOMEGALOVIRUS (CMV) EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PRECURSORES
HEMATOPOYÉTICOS: INVESTIGACIÓN DE NUEVOS
FACTORES BIOLÓGICOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL RIESGO Y
ANÁLISIS INTEGRAL DE LOS MECANISMOS INMUNITARIOS
QUE LA PREVIENEN Y CONTROLAN**



Estela Berenice Giménez Quiles

Director: David Navarro Ortega

Enero 2016



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGÍA I ECOLOGÍA

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 Estela Berenice Giménez Quiles, titulado *“Infección activa por el citomegalovirus (CMV) en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos: Investigación de nuevos factores biológicos para la estimación del riesgo y análisis integral de los mecanismos inmunitarios que la previenen y controlan”* 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.

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.

Los resultados de esta tesis doctoral se encuentran resumidos en los siguientes artículos científicos:

- I. Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., & Navarro, D. (2014). Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value?. *Journal of clinical microbiology*, 52(2), 654-656.
- II. Giménez, E., Solano, C., Azanza, J. R., Amat, P., & Navarro, D. (2014). Monitoring of trough plasma ganciclovir levels and peripheral blood cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8+ T cells to predict CMV DNAemia clearance in preemptively treated allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5602-5605.
- III. Giménez, E., Solano, C., Amat, P., de la Cámara, R., Nieto, J., López, García-Noblejas, A., & Navarro, D. (2015). Enumeration of NKG2C+ natural killer cells early following allogeneic stem cell transplant recipients does not allow prediction of the occurrence of cytomegalovirus DNAemia. *Journal of medical virology*, 87(9), 1601-7.
- IV. Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., la Cámara, R., Nieto, J., ... & Navarro, D. (2015). Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8+ T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease*, 17(3), 361-70.
- V. Giménez, E., Blanco-Lobo, P., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., Pérez-Romero, P., & Navarro, D. (2015). The role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting. *Journal of General Virology*, 96(9), 2822-31.

- VI. Monleón, D., Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Morales, J. M., Solano, C., Amat, P., & Navarro, D. (2015). Plasma metabolomics profiling for the prediction of cytomegalovirus DNAemia and analysis of virus–host interaction in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of General Virology*, 96(11), 3373-3381.

Los artículos que componen esta tesis doctoral forman parte del proyecto FIS financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III de Madrid PS 12/01992, titulado “Marcadores inmunológicos y genotípicos de protección frente a la infección por citomegalovirus en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos”.

A mis padres y a mi hermana

A Miguel

Agradecimientos

La escritura de los agradecimientos de una tesis doctoral supone el fin de toda una etapa. Y el renacer de la siguiente.

Terminan 4 años de experiencia como residente en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Valencia, años llenos de personas únicas, de momentos y experiencias de todos los colores. Empieza una nueva etapa, llena de esperanza y expectativas.

En primer lugar, quería dar las gracias a todas las personas que he conocido en el Servicio de Microbiología. De todas ellas he aprendido algo valioso y me han ayudado a crecer como persona y como profesional. De cada uno de ellos me llevo algo bonito; de todos los adjuntos, enfermeras, técnicos, residentes y personal del hospital. Sin embargo, quería hacer especial mención a los enfermeros del turno rodado, con quienes he pasado multitud de noches hablando y compartiendo experiencias y sentimientos, y sobre todo, a mis compañeros y amigos Bea, Elisa, Dayana, Maria Ángeles, Sandrine y Víctor, que han sido mi gran apoyo durante estos años. No puedo olvidarme tampoco de mis amigos farmacéuticos, siempre ahí, a mi lado. Marta, Pilar, Ana, Cris, Rafa y Bruno...gracias.

Pero sobre todo quería darle las gracias a mi director, David Navarro, quien desde el primer día ha guiado mis pasos. No solo me ha ayudado, enseñado e inspirado durante estos años. Ha sido y es ejemplo a seguir y pilar fundamental. Todo lo que he aprendido es gracias a él.

Esta tesis se la dedico a mis padres y a mi hermana Paula. Todo lo que soy es gracias a ellos. Son lo más importante de mi vida y tengo la enorme suerte de tenerlos. Y a Miguel, gracias por aparecer, por ser, por querer así. Esta tesis también es tuya.

Abreviaturas y Acrónimos

- Ac: Anticuerpo
- ACNIE: Anticuerpos capaces de neutralizar la infección en células epiteliales
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
- ATG: Globulina antitimocítica
- ARN: ácido ribonucleico.
- AUC: Área bajo la curva
- CD: Cúmulo de diferenciación
- Cmax: Concentración máxima
- Cmin: Concentración mínima
- CMV: Citomegalovirus
- D: Donante
- DNAemia: Presencia de ADN en sangre
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- EICH: Enfermedad de injerto contra huésped.
- gB: Glucoproteína gB.
- GCV: Ganciclovir
- HHV-6: Herpesvirus humano tipo 6.
- HLA: *Human leukocyte antigen*, Antígeno leucocitario humano
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HRP: Peroxidasa de rábano
- ICS: *Intracellular cytokine staining*, Tinción de Citoquinas Intracelulares
- IE-1: Proteína precoz 1 de CMV
- IgG: Inmunoglobulina de tipo G
- IFN- γ : Interferón gamma
- Kpb: kilo pares de bases
- LPS: Lipopolisacárido
- MMF: Micofenolato mofetilo
- MTX: Metotretaxo
- NF- κ B: *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*
- NK: *Natural Killer*, Células Natural Killer
- PBS: Tampón fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

- PLS-DA: Análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales
- pp65: Fosfoproteína 65 de CMV
- R: Receptor
- RMN-H¹: Resonancia magnética nuclear de protón
- ROC: Curva Característica Operativa del Receptor
- Rpm: revoluciones por minuto
- Td: tiempo de duplicación
- TMAO: Trimetilamina N-óxido
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.
- TOS: Trasplante de órgano sólido.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
- VPN: Valor Predictivo Negativo
- VPP: Valor Predictivo Positivo

ÍNDICE



Presentación.....	X
Agradecimientos.....	XI
Abreviaturas y acrónimos.....	XII
Índice.....	XIII
I. Introducción.....	2
I.1 Estructura y replicación del Citomegalovirus humano	
I.2 Transmisión, latencia y patogenicidad	
I.3 CMV en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.	
I.4 Control inmunológico de la infección por CMV.	
I.5 Prevención de la enfermedad orgánica por CMV	
I.6 Monitorización virológica en pacientes Alo-TPH	
I.7 Monitorización inmunológica en el manejo de la infección activa por CMV	
I.8 Tratamiento antiviral.	
II. Objetivos.....	16
II.1 Investigación de nuevos parámetros para determinar cuándo debe iniciarse el tratamiento antiviral y para monitorizar la respuesta al tratamiento.	
II.2 Identificación de marcadores inmunológicos de protección frente a la infección activa sistémica por CMV: Determinación precoz de células NK (NKG2C+) y naturaleza funcional de las células T CD8+.	
II. 3 Identificación de marcadores biológicos de riesgo de desarrollo de infección activa sistémica por CMV	
III. Metodología.....	24
III.1 Manejo terapéutico de la infección sistémica por CMV	
III.1.1 Monitorización Virológica	

III.2 Cálculo del tiempo de duplicación viral	
III.3 Monitorización de la respuesta inmune frente al CMV	
III.3.1 Detección y cuantificación de linfocitos totales T CD8+ específicos frente al CMV productores de IFN- γ	
III.3.2 Determinación de la funcionalidad de Linfocitos T CD8+	
III.3.3 Detección de células NK portadoras del receptor de activación CD94/NKG2C+	
III.4 Monitorización de niveles plasmáticos de (Val)-Ganciclovir mediante HPLC	
III.5 Cuantificación de Anticuerpos específicos frente a CMV	
III.5.1 Determinación de Anticuerpos capaces de neutralizar la infección en células epiteliales (ACNIE)	
III.5.2 Determinación de IgG específicas frente a CMV mediante CLIA	
III.6 Análisis Metabólico en plasma mediante H ¹ -RMN	
III.7 Análisis estadístico	
IV. Resultados y Discusión.....	42
V. Conclusiones.....	88
VI. Bibliografía.....	92
VII. Anexos.....	102
VII.1 Informe del director de la tesis doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la tesis doctoral.	
VII.2 Escrito del director de la tesis doctoral sobre el factor de impacto de las publicaciones que se recogen en la tesis doctoral.	
VIII. Artículos.....	108



I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Estructura y replicación del Citomegalovirus (CMV) humano

El Citomegalovirus humano (CMV), también denominado Herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5), es un β -Herpesvirus de la familia *Herpesviridae*. Y subfamilia *Betaherpesvirinae* (Tabla I.1)

Tabla I.1 Herpesvirus humanos

Subfamilia	Género	Nombre	Otra designación
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvirus humano 1	Herpes simple 1
		Herpesvirus humano 2	Herpes simple 2
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	Herpesvirus humano 3	Varicela-Zóster
	<i>Citomegalovirus</i>	Herpesvirus humano 5	Citomegalovirus
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvirus humano 6	HHV-6
		Herpesvirus humano 7	HHV-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Linfocriptovirus</i>	Herpesvirus humano 4	Virus de Epstein-Barr
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvirus humano 8	HHV-8

CMV es el betaherpesvirus genética y estructuralmente más complejo. Contiene un genoma de 230 kpb, que incluye 225 marcos de lectura abiertas (ORFs), dando lugar a 160 proteínas. El virión maduro (200-300 nm) presenta un ADN lineal de doble cadena dispuesto en una nucleocápside de estructura icosaédrica. La cápside se encuentra recubierta por una matriz proteica, el tegumento. Envolviendo el tegumento, se encuentra una bicapa lipídica conteniendo gran cantidad de glicoproteínas virales. (Figura I.1). Dichas glicoproteínas constituyen las dianas principales de la respuesta inmune (Fishman, 2013).

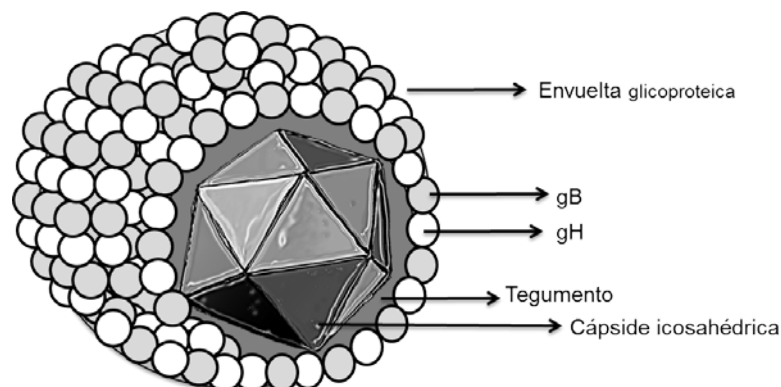


Figura I.1 Estructura del Citomegalovirus humano.



El genoma de CMV consiste en dos secuencias únicas larga y corta (UL y US, respectivamente), que se encuentran flanqueadas por secuencias repetitivas invertidas (TRL, IRL, TRS e IRS).

La cápside viral se encuentra bien caracterizada y es muy similar a la cápside de los alfa-herpesvirus y gamma-herpesvirus. Tiene una estructura icosaédrica, y está compuesta de 12 pentones, 150 hexones y 320 triplete.

El tegumento (Figura I.2) se encuentra dispuesto entre la envuelta y la cápside, y su estructura es amorfa. La mayoría de proteínas de los viriones infecciosos se encuentran en el tegumento, y habitualmente están fosforiladas (prefijo pp de fosfoproteína). La proteína más abundante, codificada por el gen UL83 es la fosfoproteína 65 (pp65).

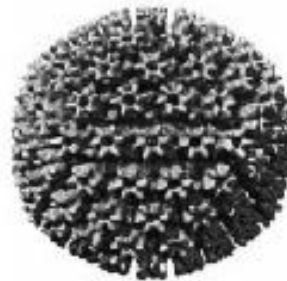


Figura I.2. Matriz proteica (tegumento) rodeando a la cápside de CMV. (imagen obtenida de rekombiotech.com)

Las proteínas presentes en el tegumento (pp150, pp71, pp28, entre otras) desempeñan un papel importante en el inicio de la infección, la modulación del metabolismo celular, la regulación de la expresión génica y en la coordinación de la maduración y formación de los viriones. Además, el tegumento contiene pequeñas cantidades de ARN viral y celular (Kalejta, 2008).

La bicapa lipídica que rodea el tegumento deriva del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi del huésped. Contiene aproximadamente 20 glicoproteínas virales involucradas en la penetración celular durante la infección (Ej: gB, gH, gL, gO, entre otras). La interacción de las glicoproteínas de la envuelta con la membrana celular da lugar a la fusión y liberación de la cápside y de las proteínas del tegumento. Posteriormente, la replicación de los ácidos nucleicos y el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo de las células del huésped, mientras que el virión se procesa en el citoplasma (Fishman, 2013).

La infección productiva resulta en la síntesis coordinada de proteínas en tres fases solapadas: Las proteínas α o IE, “*immediate early*”, sintetizadas entre 0 y 2h tras la infección, las β o “*delayed-early*” sintetizadas durante las primeras 24 h y las γ o “*late*”, producidas tras las 24h.

La expresión de genes IE o inmediatos inicia la replicación lítica. La proteína pp71, también denominada transactivador, facilita la replicación viral por múltiples mecanismos; uno de ellos consiste en la activación de la expresión de genes IE para el inicio de la infección lítica. Las proteínas IE modulan el ambiente celular y estimulan la expresión de genes precoces o “*Early*”. Las proteínas “*Early*” realizan la replicación del genoma viral. Posteriormente, se expresan los genes tardíos o “*Late*”, dando lugar a las proteínas que constituyen los componentes estructurales del virión. La formación de la cubierta se produce durante el paso por las vesículas del aparato de Golgi. Por último, la fusión de las vesículas con la membrana produce la liberación de los viriones. (Kalejta, 2008).

En ciertos tipos celulares los genes IE se silencian, resultando en la generación de una infección latente y en la minimización de la expresión viral. Las infecciones latentes bajo ciertas circunstancias pueden reactivarse y dar lugar a infecciones líticas productivas.

I.2 Transmisión, latencia y patogenicidad.

La transmisión de Citomegalovirus se produce por múltiples vías: a través de la lactancia materna, ciertos fluidos como la saliva, el contacto sexual, la transferencia placentaria, la transfusión sanguínea o por medio del trasplante. La infección por CMV tiene una seroprevalencia entre el 30-90%, y varía con el nivel socioeconómico de la población y con la edad (Crough, T., & Khanna, R., 2009)

La infección primaria en un individuo inmunocompetente es habitualmente asintomática, tras la cual CMV establece una infección latente de por vida, pudiendo dar lugar a reactivaciones periódicas. La existencia de reactivaciones es un fenómeno que se produce con más frecuencia en individuos inmunodeprimidos, sobre todo en aquellos con disminución en la funcionalidad de la respuesta inmune celular.

Durante la infección latente el virus se encuentra en la célula como una molécula de ADN circular (episoma). Sin embargo, los mecanismos por los que se realiza el mantenimiento de la latencia no son del todo conocidos. CMV es capaz de mantenerse en estado de latencia en células de la línea mieloide; de hecho, el genoma viral puede detectarse en monocitos, células precursoras CD34+, células dendríticas inmaduras y en



células endoteliales. No obstante, la presencia de genoma viral puede no ser resultado de replicación activa, ya que la represión transcripcional del promotor IE es capaz de prevenir la producción de nuevos viriones. En este contexto, la permisividad para la replicación viral depende del grado de diferenciación celular. Las células no diferenciadas no son permisivas a la replicación viral, lo que puede desempeñar un rol importante en la diseminación del virus. (Crough, T., & Khanna, R., 2009)

La reactivación del estado de latencia es un proceso clave en la patogénesis. Puede darse en estados de inmunosupresión, inflamación, infección o estrés. A pesar de que el mecanismo preciso no se encuentra bien dilucidado, TNF- α se considera un mediador clave en el proceso a través de la activación de la transcripción de genes IE por medio del factor NF- κ B. La reactivación viral también es promovida en estados inflamatorios vía AMPc.

La infección por CMV raramente causa complicaciones en individuos inmunocompetentes. La infección primaria es asintomática o puede producir un síndrome mononucleósico clínicamente parecido al producido por el virus Epstein Barr: presencia de fiebre, mialgia, linfadenopatía y hepatomegalia. Sin embargo, en el caso de fetos, neonatos e individuos inmunodeprimidos puede causar infecciones muy graves.

La infección congénita y neonatal tiene una elevada morbimortalidad. El riesgo de infección primaria en mujeres seronegativas es mayor durante el primer trimestre. No obstante, el riesgo de infección congénita en el caso de una reactivación viral es menor debido al papel protector de los Ac en la transmisión intrauterina (Crough, T., & Khanna, R., 2009).

La infección congénita y neonatal por CMV tiene una mortalidad cercana al 30% y es causa de retraso del crecimiento intrauterino, hepatitis, hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, petequias, neumonitis y de daños tanto del Sistema nervioso central como visuales y sensoriales.

En individuos VIH positivos, con una pérdida significativa de la funcionalidad del sistema inmune, CMV es capaz de causar una infección oportunista. Antes de la introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) aproximadamente un 40% de los individuos VIH positivos desarrollaban enfermedad orgánica por CMV. La manifestación más frecuente en este grupo de población continúa siendo la retinitis (necrosis hemorrágica retiniana), aunque otras manifestaciones de la enfermedad incluyen la enterocolitis, gastritis, esofagitis, hepatitis y la encefalitis. Tras la instauración

del tratamiento TARGA, se produjo una disminución notable en los casos de enfermedad por CMV. A pesar de ello, actualmente se cree que CMV podría directa o indirectamente acelerar la progresión de la enfermedad (Crough, T., & Khanna, R., 2009).

En el paciente trasplantado de órgano sólido (TOS) CMV continúa siendo una infección significativa, con una mortalidad y morbilidad asociadas elevada. Más de un 50% de los pacientes desarrollan una infección por CMV, de los que un 10-15% desarrollan enfermedad sintomática dependiendo del estatus serológico de donante y receptor. Los individuos CMV-seropositivos que reciben un trasplante de un donante CMV-seronegativos son los de mayor riesgo a la hora de desarrollar una infección por CMV. Otros factores de riesgo a destacar son el tipo de órgano trasplantado, la terapia con agentes anti-timocito y la coinfección con otros virus tales como HHV-6.

CMV en el TOS es causa tanto de síndrome por CMV (fiebre, leucopenia, artralgia, rash), como de enfermedad tisular invasiva. Las manifestaciones de la enfermedad tisular incluyen la hepatitis, neumonitis, enterocolitis, encefalitis, cistitis y la miocarditis, entre otras. La infección por CMV también se ha relacionado con una mayor incidencia de efectos indirectos, es decir, con un mayor rechazo del injerto y con determinados síndromes clínicos como son, por ejemplo, la estenosis renal arterial en el trasplante renal, la estenosis arterial coronaria en el trasplante cardíaco o la bronquiolitis obliterante en el caso del trasplante pulmonar. A pesar de ello, el efecto causal de CMV no ha sido demostrado.

I.3 CMV en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

Los pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (Alo-TPH) presentan un riesgo aumentado de infección por CMV debido al periodo prolongado de inmunosupresión. En este grupo de pacientes CMV continúa siendo una causa significativa de morbimortalidad.

La infección por reactivación del estado de latencia es un fenómeno mucho más frecuente que la infección primaria en individuos CMV-seropositivos. De hecho, entre un 45 y un 80% de los pacientes presentan uno o más episodios de reactivación viral durante los primeros 100 días tras el trasplante, dependiendo del estado de inmunosupresión. En ausencia de tratamiento antiviral, un 30% de los episodios pueden progresar a enfermedad invasiva tisular.

Los factores de riesgo asociados con la infección o enfermedad por CMV son los siguientes: la edad, la fuente de las células progenitoras, el grado de concordancia entre



el HLA de donante y receptor, el uso de inmunoglobulinas anti-timocíticas, el régimen de acondicionamiento, el tipo de profilaxis de EICH y el uso de altas dosis de corticosteroides.(Ljungman, 2008)

El estatus serológico del donante y del receptor también desempeña un papel importante en el riesgo de desarrollo de infección por CMV. En pacientes CMV-seropositivos y donantes CMV-seronegativos (D-/R+) se observa una reconstitución tardía de células T específicas, lo que se asocia con una mayor duración del tratamiento y una mayor incidencia de infecciones recurrentes.

En el caso de pacientes CMV-seronegativos y donantes seropositivos (D+/R-), la infección primaria se produce en un 30% de los pacientes. En ausencia de tratamiento adecuado, puede progresar a enfermedad tisular invasiva. Por el contrario, en pacientes y donantes CMV-seronegativos (D-/R-) existe muy bajo riesgo de infección por CMV.

La enfermedad orgánica por CMV incluye la neumonía intersticial, la enfermedad gastrointestinal, la hepatitis, la retinitis y la encefalitis, aunque las manifestaciones clínicas más comunes son la neumonitis y la enterocolitis.

El diagnóstico de enfermedad orgánica por CMV se realiza en presencia de síntomas y signos clínicos compatibles y mediante la detección de CMV en muestras clínicas apropiadas a través del cultivo directo, de técnicas inmunohistoquímicas, del análisis histopatológico o mediante hibridación in situ (Ljungman, Griffiths, & Paya, 2002). La realización de técnicas de PCR tiene un valor predictivo positivo bajo excepto en el diagnóstico de retinitis y enfermedad del sistema nervioso central. Cabe destacar que la detección de CMV en sangre no permite realizar un diagnóstico definitivo. Además, la presencia de cargas de CMV en muestras respiratorias puede ocurrir en ausencia de enfermedad orgánica. Aunque los niveles de carga viral se han correlacionado con la presencia de neumonitis en el trasplante pulmonar, no se ha podido establecer un punto de corte óptimo (Gerna et al., 2009).

La enfermedad orgánica puede producirse de forma temprana (durante los primeros 100 días tras el trasplante) o de forma tardía (a partir de los 100 días tras el trasplante), pero tiene un mal pronóstico a pesar del inicio precoz de tratamiento antiviral (Ljungman, 2008). La introducción de terapia antiviral (profilaxis universal o tratamiento anticipado) produce una disminución de la incidencia de enfermedad orgánica precoz y un aumento de supervivencia en pacientes de alto riesgo. Sin embargo, el tratamiento es capaz de producir una notable mielotoxicidad en el paciente e inclusive, disminuye o retrasa la

reconstitución hematológica, lo cual aumenta el riesgo de infecciones oportunistas. Además, se puede ver incrementado el riesgo de enfermedad orgánica tardía al producirse una falta de reconstitución de células T. El desarrollo de enfermedad orgánica tardía constituye una complicación importante que compromete notablemente la supervivencia a largo plazo del paciente.

Los factores de riesgo asociados con la enfermedad orgánica tardía incluyen la infección por CMV durante los primeros tres meses tras el trasplante, el uso de agentes que deplecionan las células T, y la falta de respuesta T detectable tras los primeros tres meses tras el trasplante. (Boeckh et al., 2003)

A pesar de que los efectos directos debidos a la replicación viral se encuentran minimizados por las estrategias actuales de tratamiento, las propiedades inmunomoduladoras de CMV se han relacionado con mayor riesgo de EICH y de superinfección bacteriana y fúngica. (Nichols et al., 2002).

I.4 Control inmunológico de la infección por CMV.

Las células NK constituyen una parte integral de la inmunidad innata. Pueden estar involucradas en el aclaramiento de la infección por CMV, aunque se conoce poco acerca del rol específico que desempeñan las células NK.

En cuanto a la respuesta humoral, la contribución de los Ac en la protección frente a la infección por CMV es debatida. No obstante, existen evidencias que apoyan el rol de la inmunidad humoral principalmente en la restricción de la diseminación viral y en la limitación de la severidad de la infección. La principal diana de los Ac es la glicoproteína gB, fundamental en el anclaje y en la penetración celular. De hecho, las mujeres que presentan inmunidad previa frente a CMV transmiten la infección al feto con mucha menos frecuencia que aquellas mujeres que desarrollan una infección primaria.

La respuesta inmune celular es el mecanismo predominante en el control de la infección por CMV. La enfermedad orgánica ocurre fundamentalmente en pacientes con profunda inmunodeficiencia celular. En efecto, la expansión de la respuesta T CD8+ citotóxica tras el trasplante se ha correlacionado con protección frente a la infección y la enfermedad por CMV (Einsele et al., 2002). Los antígenos más inmunodominantes a los cuales responden los Infocitos T CD8+ son IE-1, IE-2 y pp65. Por otra parte, los linfocitos T CD4+ también son fundamentales en el control de la infección por CMV. La reconstitución de linfocitos T CD4+ es necesaria para la reconstitución y expansión de linfocitos T CD8+ citotóxicos y para la persistencia de células T (Einsele et al., 2002). Sin



embargo, el efecto de los linfocitos CD4+ no es únicamente indirecto (mediante el mantenimiento de respuestas humorales y celulares), sino también directo a través de los linfocitos T CD4+ citotóxicos específicos frente a gB.

I.5 Prevención de la enfermedad orgánica por CMV

Actualmente existen dos estrategias principales a la hora de prevenir la aparición de enfermedad orgánica: La profilaxis universal y el tratamiento anticipado. La profilaxis universal consiste en el tratamiento de todos los pacientes tras el trasplante durante un período determinado, habitualmente durante los primeros 100 días tras el trasplante. Por el contrario, el tratamiento anticipado consiste en instaurar el tratamiento antiviral cuando la carga viral supera un umbral determinado en el compartimento sistémico.

Ambas estrategias han demostrado ser efectivas, ya que actualmente la incidencia de enfermedad orgánica por CMV es inferior al 8%. Sin embargo, el tratamiento anticipado es la estrategia de elección en la prevención de la enfermedad orgánica por CMV incluso en pacientes de alto riesgo.

Ambas estrategias presentan ciertos inconvenientes. En primer lugar, la profilaxis universal presenta mayor mielotoxicidad y en consecuencia, mayor incidencia de infecciones bacterianas y fúngicas. Además, debido a la mayor duración del tratamiento, puede incrementarse la probabilidad de resistencia antiviral y, por otro lado, la reconstitución de células T puede verse impedida, lo que puede resultar en la aparición de enfermedad orgánica tardía (Casquero et al., 2012; Meijer et al., 2003;). Respecto al tratamiento anticipado, requiere una monitorización virológica frecuente a pesar de que la frecuencia óptima no ha sido establecida. Durante los primeros 100 días lo más habitual es que se realice una vez por semana, o dos durante un episodio de infección activa, y posteriormente en cada visita del paciente, a menos que presente EICH aguda.

El principal inconveniente del tratamiento anticipado es la falta de consenso acerca del criterio adecuado para el inicio del tratamiento en base a la PCR cuantitativa. Los puntos de corte habitualmente varían entre 1000 y 10000 copias/mL en sangre total, y entre 500 y 10000 copias/mL en plasma. (Avestisyan et al., 2006; Boeck & Ljungman, 2009; Gerna et al., 2008; Gimeno et al., 2008; Kalpoe, 2004). Dichos puntos de corte han sido estimados mediante análisis por curva ROC y mediante la comparación con valores de antigenemia pp65, teniendo en consideración la magnitud de las cargas virales en los casos de enfermedad por CMV y en los episodios que se resolvieron espontáneamente. A pesar de que dichos puntos de corte son clínicamente seguros no se encuentran validados, por lo que existe una falta de estandarización al respecto.

I.6 Monitorización virológica en pacientes Alo-TPH

La identificación de CMV en sangre es capaz de identificar los pacientes en riesgo de desarrollo de enfermedad orgánica, ya que la presencia de CMV en el compartimento sistémico usualmente precede el inicio de los síntomas de enfermedad. Por ello, la monitorización en sangre (o plasma) y no en otros fluidos corporales resulta útil en la vigilancia y el manejo de los pacientes trasplantados. La monitorización virológica también tiene utilidad en la demostración de la efectividad del tratamiento antiviral.

Se ha observado que tanto la primera carga viral plasmática como el incremento de la carga viral son factores importantes en el desarrollo de la enfermedad orgánica. A pesar de que los picos de carga viral de los episodios de viremia por CMV son mucho más altos en los casos de enfermedad orgánica, el pico de carga viral por sí solo no tiene efecto sobre el riesgo de desarrollo de enfermedad.(Ljungman et al., 2006)

Actualmente existen dos métodos para la monitorización virológica: La antigenemia pp65 y la PCR cuantitativa.

La antigenemia pp65 detecta mediante inmunofluorescencia la fosfoproteína de matriz pp65 en 200.000 leucocitos polimorfonucleares periféricos fijados en un portaobjetos de vidrio (Gerna et al., 1998) . Proporciona una medida semicuantitativa de la carga viral y el procedimiento requiere menos tiempo que el cultivo y el Shell vial. A pesar de ello, presenta ciertos inconvenientes. En primer lugar, resulta difícil su aplicación en pacientes neutropénicos (Michael Boeckh & Guy Boivin, 1998), y las muestras deben ser inmediatamente procesadas. Por otra parte, el procedimiento es laborioso, no se encuentra automatizado, y los resultados son subjetivos. Además, la correlación entre la antigenemia y la carga viral no es siempre óptima, particularmente tras el inicio del tratamiento (Gimeno et al., 2008). Por último, tiene un bajo valor predictivo positivo de enfermedad gastrointestinal.(Jang et al., 2009)

La PCR cuantitativa a tiempo real es más sensible, específica, exacta y reproducible que el método de antigenemia pp65 (Espy, 2006). Es capaz de detectar más precozmente CMV y tarda más en negativizarse (Gimeno et al., 2008), por lo que resulta un marcador más preciso de control de la infección. Además, es una técnica más simple, automatizada y robusta. Sin embargo, los valores de carga viral obtenidos en centros diferentes no son comparables debido a los distintos métodos de extracción y distintas técnicas de PCR, lo que supone una limitación importante.



La magnitud de la carga viral obtenida en sangre total y en leucocitos periféricos es mayor que la obtenida en plasma, aunque según algunos autores la carga viral en plasma refleja mejor el grado de replicación viral (Kalpoe, 2004). No obstante, los niveles de carga viral en sangre total y en plasma presentan una buena correlación (Caliendo et al., 2007; Kalpoe, 2004; Leruez-Ville et al., 2003), por lo que ambas muestras son válidas a la hora de realizar la monitorización virológica.

I.7 Monitorización inmunológica en el manejo de la infección activa por CMV

La incidencia de episodios recurrentes de replicación viral es relativamente alta (30-40%).

En este contexto, la monitorización inmunológica puede proporcionar información útil para realizar la optimación de las estrategias terapéuticas actuales. La combinación de la monitorización inmunológica y la virológica podría identificar los pacientes en riesgo de desarrollo de infecciones recurrentes y de enfermedad orgánica. Y por tanto, la monitorización conjunta potencialmente puede resultar en una estrategia de tratamiento más individualizada. Existen diversos algoritmos propuestos de estrategia de tratamiento basada en la monitorización conjunta para la mejora de la infección por CMV, aunque se requieren estudios para determinar su utilidad clínica.

El control de la infección de CMV incluye mecanismos inmunitarios diversos que actúan coordinadamente. Sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ desempeñan un papel crucial en el control de la infección y en la prevención de la enfermedad orgánica (Reusser, Riddell, Meyers, & Greenberg, 1991). Específicamente, las respuestas frente a pp65 e IE-1 son inmunodominantes en muchos individuos y son capaces de proporcionar protección.

Los ensayos que permiten la cuantificación de las células T incluyen la cuantificación mediante citometría de flujo de linfocitos T CD8+ capaces de unirse a tetrámeros y pentámeros, la detección mediante citometría de flujo de citoquinas intracelulares producidas por linfocitos tras la estimulación antigénica, el ensayo ELISPOT y el ensayo comercializado QuantiFeron® (Crough, T., & Khanna, R, 2009).

A pesar de que la monitorización inmunológica podría tener utilidad en el manejo de la infección por CMV en el contexto del Alo-TPH, actualmente no tiene un impacto en el manejo terapéutico. Esto puede deberse a varias razones. En primer lugar, debido a la ausencia de estandarización de las metodologías para determinar los linfocitos T. Determinadas variables críticas como son la naturaleza del antígeno (péptidos

individuales o mezcla, lisados de células infectadas, proteínas recombinantes) y el método de análisis (funcional o no funcional), impiden la comparación directa entre resultados obtenidos por metodologías diferentes. Además, existe una falta de consenso acerca del marcador adecuado de protección, y también una falta de validación clínica de los puntos de corte de las poblaciones de células T en la protección frente a CMV (Aubert et al., 2001; Lilleri et al., 2008; Ohnishi, Sakurai, & Heike, 2005; Solano et al., 2008).

I.8 Tratamiento antiviral

El tratamiento de primera línea en el tratamiento de la infección y la enfermedad orgánica por CMV es el Ganciclovir (GCV) y su L-valil éster Valganciclovir, (val)-GCV. El GCV es un análogo del nucleósido 2' desoxiguanosina, y actúa inhibiendo de forma competitiva la ADN polimerasa viral durante la replicación vírica. Entre los efectos adversos que presenta, destacan la anemia, la neutropenia y la trombocitopenia.

EL foscarnet (ácido fosfonofórmico) es un análogo del ión pirofosfato, y actúa inhibiendo la ADN polimerasa viral. Se utiliza fundamentalmente en el caso de neutropenia severa y resistencia a GCV, aunque sus efectos adversos (daño renal principalmente) limitan su uso. Otros fármacos como Cidofovir, Maribavir, Artesunato o Leflunomida han demostrado actividad *in vitro* frente a CMV, aunque no existe experiencia clínica en su uso (Boeckh & Ljungman, 2009; Gilbert & Boivin, 2005). Actualmente se están evaluando fármacos dirigidos contra diversas dianas virales, como la proteína quinasa UL97 y proteínas involucradas en la maduración del ADN y en la replicación viral.(De Clercq, 2003)

La emergencia de resistencias en el contexto del Alo-TPH es un fenómeno infrecuente. Sin embargo, puede darse durante cursos largos o repetidos de tratamiento en pacientes con un elevado grado de inmunosupresión. Un indicio claro de resistencia al tratamiento consiste en el incremento de la carga viral a las 2-3 semanas del inicio del tratamiento en pacientes con tratamiento previo.

La resistencia al GCV puede deberse a mutaciones en el gen UL97 que codifica la fosfotransferasa (fosforila GCV a su entrada en la célula), o a mutaciones en el gen UL54 que codifica la ADN polimerasa. Las mutaciones en el gen UL54 confieren resistencia tanto a GCV como a Foscarnet y Cidofovir, mientras que las mutaciones en el gen UL97 únicamente afectan a GCV.

La transferencia adoptiva de células T de donantes CMV-seropositivos constituye una alternativa terapéutica en pacientes que no responden a la terapia. Los linfocitos T



pueden expandirse *ex vivo* previamente a la infusión o pueden ser seleccionados *ex vivo* mediante complejos multiméricos HLA-péptidos, y posteriormente ser transferidos para la expansión *in vivo*. Se ha demostrado clínicamente seguro y efectivo en la prevención y resolución de la infección por CMV, aunque la eficacia de esta terapia requiere validación técnica. (Einsele et al., 2002; Einsele, Kapp, & Grigoleit, 2008).



II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La infección por CMV continúa siendo una causa frecuente de morbimortalidad en el paciente receptor de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (Alo-TPH). Los efectos directos asociados a la replicación viral se encuentran minimizados por las estrategias de tratamiento actuales: la profilaxis universal y el tratamiento anticipado. Pese a que actualmente la incidencia de enfermedad orgánica por CMV es menor al 8%, existe un problema de sobretreatmento relacionado con ambas estrategias; en efecto, se calcula que aproximadamente entre el 30 y el 60% de los pacientes reciben tratamiento antiviral de forma innecesaria. Por lo tanto, el tratamiento actual es claramente optimizable. Los objetivos generales de esta tesis consisten en la investigación de parámetros virales, farmacológicos e inmunológicos que permitan inferir el grado de protección frente a la infección por CMV y el grado de respuesta al tratamiento antiviral. Y, además, en la investigación de nuevos parámetros biológicos que permitan identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de infección activa y enfermedad por CMV. Se persigue el optimizar y diseñar estrategias de tratamiento antiviral más individualizadas.

Esta tesis doctoral incluye tres objetivos principales:

I. Investigación de nuevos parámetros para determinar cuándo debe iniciarse el tratamiento anticipado y para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Existen dos estrategias principales a la hora de prevenir el desarrollo de la enfermedad orgánica por CMV: la profilaxis universal y el tratamiento anticipado. En el primer caso, se realiza la administración de ganciclovir (o su profármaco valganciclovir) a todos los pacientes tras el trasplante, durante un periodo de tiempo determinado. En el segundo caso, se inicia el tratamiento antiviral en el momento en el que la carga viral, determinada en sangre total o en plasma, supera un determinado umbral. Ambas estrategias han demostrado ser válidas a la hora de prevenir la aparición precoz de la enfermedad orgánica. No obstante, ambas estrategias presentan ciertos inconvenientes. En el caso del tratamiento anticipado, uno de los fundamentales, es que no existe un punto de corte bien definido y consensuado para realizar el inicio del tratamiento antiviral, por lo que existe una amplia variabilidad en los distintos centros donde se emplea dicha estrategia. La monitorización virológica, realizada mediante el ensayo de antígenemis pp65, o mediante el uso de técnicas de PCR, permite el seguimiento del paciente para detectar el inicio de la replicación viral e instaurar el tratamiento antiviral cuando proceda.



La PCR ha reemplazado el ensayo de antigenemia al ser considerablemente más sensible. En la mayoría de los casos, la primera y la segunda carga viral determinadas son de baja magnitud, y se encuentran muy por debajo del punto de corte de inicio del tratamiento anticipado. El objetivo del Artículo I consiste en investigar si la determinación de la cinética de replicación viral en el inicio del episodio permite inferir la necesidad de tratamiento antiviral.

Por otro lado, el tratamiento anticipado de las infecciones por CMV se realiza habitualmente mediante el uso de Ganciclovir (GCV) intravenoso a dosis de 5mg/kg/24h, o mediante su profármaco oral (Val)-Ganciclovir, a dosis de 900mg/12h. La monitorización de niveles de GCV como marcador de actividad terapéutica no se realiza rutinariamente, ya que no se encuentra establecido un rango de concentraciones eficaces en plasma. Además, la forma activa del ganciclovir es la forma trifosfato que se encuentra en el interior celular, por lo que la concentración en plasma es un marcador surrogado de eficacia.

Mientras que la monitorización de los niveles valle de GCV ha mostrado ser útil en la predicción de la eficacia terapéutica durante el tratamiento de retinitis por CMV en pacientes VIH positivos, existen datos contradictorios en el marco del trasplante alogénico y en el del órgano sólido.

El objetivo del artículo II consistió en la monitorización de niveles plasmáticos de GCV y de linfocitos T CD8+ CMV específicos funcionales con el propósito de investigar su participación en el aclaramiento de la infección por CMV.

II. Identificación de marcadores inmunológicos de protección frente a la infección activa sistémica por CMV: Determinación precoz de células NK (NKG2C+), naturaleza polifuncional de las células T CD8+ y cuantificación de anticuerpos que neutralizan la infección de células epiteliales (ACNIE).

La reconstitución de la inmunidad T funcional CMV-específica es esencial en el control de la infección activa sistémica y de la enfermedad orgánica por CMV tras el trasplante alogénico de precursores alogénicos. (Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010). Estudios recientes sugieren que la expansión de células NK (portadoras del receptor tipo lectina C NKG2C+) se encuentra asociada con el control de la infección por CMV (Barron et al., 2009). De hecho, en trabajos previos del grupo la expansión de las células NK

NKG2C+ se producía concomitantemente con el aclaramiento de la viremia, y con la expansión de células T CD8+ (Muñoz-Cobo et al., 2012). Las células NK CD94/NKG2C+ pueden tener un papel esencial en la protección frente a la viremia principalmente en los estadios tempranos tras el trasplante, ya que la reconstitución de las células NK se produce antes que la reconstitución de los linfocitos T CD8+ y, además, su funcionalidad no se encuentra afectada por los regímenes inmunosupresores dirigidas contra células T.

No obstante, su papel en la prevención frente a la viremia durante las primeras fases tras el trasplante no ha sido totalmente esclarecido. En trabajos previos del grupo la expansión temprana de células NK NKG2C+ en pacientes sin inmunidad T funcional (IFN- γ) no era capaz de discernir entre aquellos pacientes que posteriormente desarrollaban o no viremia. (Muñoz-Cobo et al., 2014).

El objetivo principal del artículo III consistió en investigar el papel de la monitorización temprana de las subpoblaciones de células NK (NKG2C+) como marcador inmunitario de riesgo o de protección frente al desarrollo de viremia, particularmente en pacientes con reconstitución temprana de la inmunidad T CMV-específica.

Por otro lado, la determinación de los linfocitos totales T CD8+ productoras de IFN- γ permite discriminar entre pacientes protegidos o no frente al desarrollo de viremia con un elevado VPP, pero con un modesto VPN (Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010). No obstante, datos preliminares (Lacey et al., 2006) sugieren que las células T CD8+ polifuncionales (productoras de varias citoquinas tales como TNF- α , IL-2, MIP-1 β , etcétera) podrían ser más efectivas que las células T monofuncionales (productoras de una sola citoquina) en la protección frente a la viremia y enfermedad por CMV.

El objetivo principal del artículo IV consistió en determinar la naturaleza polifuncional de las células T CD8+ asociadas con la protección y el control frente a la viremia por CMV.

La protección y el aclaramiento de la infección activa sistémica por CMV dependen fundamentalmente de la expansión y funcionalidad de la respuesta T específica frente al virus. Sin embargo, el papel de los anticuerpos con capacidad neutralizante no se encuentra totalmente esclarecido, ya que existen datos contradictorios con respecto a su participación en la prevención y control frente a CMV.

Los ensayos clásicos de neutralización determinan títulos de Anticuerpos (Ac) frente a la glucoproteína gB y el complejo gH-gL, ambos esenciales en la infección de



fibroblastos (Vanarsdall et al., 2008). Sin embargo, en la infección de células endoteliales, mieloides y epiteliales es fundamental el complejo gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128, por lo que los anticuerpos frente a dicho complejo son mucho más eficaces en la neutralización de la infección de estos tipos celulares. (Gabriele Hahn et al., 2004; Gerna et al., 2005; Ryckman, Chase, & Johnson, 2008; Wang & Shenk, 2005).

EL objetivo del Artículo V consistió principalmente en investigar el papel de los anticuerpos frente al complejo pentamérico gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128 en paralelo con el de los linfocitos T CD8+ CMV-específicos funcionales (IFN- γ) en el control de la infección activa sistémica por CMV.

III. Identificación de marcadores biológicos de riesgo de desarrollo de infección activa sistémica por CMV

El desarrollo de nuevos fármacos con mayor actividad intrínseca contra CMV (Ferrara, 2009) (Letermovir, Maribavir) despierta de nuevo el interés por la profilaxis antiviral en contraposición con el tratamiento anticipado para prevenir la morbi-mortalidad asociada a CMV. La identificación de marcadores biológicos de riesgo de desarrollo de CMV, especialmente de episodios que requieren tratamiento antiviral, podría ser útil para el diseño de estrategias de tratamiento profiláctico en base a características individuales del paciente, es decir, la denominada profilaxis dirigida.

Se hace necesario, por tanto, la estratificación del riesgo individual de desarrollo de CMV en base a nuevos marcadores biológicos, ya que los factores clínicos y demográficos asociados con la incidencia de reactivación vírica poseen un valor predictivo positivo escaso.

El análisis metabolómico de biofluidos mediante el uso de resonancia magnética nuclear es una herramienta cada vez más extendida en el diagnóstico, en la predicción del curso clínico o en la monitorización de la eficacia antimicrobiana en diversas enfermedades infecciosas, tales como la malaria, la tuberculosis, la sepsis o la infección congénica por CMV, entre otras. (Michaeli et al., 2012; Noto, Dessi, Puddu, Mussap, & Fanos, 2014). Además de ello, permite el estudio de las interacciones entre el huésped y el microorganismo.



El objetivo del artículo VI consistió en la investigación de la utilidad potencial del perfil metabolómico en plasma en la predicción del desarrollo de infección activa sistémica.



III. METODOLOGÍA

III.1 Manejo terapéutico de la infección sistémica por CMV

En el Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Valencia se emplea la estrategia del tratamiento anticipado, por lo que se realiza un seguimiento virológico frecuente de todos los pacientes durante su ingreso para establecer el inicio y el cese de la terapia antiviral.

El inicio del tratamiento anticipado se establece cuando la carga viral supera un valor determinado en el compartimento sistémico, que en el caso de nuestro centro es de 500 o 1000 copias/mL dependiendo de la PCR utilizada (Clarí et al., 2013). El tratamiento se realiza con ganciclovir (5mg/kg/12h), su profármaco oral valganciclovir (900mg/12h) o con Foscarnet (60mg/kg/12h) hasta que se produce la negativización de la carga viral plasmática. (Solano et al., 2008)

III.1.1 Monitorización Viroológica mediante PCR en tiempo real.

La monitorización de la carga viral plasmática se realiza una o dos veces por semana durante los primeros 100 días tras el trasplante, en el contexto de la estrategia de tratamiento anticipado descrita previamente.

Posteriormente, se realiza un seguimiento durante las visitas programadas de cada paciente, o semanalmente en el caso de tratamiento con dosis altas de corticosteroides en el marco de una enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Las muestras de sangre periférica (EDTA) de cada paciente son remitidas al Servicio de Microbiología inmediatamente tras la extracción y son centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos. Las muestras de plasma obtenidas se mantienen a 4°C hasta la extracción. Si no es posible realizar la extracción del material genético durante las dos siguientes horas, se mantienen almacenadas a -20°C hasta su análisis.

La extracción se realiza de forma rutinaria en el sistema automatizado m24sp (Abbott), a partir de 500 µL de plasma, obteniendo un volumen de elución de 80 µL. El sistema es capaz de extraer simultáneamente 18 muestras.

La carga viral de CMV se cuantifica desde el año 2012 mediante la nueva PCR Abbott *RealTime* CMV (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA). Es una PCR con una extraordinaria sensibilidad y especificidad, con un límite de detección de 20 copias/mL y un rango lineal que abarca de 20 a 100×10^6 copias/mL. Previamente, hasta el año 2012, la cuantificación de la carga viral se realizaba con la PCR de Abbott CMV PCR Kit. A pesar de que las cargas virales del nuevo kit de Abbott sean más elevadas en

comparación con las del kit antiguo (aproximadamente $1\log_{10}$), ambas presentan el mismo límite de detección y el mismo rango de cuantificación. (Clarí et al., 2013).

Durante la realización del artículo III y IV se incluyeron pacientes procedentes de los Hospitales Morales Meseguer (Murcia), La Princesa y Ramón y Cajal (Madrid), como parte de un proyecto multicéntrico FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) 12/1992.

En dichos centros se utilizaron las siguientes PCR real-time:

- CMV PCR Kit (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA)
- LightCycler CMV Quant Kit (Roche, Branchburg, New Jersey, USA)

La PCR de Roche tiene un límite de detección de 150 copias/mL, no obstante, los resultados proporcionados son comparables a los resultados proporcionados por las PCR de Abbott, ya que difieren menos de $0.5 \log_{10}$ copias/mL en todo el rango de cuantificación (Bravo et al., 2011).

Tabla III.1: Características de las PCR comerciales utilizadas para la cuantificación de CMV en plasma

Nombre	Casa Comercial	Diana	LD (copias/mL)
Abbott Real Time CMV	Abbott Molecular	UL34/UL80.5	20
CMV PCR Kit	Abbott Molecular	UL122	20
LightCycler CMV Quant Kit	Roche	UL54 (DNA pol)	150

III.2 Cálculo del tiempo de duplicación viral (td)

El cálculo del tiempo de duplicación (td) viral se realizó incluyendo únicamente primeros episodios de infección activa sistémica por CMV durante los primeros 100 días tras el trasplante alogénico mediante la siguiente fórmula:

Td= (t2-t1) x [log2/log (q2/q1)], siendo t2-t1 la diferencia en días entre las dos determinaciones de carga viral, y q1 y q2 la primera y la segunda carga viral, respectivamente.

Las cargas virales obtenidas en los distintos centros se normalizaron a Unidades Internacionales (UI) mediante el uso del estándar WHO (World Health Organization, Expert Committee on Biological Standardization).

El t_d fue calculado en la fase inicial de la replicación viral, y siempre antes del inicio del tratamiento anticipado. Para el cálculo, se emplearon la primera y la segunda carga viral, ambas durante las primeras fases de replicación, ya que la replicación vírica durante esta fase sigue una cinética lineal. Únicamente se incluyeron para el cálculo del t_d incrementos de la segunda carga viral del al menos 3 veces con respecto a la primera, y por tanto, que fueran superiores al coeficiente de variación de la técnica, pero inferiores al punto de corte de inicio del tratamiento antiviral. Además, el tiempo máximo transcurrido entre la primera carga viral y la segunda fue siempre inferior a 10 días.

III.3 Monitorización de la respuesta inmune frente a CMV

III.3.1 Detección y cuantificación de linfocitos T CD8+ específicos frente al CMV productores de IFN- γ

La monitorización de la respuesta inmune celular específica se llevó a cabo durante el primer y el segundo mes aproximadamente tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. La cuantificación de los linfocitos T CD8+ específicos frente al CMV se realizó mediante Citometría de Flujo siguiendo el protocolo de Tinción de Citoquinas Intracelulares (ICS) (Fastimmune, BD-Beckton Dickinson, San Jose, CA).

La estimulación de 500 μ L de sangre total (heparina de sodio) se realizó empleando librerías de péptidos con secuencias solapadas (1 μ g/mL/péptido) que abarcaban la secuencia completa de los antígenos pp65 e IE-1 de CMV, altamente inmunogénicos (JPT peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania). La estimulación se realizó en presencia de un correceptor (anticuerpo monoclonal frente a CD28 y CD49d) durante 6h a 37°C. En las últimas 4 horas de incubación se añadió un inhibidor del transporte proteico (Brefeldin A Solution, eBioscience) a una concentración de 5 μ g/mL.

Previo al análisis por Citometría de flujo se lisaron los hematíes utilizando para ello la Solución de lisis FACS Lysing Solution 10X (BD-Beckton Dickinson, San Jose, CA). Tras sucesivos lavados con solución fosfatada 2% (PBS), las células se permeabilizaron (Permeabilizing Solution 2, BD-Beckton Dickinson, San Jose, CA) y se tiñeron utilizando una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos: Anti-IFN- γ -FITC, Anti-CD3-APC, Anti-CD8-PercP-Cy5.5 y Anti-CD69-PE. Las muestras se mantuvieron a 4°C en presencia de para-formaldehído hasta la realización del análisis (un tiempo máximo de una hora).

El análisis se realizó en un Citómetro de Flujo FACSCalibur utilizando el Software CellQuest (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

La estrategia de selección celular fue la siguiente: En primer lugar se seleccionaron 10000 células conteniendo los marcadores CD3+ y CD8+, y posteriormente se seleccionaron aquellas células que producían IFN- γ y que además contenían el marcador de activación CD69.

Para el cálculo del número absoluto de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ tras el estímulo antigénico, se multiplicó el porcentaje de células CD8 productoras de IFN- γ (obtenido tras extraer el 'background' o ruido de fondo de la técnica) por el número absoluto de linfocitos CD8. En cada ensayo se incluyó en paralelo un control positivo y un control negativo, y únicamente respuestas superiores al 0.1% se consideraron específicas.

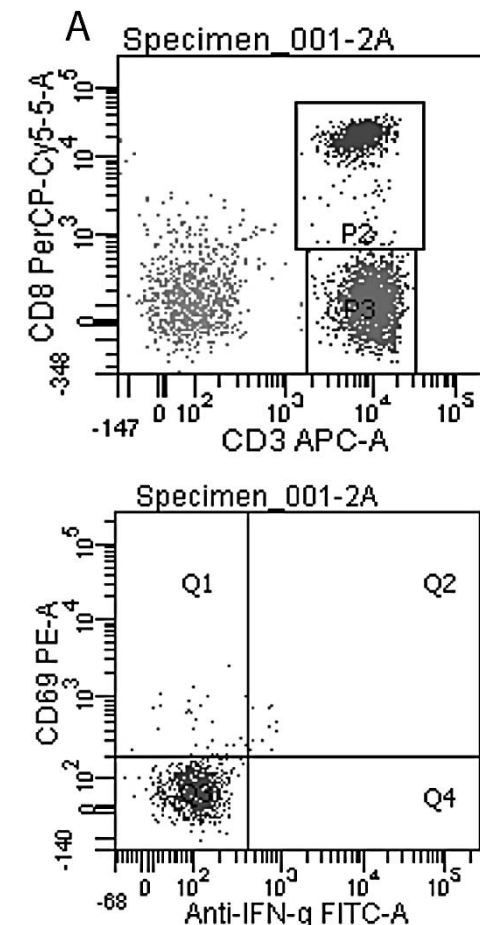


Figura III.1 Determinación de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ tras la estimulación antigénica con péptidos de CMV.

III.3.2 Determinación de la funcionalidad de los Linfocitos T CD8+

La detección de linfocitos T CD8+ con capacidad monofuncional (productores de IFN- γ , TNF- α o con el marcador de activación CD107a) y polifuncional (productores de IFN- γ / TNF- α , con o sin el marcador CD107a) fue realizada en un Citómetro de flujo FACScant II mediante el protocolo de tinción de citoquinas intracelulares descrito anteriormente. Durante la estimulación con los sets de péptidos de CMV, se añadió, junto con el correceptor, un anticuerpo monoclonal frente a CD107a conjugado con el fluorocromo APC y monensina (1 μ M). El período de incubación fue de 6h a 37°C. Tras la lisis de hematíes y los lavados con PBS, las células se tiñeron con distintos anticuerpos monoclonales conjugados (Anti-CD8-PerCP-Cy5.5 y Anti-CD3-APC-Cy7) y posteriormente se permeabilizaron para permitir la tinción con Anti-IFN- γ -FITC y Anti-TNF- α -PE.

En la Figura III.2 se observa un ejemplo de la estrategia de selección para la cuantificación de las distintas poblaciones funcionales de linfocitos T CD8+: linfocitos monofuncionales (capaces de producir una sola Citoquina) productores de IFN- γ (Panel Q3-5), TNF- α (panel Q3-4) o CD107 (panel Q3-1), linfocitos polifuncionales (productores de IFN- γ y TNF- α , panel Q4-5) y linfocitos polifuncionales con el marcador CD107a (panel Q2-1).

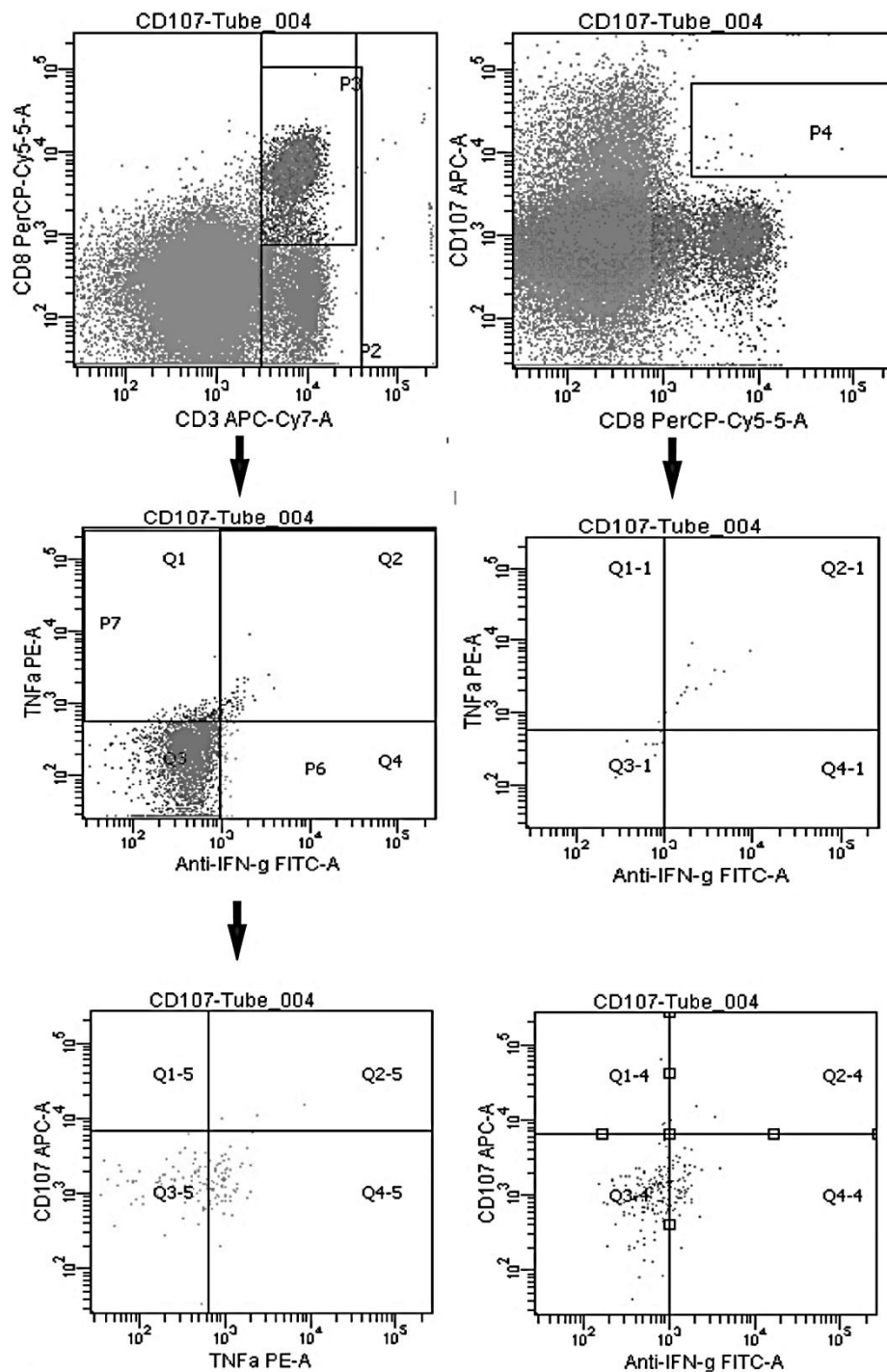


Figura III.2 Detección de linfocitos T CD8+ monofuncionales (productores de IFN- γ , TNF- α o CD107a) y polifuncionales (productores de IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a, TNF- α /CD107a y/o IFN- γ /TNF- α /CD107a)

III.3.3 Detección de células NK portadoras del receptor de activación CD94/NKG2C+

La cuantificación de células Natural Killer (NK) portadoras del receptor de activación lectina tipo C NKG2C se realizó en muestras de sangre periférica (EDTA) mediante citometría de flujo durante el primer y segundo mes tras el trasplante alogénico. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales marcados: Anti-CD3-PerCP, Anti-CD16-FITC, Anti-CD56-APC y Anti-NKG2C-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Se determinaron simultáneamente las dos poblaciones principales de células NK CD94/NKG2C: i) CD3/NKG2C+/CD56^{bright}/CD16^{-/low}, con capacidad de producir citoquinas tales como IFN- γ , y ii) CD3/NKG2C+/CD56^{dim}/CD16⁺, con potencial citotóxico. El número absoluto de cada población de células NK se obtuvo tras multiplicar el porcentaje de cada una de ellas por el número absoluto de linfocitos. En la Figura III.3 se observa un ejemplo de la cuantificación de las subpoblaciones celulares.

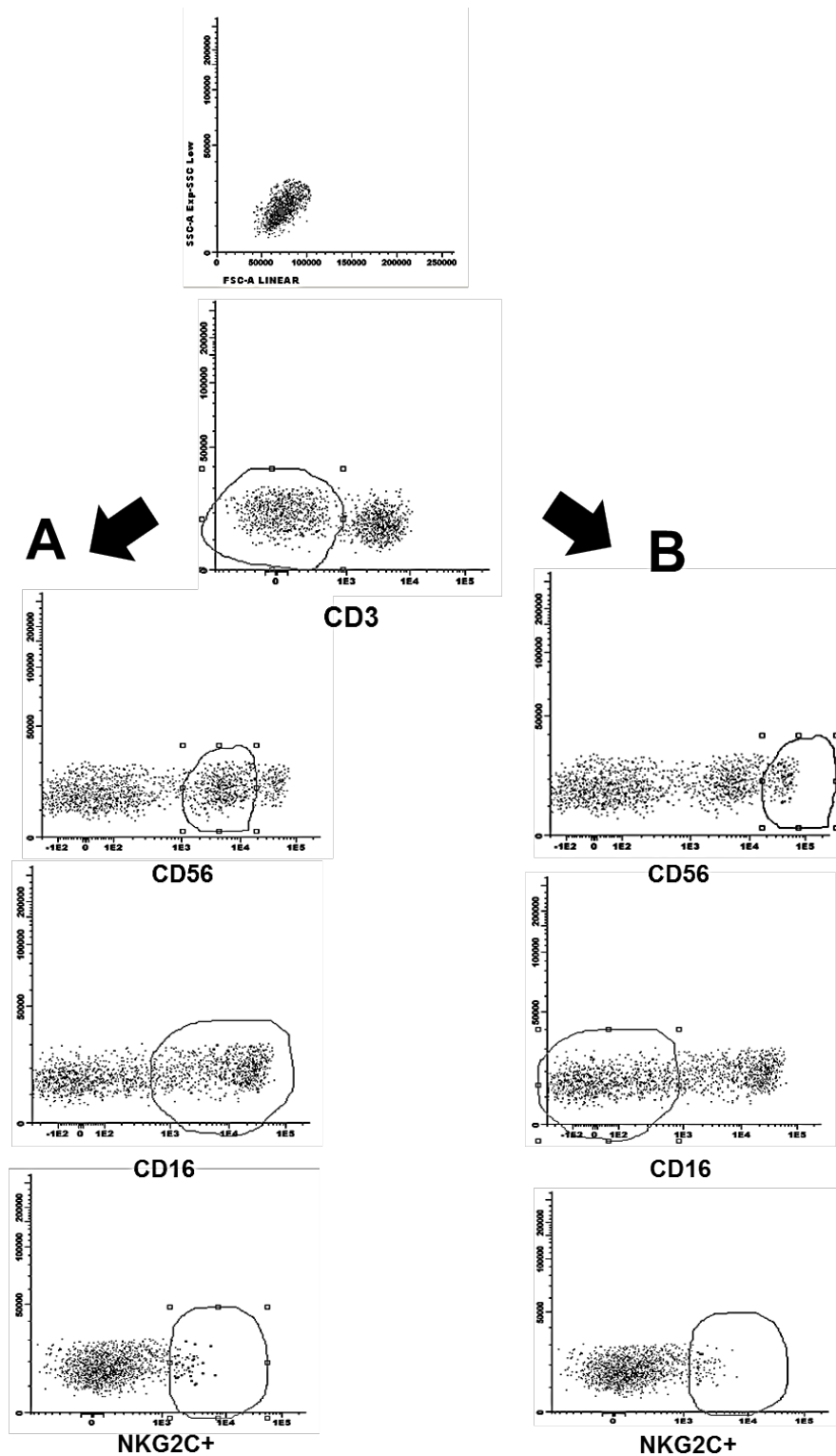


Figura III.3. Cuantificación de poblaciones células NK NKG2C+ por citometría de flujo: CD3/NKG2C+/CD56^{dim}/CD16⁺ (A) y CD3/NKG2C+/CD56^{bright}/CD16^{-low} (B).

III.4 Monitorización de niveles plasmáticos de (Val)-Ganciclovir mediante HPLC

La cuantificación de concentraciones de (val)-ganciclovir en plasma se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) siguiendo el protocolo descrito por (Campanero MA et al., 1998). Brevemente, las muestras de plasma se trataron con ácido tricloroacético al 50%, y el sobrenadante obtenido fue neutralizado con Hidróxido sódico (NaOH) 2M y purificado posteriormente con cloroformo. Para el análisis por HPLC se empleó una columna de base sílica Hypersil ODS-2 C18 (Thermo Scientific). La fase móvil (1mL/min) estaba compuesta por una solución de dihidrógeno fosfato sódico de trietilamina, y la detección se realizó a 254 nm. El límite de detección fue de 10ng/mL.

La monitorización de niveles de GCV se realizó una vez alcanzada la fase de equilibrio estacionario, e inmediatamente antes de la siguiente dosis terapéutica, por lo que se determinaron niveles valle (concentración mínima).

III.5 Cuantificación de Anticuerpos específicos frente a CMV

III.5.1 Determinación de Anticuerpos capaces de neutralizar la infección en células epiteliales (ACNIE)

La determinación de anticuerpos específicos contra el complejo glicoproteico gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128, necesario para la infección de células epiteliales, endoteliales y mieloides, se realizó mediante un ensayo de microneutralización (Cui, Meza, Adler, & McVoy, 2008)

Para ello se emplearon células humanas epiteliales de pigmento retiniano (ARPE-19) cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FCS (HyClonme Laboratories), 1000 IU/L Penicilina y 10 mg/L de Estreptomina (Gibco).

La cepa de CMV BADr UL131-Y4 fue amablemente proporcionada por el Dr. T-Shenk, de la Universidad de Princeton. Esta cepa deriva de la cepa de CMV AD169, y es capaz de replicarse tanto en células ARPE-19 como en células MRC-5 gracias a que expresa una proteína UL131 funcional. (Hahn et al., 2004; Wang & Shenk, 2005).

De forma esquemática, el protocolo del ensayo de neutralización fue el siguiente:

Se realizaron diluciones seriadas en el medio DMEM de las muestras de suero previamente inactivadas por calor (de 1:5 a 1:2560). Se incubaron 50 µL de muestra de



suero (por triplicado) con el inóculo de la cepa BADrUI131-Y4 durante 2h a 37°C, y tras el período de incubación fue añadido sobre una monocapa de células ARPE-19 dispuestas en placas de 96 pocillos. En cada ensayo se utilizaron en paralelo tanto control positivo como negativo.

Las células se incubaron durante 48h a 37°C en 5% CO₂ y posteriormente se fijaron con PBS en solución de acetona diluida 1:4. Se realizó la tinción de las células ARPE-19 con un anticuerpo monoclonal específico frente a p72 (Proteína temprana IE-1) con una dilución 1:2000. Tras el lavado con PBS (y Tween 20 0.05%) se añadió un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Sigma Aldrich), dirigido frente al primer anticuerpo monoclonal. El revelado se realizó añadiendo 100 µL de Peroxidasa (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Siga Aldrich). Tras 15 minutos de incubación, la reacción se detuvo añadiendo 50 µL de Ácido Sulfúrico 0.5M. Se realizó la medición de la absorbancia a 450-490 nm en un lector de microplacas.

El título de anticuerpos capaces de neutralizar la infección de células epiteliales fue la dilución de suero (media de las determinaciones) capaz de inhibir al menos el 50% de la infectividad viral respecto al control. Se ensayaron 338 sueros en total.

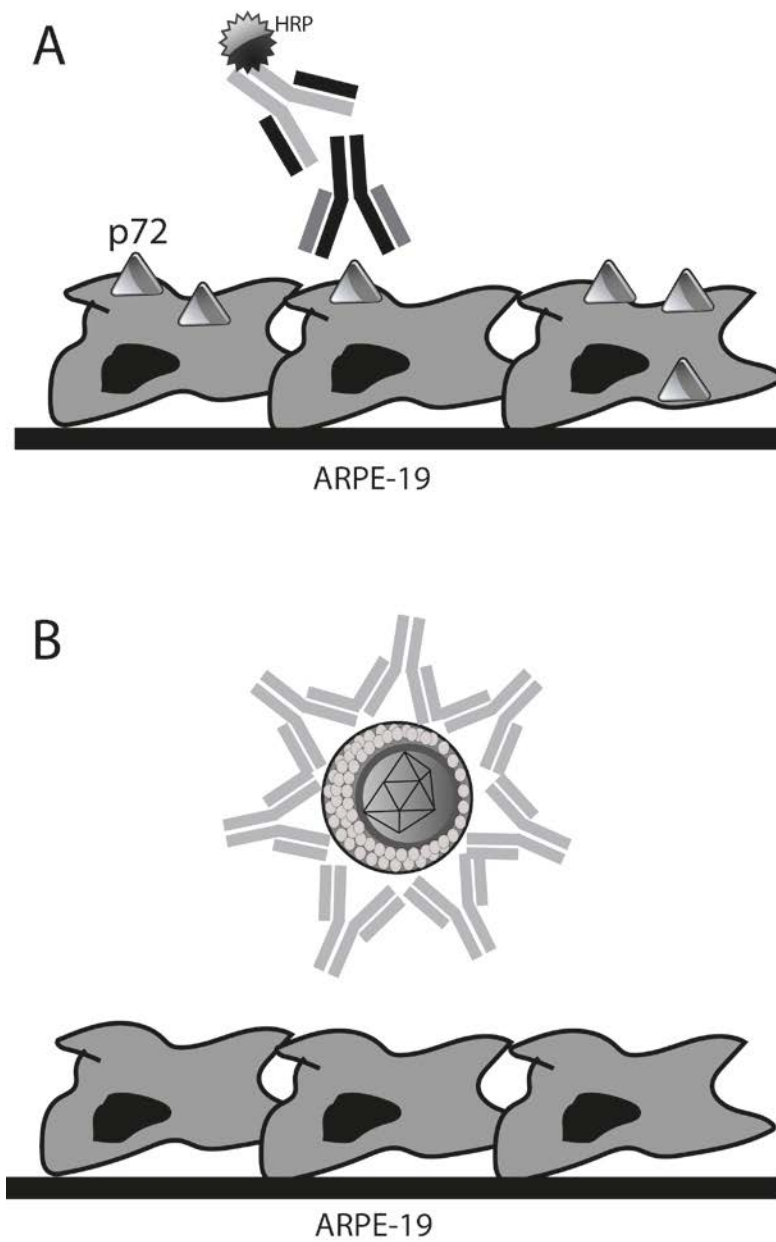


Figura III.4 Esquema del ensayo de microneutralización para la detección de anticuerpos capaces de neutralizar la infección de células epiteliales (ACNIE). En el panel A se representa el escenario en ausencia de ACNIE, mientras que en el panel B se representa la neutralización de la cepa BADrUL131-Y4 por los ACNIE.

III.5.2 Determinación de Anticuerpos IgG específicos frente a CMV mediante CLIA

Los anticuerpos IgG específicos frente a CMV (Cepa AD169) se determinaron mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA, Abbott Diagnostics). Brevemente, las muestras de suero se incubaron en pocillos de microdilución recubiertos con partículas virales purificadas e inactivadas. Tras el período de incubación, se añadió un anticuerpo secundario específico frente a IgG humanas conjugado con HRP (peroxidasa). Tras la adición del sustrato, la lectura se realizó mediante luminometría. La concentración de IgG (Unidades arbitrarias, UA) se obtuvo tras realizar la interpolación de los valores de URL (unidades relativas de luz) de la curva de calibrado.

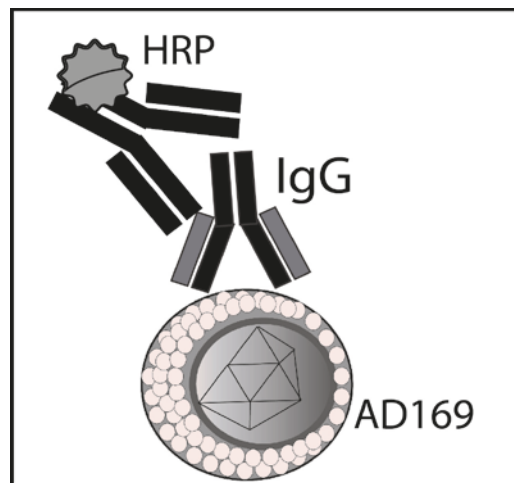


Figura III.5. Esquema de la determinación de IgG mediante ensayo de quimioluminiscencia (CLIA).

III.6 Análisis Metabólico en plasma

III.6.1 Espectroscopía RMN-H¹

En el artículo VI se realizó la investigación de la utilidad potencial del metaboloma plasmático para la predicción del desarrollo de viremia por CMV mediante espectrometría RMN-H¹. La espectrometría de Resonancia magnética nuclear (RMN) se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Brevemente, la interacción del momento magnético del núcleo (m) con un campo magnético externo conduce a la generación de diferentes niveles energéticos. La aplicación de un pulso de radiofrecuencia puede provocar la absorción de energía (magnetización transitoria). La vuelta al estado de equilibrio o relajación se conoce como *Free Induction Decay* (FID). La transformada de *Fourier* permite transformar los FID en espectros de picos de RMN. El

área y la posición de cada pico del espectro dependen directamente del número de protones y del entorno químico de los mismos (grado de desplazamiento). La espectroscopía de RMN se utiliza fundamentalmente en la investigación de estructuras moleculares, aunque en los últimos años ha demostrado utilidad en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Se realizó el análisis del “metaboloma” en muestras de plasma de 53 pacientes con y sin infección por CMV. Las muestras de plasma se mezclaron con 50 μ L de agua deuterada (D_2O) y se introdujeron en tubos de 5 mm de RMN. El análisis se realizó en un espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Bruker GmbH) a 600 MHz con una sonda de detección inversa $^1H/^{13}C/^{15}N$, calibrado con muestras referencia de Alanina y Creatina 10mM.

Se obtuvo un total de 256 FID con un tamaño espectral total de 14ppm. La señal procedente del H_2O se eliminó con una irradiación suave durante el tiempo de reposo (1s). Antes de aplicar la transformada de Fourier, se amplió el FID mediante la multiplicación de la señal en 0,3 Hz. La señal del doblete correspondiente al CH_3 de la Alanina (1475 ppm) fue utilizada como referencia en cada uno de los espectros obtenidos. Para la identificación de metabolitos relevantes se emplearon bases de datos de espectros.

Los espectros obtenidos mediante RMN fueron procesados con el Software MNova (Mestre Lab) y transferidos a MATLAB para el análisis posterior.

III.6.2 Análisis Metabolómico

Las regiones químicas investigadas fueron aquellas con resonancias entre 0.50-4.70 y 5.5-9.5 ppm. Las regiones correspondientes al EDTA fueron excluidas (2.53-2.58, 3.1-3.3 y 3.6-3.7 ppm).

Los espectros se agruparon en áreas de 0.01ppm (6Hz) y se analizaron mediante análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Este método gráfico combina una matriz de datos espectrales y una matriz de datos cualitativos, con el objetivo de detectar variaciones relevantes y patrones en el espectro que puedan relacionarse con los datos.

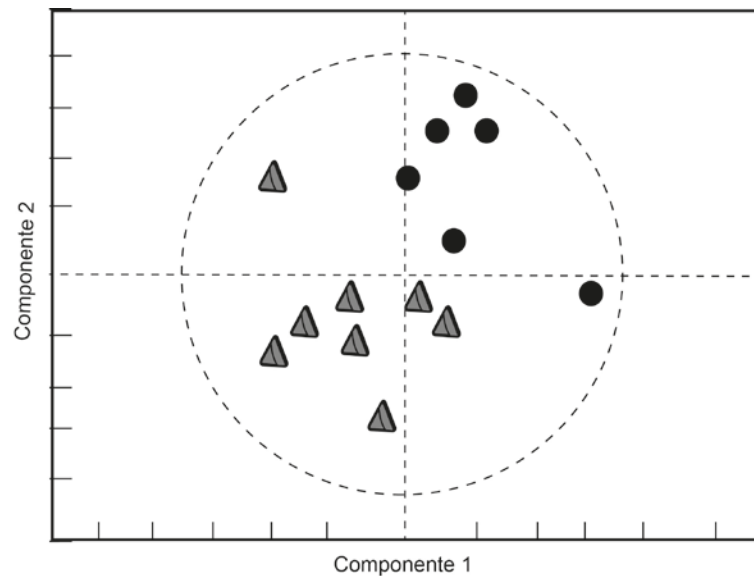


Figura III.6: Representación de resultado obtenido mediante análisis de dos componentes (PLS-DA).

El análisis PLS-DA proporciona un método gráfico de fácil comprensión para identificar regiones espectrales que permitan una separación entre distintos grupos, por ejemplo, entre pacientes con y sin infección por CMV. Además, muestra la capacidad de separación y la significación estadística del resultado.

Para la evaluación de la precisión de los modelos propuestos, se empleó la validación cruzada, útil para la evaluación de la complejidad de un modelo y para la evaluación de su aplicabilidad cuando se utiliza sobre datos desconocidos.

La validación cruzada incluye una serie de experimentos o subvalidaciones. En cada experimento de subvalidación se eliminan una serie de datos y el modelo es construido en función de los restantes. Posteriormente, el modelo se aplica sobre los datos que no habían sido utilizados en la construcción del modelo. Se realizaron 25 divisiones al azar de los datos, realizando experimentos de subvalidación en cada uno de ellos. La precisión del modelo se calculó mediante el promedio del % de éxito de clasificación de cada uno de los grupos de muestras seleccionadas.

La calidad del modelo viene descrito por los siguientes parámetros: R^2X , R^2Y y Q^2 .

Los parámetros R^2X e R^2Y indican la "Bondad de ajuste" del modelo, es decir, la proporción de diferencias observadas en los datos que se encuentran explicadas por el modelo. Varía de 0 a 1, y el modelo mejora a medida que el valor se aproxima a 1. El

parámetro Q^2 refleja la capacidad de predicción del modelo, es decir, la proporción de diferencias en los datos que es capaz de predecir el modelo. También varía de 0 a 1, aunque suele ser menor a 0.7. Fue calculado a partir de los experimentos de validación cruzada.

Por último, las señales de los metabolitos de los espectros que más contribuían al modelo se integraron y semicuantificaron mediante procedimientos optimizados de Levenburg-Marquard (MATLAB 7.4).

Los niveles de los distintos metabolitos se expresaron como contenido metabólico relativo total, y fueron calculados a partir de la integral del metabolito, dividido por la suma de todas las integrales del espectro. La significación estadística de las diferencias entre los niveles de los metabolitos se obtuvo mediante el test ANOVA con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

III.7 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS (versión 20.0). La normalidad de las distribuciones se contrastó mediante las pruebas Kolmogorov-Smirnov (K-S) y Shapiro-Wilk. La independencia de las variables categóricas se analizó mediante el contraste Chi cuadrado y el test exacto de Fisher, y la comparación de muestras independientes se llevó a cabo mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La asociación de dos variables continuas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Por último, la elección de puntos de corte se llevó a cabo mediante análisis de curvas ROC. Un valor de P menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo en todos los casos.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se encuentran estructurados en tres partes, correspondientes a los tres objetivos presentados anteriormente. En primer lugar, se presentan los resultados relacionados con la evaluación de factores (farmacocinéticos e inmunológicos) asociados con la respuesta al tratamiento antiviral, y con la investigación de la cinética viral como factor predictor de la necesidad de tratamiento. En segundo lugar, se presentan los resultados relacionados con la investigación de las características de la respuesta inmune, asociadas con la prevención y el control de la infección por CMV. En tercer y último lugar, se presentan los resultados obtenidos en la investigación y evaluación de marcadores biológicos de riesgo de infección sistémica por CMV.

IV.I Investigación de nuevos parámetros para determinar cuándo debe iniciarse el tratamiento anticipado y para monitorizar la respuesta al tratamiento. (Artículos I y II)

IV.I.1 Predicción de la necesidad de tratamiento antiviral con base en la cinética de replicación: cálculo del tiempo de duplicación (td)

La monitorización virológica mediante el uso de PCR altamente sensibles durante el tratamiento anticipado permite la detección temprana de cargas virales de baja magnitud, que suelen estar por debajo del punto de corte de inicio de tratamiento, que en el caso de nuestro centro es de 500 copias/mL (hasta el año 2012), o de 1000 copias/mL (a partir del año 2012). Durante las primeras fases de la replicación viral, ésta sigue una cinética lineal, por lo que es posible el cálculo de parámetros cinéticos como el tiempo de duplicación (td).

El objetivo del artículo I consistió en determinar si se podría inferir la necesidad de tratamiento antiviral de un episodio de infección por CMV mediante el cálculo del tiempo de duplicación viral.

IV.I.1.1 Tiempo de duplicación en pacientes con o sin necesidad de tratamiento antiviral.

Se incluyó un total de 82 pacientes receptores de trasplante alogénico durante los años 2010 y 2013 en el Hospital Clínico de Valencia. Un total de 55 pacientes desarrolló un episodio inicial durante los primeros 100 días tras el trasplante. De ellos, 32 episodios fueron tratados (58.2%) mientras que los 23 restantes se aclararon espontáneamente.

Cabe destacar que en todos los episodios la carga inicial fue inferior al punto de corte de inicio de tratamiento, e incluso, en 41 (74.5%) casos fue menor a 100 copias/mL.

La carga viral inicial fue de mayor magnitud en aquellos pacientes que posteriormente recibieron tratamiento antiviral, en comparación con los que no fueron tratados. Sin embargo, la diferencia observada en la carga inicial no fue lo suficientemente significativa como para poder inferir la necesidad de tratamiento de los episodios.

El cálculo del tiempo de duplicación fue calculado en aquellos pacientes con cargas iniciales inferiores al punto de corte establecido para el tratamiento, y siempre y cuando la distancia en días entre una carga y otra fuera menor a 10 días. Además, para el cálculo únicamente se incluyeron aquellos episodios en los que la segunda carga superara al menos tres veces la primera (mayor al coeficiente de variación).

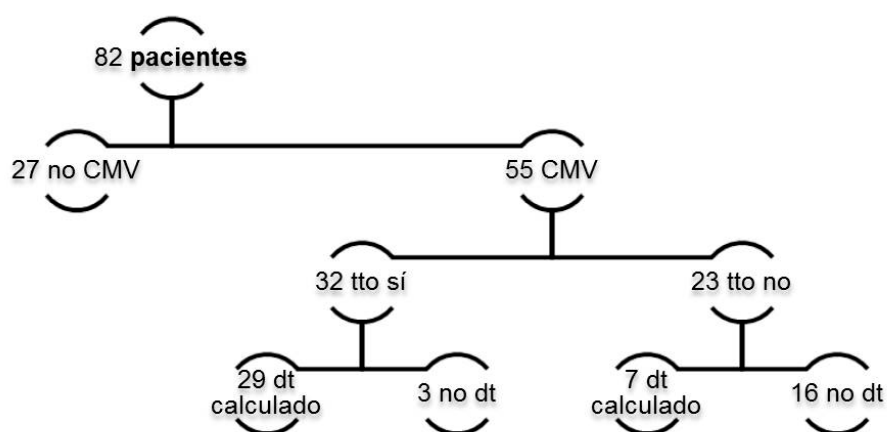


Figura IV.1. Esquema del cálculo total del tiempo de duplicación en pacientes con infección por CMV.

Finalmente, el td fue calculado en 36 pacientes (65.5%), 29 (80.6%) de los cuales recibieron tratamiento antiviral.

En la Tabla IV.1 se muestran la carga inicial y el tiempo de duplicación calculados en pacientes de acuerdo con el riesgo de desarrollar infección por CMV. Los pacientes incluidos en el grupo de riesgo alto fueron aquellos que cumplieron alguna de las siguientes características pre-trasplante: Trasplante procedente de donante no emparentado, o con HLA (Human Leukocyte Antigen) no idéntico, fuente de trasplante de



cordón umbilical, serología de CMV D-/R+ o tratamiento con corticosteroides a altas dosis debido a la existencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Por el contrario, los pacientes incluidos en el grupo de riesgo bajo-intermedio fueron aquellos que cumplieron las siguientes características pre-trasplante: Trasplante procedente de donante emparentado y HLA idéntico, Serología D+/R+ o D+/R- y ausencia de enfermedad de injerto contra huésped.

Tabla IV.1 Carga viral inicial y tiempo de duplicación (td) en pacientes con infección por CMV que necesitaron o no tratamiento antiviral.

Parámetro/ Grupo de pacientes	Tratamiento antiviral	No tratamiento	<i>P</i>
Carga inicial (IU/mL)			
General	75 (31-9641)	36 (31-1090)	0.22
Riesgo alto	32 (31-3920)	31 (31-1090)	0.093
Riesgo bajo	232 (31-9641)	59 (31-596)	0.153
Tiempo de duplicación (td), días			
General	1.91 (0.81-7.05)	4.21 (2.13-11.52)	0.001
Riesgo alto	2.12 (0.81-3.91)	3.26 (2.13-11.35)	0.012
Riesgo bajo	1.73 (1.42-7.05)	7.87 (4.21-11.52)	0.099

Como se observa en la Tabla IV.1, el tiempo de duplicación fue considerablemente menor en aquellos pacientes que posteriormente fueron tratados con (val)-ganciclovir ($P=0.001$), particularmente en pacientes con riesgo elevado de desarrollar infección por CMV.

Mediante análisis por curva ROC se estableció un punto de corte de $td=2,41$ días, capaz de discriminar entre episodios que posteriormente fueron tratados con una sensibilidad de 81,3% y una especificidad de 71.6%. Utilizando un punto de corte de $td=2$ días se logró aumentar la sensibilidad al 100%, mientras que la especificidad fue del 51%.

Posteriormente, se evaluó el punto de corte de $td=2$ mediante su aplicación en los episodios de replicación viral de los pacientes incluidos, observándose lo siguiente: En todos los pacientes tratados con un tiempo de duplicación menor o igual a 2 días ($n=15$, 9 de riesgo alto y 6 de riesgo bajo) se hubiera anticipado el inicio de la terapia aproximadamente una semana. Por el contrario, aquellos pacientes con un td mayor de 2 días ($n=14$, 11 de riesgo alto y 3 de riesgo bajo) se hubieran tratado en el momento en que la carga viral superara el punto de corte de inicio de tratamiento.

IV.I.2 Predicción de la respuesta al tratamiento antiviral mediante la monitorización plasmática de los niveles de Ganciclovir (GCV).

Existen datos contradictorios en el marco del trasplante alogénico con respecto a la utilidad de la monitorización de niveles de GCV en plasma como marcador de eficacia terapéutica. En el artículo II realizamos la monitorización de los niveles plasmáticos de GCV durante el tratamiento anticipado de episodios de replicación por CMV, junto a la monitorización en paralelo de la expansión de linfocitos T CD8+ CMV-específicos, los cuales han demostrado tener un papel esencial en el aclaramiento viral (Lilleri et al., 2008; Reusser et al., 1991; Solano et al., 2008; Tormo et al., 2010).

Se incluyó un total de 13 episodios (13 pacientes), tratados con Ganciclovir intravenoso (en 10 casos) o con su profármaco oral (val)-ganciclovir (en 3 casos). De los 13 episodios, 9 fueron episodios iniciales que se iniciaron una mediana de 28 días tras el trasplante, rango 0-51, mientras que los 4 restantes fueron episodios recurrentes iniciados una mediana de 321 días, rango 144-766.

La determinación de la concentración de GCV en plasma se realizó mediante HPLC inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis terapéutica, obteniéndose por tanto, el nivel valle de GCV. Se incluyó un total de 52 muestras de plasma, aproximadamente una mediana de 3 muestras por paciente (2-10), obtenidas semanalmente durante el tratamiento antiviral. Para la cuantificación de los linfocitos T CD8+ CMV específicos productores de IFN- γ se incluyó un total de 79 muestras, en total una mediana 5 muestras por paciente, rango 2-13. En la Figura IV.2 se muestra una representación esquemática de los resultados obtenidos.

En total se aclararon 9 episodios (69%) de infección sistémica por CMV tras una mediana de 24 días de tratamiento antiviral (rango 15-87). El resto de los episodios continuaron activos y detectables en plasma hasta el fin del seguimiento (exitus del paciente).

Tal y como se observa en la Tabla IV.2, se detectaron niveles valle por encima de 0.6 mg/L en un total de 10 pacientes (76.9%). La mediana de la concentración de GCV en dichos pacientes fue de 2.90 mg/L, rango 1,17-5,80.

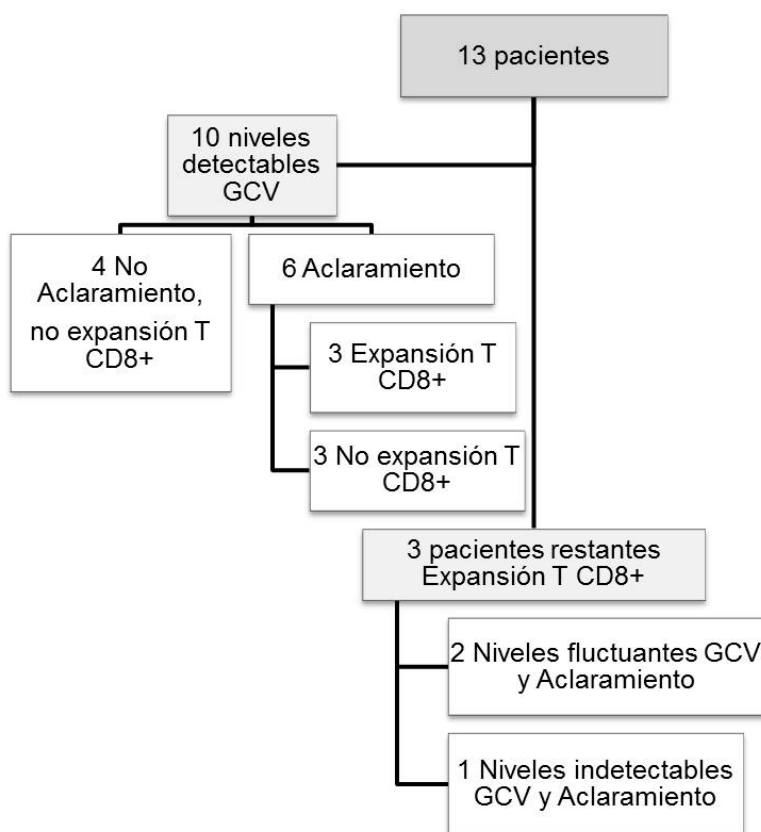


Figura IV.2. Esquema de los pacientes incluidos en el estudio según niveles plasmáticos de GCV y aclaramiento de la infección viral.

A pesar de presentar concentraciones plasmáticas mantenidas por encima de 0.6 mg/L (concentración establecida como mínima eficaz en el tratamiento de retinitis por CMV), 4 episodios no se resolvieron al final del seguimiento. Característicamente en los 4 pacientes (número 1, 2, 4 y 5, de Tabla IV.2) se observó una falta de expansión de linfocitos T CD8+ CMV específicos funcionales. Debido a la ausencia de respuesta al tratamiento antiviral a pesar de la detección de concentraciones terapéuticas en principio adecuadas, se realizó la secuenciación de los genes UL54 y UL97 que codifican para las proteínas ADN polimerasa y UL97 proteína quinasa, respectivamente, con el fin de detectar mutaciones que pudieran conferir resistencia al GCV en estos pacientes. Se utilizó una muestra de plasma obtenida tras 4 semanas tras el inicio del tratamiento con GCV, detectándose la mutación M460V en el gen UL97 que codifica para la proteína quinasa solamente en el paciente nº 5.

Con respecto a los 6 pacientes que presentaron concentraciones adecuadas de GCV durante todo el periodo, se observó un aclaramiento de la carga viral plasmática en

todos los casos tras el tratamiento antiviral. En el 50% de los pacientes se detectó una marcada expansión de linfocitos T CD8+ funcionales, mientras que en el 50% restante (pacientes nº 8, 11, 12 de Tabla IV.2) no se produjo dicha expansión. Sin embargo, no puede descartarse el hecho de que otros antígenos, distintos a los utilizados en la técnica de estimulación, pudieran generar inmunidad protectora frente al virus.

Por último, en 3 pacientes se detectaron concentraciones de GCV en plasma fluctuantes (en 2 pacientes) o incluso indetectables (en 1 paciente). A pesar de ello, en todos los casos se produjo el aclaramiento de la viremia junto con una expansión de linfocitos T CD8+ CMV-específicos y funcionales. En este contexto, la expansión de células T se produjo en el momento del aclaramiento plasmático de la carga viral de CMV o precediendo a ésta entre una y tres semanas.

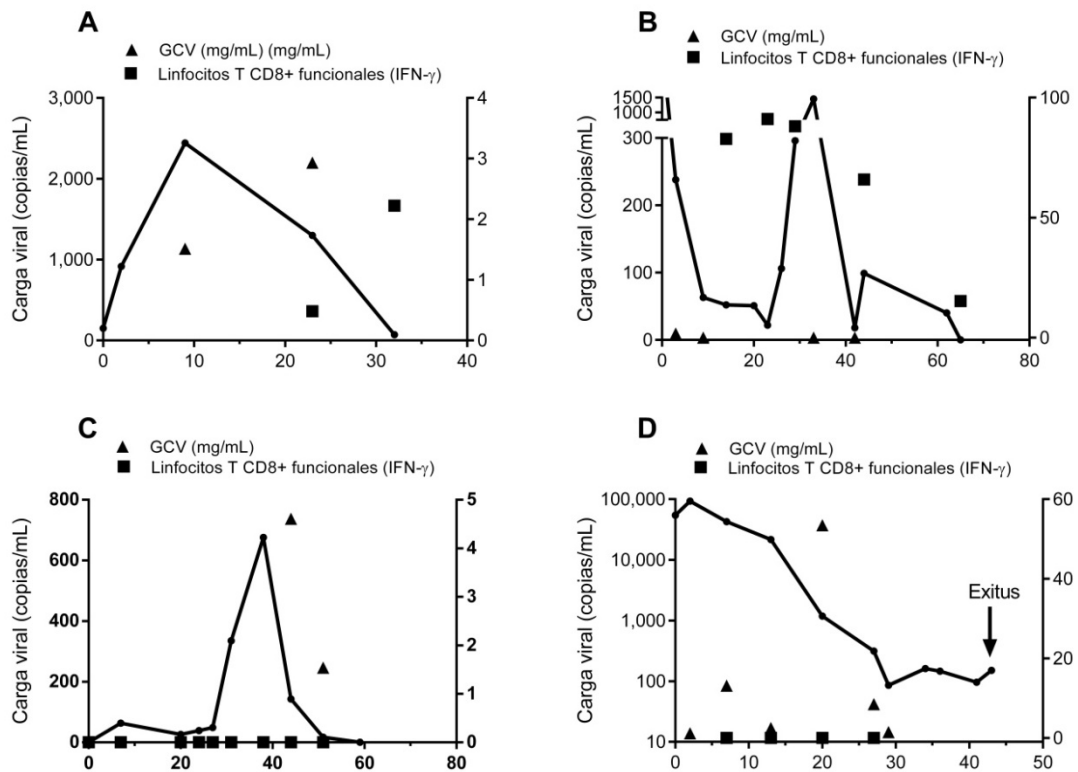


Figura IV.3. Ejemplos de cinética de aclaramiento viral en pacientes con niveles variables de GCV en plasma, según la expansión de linfocitos T CD8+ CMV-específicos funcionales. A) Aclaramiento de la carga viral en un paciente con niveles detectables de GCV y con expansión de linfocitos T CD8+. B) Aclaramiento de la carga viral en un paciente con expansión de linfocitos T CD8+ y niveles indetectables de GCV. C) Aclaramiento de la carga viral en un paciente con niveles detectables de GCV y sin expansión de linfocitos T CD8+. D) Ausencia de aclaramiento viral en un paciente con niveles detectables de GCV y sin expansión de linfocitos T CD8+.

**Tabla IV.2. Datos virológicos, farmacocinéticos e inmunológicos de los pacientes incluidos en el estudio.**

Nº Pte	Tratamiento	GCV > 0.6 mg/mL (mediana; rango)	Pico carga viral	Resolución	Expansión de Linfocitos T CD8+	Pico de Linfocitos T CD8+(cél/s/µL)
1	IV GCV	Si (5.80; 0.64-5.8)	3872	No	No	0.58
2	IV GCV	Si (2.57; 1.65-4.92)	3766	No	No	0.80
3	IV GCV	No (0.00; 0.00-1.597)	3221	Si	Si	91.06
4	IV GCV	Si (1.17;1.04-3.48)	18075	No	No	0.00
5	IV GCV	Si (5.48; 1.15-53.4)	92823	No	No	0.00
6	(Val)GCV	No (0.00;0.00-6.65)	13995	Si	Si	5.15
7	IV GCV	No (0.00;0.00-0.00)	2129	Si	Si	14.00
8	IV GCV	Si (3.97;1.54-4.61)	676	Si	No	0.00
9	IV GCV	Si (1.34)	2876	Si	Si	237.92
10	IV GCV	Si (2.22;1.51-2.93)	2442	Si	Si	2.22
11	(Val)GCV	Si (1.86; 1.55-2.00)	1149	Si	No	0.00
12	(Val)GCV	Si (4.69;4.47-4.92)	1108	Si	No	0.00
13	IV GCV	Si (3.22;2.75-3.69)	907	Si	Si	1.98

El objetivo del artículo I consistió en la investigación del cálculo del parámetro cinético tiempo de duplicación (t_d) como elemento predictor de la necesidad de tratamiento de los episodios de infección de CMV. La utilidad clínica de la determinación de la cinética viral en sangre en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos fue postulada en primer lugar por (Vicent C Emery et al., 2000) quien mostró que incrementos significativos en la carga viral se asociaban independientemente con la presencia de enfermedad orgánica por CMV tanto en trasplante de órgano sólido como en el trasplante alogénico.

La utilización de técnicas de PCR altamente sensibles durante la monitorización virológica permite la detección de cargas virales durante la replicación inicial del virus que se encuentran muy por debajo de los puntos de corte habitualmente empleados para el inicio del tratamiento anticipado.

Tras el cálculo del tiempo de duplicación, se observó que los episodios que finalmente fueron tratados tuvieron tiempos de duplicación significativamente menores. De hecho, se pudo establecer un punto de corte de $t_d = 2$ días capaz de predecir el inicio de tratamiento con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 51%. Tras la evaluación del punto de corte en la cohorte de pacientes incluidos, se estimó que la estrategia de inicio de tratamiento anticipado en base al cálculo del tiempo de duplicación hubiera anticipado el inicio del tratamiento aproximadamente una semana en un total de 15 pacientes.

Indudablemente el tamaño muestral de la cohorte es una limitación a la hora de investigar si dicha anticipación en el inicio del tratamiento podría tener un efecto significativo en la duración del mismo, y consecuentemente, en la toxicidad farmacológica asociada.

La variabilidad inter e intraensayo observada entre distintas PCRs impide la comparación directa de resultados entre diferentes centros. En este contexto, el empleo del tiempo de duplicación, obtenido con base en una cinética lineal durante los inicios de la replicación viral, podría tener menor variabilidad y por tanto, utilidad clínica en la comparación entre distintos centros.

En conclusión, esta estrategia debería evaluarse en el contexto de un ensayo clínico con el fin de evaluar su eficacia y su seguridad en el marco del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.



Por otro lado, existe poca información disponible acerca de la utilidad clínica de la monitorización farmacocinética de los niveles de GCV con el fin de predecir eficacia clínica. Además, el rango de concentraciones plasmáticas no se encuentra bien establecido. El rango terapéutico en el tratamiento de la enfermedad orgánica por CMV en el trasplante de órgano sólido se encuentra entre 0,2 y 2 mg/L, mientras que la concentración terapéutica eficaz en el tratamiento de la retinitis por CMV en pacientes VIH positivos se encuentra en 0.6 mg/L.

Tras la monitorización de concentraciones plasmáticas durante el tratamiento anticipado con GCV/ (val)GCV de los episodios de infección activa sistémica por CMV, se observó que niveles valle de GCV mantenidos por encima de una concentración de 0,6 mg/L no se asociaron con el aclaramiento de la carga viral plasmática.

De hecho, un porcentaje de pacientes con niveles detectables de GCV, pero con ausencia de expansión de linfocitos T CD8+ funcionales, fueron incapaces de aclarar el episodio de viremia. En concordancia, en ciertos pacientes con niveles plasmáticos fluctuantes o indetectables de GCV se produjo el aclaramiento de la infección por CMV, gracias a la expansión de linfocitos T CD8+. Con ello se muestra una vez más, el rol crítico de la inmunidad celular en el control de la infección por CMV.

En 3 pacientes se produjo el aclaramiento de la carga viral junto con la presencia de niveles adecuados de GCV y la expansión de linfocitos T CD8+, por lo que en estos casos no se pudo conocer la contribución específica de cada uno de ellos en el aclaramiento viral.

En general, los datos observados coinciden con los datos aportados por (Perrottet et al., 2010), en los que se observó un aclaramiento viral variable durante el tratamiento de enfermedad orgánica por CMV en el receptores D+/R- de trasplante de órgano sólido, a pesar de la detección de concentraciones terapéuticas adecuadas.

Si bien, existen limitaciones en el estudio que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, se obtuvieron muestras semanales para la monitorización de GCV, por lo que no pudieron calcularse los parámetros cinéticos $C_{máx}$, C_{min} , AUC, etc, más adecuados quizás, en la predicción de eficacia clínica.

En conclusión, la monitorización de GCV en plasma no fue capaz de predecir la respuesta al tratamiento en este contexto clínico. En este sentido, la monitorización inmunológica podría tener mayor valor clínico.

IV.II Identificación de marcadores inmunológicos de protección frente a la infección activa sistémica por CMV: Determinación precoz de células NK (NKG2C+) naturaleza polifuncional de las células T CD8+ y cuantificación de anticuerpos que neutralizan la infección de células epiteliales (ACNIE). (Artículos III, IV y V)

IV.II.1 Papel de las células NK CD94/NKG2C+ en el control de la infección por CMV en pacientes con reconstitución temprana de células T CD8+ CMV-específicas. (Artículo III)

Las células NK son la primera población linfocitaria que se reconstituyen tras el Alo-TPH. Su función está regulada por distintos receptores activadores e inhibidores (KIRS, NKG2A, NKG2C, NKG2D), definiendo distintos tipos funcionales de células NK. En particular, se ha observado que las células NK portadoras del receptor tipo lectina C NKG2C+ y con marcador CD94 se encuentran fundamentalmente en individuos CMV-seropositivos, y parecen participar en la resolución de los episodios de CMV.

Existen dos poblaciones principales de células NK CD94/NKG2C+ descritas: Las células NK CD94/NKG2C+ CD56^{brigh+}/CD16^{-/low}, que expresan gran nivel del receptor inhibidor NKG2A y pocos niveles de receptores KIR. Se encuentran principalmente en órganos linfoides, tienen poca capacidad citotóxica y son capaces de producir gran cantidad de citoquinas inmunomoduladoras. Por el contrario, la población de células NK CD94/NKG2C+ CD56^{dim}/CD16⁺ expresan gran cantidad de receptores KIR y tienen elevado poder citotóxico frente a células infectadas por virus. Se encuentran principalmente en sangre periférica.

En el artículo III se realizó la cuantificación de ambas poblaciones de células NK durante el primer y el segundo mes tras el trasplante. Se incluyó una cohorte de 61 pacientes receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos durante los años 2010-2013. La procedencia de los pacientes fue la siguiente: Hospital Clínico Universitario de Valencia (n=20), Hospital de la Princesa (n=22), Hospital Morales Meseguer (n=13) y Hospital Ramón y Cajal (n=6). El seguimiento se realizó durante los primeros 100 días tras el trasplante, y únicamente se estudiaron episodios iniciales de reactivación viral. Los factores demográficos y clínicos pre-trasplante más relevantes se encontraban equilibrados en ambos grupos de pacientes (con y sin infección activa sistémica).

IV.II.1.1 Niveles de las poblaciones de células NK CD94/NKG2C+ en pacientes con y sin infección activa sistémica por CMV durante los primeros 100 días tras el trasplante alogénico.

Un total de 31 pacientes (50.8%) desarrolló un episodio inicial de infección activa sistémica durante los 100 días siguientes al trasplante alogénico. De los 31 episodios, 9 se desarrollaron antes de la primera determinación de células NK NKG2C+ en el día +30. De los 22 episodios restantes, 15 episodios se desarrollaron entre la primera (+30) y la segunda (+60) determinación, mientras que 7 episodios se desarrollaron entre los días +60 y +100.

En primer lugar, se investigaron los niveles totales y los de las distintas subpoblaciones de células NK NKG2C+ determinados en el día +30 tras el trasplante (excluyendo los 9 episodios que se desarrollaron antes de la primera determinación) en aquellos pacientes que posteriormente desarrollaron o no un episodio de infección activa sistémica. Los niveles celulares de los linfocitos T CD8+ específicos frente al CMV y productores de IFN- γ se determinaron en paralelo mediante el protocolo de tinción de citoquinas intracelulares. El análisis de los niveles celulares se realizó de acuerdo al estatus serológico de los pacientes, ya que las células NK con el receptor NKG2C+ son más numerosas en individuos infectados por CMV. Cabe destacar que la proporción de pacientes con serología de CMV de donante y receptor positiva (D+/R+) fue comparable en pacientes con o sin infección activa sistémica por CMV.

Los niveles de poblaciones de células NK NKG2C+ determinados en el día +30 fueron comparables entre pacientes que posteriormente desarrollaron o no un episodio de infección por CMV. Por tanto, la cuantificación temprana de poblaciones de células NK NKG2C+ no permitió inferir el riesgo de desarrollo de infección por CMV (Figura IV.4).

De forma análoga, no se encontraron diferencias en los niveles de las poblaciones de células NK NKG2C+ durante el segundo mes tras el trasplante (+60) entre pacientes con infección activa por CMV previa (durante los días +0 y +60) o sin infección durante todo el periodo de estudio. (Figura IV.5)

Como se observa en la Tabla IV.3, tanto en pacientes D+/R+ como en pacientes D+/R-, los niveles de linfocitos T CD8+ funcionales CMV-específicos fueron mayores (aunque no de forma significativa) en aquellos pacientes sin infección por CMV, en comparación con aquellos pacientes con infección por CMV.



Tabla IV.3: Niveles celulares en pacientes con o sin infección activa sistémica por CMV durante los días +30 y +100 tras el TPH, de acuerdo con el estatus serológico del donante y el receptor.

Serología de donante y receptor (D/R)	Población celular (cél/ μ L) Mediana (rango)	Infección aguda sistémica por CMV	
		Si	No
D+/R+	CD56 ^{bright+} /CD16 ^{-/low}	2.70 (0.03-9.21)	2.57 (0.06-4.03)
	CD56 ^{dim} /CD16 ⁺	6.47 (0-103.77)	8.03 (0.38-24.55)
	Linfocitos T CD8+ CMV-específicos productores de IFN- γ	0.84 (0.02-4.61)	1.11 (0.02-3.12)
D+/R-	CD56 ^{bright+} /CD16 ^{-/low}	0.17 (0-13.65)	1.76 (0.13-5.61)
	CD56 ^{dim} /CD16 ⁺	3.81 (0-42.21)	7.30 (0.75-22.88)
	Linfocitos T CD8+ CMV-específicos productores de IFN- γ	0.47 (0.07-2.69)	0.99 (0.05-9.45)

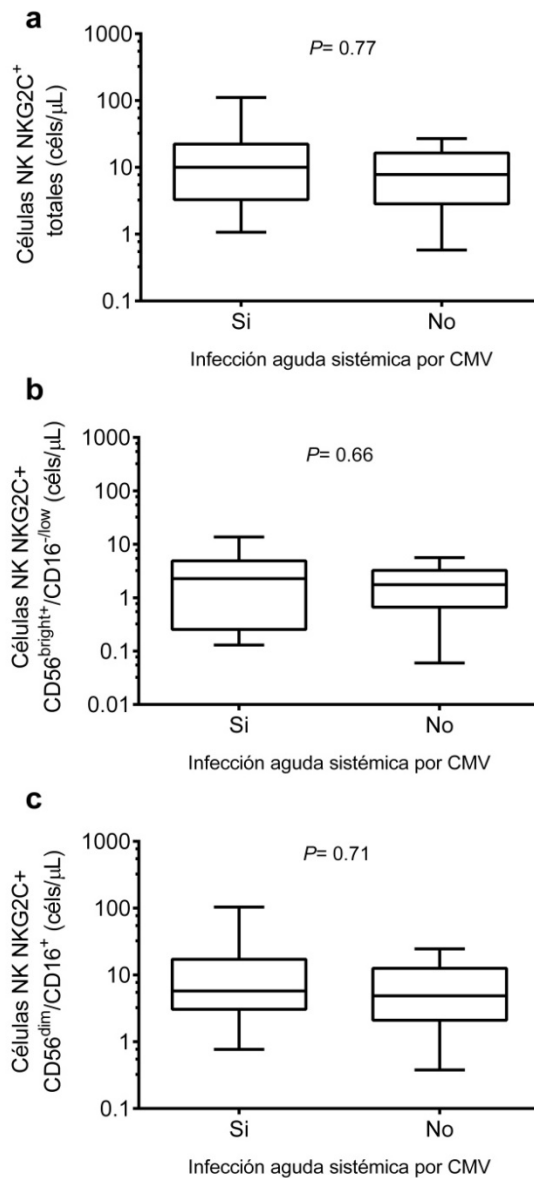


Figura IV.4: Niveles de poblaciones de células NK NKG2C⁺ totales (a), NK NKG2C⁺ CD56^{bright+}/CD16^{low} (b) y NK NKG2C⁺ CD56^{dim}/CD16⁺ (c) durante el primer mes (+30) tras el trasplante en pacientes que posteriormente desarrollaron o no infección aguda sistémica por CMV.

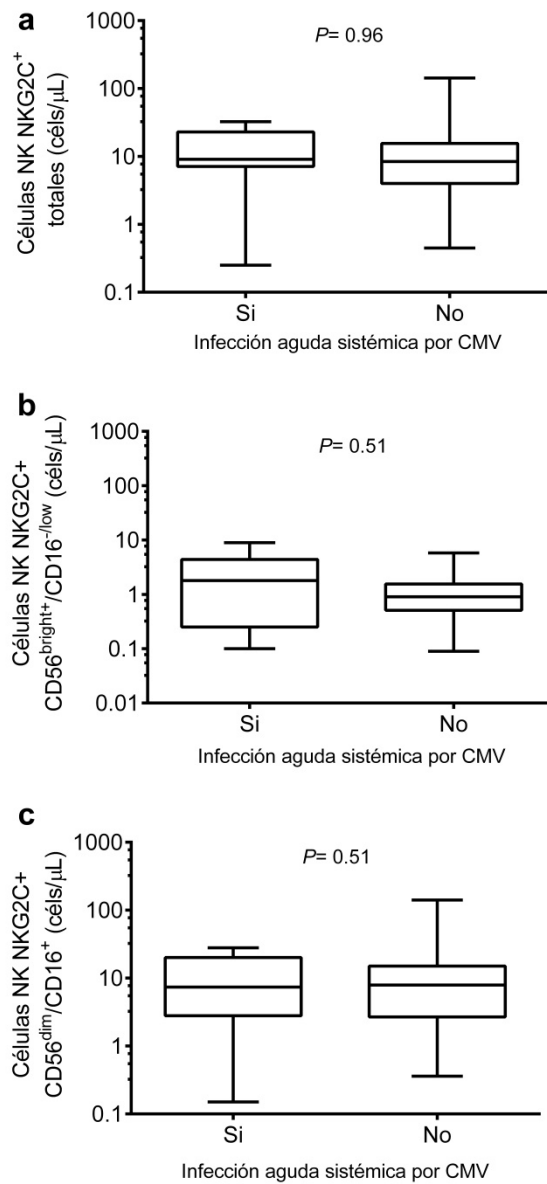


Figura IV.5: Niveles de poblaciones de células NK NKG2C⁺ totales (a), NK NKG2C⁺ CD56^{bright+}/CD16^{low} (b) y NKG2C⁺ CD56^{dim}/CD16⁺ (c) durante el segundo mes tras el trasplante (+60) en pacientes con infección activa sistémica previa y en pacientes sin infección por CMV.

Por lo tanto, la cuantificación de las distintas poblaciones de células NK NKG2C⁺ durante el post-trasplante inmediato no fue capaz de inferir la protección frente al desarrollo de infección activa sistémica en este contexto clínico.

IV.II.1.2 Correlación entre células NK CD94/NKG2C+ y linfocitos T CD8 (específicos frente al CMV) en pacientes sin DNAemia previa.

Posteriormente, se analizó la correlación existente entre las células NK NKG2C+ y los linfocitos T CD8+ específicos frente al CMV productores de IFN- γ , ambos determinados en el día +30 tras el trasplante.

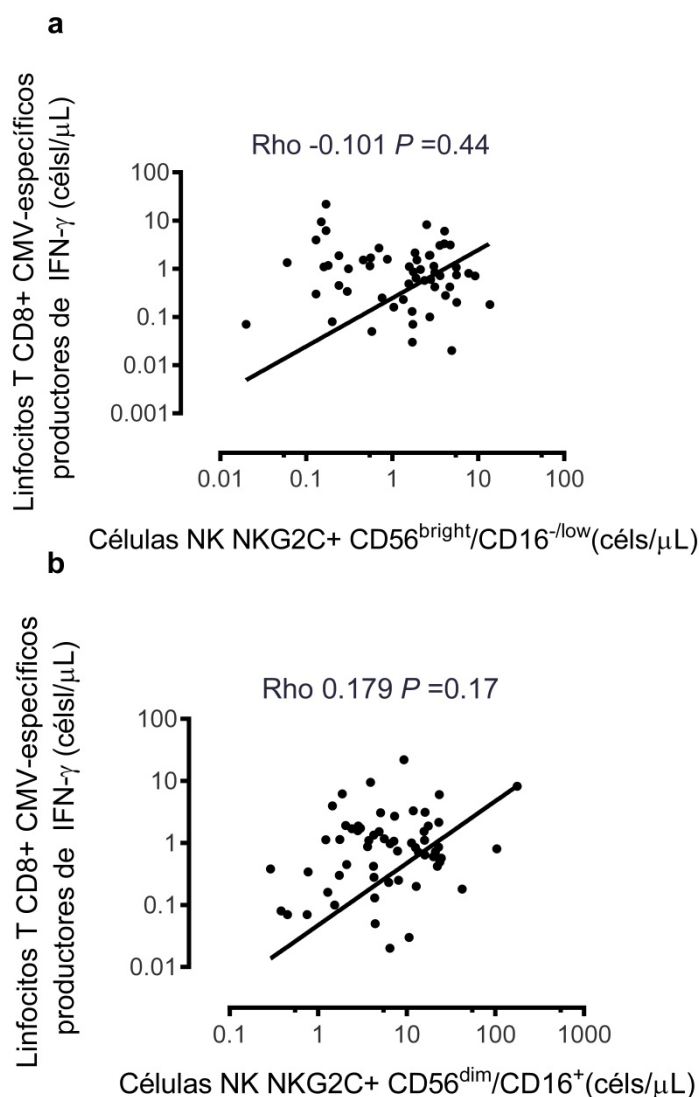


Figura IV.6. Correlación entre niveles de linfocitos T CD8+ funcionales (IFN- γ) específicos frente al CMV y células NK NKG2C+ en el día +30. a) células NK NKG2C+ CD56^{bright}/CD16^{-low} y b) células NK NKG2C+ CD56^{dim}/CD16⁺.

Tal y como se observa en la figura IV.6, no se observó ninguna correlación entre los niveles de células NK NKG2C+ y los niveles de linfocitos T CD8+ funcionales determinados en el día +30.

IV.II.1.3 Correlación entre los niveles de células NK CD94/NKG2C+ y el nivel replicativo viral de CMV

Posteriormente se investigó la relación existente entre la expansión temprana de células NK NKG2C+ y el nivel replicativo de los episodios que se sucedieron posteriormente.

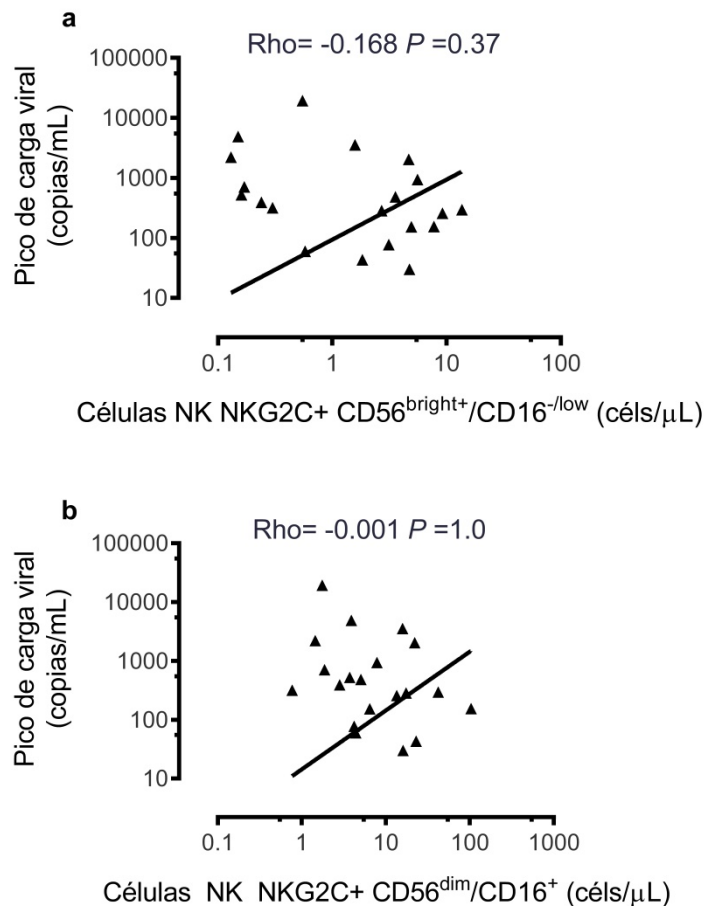


Figura IV.7. Correlación entre niveles de células NK NKG2C+ (determinadas en el día +30) y el pico de carga viral de los episodios posteriores. (a) células NK NKG2C+ CD56^{bright+}/CD16^{-low} y b) células NK NKG2C+ CD56^{dim}/CD16⁺.

No se observó ninguna correlación entre el pico de carga viral y el nivel de las células NK NKG2C+ (Figura IV.7), por lo que la dinámica de los episodios de viremia por CMV no se vio afectada por el grado de expansión precoz de las poblaciones de células NK.

No obstante, se analizó la correlación entre los niveles de células NK NKG2C+ determinados el día +60 y el pico de carga viral de los episodios de viremia previos (entre

los días +0 y +60), observándose una correlación modesta (Rho Spearman 0.57, $P=0.02$), específicamente en la población de células NK NKG2C+ CD56^{dim}/CD16⁺. (Figura IV.8).

Por tanto, el nivel replicativo de los episodios de reactivación viral podría tener efecto sobre el grado de expansión de la población de células NK NKG2C+ con capacidad citotóxica.

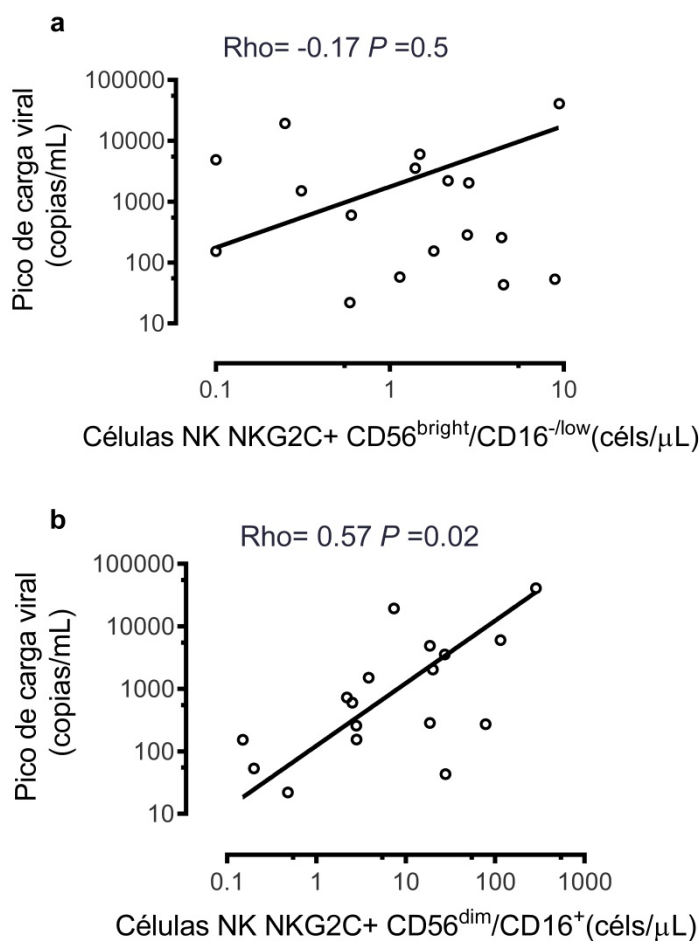


Figura IV.8. Correlación entre niveles de células NK NKG2C+ (día +60) y el pico de carga viral de los episodios previos de infección por CMV. a) células NK NKG2C+ CD56^{bright}/CD16^{low} y b) células NK NKG2C+ CD56^{dim}/CD16⁺.

IV.II.2 Identificación del perfil funcional de las células T CD8+ asociadas con la protección y control de la infección activa sistémica por el CMV. (Artículo IV)

La reconstitución de la inmunidad T (CD8+ y CD4+) es esencial en el control de la infección por CMV y en la prevención de enfermedad orgánica. La determinación de linfocitos totales T CD8+ funcionales y específicos frente a CMV permite la discriminación

de pacientes en riesgo de desarrollo de DNAemia por CMV con un elevado VPP.(Solano et al., 2008; N Tormo et al., 2010). Sin embargo, la naturaleza funcional de dicha respuesta T no se encuentra completamente definida. El objetivo principal del artículo IV consistió en la determinación del perfil funcional de los linfocitos T CD8+ asociados con la prevención y control de la viremia por CMV, y de los factores que afectan a su reconstitución.

Se incluyó un total de 94 pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos durante los años 2010-2012. El período de seguimiento de los pacientes comprendió los primeros 100 tras el trasplante. Se determinaron los siguientes perfiles funcionales mediante el protocolo de tinción de citoquinas intracelulares descrito previamente: células monofuncionales (productores de IFN- γ , TNF- α , o con el marcador de activación CD107a), y células polifuncionales (productoras de IFN- γ / TNF- α , con o sin el marcador CD107a).

IV.II.2.1 Incidencia de infección activa sistémica por CMV durante los primeros 100 días post-trasplante.

Un total de 50 pacientes (53%) desarrolló un episodio inicial de DNAemia por CMV durante los primeros 100 días tras el trasplante. De ellos, en 20 casos la detección de viremia precedió a la primera monitorización inmunológica, mientras que en los 30 restantes se desarrolló posteriormente (Figura IV.9). De los pacientes con episodio de viremia durante los días +30 y +100 hubo datos de inmunidad celular disponibles en 26 de 30 pacientes, mientras que en el caso de pacientes sin infección por CMV hubo en 43 de 44 pacientes.

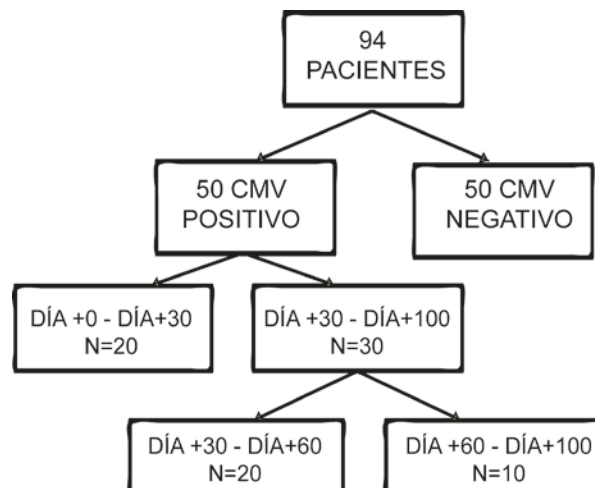


Figura IV.9. Esquema de la incidencia de CMV DNAemia durante los 100 primeros días tras el trasplante.

Entre los factores clínicos y demográficos más relevantes relacionados con la incidencia de infección activa sistémica, el hecho de recibir un trasplante de un donante no relacionado fue el único factor asociado con una mayor incidencia de infección por CMV ($P=0.05$), mientras que por el contrario, los pacientes CMV seronegativos tuvieron una incidencia más baja con respecto a los pacientes CMV seropositivos ($P=0.02$).

IV.II.2.2 Perfiles funcionales en pacientes con y sin infección sistémica por CMV.

En primer lugar se realizó la comparación entre los perfiles funcionales en pacientes con y sin infección por CMV. En la Tabla IV.4 se observan los distintos perfiles funcionales (en los días +30 y +60) de los linfocitos T CD8+ de pacientes sin infección por CMV, comparados con los perfiles funcionales (en el día +30) de pacientes con infección posterior por CMV.

Tabla IV.4. Perfiles funcionales en pacientes con y sin infección por CMV a partir del día +30 y en pacientes sin CMV hasta el día +60 tras el trasplante.

Población de linfocitos T CD8+	Pacientes con Respuesta T detectable (n total)		
	+30	+60	+30
	Ausencia de infección por CMV		Infección por CMV entre +30 y +100
CD107a total	15	11	5
TNF- α total	25	22	10
IFN- γ total	26	23	10
Células monofuncionales (solo)			
CD107a	14	10	4
TNF- α	7	6	1
IFN- γ	8	6	1
Polifuncionales (IFN- γ /TNF- α)	17	17	9
Polifuncionales y CD107a	10	11	3
Monofuncionales y Polifuncionales			
CD107a+ IFN- γ /TNF- α	3	0	2
TNF- α + IFN- γ /TNF- α	5	6	6
IFN- γ + IFN- γ /TNF- α	6	6	6

Como se observa en la Tabla IV.4, aquellos pacientes sin viremia por CMV tuvieron mayor nivel de respuesta T (tanto en el día +30 como en el día +60) de cualquier tipo funcional (monofuncional y polifuncional).

Además, en pacientes sin infección por CMV el nivel (células/ μ L) de células polifuncionales (con o sin el marcador CD107a) fue mayor que en pacientes con viremia por CMV ($P=0.32$), e incluso, aquellos pacientes con células polifuncionales tuvieron una menor necesidad de tratamiento del episodio en comparación con pacientes sin células polifuncionales (Un 46% frente a un 23%, $P=0.22$)

A pesar de todo ello, no se observaron diferencias significativas en el perfil funcional de la respuesta T que permitieran discriminar entre pacientes en riesgo de desarrollo de infección por CMV a partir del día +30. (Figuras IV.10 y IV.11).

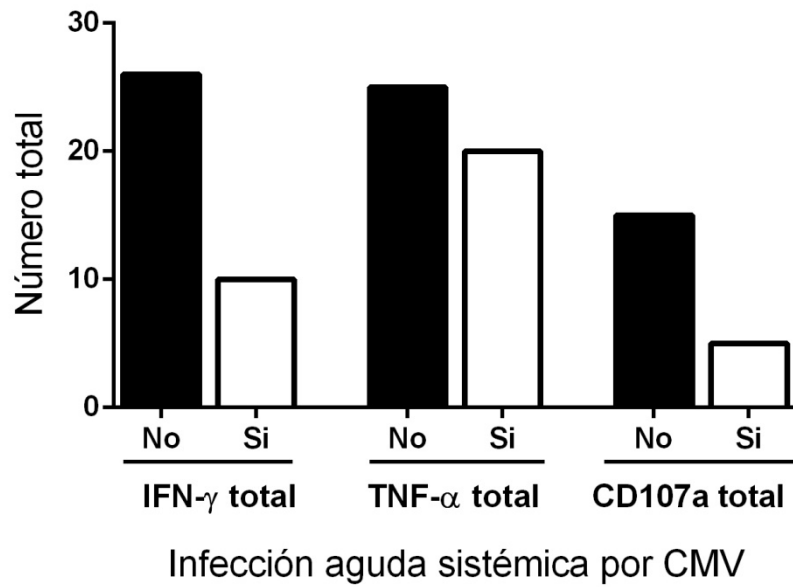


Figura IV.10. Número absoluto de células totales productoras de IFN- γ , TNF- α y CD107a determinadas el día +30 en pacientes que desarrollaron o no subsecuentemente un episodio de infección por CMV.

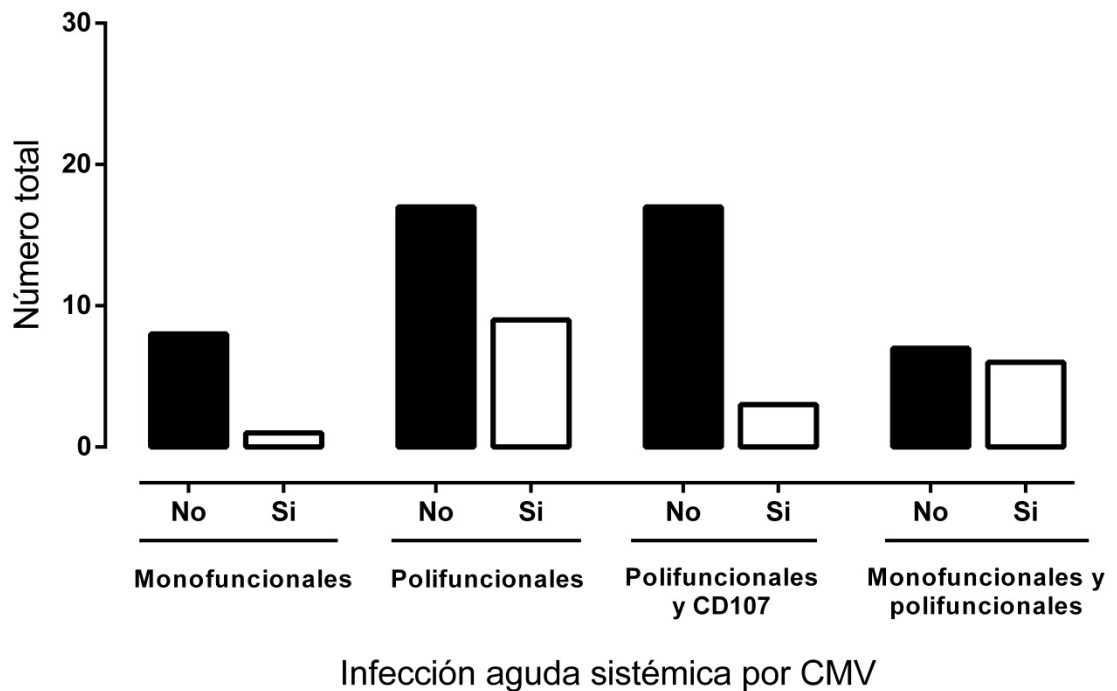


Figura IV.11. Perfiles funcionales de linfocitos T CD8+ determinados el día +30 en pacientes con y sin un episodio subsecuente de infección por CMV.

Posteriormente, se investigó la relación entre la capacidad funcional de la respuesta T y la dinámica de la replicación viral de aquellos episodios que sucedieron durante los días +30 y +100. Tal y como se observa en las Tablas IV.5 y IV.6, la presencia de células polifuncionales (con o sin el marcador CD107a), estaba asociada con una menor capacidad replicativa viral, es decir, con cargas inicial y pico mucho menores.

Tabla IV.5. Relación entre parámetros cinéticos de los episodios de DNAemia por CMV y la existencia de linfocitos T CD8+ polifuncionales.

Parámetro	Linfocitos T CD8+ Polifuncionales (Productores de IFN- γ y TNF- α)		P
	Si	No	
Pico de carga viral, mediana (rango)	295 (30-19266)	1592 (133-83665)	0.04
Carga inicial, mediana (rango)	155 (2-3540)	575 (4-83665)	0.05

Tabla IV.6. Relación entre parámetros cinéticos de los episodios de DNAemia por CMV y la presencia de linfocitos T CD8+ polifuncionales (con el marcador de activación CD107a).

Parámetro	Linfocitos T CD8+ Polifuncionales con marcador CD107a		P
	Si	No	
Pico de carga viral, mediana (rango)	58 (30-77)	1592 (133-83665)	0.006
Carga inicial, mediana (rango)	28 (2-77)	528 (4-83665)	0.02

Además, se determinaron los factores clínicos y demográficos capaces de afectar a la reconstitución de la respuesta T polifuncional (edad, sexo, regímenes de acondicionamiento y profilaxis, estatus serológico, etcétera) en pacientes sin replicación por CMV previa. Ninguno de los factores clínicos mencionados tuvo un impacto significativo en la reconstitución de células polifuncionales en la cohorte de pacientes incluida. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mayor adquisición de células polifuncionales en pacientes que recibieron un trasplante de donantes CMV-seropositivos con respecto a los donantes seronegativos.

IV.II.2.3 Correlación entre células T CD8+ productoras de IFN- γ (total) y células polifuncionales

Se analizó la correlación existente entre los linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ y los linfocitos polifuncionales (productores de IFN- γ y TNF- α) en pacientes sin viremia por CMV. Tal y como se observa en la Figura IV.12, se observó una buena correlación entre los niveles totales de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ y la subpoblación de linfocitos T con capacidad polifuncional.

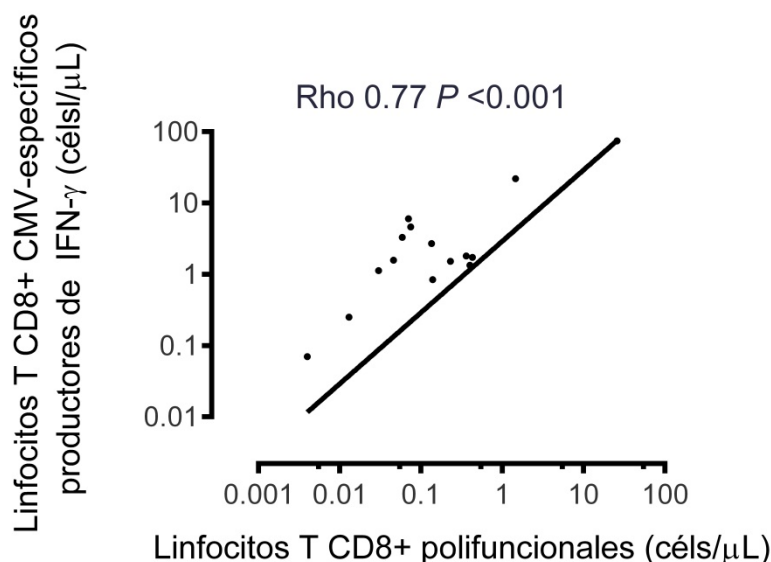


Figura IV.12. Correlación entre linfocitos T CD8+ polifuncionales (IFN- γ /TNF- α) y linfocitos totales productores de IFN- γ .

Mediante análisis por curva ROC, se estableció un punto de corte de células polifuncionales óptimo de 0.3 células/ μ L capaz de conferir protección frente a la infección activa sistémica por CMV con un valor predictivo positivo (VPP) de 75% y un valor predictivo negativo (VPN) de 40%.

IV.II.2.4 Evaluación de la utilidad clínica de la determinación de funcionalidad de las poblaciones de linfocitos T CD8+

Con el fin de investigar la utilidad clínica de la cuantificación de las distintas poblaciones funcionales de los linfocitos T CD8+ CMV específicos, se realizó el cálculo de los valores predictivo positivo y negativo de cada una de las determinaciones en la protección frente a la infección por CMV. De esta forma, la reconstitución temprana (+30) de los linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ (total), de cualquier magnitud, tuvo un VPP

de 72.2% y un VPN de 48.5%. De igual forma, la detección de linfocitos T CD8+ productores de TNF- α (total) tuvo un VPP de 71% y un VPN 47%, mientras que la detección de linfocitos T CD8+ productores CD107a tuvo un VPP de 75% y un VPN de 43%.

En cuanto a la determinación de subpoblaciones de linfocitos funcionales, la detección de T CD8+ polifuncionales (IFN- γ / TNF- α) tuvo un VPP de 65% y un VPN de 40% y la detección de T CD8+ polifuncionales con el marcador CD107a tuvo un VPP de 66% y un VPN de 47%.

Cabe destacar que la detección de linfocitos T CD8+ CMV específicos productores de IFN- γ mayores a una célula/ μ L tuvo un VPP del 100% y un VPN del 53% con respecto a la protección frente a la infección sistémica por CMV.

IV.II.3 Investigación del rol de los anticuerpos que neutralizan la infección en células epiteliales en el control de la infección activa sistémica por CMV (Artículo V).

Los Ac frente al complejo gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128, más efectivos que los anticuerpos frente a gB en la neutralización de la infección en células epiteliales, se han correlacionado con el control frente a CMV en individuos inmunocompetentes y con la protección de la transmisión fetal (Lilleri et al., 2012; Lilleri et al., 2013). EL objetivo del artículo V consistió en determinar el papel concreto de los anticuerpos que neutralizan la infección en células epiteliales (ACNIE) en el control de la infección por CMV.

Para ello, se determinó el título de ACNIE mediante ensayo de neutralización en un total de 338 sueros procedentes de un total de 39 pacientes (CMV seropositivos) receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Las muestras de suero se obtuvieron semanalmente hasta el día 100 tras el trasplante.

IV.II.3.1 Cinética de los anticuerpos en suero de pacientes con y sin infección activa sistémica por CMV

Un total de 24 pacientes (61.5%) desarrolló un episodio inicial de infección activa sistémica durante los primeros 100 días tras el trasplante. De ellos, 12 (50%) requirieron tratamiento antiviral, mientras que los 12 restantes se aclararon sin necesidad de tratamiento.

En primer lugar se determinó la cinética de ACNIE en suero de las muestras disponibles antes del inicio del episodio de viremia. Se utilizaron como controles las

muestras de suero disponibles de los pacientes sin infección activa obtenidas durante un marco de tiempo comparable.

Con el objetivo de determinar el perfil cinético precoz de los títulos de ACNIE, se incluyeron aquellos pacientes que tuvieron más de una muestra disponible antes del episodio de CMV. En total se incluyeron 18 pacientes (60 muestras) con infección por CMV y 15 pacientes (76 muestras) sin CMV como controles. Se determinó además, la cinética de los títulos de IgG específicos frente a CMV en un total de 31 pacientes.

El perfil cinético precoz de los títulos de ACNIE fue comparable en los pacientes que desarrollaron posteriormente un episodio de replicación de CMV y en los pacientes sin viremia por CMV durante el periodo de estudio (Figura IV.13).

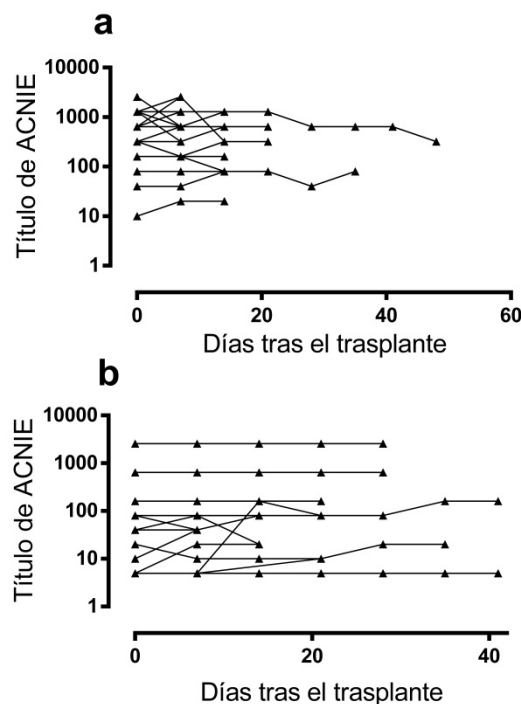


Figura IV.13. Cinética de los títulos de ACNIE en pacientes con (a) y sin (b) infección activa sistémica por CMV determinada previamente al inicio del episodio.

Los títulos de ACNIE permanecieron estables en el 72% y en el 66% de los pacientes con y sin infección activa sistémica por CMV, respectivamente. ($P=0.73$). En el resto de pacientes se observaron incrementos, descensos y fluctuaciones de los niveles de ACNIE en ambos grupos por igual.

En cuanto al perfil cinético de los títulos de IgG frente a CMV, no se observaron diferencias que permitieran discriminar entre pacientes con y sin infección por CMV, ya que ambas cinéticas fueron comparables en ambos grupos. (Figura IV.14).

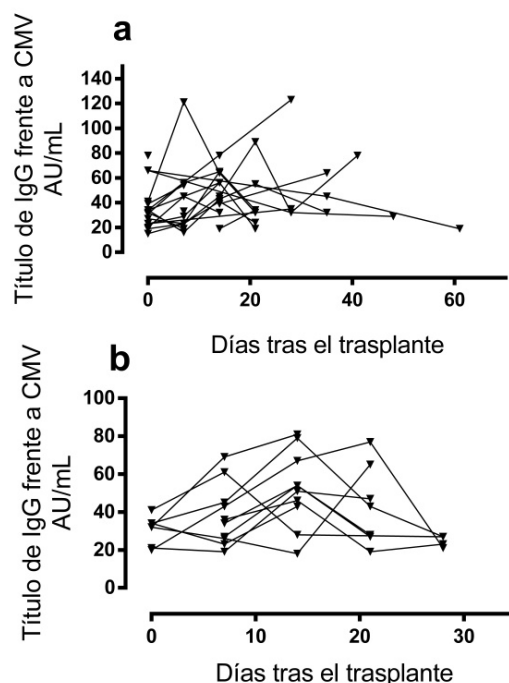


Figura IV.14. Cinética de los títulos de IgG en pacientes con (a) y sin (b) infección activa sistémica por CMV determinada previamente al inicio del episodio.

IV.II.3.2 Predicción del desarrollo de viremia mediante la cuantificación de ACNIE.

Posteriormente, se realizó la determinación los niveles de IgG y de ACNIE en pacientes con y sin DNAemia por CMV con el objetivo de investigar si los niveles eran capaces de discriminar entre ambos grupos de pacientes.

En la tabla IV.7 se muestran los niveles basal (mediana 0 días) y pico (mediana 14 días) de los ACNIE en muestras previas al desarrollo de CMV y en pacientes control. Aquellos pacientes que posteriormente desarrollaron un episodio de DNAemia tuvieron niveles basal y pico de título de ACNIE mucho mayores que los pacientes sin CMV. (Figura IV.15)

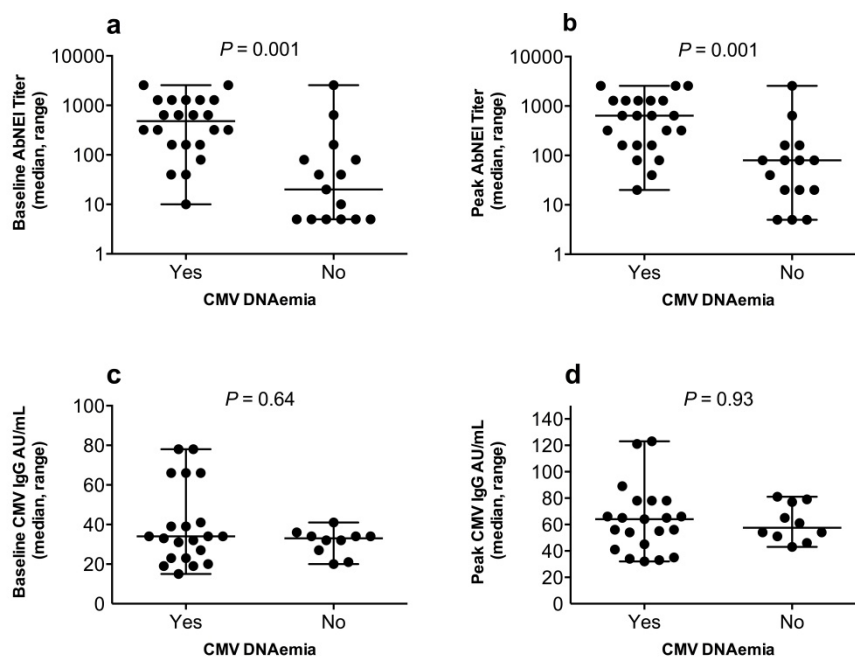


Figura IV.15. Títulos basal (a, c) y pico (b, d) de Ac IgG y ACNIE en pacientes con y sin DNAemia por CMV.

Mediante análisis ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se estableció un punto de corte del título basal de ACNIE de 4.7 (\log_2), correspondiente a un título de 1/120, capaz de predecir el desarrollo de viremia por CMV con una sensibilidad del 83% y una especificidad de 80%. (Figura IV.16). De hecho, los pacientes con un nivel basal de ACNIE mayor a 4.7 (\log_2) tuvieron un riesgo (Odds Ratio) 20 veces mayor de desarrollar un episodio de DNAemia por CMV en comparación con aquellos pacientes con niveles basales inferiores.

Sin embargo, el nivel basal y pico de los títulos de Ac IgG frente a CMV no difirió entre pacientes con y sin CMV, por lo que no se pudo establecer un punto de corte que permitiera discriminar entre ambos grupos de pacientes. (Figura IV.15).

Cabe destacar que los factores clínicos y demográficos de riesgo para el desarrollo de CMV fueron comparables en pacientes con nivel basal y pico mayor o menor a 4.7 \log_2 .

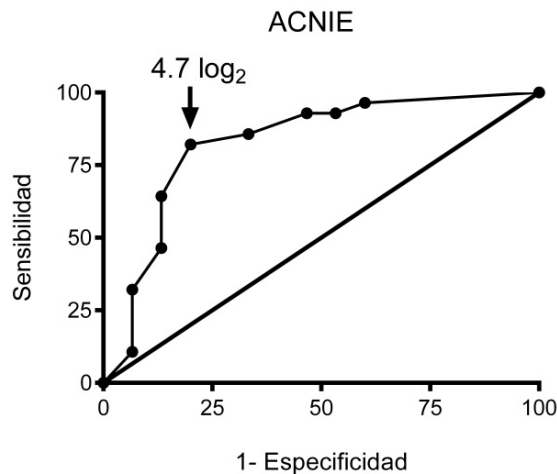


Figura IV.16. Curva ROC de los títulos de ACNIE determinados basalmente.

IV.II.3.3 Influencia de ACNIE sobre la dinámica y la cinética de replicación viral.

Tras la investigación del papel de los ACNIE en la protección frente al desarrollo de viremia, se investigó su rol en la cinética y en el aclaramiento de los episodios de viremia por CMV.

La cinética de ACNIE durante los episodios de viremia se investigó mediante la determinación de los títulos en 20 pacientes con infección por CMV (110 muestras). Tal y como se observó anteriormente, los títulos se mantuvieron constantes en la mayor parte de los episodios. En los restantes, los títulos aumentaron, fluctuaron o disminuyeron indistintamente. De igual forma, la cinética de ACNIE fue similar en muestras de suero de pacientes controles obtenidas en marcos de tiempo comparables.

Adicionalmente, tanto la carga inicial y pico de carga viral como la duración de viremia en plasma fueron comparables en pacientes con niveles de ACNIE por encima o por debajo del punto de corte de $4.7 \log_2$. (Tabla IV.8).



Tabla IV.7. Datos relevantes de los pacientes incluidos en el estudio.

Pte	Serología CMV	Viremia por CMV	Tratamiento antiviral	Pico de carga viral (copias/mL)/ Duración viremia (días)	Niveles (Log ₂) basales ACNIE /Niveles Pico ACNIE	Linfocitos T CD8 ⁺ (IFN γ /TNF α) (cél/s/ μ L)
1	D+R+	Si	Si	1062 / 45	7.85 / 7.85	NA
2	D-R+	Si	No	272 / 115	6.46 / 6.46	NA
3	D+R+	Si	No	725 / 64	7.15 / 7.15	NA
4	D+R+	Si	No	94 / 19	NA / NA	NA
5	D-R+	Si	Si	13165 / 40	7.85 / 7.85	NA
6	D+R+	Si	Si	3656 / 89	5.77 / 5.77	0.00 †
7	D+R+	Si	No	106 / 23	5.08 / 5.08	2.49 †
8	D+R+	Si	No	74 / 44	6.46 / 7.15	1.66 †
9	D+R+	Si	Si	40851 / 73	5.77 / 5.77	5.83 †
10	D-/R+	Si	No	277 / 49	3.69 / 3.69	0.00 †
11	D-/R+	Si	Si	1108 / 57	3.69 / 4.38	0.00 †
12	D+R+	Si	Si	17270 / 150	NA / NA	0.00 †
13	D+R+	Si	Si	2842 / 36	7.15 / 7.15	1.10
14	D-/R+	Si	Si	1455 / 142	5.77 / 5.77	0.06
15	D-/R+	Si	Si	2039 / 124	5.77 / 5.77	0.23
16	D+R+	Si	No	144 / 67	7.15 / 7.15	0.00
17	D+R+	Si	No	53 / 18	7.15 / 7.85	0.94
18	D-/R+	Si	Si	4873 / 127	6.46 / 6.46	2.6
19	D+R+	Si	No	593 / 36	6.46 / 6.46	0.31
20	D-/R+	Si	No	60 / 7	7.15 / 7.15	0.02
21	D+R+	Si	No	53 / 7	4.38 / 4.38	1.49
22	D+/R-	Si	Si	4828 / 30	2.30 / 3.00	0.00
23	D-/R+	Si	Si	2094 / 34	5.77 / 6.46	0.00
24	D+R+	Si	No	907 / 41	5.08 / 5.08	0.00
25	D+R+	No	NA	NA	6.46 / 6.46	NA
26	D+R+	No	NA	NA	5.08 / 5.08	NA
27	D+R+	No	NA	NA	3.00 / 3.00	NA
28	D-/R+	No	NA	NA	1.61 / 5.08	NA
29	D-/R+	No	NA	NA	1.61 / 1.61	NA
30	D+R+	No	NA	NA	3.69 / 4.38	0.79
31	D-/R+	No	NA	NA	7.85 / 7.85	0.74
32	D-/R+	No	NA	NA	4.38 / 4.38	0.09
33	D+R+	No	NA	NA	2.30 / 3.69	0.02
34	D-/R+	No	NA	NA	1.61 / 3.00	0.49
35	D+R+	No	NA	NA	4.38 / 4.38	2.01
36	D+R+	No	NA	NA	3.69 / 4.38	0.00
37	D-/R+	No	NA	NA	1.61 / 3.00	0.00
38	D+R+	No	NA	NA	1.61 / 1.61	0.00
39	D-/R+	No	NA	NA	1.61 / 1.61	0.00

Tabla IV.8. Características cinéticas de los episodios de infección activa en pacientes con niveles basal y pico de ACNIE superiores e inferiores al punto de corte de $4.7 \log_2$

Parámetro, mediana (rango)	Título Basal ACNIE		Título pico de ACNIE	
	<4.7 (\log_2)	>4.7 (\log_2)	<4.7 (\log_2)	>4.7 (\log_2)
Carga inicial (copias/mL)	52 (16-91)	54 (10-188)	51 (16-91)	55 (10-188)
Pico de carga viral (copias/mL)	693 (53- 4828)	985 (53- 40851)	1108 (53- 17270)	907 (53- 40851)
Duración viremia (días)	39.5 (7-57)	44.5 (7-150)	49 (7-150)	44 (7-142)

Cabe destacar el hecho de que no hubo correlación (Rho Spearman -0.3, $P=0.40$) entre el pico de carga viral de los episodios de infección activa sistémica y los títulos de ACNIE durante los mismos (Figura IV.17), indicando que tanto la cinética de aclaramiento viral como la necesidad de tratamiento antiviral fueron independientes de los niveles de Ac.

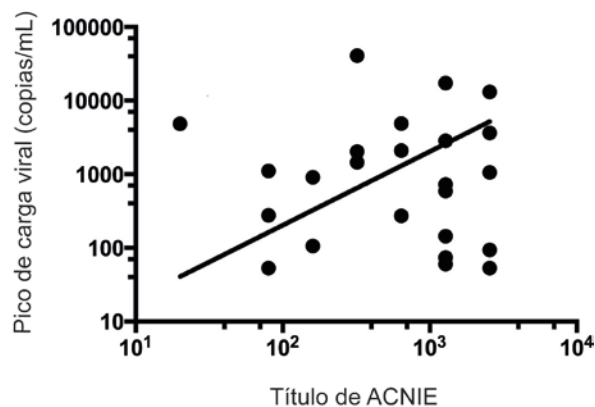


Figura IV.17. Correlación entre el pico de carga viral (copias/mL) y el título de ACNIE durante los episodios de DNAemia por CMV.

IV.II.3.4 Rol de los linfocitos T CD8+ (CMV-específicos) polifuncionales (IFN- γ /TNF- α) en la modulación del grado de replicación viral durante los episodios de infección por CMV.

Paralelamente a la cuantificación de ACNIE, se realizó la cuantificación de linfocitos T CD8+ polifuncionales. En total hubo datos disponibles de respuesta inmunológica en 29 de 39 (74.4%) pacientes, 19 de los cuales (65.5%) tuvieron infección por CMV. Finalmente para el análisis fueron excluidos 7 pacientes (pacientes 6-12, Tabla IV.7) por



el hecho de desarrollar infección por CMV antes de la primera monitorización inmunológica en el día +30.

Presentaron respuestas detectables polifuncionales en 8 y en 6, de 12 y 10 pacientes con y sin infección por CMV, respectivamente ($P=0.87$), por lo que ambos grupos no difirieron en cuanto a la expansión temprana de linfocitos T CD8+. Además, los niveles de los linfocitos T CD8+ fueron comparables en ambos grupos de pacientes (mediana 0.31 céls/ μ L y 0.61 céls/ μ L, en pacientes con y sin CMV, respectivamente).

A pesar de ello, tal y como se observa en la Tabla IV.9, aquellos pacientes con niveles detectables en el día +30 tuvieron episodios de reactivación de CMV con cargas virales mucho menores que los pacientes sin expansión de células T CD8+, aunque esta diferencia no llegó a tener significación estadística. Asimismo, la duración de los episodios fue mucho menor en pacientes con células polifuncionales detectables (Tabla IV.9).

Tabla IV.9. Características cinéticas de los episodios de infección activa en pacientes con y sin expansión de linfocitos T CD8+ polifuncionales.

Parámetro	Linfocitos T CD8+ polifuncionales		P
	Si	No	
Carga inicial (copias/mL)	52 (33-83)	60 (10-188)	0.40
Pico de carga viral (copias/mL)	350 (53-40851)	1455 (60-17270)	0.33
Duración viremia (días)	30 (7-73)	57 (7-150)	0.50

En el artículo III se investigó el papel de las células NK NKG2C+ como marcador temprano de control de la infección activa sistémica por CMV en una cohorte de pacientes con reconstitución de la inmunidad T específica frente al CMV. Tal y como se observó en estudios previos del grupo en pacientes carentes de respuesta inmune celular (Muñoz-Cobo et al., 2014), el nivel de las células NK NKG2C determinadas durante el primer mes tras el trasplante no permitió discriminar entre aquellos pacientes en riesgo de desarrollo de infección activa sistémica. Igualmente, la magnitud de la expansión celular de las distintas poblaciones de células NK NKG2C no tuvo ningún efecto sobre el nivel replicativo (pico de carga viral) de los episodios subsecuentes.

Los datos obtenidos contradicen los aportados por (Barron et al., 2009), donde se observó una menor proporción de episodios de CMV en pacientes con niveles de células NK funcionales (productoras de IFN- γ). Adicionalmente, en los aportados por (Kheav et al., 2014) encontraron que la determinación de células NK NKG2C+ en el día +90 tras el trasplante en pacientes con serología positiva era capaz de inferir el riesgo de desarrollo de CMV.

Estas discrepancias pueden deberse a varias causas:

En primer lugar, se realizó el análisis inmunológico durante el primer y el segundo mes tras el trasplante, mientras que en los trabajos mencionados anteriormente, se realizó durante los días +90 y +180. Por otro lado, se analizaron únicamente episodios iniciales tras el TPH, mientras que en el resto de trabajos se incluyeron tanto episodios iniciales como recurrentes. Asimismo, los episodios de infección activa sistémica se definieron como la presencia de cualquier carga viral detectable en plasma, mientras que en el estudio de (Kheav et al., 2014), la definición de infección por CMV incluyó solo episodios que superaron las 1000 copias/mL en plasma, valor que coincide con el punto de corte de inicio de tratamiento anticipado en nuestro centro. Otra diferencia notable que puede influir en la generación de discrepancias es que se incluyeron pacientes CMV seronegativos en la cohorte de pacientes.

Indudablemente el estudio presenta ciertas limitaciones que no pueden ser ignoradas. Por un lado, el reducido tamaño muestral de pacientes, que impide extraer conclusiones más firmes. Por otro lado, a pesar de que se determinaron en paralelo los linfocitos T CD8+ funcionales, no se realizó la investigación de la capacidad funcional de las células NK NKG2C+. Además, en el manejo de la infección activa por CMV se



emplearon PCR con distintos límites de detección durante la monitorización de la carga viral en los distintos centros participantes.

En conclusión, la monitorización temprana de las células NK NKG2C+ no permitió inferir el riesgo de desarrollo de viremia en el paciente trasplantado. A pesar de ello, no se puede descartar totalmente una implicación de las células NK en la prevención y control de la infección por CMV.

En el artículo IV se analizaron las características funcionales de los linfocitos T CD8+ CMV específicos en pacientes que desarrollaron o no un episodio de infección activa por CMV con el objetivo de identificar un perfil funcional asociado con la protección frente a la viremia por CMV.

En general, los pacientes sin infección por CMV tuvieron una mayor reconstitución de células T CD8+ de cualquier tipo funcional.

Aquellos pacientes con niveles detectables de células polifuncionales (aquellas capaces de producir IFN- γ , TNF α y CD107a) tuvieron episodios de infección activa sistémica de menor capacidad replicativa (menor carga viral plasmática) en comparación con los pacientes sin expansión de células polifuncionales. E incluso, aquellos pacientes con células polifuncionales tuvieron menor necesidad de tratamiento antiviral.

Sin embargo, la presencia de células polifuncionales no fue capaz de predecir la protección frente al desarrollo de CMV. No se encontró ningún perfil funcional significativamente asociado con protección o control frente a la viremia por CMV. De hecho, en un tercio de los pacientes sin CMV se detectaron únicamente células monofuncionales (productoras de un único tipo de citoquina), lo que podría indicar que en ciertos pacientes podrían ser suficientes en el control de los episodios de replicación de CMV.

Posteriormente se investigaron los factores asociados con la reconstitución de células polifuncionales en pacientes sin viremia previa, no encontrándose ningún factor clínico o demográfico que tuviera un impacto significativo en los pacientes incluidos.

Adicionalmente, se determinó la correlación y el VPP y VPN entre los linfocitos T CD8+ totales productores de IFN- γ y los linfocitos T CD8+ polifuncionales (IFN- γ /TNF- α), obteniendo una buena correlación y un resultado de VPP (70%) y VPN (40%) comparable entre ambos tipos celulares. No obstante, cabe destacar que la detección de linfocitos T

CD8+ productores de IFN- γ >1 cél/ μ L fue capaz de predecir la ausencia de infección por CMV con un VPP del 100% y un VPN de 53%, por lo que posee mayor valor clínico.

En conclusión, la cuantificación de linfocitos T CD8+ polifuncionales tuvo menor poder discriminante que los linfocitos T CD8+ totales productores de IFN- γ como marcador de protección frente a la infección por CMV.

A pesar de ello, el estudio presenta ciertas limitaciones que se deben mencionar. En primer lugar, el tamaño muestral de la cohorte es moderado y no se realizó la determinación de otras citoquinas como IL-2 o MIP-1 β , que pueden desempeñar un papel importante en la protección frente a CMV. Además, la detección de células polifuncionales en sangre periférica puede no ser un reflejo fiel de la funcionalidad de las células existentes en mucosas y órganos, donde CMV se reactiva inicialmente.

Adicionalmente, se realizó la detección de células funcionales únicamente frente a los antígenos IE-1 y pp65, por lo que otros antígenos relevantes en la protección frente a CMV pueden no haber sido detectados por el protocolo empleado. Tampoco se realizó la detección de linfocitos T CD4+, esenciales en la protección a largo plazo.

Cabe destacar que la síntesis y secreción de citoquinas es un proceso que se realiza de forma secuencial y programada, no de forma simultánea. Por lo que durante la monitorización inmunológica una determinada célula podría haber sido erróneamente clasificada, por el momento concreto en el que se realizó la monitorización.

Por último, se realizó la monitorización de la inmunidad T en los primeros momentos tras el trasplante, pero no se investigó la presencia de células polifuncionales tras los 100 días post-trasplante, lo que podría tener interés principalmente en aquellos pacientes que desarrollan de forma tardía enfermedad orgánica por CMV o enfermedad de injerto contra huésped.

En el artículo V se investigó la participación de los ACNIE en la prevención y control de la infección por CMV en el marco del trasplante alogénico.

Tras el análisis de los datos, se puede concluir que los ACNIE no parecen desempeñar un papel relevante en la resolución o prevención de la DNAemia por CMV, ya que, el perfil cinético de los ACNIE fue indistinguible en aquellos pacientes con o sin CMV, y el nivel replicativo de los episodios de viremia fue independiente de los títulos previos de ACNIE. Además de ello, la cinética de los títulos de ACNIE no tuvo relación con la cinética de replicación viral durante los episodios; en efecto, en la mayoría de los



casos en los que la viremia se aclaró del plasma, los títulos de ACNIE se mantuvieron constantes.

Paradójicamente, se observó que pacientes con niveles basales de ACNIE elevados tenían mayor incidencia posterior de viremia. De hecho, se pudo establecer un punto de corte de $4.7 \log_2$ capaz de predecir el desarrollo de infección por CMV con una sensibilidad y especificidad del 80%. Este hecho puede deberse a varios motivos: En primer lugar, una replicación temprana en órganos o mucosas podría activar células B residuales de memoria del propio receptor, o transferidas a través del injerto del donante, dando lugar a niveles elevados de ACNIE (Yamazaki et al., 2014). Otra posibilidad reside en el hecho de que en última instancia, los niveles de ACNIE basales podrían ser un reflejo de niveles latentes del virus, proporcionando una medida indirecta del riesgo potencial de reactivación. (Forster et al., 2010)

Por último, cabría la posibilidad de que una fracción de los ACNIE determinados pudiera potenciar la infectividad de CMV. En el trabajo aportado por (Maidji, McDonagh, Genbacev, Tabata, & Pereira, 2006) se observó que Ac de escasa capacidad neutralizante podían potenciar la infección placentaria mediante la transcitosis de complejos CMV-IgG mediada por receptores Fc.

La falta de contribución de los ACNIE en el control de la viremia por CMV observada está en contraposición con los datos aportados sobre infección por CMV en el embarazo (Lilleri et al., 2012; Lilleri et al., 2013), donde la transmisión fetal se asociaba con la generación tardía de Ac frente al complejo gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128 durante la infección primaria.

Una explicación plausible es que los ACNIE pudieran ser más efectivos en el control de la infección por CMV en individuos inmunocompetentes, más que en individuos inmunodeprimidos. Además, no se debe olvidar el hecho de que más de un 50% de los individuos tenían respuesta T polifuncional.

Tras la investigación del papel de las células NK NKG2C+ y de los linfocitos T CD8+ polifuncionales (IFN- γ /TNF- α) en la protección y control frente a la infección por CMV en los primeros estadios tras el trasplante alogénico, se puede concluir que la cuantificación de células NK NKG2C+ no tiene utilidad clínica como marcador temprano de protección frente al desarrollo de CMV. Asimismo, la determinación de linfocitos T CD8+ polifuncionales tiene el mismo valor clínico (similar VPP y VPN) como marcador de protección que la determinación de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ total.

Adicionalmente, aunque los ACNIE no parecen participar de forma notable en la resolución y control de los episodios de infección por CMV, su determinación podría ser útil como marcador indirecto de riesgo de viremia por CMV, lo cual podría tener su interés en el marco de una profilaxis antiviral dirigida e individualizada.

IV.III. Identificación de marcadores biológicos de riesgo de infección activa sistémica por CMV (Artículo VI)

IV.III.1 Investigación de la utilidad potencial del perfil metabolómico plasmático en la predicción de desarrollo de viremia por CMV.

La tecnología de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permite detectar perfiles de metabolitos y compuestos en numerosas muestras clínicas. Dicho análisis “Metabolómico” es una herramienta que se demuestra eficaz en el diagnóstico, evolución y monitorización de diversas enfermedades infecciosas, así como en el estudio de las interacciones entre huésped y microorganismo. (Yamazaki et al., 2014).

El objetivo del artículo VI consistió en la identificación de un perfil metabolómico en plasma capaz de discriminar entre pacientes con y sin infección activa sistémica en pacientes receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.

Se incluyó un total de 53 pacientes, 34 con infección por CMV y 19 sin infección por CMV. Los factores clínicos y demográficos más relevantes se encontraron equilibrados en ambos grupos de pacientes. Se obtuvo una muestra semanal de plasma hasta el día 100 tras el trasplante, analizándose en total 397 muestras de plasma, de las cuales, 105 muestras correspondieron a pacientes con infección por CMV y 292 muestras a pacientes sin CMV.

IV.III.1.1 Perfil metabolómico plasmático en pacientes que desarrollaron infección activa por el CMV.

En primer lugar se investigó el perfil metabolómico asociado con la presencia de replicación viral durante los episodios de infección por CMV, en comparación con los pacientes control. Las muestras de plasma utilizadas como control (n=292) se obtuvieron en un marco de tiempo comparable al de las muestras de pacientes con replicación por CMV (n=105).

Tras realizar el análisis por RMN- H^1 de las muestras, se encontró una diferencia metabólica robusta entre las muestras obtenidas durante la replicación por CMV y las muestras control. Se obtuvo un espectro con picos claros y definidos de un total de 42 metabolitos. Tras realizar el análisis PLS-DA se obtuvo un perfil global diferencial para las muestras que fueron positivas para CMV, con una capacidad de clasificación (obtenida en ensayos de validación cruzada) de 81%. La bondad de ajuste del modelo fue bastante alta, con un R^2X de 0.514, un R^2Y de 0.711 y un Q^2 de 0.592.

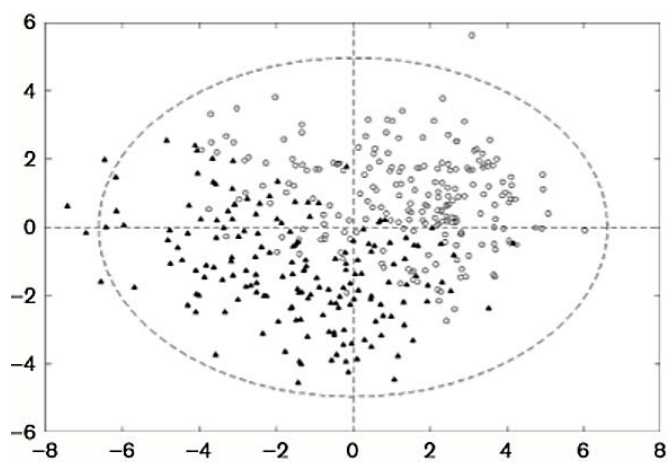


Figura IV.18. Modelo obtenido por PLS-DA en muestras con y sin replicación por CMV.

Las regiones espectrales y los picos con una mayor contribución al modelo se ordenaron en función su puntuación “VIP score” (Figura IV.18), y posteriormente los picos se cuantificaron y analizaron.

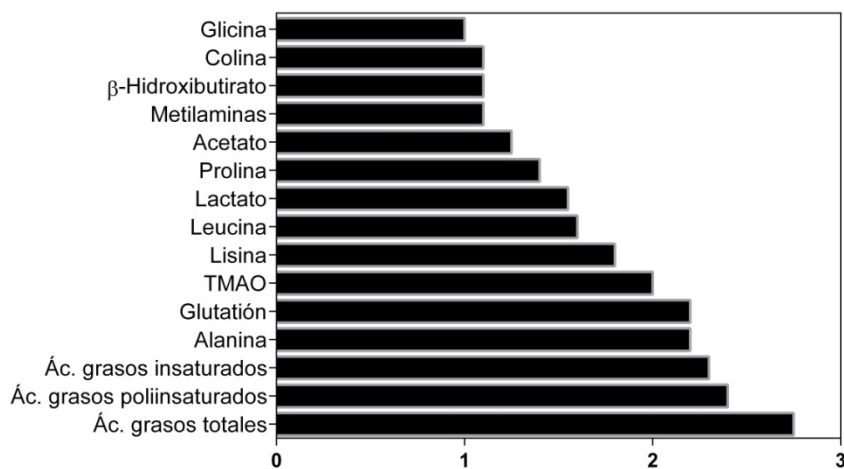


Figura IV.19. Picos de los metabolitos ordenados en función de su grado de contribución al modelo obtenido por PLS-DA.

Posteriormente, se calculó la diferencia de la concentración media de cada metabolito en las muestras CMV positivas y en las muestras control, normalizándose en función de las muestras control. El grado de variación de cada metabolito se muestra en la Figura IV.19. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en 8 de los 15 metabolitos. Específicamente, se observaron incrementos en los niveles de metabolitos involucrados en el metabolismo de ácidos grasos (ácidos grasos totales y ácidos grasos poliinsaturados), glutatión total y acetato; por el contrario, se observó una disminución en los niveles de lisina.

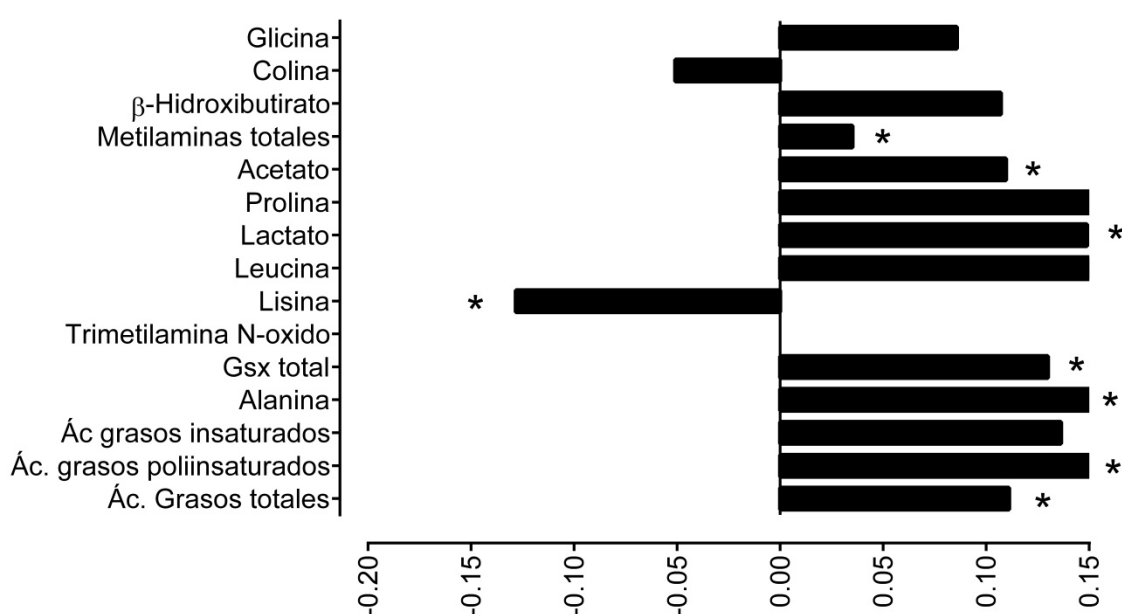


Figura IV.20. Variación en el contenido metabólico de las muestras de pacientes con infección por CMV con respecto a las muestras de pacientes control.

Dado el hecho de que las infecciones bacterianas sistémicas (Bacteriemias) son capaces de ejercer un efecto en el perfil metabólico plasmático, se investigó la proporción de las mismas en ambos grupos de pacientes durante el tiempo de estudio. En 9 de los casos hubo infección bacteriana previamente o durante el transcurso de infección por CMV; por el contrario, en los pacientes sin infección por CMV hubo 10 casos de bacteriemia ($P=0.10$).

IV.III.1.2 Predicción del desarrollo de viremia mediante perfil metabolómico en plasma en el post-trasplante inmediato.

Dado que la replicación viral sistémica durante un episodio de infección por CMV fue capaz de proporcionar un perfil metabolómico en plasma con una capacidad discriminante elevada, posteriormente se investigó si el perfil metabolómico plasmático determinado precozmente tras el trasplante era capaz de predecir el desarrollo de infección por CMV con suficiente sensibilidad.

Para ello, se emplearon 134 muestras de plasma obtenidas durante los primeros 30 días tras el trasplante de pacientes con infección posterior por CMV. Como controles se utilizaron 100 muestras de plasma de pacientes sin CMV, obtenidas también durante los primeros 30 días.

Tras el screening inicial y el análisis por PLS-DA, se encontraron diferencias robustas en varios metabolitos. La bondad de ajuste del modelo fue bastante alta (R^2Y 0.943, R^2X 0.861 y Q^2 0.491), con una capacidad de clasificación obtenida por validación cruzada de 73%.

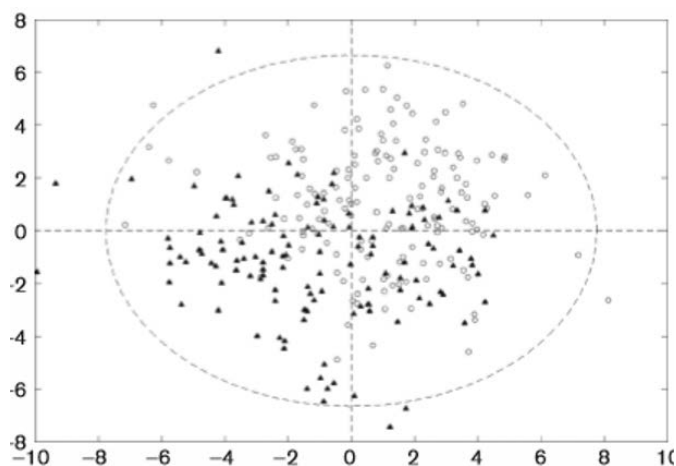


Figura IV.21. Modelo predictor obtenido por PLS-DA.

Los metabolitos con mayor contribución al modelo (VIP scores >1) se observan en la Figura IV.22.

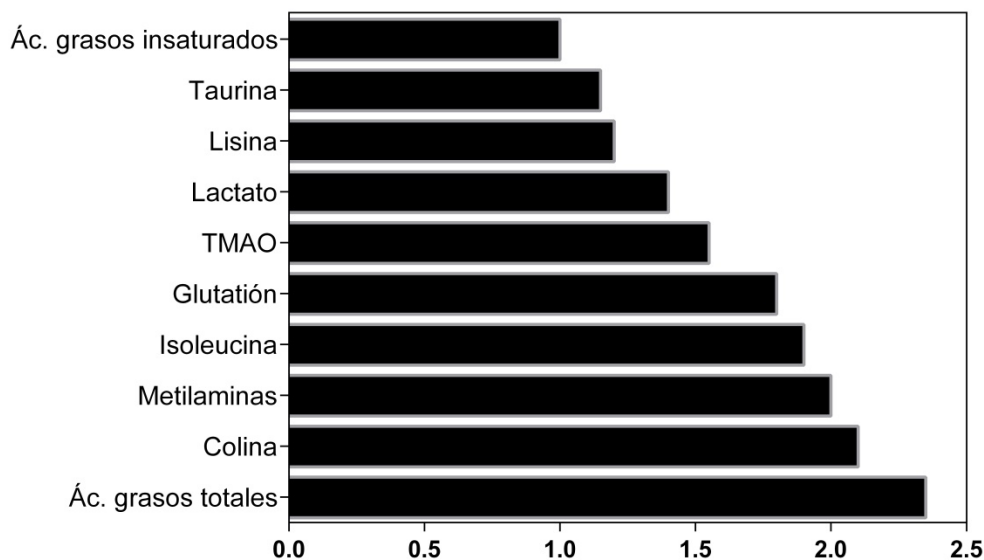


Figura IV.22. Picos de los metabolitos ordenados en función de su grado de contribución al modelo obtenido por PLS-DA.

Tras analizar el contenido metabólico relativo en muestras de pacientes con posterior infección por CMV, se observó que la concentración de 6 metabolitos difirió significativamente con respecto a las muestras control. Concretamente, se observó un aumento en los niveles de Taurina, Glutación total, Colina, Metilamina, N-óxido trimetilamina (TMAO) y lactato. En cambio, se observó una disminución en los niveles de lisina e isoleucina.

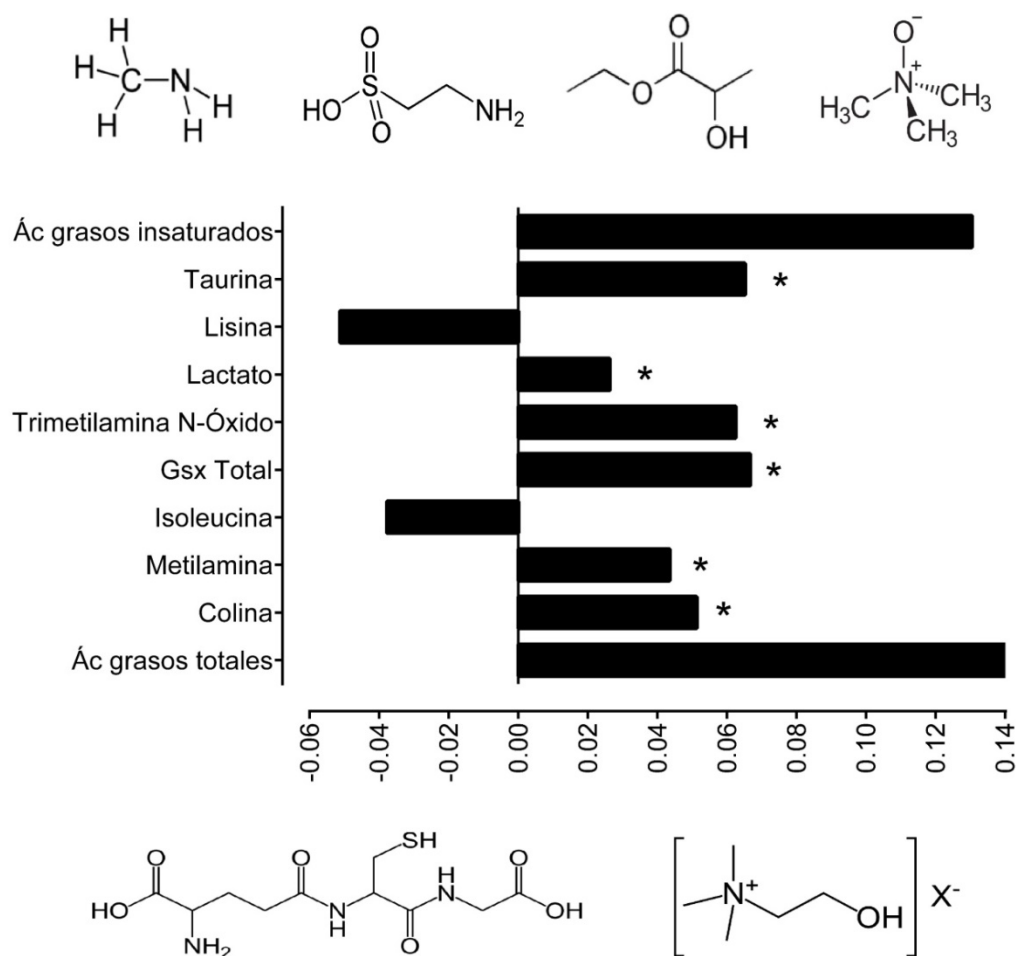


Figura IV.23. Variación en el contenido metabólico de las muestras de pacientes con infección subsecuente por CMV con respecto a las muestras de pacientes control.

Posteriormente, se investigó la capacidad de la determinación del perfil metabólico de una única muestra de plasma en la predicción de la infección por CMV. Los datos indicaron que la concentración de determinados metabolitos (Colina, Metilamina, Glutación total, TMAO y taurina) se encontraban en mucha mayor concentración durante la segunda semana (mediana 22 días) tras el trasplante. El modelo obtenido con una sola muestra tuvo una capacidad de clasificación de 68%.

El artículo VI es el primer trabajo en utilizar el análisis del metaboloma como predictor del desarrollo de infección por CMV, y en evaluar el impacto de la replicación viral en el perfil metabolómico.

Tras analizar muestras de plasma obtenidas durante el primer mes tras el trasplante de pacientes que desarrollaron o no posteriormente infección por CMV, se obtuvo un modelo mediante análisis PLS-DA con una capacidad de clasificación de 73%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido relativo de ciertos metabolitos: Metilaminas (TMAO), taurina, glutatión y lactato.

El TMAO es un metabolito procedente del metabolismo bacteriano. Su presencia en plasma se encuentra relacionada con la translocación bacteriana, que puede ocurrir tanto en el caso de alteración de la barrera intestinal como durante el sobrecrecimiento bacteriano, y, también, en respuestas inflamatorias y estrés oxidativo (Tang et al., 2014). Tanto el glutatión total como la taurina son potentes antioxidantes y anti-inflamatorios, y son generados en respuesta a estados pro-inflamatorios (Tabas & Glass, 2013). Por otro lado, el lactato es producido durante el metabolismo anaeróbico de la glucosa. En sangre se ha visto aumentada su producción tras la administración del lipopolisacárido (LPS) bacteriano. (Michaeli et al., 2012).

La reactivación de CMV se encuentra promovida por estados inmflamatorios (Cook, 2006), por lo que el riesgo de infección por CMV podría estar relacionado directamente con el estado neto de inflamación del individuo tras el trasplante. De hecho, el nivel plasmático de metabolitos puede ser un reflejo del grado de inflamación sistémica (metilaminas), de las respuestas compensatorias anti-inflamatorias (Glutatión, taurina), o de ambas. La taurina y el glutatión se producen principalmente en respuesta al daño celular (Vastag, Koyuncu, Grady, Shenk, & Rabinowitz, 2011), y además, la taurina está involucrada en la osmoregulación y en el volumen celular; podría ser excretada por la célula en respuesta al incremento de volumen celular inducido por CMV (Locci et al., 2013).

Tras el análisis y la modelización sobre una única muestra, se obtuvo un resultado óptimo, con un grado de clasificación de 68% en muestras obtenidas durante la segunda semana tras el trasplante. Cabe destacar que la robustez del modelo de predicción se encuentra en las variaciones de los metabolitos presentes en el perfil metabolómico completo, más que en variaciones de concentraciones de metabolitos individuales.

En cuanto a los cambios metabólicos observados durante los episodios de replicación viral, se observó un incremento de metabolitos procedentes del metabolismo de ácidos grasos, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de metabolitos de respuesta al estrés oxidativo. Se obtuvo un modelo con una capacidad de clasificación de 81%.

Durante la replicación viral se observó un aumento de productos metabólicos procedentes de la glicólisis, así como un aumento en la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, dicho cambio metabólico podría no deberse totalmente a la replicación por CMV. En este sentido, una limitación importante reside en que no se estudió el perfil metabólico en muestras tras el aclaramiento viral.

En este contexto, estudios *in vitro* previos (Shenk et al., 2008; Vastag et al., 2011) mostraron un aumento de alanina, acetyl-CoA y ácidos grasos en fibroblastos humanos infectados con CMV, previsiblemente debido a una disrupción de la actividad mitocondrial. No obstante, el patrón metabólico encontrado en modelos *in vitro* no coincide totalmente con el encontrado en la cohorte de pacientes. Puede que otros factores, no únicamente la replicación de CMV, afecten al perfil metabólico plasmático. Por ejemplo, la infección bacteriana sistémica o la incidencia de enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Aunque si bien es cierto, ambos factores se encontraron equilibrados en la cohorte estudiada.

Además, cabe destacar que el perfil metabólico observado fue similar, aunque no idéntico, al encontrado en muestras de orina de niños con infección congénita por CMV (Locci et al., 2013).

El estudio presenta ciertas limitaciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, el tamaño muestral es limitado. Además, los pacientes presentan cierta heterogeneidad en factores clínicos y demográficos, tales como la edad, el tipo de trasplante, la fuente de células progenitoras, o la incidencia de EICH.

La limitación más relevante a mencionar es que no se utilizó una cohorte independiente de pacientes para realizar estudios de validación cruzada, lo cual es necesario para validar los resultados obtenidos en el presente estudio.

En conclusión, los datos aportados sugieren que la determinación del perfil metabólico en plasma fue capaz de identificar con suficiente robustez aquellos pacientes en riesgo de desarrollo de infección por CMV. En este sentido, la determinación del perfil metabólico plasmático en plasma de forma precoz tras el trasplante, puede



ser una herramienta útil a la hora de determinar el riesgo individual de desarrollar infección por CMV, y por tanto, de guiar de forma individualizada la instauración del tratamiento profiláctico en la era de los nuevos antivirales.



V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El $td \leq 2$ días permite identificar precozmente a los pacientes que necesitan ser tratados con antivirales.
- La monitorización de los niveles plasmáticos valle de Ganciclovir no permite predecir la respuesta al tratamiento antiviral, al contrario que la detección de linfocitos T CD8+ CMV-específicos productores de IFN- γ .
- La monitorización temprana de células NK que expresan el receptor de activación NKG2C+ no permite inferir el riesgo de infección por CMV en el paciente trasplantado con niveles detectables de linfocitos T CMV-específicos.
- La cuantificación de los linfocitos totales CMV-específicos productores de IFN- γ tiene mayor utilidad clínica (mayor VPP y mayor VPN) que la cuantificación de las distintas poblaciones bi o polifuncionales de linfocitos T CD8+.
- La monitorización de los niveles de ACNIE permite inferir el riesgo de infección por CMV con una sensibilidad de 80%, lo que puede tener utilidad en el diseño de estrategias terapéuticas individualizadas.
- La determinación del perfil “metabolómico” plasmático mediante RMN- H^1 permite inferir el riesgo precoz de infección activa sistémica por CMV con una elevada sensibilidad, lo que puede tener utilidad en el manejo terapéutico de los pacientes receptores de trasplante alogénico.



VI. BIBLIOGRAFÍA

- Anasetti, C. (2008). What are the most important donor and recipient factors affecting the outcome of related and unrelated allogeneic transplantation?. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 21(4), 691-697.
- Aubert, G., Hassan-Walker, A. F., Madrigal, J. A., Emery, V. C., Morte, C., Grace, S., ... & Travers, P. J. (2001). Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 955-963.
- Avetisyan, G., Aschan, J., Hägglund, H., Ringden, O., & Ljungman, P. (2007). Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone marrow transplantation*, 40(9), 865-869.
- Avetisyan, G., Larsson, K., Aschan, J., Nilsson, C., Hassan, M., & Ljungman, P. (2006). Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 38(10), 687-692. doi:10.1038/sj.bmt.1705507
- 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. *Clinical Infectious Diseases*, 49(12), 1777-1783. doi:10.1086/648423
- Behrendt, C. E., Nakamura, R., Forman, S. J., & Zaia, J. A. (2013). Donor killer immunoglobulin-like receptor genes and reactivation of cytomegalovirus after HLA-matched hematopoietic stem-cell transplantation: HLA-C allotype is an essential cofactor. *Frontiers in Immunology*, 4, 36. doi:10.3389/fimmu.2013.00036
- Boeckh, M., & Boivin, G. (1998). Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 533-554.
- Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S. R., Bowden, R. A., Huang, M., 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), 407-414. doi:10.1182/blood-2002-03-0993
- Boeckh, M., & Ljungman, P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 113(23), 5711-5719. doi:10.1182/blood-2008-10-143560
- 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
- Campanero, M. A., Sadaba, B., García-Quetglas, E., & Azanza, J. R. (1998). Development and validation of a sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 706(2), 311-317.
- Casquero, S., Rangel, D., Lage, E., Sobrino, M., Cristobo, P., Cordero, E., & Cisneros, J. M. (2012). Preemptive therapy in the prevention of cytomegalovirus disease in high- and low-risk heart transplant recipients. *Transplantation Proceedings*, 44(7), 2113-2114. doi:10.1016/j.transproceed.2012.07.066

- 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
- Clari, M. Á., Bravo, D., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., ... & Navarro, D. (2013). Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *75*(2), 207-209.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., . . . Moss, P. A. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(3), 379-386. doi:10.1084/jem.20040613
- Crough, T., & Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews*, *22*(1), 76-98.
- 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
- Cook, C. H. (2006). Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1 triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *Journal of Virology*, *80*(18), 9151-9158. doi:10.1128/JVI.00216-06
- Cui, X., Meza, B. P., Adler, S. P., & McVoy, M. A. (2008). Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*, *26*(45), 5760-5766.
- Bravo, D., Clari, M. Á., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., & Navarro, D. (2011). Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*, *49*(8), 2899-2904.
- De Clercq, E. (2003). New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(5), 1079-1083.
- Einsele, H., Kapp, M., & Grigoleit, G. U. (2008). CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, *40*(1), 71-75. doi:10.1016/j.bcmed.2007.07.002
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., . . . Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, *99*(11), 3916-3922. doi:10.1182/blood.V99.11.3916
- 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.

- Emery, V., Zuckerman, M., Jackson, G., Aitken, C., Osman, H., Pagliuca, A., . . . Clark, A. (2013). Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology*, *162*(1), 25-39. doi:10.1111/bjh.12363
- 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
- Espy, M. J. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 595. doi:10.1128/CMR.00022-06
- Ferrara, J. L. M. (2009). Recent advances in cytomegalovirus: An update on pharmacologic and cellular therapies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *15*(1), 1. doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.002
- Fishman, J. A. (2013). Overview: Cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *American Journal of Transplantation*, *13*(s3), 1-8. doi:10.1111/ajt.12002
- 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), 2665-2674. doi:10.1182/blood-2011-10-386995
- Foley, B., Felices, M., Cichocki, F., Cooley, S., Verneris, M. R., & Miller, J. S. (2014). The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation (HCT). *Immunological Reviews*, *258*(1), 45-63. doi:10.1111/imr.12157
- Forster, M. R., Trgovcich, J., Zimmerman, P., Chang, A., Miller, C., Klenerman, P., & Cook, C. H. (2010). Antiviral prevention of sepsis induced cytomegalovirus reactivation in immunocompetent mice. *Antiviral Research*, *85*(3), 496-503. doi:10.1016/j.antiviral.2009.12.004
- Hahn, G., Revello, M. G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., ... & Baldanti, F. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *Journal of virology*, *78*(18), 10023-10033.
- Gerna, G., Percivalle, E., Torsellini, M., & Revello, M. G. (1998). Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *Journal of clinical microbiology*, *36*(12), 3585-3589.
- Gerna, G., Lilleri, D., Caldera, D., Furione, M., Bragotti, L. Z., & Alessandrino, E. P. (2008). Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, *41*(10), 873-879. doi:10.1038/sj.bmt.1705986

- Gerna, G., Lilleri, D., Rognoni, V., Agozzino, M., Meloni, F., Oggionni, T., ... & D'Armini, A. M. (2009). Preemptive therapy for systemic and pulmonary human cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 9(5), 1142-1150.
- Gerna, G., Percivalle, E., Lilleri, D., Lozza, L., Fornara, C., Hahn, G., . . . Revello, M. G. (2005). Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *Journal of General Virology*, 86(2), 275-284. doi:10.1099/vir.0.80474-0
- Gilbert, C., & Boivin, G. (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 274(20), 5223. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06058.x
- Grzywacz, B., Kataria, N., Sikora, M., Oostendorp, R. A., Dzierzak, E. A., Blazar, B. R., . . . Verneris, M. R. (2006). Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*, 108(12), 3824-3833. doi:10.1182/blood-2006-04-020198
- 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
- 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
- Jang, E., Park, S. Y., Lee, E. J., Song, E. H., Chong, Y. P., Lee, S., . . . Kim, S. (2009). Diagnostic performance of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in patients with CMV gastrointestinal disease. *Clinical Infectious Diseases*, 48(12), e124. doi:10.1086/599116
- Kalejta, R. F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews [H.W. Wilson - GS]*, 72(2), 249. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/222895747>
- Kheav, V. D., Busson, M., Scieux, C., de Latour, R. P., Maki, G., Haas, P., ... & Robin, M. (2014). Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *haematologica*, 99(12), 1860-1867.
- 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 Transplantation*, 46(8), 1089-1098. doi:10.1038/bmt.2010.261
- 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. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(10), 1410-1421. doi:10.1086/508495
- Leruez-Ville, M., Ouachée, 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. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2040-2046.
- Lilleri, D., Fornara, C., Chiesa, A., Caldera, D., Alessandrino, E. P., & 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(2), 248-256. doi:10.3324/haematol.11912
- 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. *Journal of Clinical Immunology*, 32(6), 1324-1331. doi:10.1007/s10875-012-9739-3
- Lilleri, D., Kabanova, A., Revello, M. G., Percivalle, E., Sarasini, A., Genini, E., . . . Gerna, G. (2013). Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS One*, 8(3), e59863. doi:10.1371/journal.pone.0059863
- Ljungman, P., Perez-Bercoff, L., Jonsson, J., Avetisyan, G., Sparrelid, E., Aschan, J., ... & Ringdén, O. (2006). Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *haematologica*, 91(1), 78-83.
- Ljungman, P. (2008). CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 42, S70-S72.
- Ljungman, P., Griffiths, P., & Paya, C. (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 34(8), 1094-1097. doi:10.1086/339329
- Locci, E., Noto, A., Lanari, M., Lazzarotto, T., Fanos, V., & Atzori, L. (2013). Metabolomics: A new tool for the investigation of metabolic changes induced by cytomegalovirus. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(S2), 17-19. doi:10.3109/14767058.2013.829684
- Macagno, A., Bernasconi, N. L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M. G., ... & Lanzavecchia, A. (2010). Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *Journal of virology*, 84(2), 1005-1013.
- Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Tabata, T., & Pereira, L. (2006). Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal fc receptor-mediated transcytosis. *American Journal of Pathology*, 168(4), 1210-1226.
- 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 Pathogens*, 6(3), e1000798. doi:10.1371/journal.ppat.1000798
- Michaeli, B., Martinez, A., Revelly, J., Cayeux, M., Chioléro, R. L., Tappy, L., & Berger, M. M. (2012). Effects of endotoxin on lactate metabolism in humans. *Critical Care (London, England)*, 16(4), R139. doi:10.1186/cc11444
- 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. *American Journal of Transplantation*, *8*(12), 2590-2599. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02425.x
- Nichols, W. G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., & Boeckh, M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: Evidence for indirect effects of primary CMV infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(3), 273-282. doi:10.1086/338624
- Noto, A., Dessi, A., Puddu, M., Mussap, M., & Fanos, V. (2014). Metabolomics technology and their application to the study of the viral infection. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, *27*(S2), 53-57. doi:10.3109/14767058.2014.955963
- Ohnishi, M., Sakurai, T., & Heike, Y. (2005). Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-enzyme-linked immunospot and human leukocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br. J. Haematol.*, *38*(10), 687-692. doi:10.1038/sj.bmt.1705507
- Perrottet, N., Manuel, O., Lamothe, F., Venetz, J., Sahli, R., Decosterd, L. A., . . . Meylan, P. (2010). Variable viral clearance despite adequate ganciclovir plasma levels during valganciclovir treatment for cytomegalovirus disease in D+/R- transplant recipients. *BMC Infectious Diseases*, *10*(1), 2. doi:10.1186/1471-2334-10-2
- Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Cheek, E., Akbar, A., & Kern, F. (2012). Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *Journal of virology*, *86*(2), 1001-1009.
- 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), 1373-1380. Retrieved from <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/78/5/1373>
- Ryckman, B. J., Chase, M. C., & Johnson, D. C. (2008). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: Evidence for cell type-specific receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(37), 14118-14123. doi:10.1073/pnas.0804365105
- San Juan, R., Aguado, J. M., Lumberras, C., Fortun, J., Muñoz, P., Gavalda, J., ... & Ramos, A. (2008). Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clinical infectious diseases*, *47*(7), 875-882.

- Seggewiss, R., & Einsele, H. (2010). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: An update. *Blood*, 115(19), 3861-8. doi:10.1182/blood-2009-12-234096 [pii] 10.1182/blood-2009-12-234096
- Shenk, T., Parikh, A., Bennett, B. D., Rabitz, H. A., McArdle, J., Rabinowitz, J. D., . . . Munger, J. (2008). Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1179-1186. doi:10.1038/nbt.1500
- 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., & D, N. (2010). Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virology*, (5), 111-124.
- 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., 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
- Tabas, I., & Glass, C. K. (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, 339(6116), 166-172.
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Fan, Y., Levison, B., Hazen, J. E., Donahue, L. M., . . . Hazen, S. L. (2014). Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(18), 1908-1914. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.617
- Tilton, C., Clippinger, A. J., Maguire, T., & Alwine, J. C. (2011). Human cytomegalovirus induces multiple means to combat reactive oxygen species. *Journal of virology*, 85(23), 12585-12593.
- 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 IFNgamma 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 IFNgamma 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-gamma 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
- Torre-Cisneros, J., Caston-Osorio, J. J., Martin, C., Rivero, A., Doblaz, 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
- Vanarsdall, A. L., Ryckman, B. J., Chase, M. C., & Johnson, D. C. (2008). Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *Journal of virology*, 82(23), 11837-11850.
- Vastag, L., Koyuncu, E., Grady, S. L., Shenk, T. E., & Rabinowitz, J. D. (2011). Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002124. doi:10.1371/journal.ppat.1002124
- Wang, D., & Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18153-18158.
- WHO expert committee on biological standardization. (2013). ().World Health Organization.
- Yamazaki, R., Tanaka, Y., Nakasone, H., Sato, M., Terasako-Saito, K., Sakamoto, K., . . . Kanda, Y. (2014). Allotype analysis to determine the origin of cytomegalovirus immunoglobulin-G after allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease*, 16(6), 904-913. doi:10.1111/tid.12304
- 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), 6465-6476. doi:10.1182/blood-2009-02-203307



V.II ANEXOS

VII. ANEXOS

VII.1 Informe del Director de la tesis doctoral sobre la coautoría de 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, realizo el presente escrito con el objetivo de justificar la situación de la doctoranda como segunda firmante en el artículo VI de la presente tesis doctoral.

La doctoranda, Estela Giménez, ha realizado la mayor parte de los aspectos microbiológicos contenidos en la tesis doctoral y que incluyen la obtención de los datos, el análisis de resultados y la interpretación de los mismos. Sin embargo, los resultados del artículo VI nacen de la colaboración con el Servicio de Metabolómica de la fundación INCLIVA, por lo que se le ha otorgado el lugar de primer firmante al Dr. Daniel Monleón por ser especialista en la técnica de la Resonancia Magnética Nuclear.

Además, los resultados obtenidos en coautoría no han sido utilizados ni implícita ni explícitamente para la realización de otra tesis doctoral.

Fdo. David Navarro Ortega

_____ a _____ de _____ de _____

VII.2 Escrito del Director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la tesis doctoral.

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

Artículo	Revista	Año de publicación	Factor de Impacto
I	<i>Journal of clinical microbiology</i>	2014	3.99
II	<i>Antimicrobial agents and chemotherapy</i>	2014	4.48
III	<i>Journal of medical virology</i>	2015	2.35
IV	<i>Transplant Infectious Disease</i>	2015	2.06
V	<i>Journal of General Virology</i>	2015	3.18
VI	<i>Journal of General Virology</i>	2015	3.18

Dr David Navarro Ortega

Catedrático, Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología i Ecología,

Universitat de València

_____ a _____ de _____ de _____



VII. ARTÍCULOS

Early Kinetics of Plasma Cytomegalovirus DNA Load in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients in the Era of Highly Sensitive Real-Time PCR Assays: Does It Have Any Clinical Value?

Estela Giménez,^a Beatriz Muñoz-Cobo,^a Carlos Solano,^b Paula Amat,^b David Navarro^a

Microbiology Service^a and Hematology and Clinical Oncology Service,^b Hospital Clínico Universitario, Institute of Research INCLIVA, Valencia, Spain

We report that in a population of allogeneic stem cell transplant recipients, determination of the viral doubling time (dt) of the cytomegalovirus (CMV) DNA plasma load predicted the eventual need for inception of preemptive antiviral therapy, whereas the level of the initial plasma CMV DNA load did not. The data thus indicated that determination of the dt of CMV DNA may be useful in the therapeutic management of CMV infection in this clinical setting.

Preemptive antiviral therapy based on virological monitoring is currently the standard of care for the prevention of cytomegalovirus (CMV) disease in allogeneic stem cell transplant (Allo-SCT) recipients (1–3). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) tests have largely replaced the pp65 antigenemia (AG) assay for guiding antiviral inception, with satisfactory clinical results (1, 2, 4, 5). While in the AG test era, the positivity of the assay triggered the initiation of antiviral therapy, in the qRT-PCR era, the deployment of treatment is delayed until the CMV DNA load in the blood reaches a predetermined threshold. This is meant to avoid overtreatment, as qRT-PCR tests are more sensitive than the AG assay (3, 4). The fact is that the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) of most “in-house” and commercially available qRT-PCRs are well below the plasma CMV DNA load thresholds that are widely accepted for triggering the initiation of preemptive antiviral therapy (between 500 and 1,000 copies/ml at most centers, in the setting of no risk-adapted strategies) (1). In our experience (6), CMV DNA loads at the beginning of episodes of active CMV infection (first and even second positive qRT-PCR results) are frequently of low magnitude (below 500 copies/ml); this seems to be the experience of other groups as well (7, 8). However, whether information on clinical utility could be derived from these early measurements remains to be determined. In the present study, we investigated whether the analysis of early kinetics of plasma CMV DNA load, as measured by highly sensitive qRT-PCR assays, allowed us to predict which episodes of active systemic CMV infection would eventually need to be treated in the context of a preemptive antiviral therapy strategy triggered by widely accepted plasma CMV DNA load cutoffs (1).

The patients included in this study ($n = 82$) underwent Allo-SCT at the Hematology Unit of University Clinic Hospital of Valencia between May 2010 and February 2013. The median age of the patients was 46 years (range, 15 to 71 years). The most relevant characteristics of the patients are shown in Table 1. From May 2010 to May 2012, patients were treated preemptively, as described previously (9), when the plasma CMV DNA load reached >500 copies/ml, as determined by the Abbott CMV PCR kit (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) (4). Since May 2012, the CMV DNA load threshold for the initiation of antiviral therapy has been set at 1,000 copies/ml, as determined by the new RealTime CMV PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). This cutoff approximately equates to that employed earlier, as the new RealTime PCR

assay yields CMV DNA values of higher magnitude than the CMV PCR kit (10). The limits of detection and quantitation of both qRT-PCR assays are approximately 20 copies/ml (95% confidence interval [CI]) (4, 11). Data from 17 patients guided by the Abbott CMV PCR kit had been previously reported (6).

Fifty-five of the 82 patients developed an episode of active CMV infection within the first 100 days following Allo-SCT, at a median of 32 days after transplant (range, 2 to 56). Only the first episodes of active CMV infection were considered for analysis in this study. Of these, 32 patients were preemptively treated with antivirals, whereas the remaining 23 patients spontaneously cleared the episode. Only one patient developed CMV end-organ disease (intestinal disease). Initial CMV DNA loads were below the threshold for the inception of antiviral therapy in all episodes, regardless of whether these were ultimately treated or not (data not shown); in fact, in 41 of 55 episodes, they were below 100 copies/ml. We first asked whether the initial CMV DNA load in episodes that were eventually treated with antivirals differed from that in episodes that were not. For this analysis, CMV DNA load values obtained by the respective qRT-PCR assay were normalized to the 1st WHO International Standard for CMV for Nucleic Acid Amplification-Based Assays (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, United Kingdom) and expressed in IU/ml (12). The conversion factors (from copies/ml to IU/ml) for the qRT-PCR assays employed in this study were previously defined (11). Overall, plasma CMV DNA loads were higher in the former group, although the differences did not reach statistical significance (Table 2). This was irrespective of both the qRT-PCR assay employed and the individual risk of patients for CMV end-organ disease (1–3). Thus, no reliable initial CMV DNA load threshold predicting the eventual need for antiviral therapy could be established by this study. This is in accordance

Received 16 September 2013 Returned for modification 14 November 2013

Accepted 20 November 2013

Published ahead of print 27 November 2013

Editor: Y.-W. Tang

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

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02571-13

TABLE 1 Demographic and clinical data for the patients in this study

Parameter	No. (%) of patients with result
Sex	
Male	53 (64.6)
Female	29 (35.4)
Stem cell source	
Bone marrow	4 (4.9)
Peripheral blood	57 (69.5)
Cord blood	21 (25.6)
Type of donor	
Related	36 (43.9)
Unrelated	46 (56.1)
HLA match	
Identical	57 (69.5)
Mismatched	25 (30.5)
CMV serostatus ^a	
D ⁻ /R ⁻	11 (13.4)
D ⁻ /R ⁺	31 (37.8)
D ⁺ /R ⁻	5 (6.1)
D ⁺ /R ⁺	35 (42.7)
Conditioning regimen	
Nonmyeloablative	42 (51.2)
Myeloablative	40 (48.8)
CMV end-organ disease	
No	81 (98.8)
Yes	1 (1.2)
Acute graft vs host disease	
Grades 0-I	49 (59.8)
Grades II-IV	33 (40.2)
Underlying disease	
Acute lymphatic leukemia	8 (9.8)
Acute myeloid leukemia	31 (37.8)
Aplastic anemia	3 (3.7)
Chronic lymphatic leukemia	12 (14.6)
Hodgkin's disease	4 (4.9)
Multiple myeloma	2 (2.4)
Myelodysplastic syndrome	2 (2.4)
Non-Hodgkin's lymphoma	19 (23.2)
Plasma cell leukemia	1 (1.2)

^a D, donor; R, recipient.

with data published previously by our group for a cohort of patients in which the initiation of antiviral therapy was triggered either by the AG assay or by a qRT-PCR assay (6). CMV DNA loads measured in the second positive qRT-PCR tests were below the cutoff for the initiation of antiviral therapy in 41 of 47 episodes. (A single positive qRT-PCR result was seen in 8 episodes.) Second qRT-PCR analyses were performed at a median of 6 days (range, 4 to 8 days) after the first. This allowed us to calculate the viral doubling time (dt) in the absence of antiviral treatment (6). These calculations were only performed for episodes in which there was an increase between the first and second CMV DNA load values of >3-fold (>0.5 log₁₀ copy/ml, which is above the

TABLE 2 Early kinetics of plasma CMV DNA load in active CMV infection developing in allogeneic stem-cell transplant recipients who required or did not require preemptive antiviral therapy

Parameter/group of patients (no. of patients) ^a	Median (range) result:		P value ^b
	With preemptive therapy	Without preemptive therapy	
Initial CMV DNA load, IU/ml			
Overall (55)	75 (31–9,641)	36 (31–1,090)	0.222
High risk (35)	32 (31–3,920)	31 (31–1090)	0.693
Low risk (20)	232 (31–9,641)	59 (31–596)	0.153
CMV dt, days ^c			
Overall (36)	1.91 (0.81–7.05)	4.21 (2.13–11.52)	0.001
High risk (25)	2.12 (0.81–3.91)	3.26 (2.13–11.35)	0.012
Low risk (11)	1.73 (1.42–7.05)	7.87 (4.21–11.52) ^d	0.099

^a High-risk patients for CMV end-organ disease were those meeting one or more of the following conditions: (i) unrelated or (ii) HLA-mismatched allograft, (iii) CMV seropositive receiving an allograft from a CMV-seronegative donor, and (iv) treatment with high-dose corticosteroids (>1 mg/kg body weight/day) for acute graft versus host disease (1). Twenty of 35 high-risk patients were preemptively treated with antivirals. Low-risk (and intermediate-risk) patients for CMV end-organ disease were those meeting one or more of the following conditions: (i) sibling and HLA-matched allograft, (ii) CMV seropositive receiving an allograft from a CMV-seropositive donor or CMV seronegative receiving an allograft from a CMV-seropositive donor, and (iii) absence of acute graft versus host disease or treatment with high corticosteroid doses (1). Twelve of the 20 low-intermediate-risk patients were preemptively treated with antivirals.

^b Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U test. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

^c The CMV doubling time was given by $dt = (t_2 - t_1) \times [\log_2 / \log(q_2/q_1)]$, with q_1 and t_1 representing the CMV DNA (copies/ml) at the time of the first positive qRT-PCR (in days), respectively, and q_2 and t_2 representing CMV DNA at the time of the second positive qRT-PCR. Only episodes in which there was an increase between the first and second CMV DNA load values of >3-fold were considered for analysis ($n = 36$).

Twenty of the 25 high-risk patients and 9 of the 11 low- to intermediate-risk patients were preemptively treated with antivirals.

^d Mean of two values.

interassay coefficient of variation of both PCR assays) ($n = 36$) (2, 13). Twenty-nine of these 36 episodes were treated with antivirals. As shown in Table 2, patients who were eventually treated displayed dt values that were significantly shorter than those who did not. Receiver operating characteristic analyses (14) were performed to determine the optimal cutoff value for predicting the need of treatment. Overall, a dt threshold of 2.41 days displayed a sensitivity of 81.3% and a specificity of 71.6%. For the high-risk group, the dt was 2.17 days (sensitivity, 81.8%; specificity, 59.4%), and for the low- to intermediate-risk group, the optimal dt was 3.6 days (sensitivity, 80.0%; specificity, 66.7%). Overall, a dt cutoff value of 2.0 days predicted the need for antiviral treatment with maximum sensitivity (100%), albeit with a modest specificity (51%); that is, all patients with dt values of ≤ 2 days (9 high risk and 6 low to intermediate risk) would have been treated approximately 1 week earlier, whereas patients with dt values of >2 days that eventually required the inception of antiviral therapy (11 high-risk and 3 low- to intermediate-risk patients) would have been treated at the time they had reached the established CMV DNAemia cutoff for initiation of preemptive therapy.

The clinical significance of the early kinetics of CMV DNA load in blood in transplant recipients was first postulated by Emery et al. (10). They showed that the rate of viral load increase was an independent risk factor for CMV disease in a mixed population of solid organ transplant and Allo-SCT recipients. In the referred study, nevertheless, an endpoint quantitative PCR assay display-

ing a higher LOD than that in the present study was employed. In the era of highly sensitive qRT-PCRs, our data lend support to the clinical utility of these analyses. In our setting, dt values, but not initial CMV DNA load values, allowed the prediction of the need for antiviral therapy in both high-risk and low- to intermediate-risk patients. According to current practice at most transplant centers (1–3), the implementation of antiviral therapy upon reaching dt values of ≤ 2.0 days would have prompted the inception of antiviral therapy approximately 1 week earlier in 15 patients. However, whether this would have resulted in a clinical benefit for patients (shorter duration of treatments and less toxicity) is unknown. We are currently in the process of designing a controlled clinical trial aimed at evaluating the safety and clinical efficacy of this strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by a grant (09/1117) from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

David Navarro has received honoraria from Abbott Diagnostics for participating in two conferences. All other authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Boeckh M, Ljungman P. 2009. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113:5711–5719. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-10-143560>.
- Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H, Pagliuca A, Potter M, Peggs K, Clark A, British Committee for Standards in Haematology, British Society of Blood and Marrow Transplantation, UK Virology Network. 2013. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 162:25–39. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12363>.
- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol.* 5:111–124. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.09.64>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00797-08>.
- Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P, Clari MA, Bravo D, Benet I, Montoro J, Navarro D. 2013. 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.* 48:1010–1012. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2012.286>.
- Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, Bravo D, Clari MÁ, Benet I, Remigia MJ, Montoro J, Navarro D. 2011. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17:1602–1611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.08.014>.
- Green ML, Leisenring W, Stachel D, Pergam SA, Sandmaier BM, Wald A, Corey L, Boeckh M. 2012. Efficacy of a viral load-based, risk-adapted, preemptive treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease after hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18:1687–1699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.05.015>.
- Waggoner J, Ho DY, Libiran P, Pinsky BA. 2012. Clinical significance of low cytomegalovirus DNA levels in human plasma. *J. Clin. Microbiol.* 50:2378–2383. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06800-11>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2010.330>.
- Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. 2000. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 355:2032–2036. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02350-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02350-3).
- Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, Giménez E, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Pérez-Romero P, Navarro D. 2013. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75:207–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.010>.
- Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD, Collaborative Study Group. 2010. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO international standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS Report 2010. WHO/BS/10.2138. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Bravo D, Clari MÁ, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, José Remigia M, Navarro D. 2011. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 49:2899–2904. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00785-11>.
- Zweig MH, Campbell G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39:561–577.

Monitoring of Trough Plasma Ganciclovir Levels and Peripheral Blood Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8⁺ T Cells To Predict CMV DNAemia Clearance in Preemptively Treated Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Estela Giménez,^a Carlos Solano,^{b,c} José Ramón Azanza,^d Paula Amat,^b David Navarro^{a,e}

Microbiology Service^a and Hematology and Medical Oncology Service,^b Hospital Clínico Universitario, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^c; Clinic Pharmacology Service, Clínica Universidad de Navarra, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain^d; Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^e

It is uncertain whether monitoring plasma ganciclovir (GCV) levels is useful in predicting cytomegalovirus (CMV) DNAemia clearance in preemptively treated allogeneic stem cell transplant recipients. In this observational study, including 13 episodes of CMV DNAemia treated with intravenous (i.v.) GCV or oral valganciclovir, we showed that monitoring trough plasma GCV levels does not reliably predict response to therapy. Rather, immunological monitoring (pp65 and immediate-early [IE]-1-specific gamma interferon [IFN- γ]-producing CD8⁺ T cells) appeared to perform better for this purpose.

Ganciclovir (GCV) and its ester prodrug valganciclovir (V-GCV) are the first-line drugs for preemptive treatment of active cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic stem cell transplant (Allo-SCT) recipients (1). These two drugs display similar efficacies in CMV DNA clearance (2), despite the fact that V-GCV leads to higher exposure than does GCV (3). Since intracellular GCV triphosphate is the active form of this compound, the plasma GCV concentration is simply a surrogate of the drug's antiviral activity (1, 2). Monitoring trough plasma GCV levels in AIDS patients receiving oral GCV as maintenance therapy for CMV retinitis was shown to be clinically useful in predicting therapy failure and disease progression (4, 5). Nevertheless, no therapeutic concentrations of GCV have been formally defined (6). In the solid organ transplant (SOT) setting, contradictory data have been reported on the clinical value of routine pharmacokinetic monitoring of GCV (6–8). This issue remains unresolved in the Allo-SCT setting. In the current study, we monitored trough plasma GCV levels during a number of episodes of CMV DNAemia in order to determine whether there is a relationship between trough plasma GCV concentrations and the efficacy in achieving plasma CMV DNA clearance. In parallel, we prospectively enumerated CMV-specific (pp65 plus immediate-early [IE]-1) gamma interferon (IFN- γ)-producing CD8⁺ T cells in blood, as previous studies demonstrated the critical influence of an adequate expansion of these T-cell populations on CMV DNAemia clearance (9, 10).

A total number of 13 episodes of CMV DNAemia developing in 13 patients were included in the current study. None of these patients had CMV end-organ disease. The clinical and demographic characteristics of these patients are shown in Table 1. This study was approved by the review board and ethics committees of the Hospital Clínico Universitario. Each patient gave written informed consent to participate in the study.

Preemptive therapy with oral V-GCV (900 mg every 12 h) or intravenous (i.v.) GCV (5 mg/kg of body weight every 12 h) was initiated when the plasma CMV DNA load reached 500 copies/ml, as determined by the CMV real-time PCR assay (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) (11), and interrupted upon two consec-

utive negative PCR results (12). Plasma GCV levels were measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with spectrofluorometric detection, as previously described (13). The limit of detection of the assay is 0.25 mg/liter, and the intra- and interday coefficients of variation do not exceed 6.65%. Plasma specimens were kept at -20°C for a maximum of 6 months and were retrieved for GCV concentration measurements. It was shown previously that GCV remains stable at this temperature for at least 6 months (13, 14). Blood samples were drawn at steady state (>1 day after the initiation of therapy) just before intake of the drug (trough level). Following the current policies at our center, blood specimens from the hospitalized patients and the outpatients were scheduled to be drawn for biochemical and hematimetric analyses, virus PCR assays, and trough cyclosporine measurements within 30 to 60 min prior to V-GCV or i.v. GCV administration.

CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ T cells were enumerated by flow cytometry for intracellular cytokine staining, as previously described (9, 10, 12). Whole blood was simultaneously stimulated with two sets of 15-mer overlapping peptides encompassing the sequences of both proteins (1 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{peptide}$). Increases in CMV-specific CD8⁺ T-cell counts from baseline levels (at the time of detection of CMV DNAemia) that reached ≥ 1 cell/ μl were considered significant (9, 10).

Nine out of the 13 episodes of CMV DNAemia included in the current study were first (initial) episodes that occurred at a median of 28 days after Allo-SCT (range, 0 to 51 days). The remaining 4 episodes were recurrences that developed at a median of 321 days after Allo-SCT (range, 144 to 766 days) (Table 2, patients 3, 9,

Received 2 April 2014 Returned for modification 15 June 2014

Accepted 22 June 2014

Published ahead of print 30 June 2014

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

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02953-14

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of study patients

Patient no.	Sex ^a	Age (yr)	Underlying disease ^b	Conditioning regimen	HLA ^c matching	Donor type	CMV serostatus ^d	Stem cell source ^e	Acute GvHD (grade) ^f
1	F	64	AML	Nonmyeloablative	Mismatched	Related	D ⁺ /R ⁺	PB	0–II
2	M	31	AML	Myeloablative	Mismatched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	UCB	0–II
3	F	62	AML	Nonmyeloablative	Matched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	PB	0–II
4	M	49	MM	Myeloablative	Mismatched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	UCB	0–II
5	M	39	ALL	Nonmyeloablative	Mismatched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	UCB	0–II
6	F	45	NHL	Myeloablative	Matched	Unrelated	D ⁺ /R ⁺	PB	0–II
7	M	63	AML	Nonmyeloablative	Matched	Related	D ⁺ /R ⁺	PB	0–II
8	M	27	AML	Myeloablative	Matched	Related	D ⁺ /R ⁻	PB	III–IV
9	M	56	AML	Nonmyeloablative	Matched	Related	D ⁺ /R ⁺	PB	0–II
10	M	38	AA	Myeloablative	Mismatched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	UCB	0–II
11	F	58	ALL	Nonmyeloablative	Mismatched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	UCB	0–II
12	F	55	AML	Nonmyeloablative	Matched	Related	D ⁺ /R ⁺	PB	III–IV
13	F	62	NHL	Nonmyeloablative	Matched	Unrelated	D ⁻ /R ⁺	PB	0–II

^a F, female; M, male.^b AML, acute myeloid leukemia; MM, multiple myeloma; ALL, acute lymphocytic leukemia; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; AA, aplastic anemia.^c HLA, human leukocyte antigen.^d D, donor; R, recipient.^e PB, peripheral blood; UCB, umbilical cord blood.^f GvHD, graft versus host disease.

10, and 13). Ten episodes were preemptively treated with i.v. GCV, and 3 were treated with oral V-GCV. All the patients had a glomerular filtration rate of >60 ml/min.

Trough plasma GCV levels were measured in 52 specimens (median, 3/patient; range, 2 to 10/patient). CMV-specific CD8⁺ T-cell levels in 79 specimens were determined (median, 5/patient; range, 2 to 13/patient). These data are shown in Table 2 and are summarized as follows. (i) CMV DNAemia clearance was achieved in 9 episodes, after a median of 24 days of treatment (range, 15 to 87 days); the remaining 4 episodes were still active at the end of the follow-up (patient death). (ii) Trough plasma GCV levels of >0.6 mg/liter were consistently measured in 10 episodes (median, 2.90 mg/liter; range, 1.17 to 5.80 mg/liter). Four of these episodes (1, 2, 4, and 5) remained unresolved at the end of the follow-up. A significant expansion of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells was not demonstrated in any of these episodes. A single plasma specimen/patient from patients 1, 2, and 5

was used for sequence analysis of the *UL54* and *UL97* genes. These specimens were obtained at least 4 weeks following antiviral inception, and the specimens displayed CMV DNA loads of >1,000 copies/ml, which is approximately the limit of detection of the PCR sequencing method employed in the current study (9). A mutation known to confer resistance to GCV was found only in patient 5 (M460V in the *UL97* gene). As for the 6 episodes that were eventually cleared, a significant expansion of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T cells was observed in 3 episodes. As for the remaining 3 episodes (patients 8, 11, and 12), we cannot rule out the possibility that functional CD8⁺ T cells targeting other viral proteins contributed to CMV DNAemia clearance. (iii) Fluctuating trough plasma GCV levels (defined by those changing from higher than to less than 0.6 mg/liter one or more times over the study period) were observed throughout 2 episodes. These episodes were eventually cleared in concomitance with a significant expansion of CMV-specific CD8⁺ T cells. (iv) Undetectable plasma

TABLE 2 Virological, immunological, and pharmacokinetic data on 13 episodes of CMV DNAemia developing in 13 allogeneic stem cell transplant patients

Patient no.	Treatment	Trough plasma ganciclovir level		Peak CMV DNA load (copies/ml)	CMV DNAemia (clearance status/day after treatment inception)	Significant expansion of CMV-specific IFN- γ CD8 ⁺ T cells ^a	Peak level of CMV-specific IFN- γ CD8 ⁺ T cells (cells/ μ l)
		Median (range) (mg/liter)	No. of measurements				
1	Ganciclovir	5.80 (0.64–5.80)	4	3,872	No/46	No	0.58
2	Ganciclovir	2.57 (1.65–4.92)	3	3,766	No/29	No	0.80
3	Ganciclovir	<0.25 (<0.25–1.59)	4	3,221	Yes/15	Yes	91.06
4	Ganciclovir	1.17 (1.04–3.48)	4	18,075	No/18	No	0.00
5	Ganciclovir	5.48 (1.15–53.40)	6	92,823	No/97	No	0.00
6	Valganciclovir	<0.25 (<0.25–6.65)	5	13,995	Yes/33	Yes	5.15
7	Ganciclovir	<0.25	10	2,129	Yes/87	Yes	14.00
8	Ganciclovir	3.97 (1.54–4.61)	3	676	Yes/27	No	0.00
9	Ganciclovir	0.62–1.34	2	2,876	Yes/23	Yes	237.92
10	Ganciclovir	2.22 (1.51–2.93)	3	2,442	Yes/32	Yes	2.22
11	Valganciclovir	1.86 (1.55–2.00)	3	1,149	Yes/27	No	0.00
12	Valganciclovir	4.47–4.92	2	1,108	Yes/15	No	0.00
13	Ganciclovir	3.22 (2.75–3.69)	3	907	Yes/16	Yes	1.98

^a Increases in CMV-specific CD8⁺ T-cell counts from baseline levels (at the time of detection of CMV DNAemia) that reached ≥ 1 cell/ μ l were considered significant.

GCV levels were seen in 1 episode, despite the administration of i.v. GCV. This episode was eventually cleared upon a significant expansion of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T cells. (v) In patients 3, 9, and 13, an expansion of CMV-specific CD8⁺ T-cell levels of >1 cell/ μ l was achieved at the time of plasma CMV DNAemia clearance, whereas in patients 6, 7, and 10, it preceded CMV DNAemia clearance by 1 week (patients 6 and 10) or 3 weeks (patient 7). Variability in the time course of reaching a sufficient T-cell expansion to control active CMV infection was previously reported by our group (10).

There is scant information on whether the measurement of plasma GCV levels is of any clinical utility in predicting the response to preemptive therapy in Allo-SCT recipients. In fact, the therapeutic range of plasma GCV concentrations has not been formally established in any clinical setting, although trough levels between 0.2 and 2.0 mg/liter in solid organ transplant recipients with CMV end-organ disease and >0.6 mg/liter in HIV patients with retinitis have been tentatively proposed (4–6, 15). In this context, we found that maintained trough plasma GCV levels of >0.6 mg/liter were not consistently associated with CMV DNAemia clearance. In none of the unresolved episodes was a significant expansion of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells observed. These findings are in keeping with data reported by Emery et al. (16), which revealed that an anti-CMV drug with an efficacy of >93% is required to eliminate viral growth during infection of CMV-naïve liver transplant recipients, whereas lower efficacy levels (84%) are sufficient to reduce the basic reproductive number (R_0 value) to <1 in experienced CMV-immune hosts. In contrast, either undetectable or fluctuating trough plasma GCV levels were observed throughout 4 episodes that were nevertheless cleared, most likely at the expense of a robust expansion of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells of >1 cell/ μ l, previously shown to be associated with viral clearance (9, 10). This T-cell expansion was manifest at the time of the first negative real-time PCR result or shortly before it. These data further prove the critical role of CMV-specific functional T-cell immunity in controlling CMV replication. In addition, maintained trough levels of >0.6 mg/liter were observed in 3 episodes in which a concomitant expansion of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells was demonstrated, so we were unable to ascertain the relative contribution of each factor to viral clearance. Taken together, our data are in line with those of Perrottet et al. (7), who reported variable CMV DNAemia clearance (in whole blood) despite adequate plasma levels during V-GCV treatment for CMV disease in donor-positive/recipient-negative SOT recipients.

For the current study, we used leftover plasma specimens which were submitted to our laboratory for routine CMV DNA load monitoring (performed once a week). Thus, we were unable to determine the pharmacokinetic parameters, such as the maximum concentration of drug in serum (C_{max}), the area under the concentration-time curve from 0 to 12 h (AUC_{0-12}), and the AUC_{0-24} , whose clinical utility in predicting response to therapy has been proposed (6, 8, 15, 17). In addition, the unavailability of a number of plasma specimens precluded a more systematic analysis of GCV levels throughout the duration of the episodes. Despite these limitations, our data indicate that monitoring trough plasma GCV levels does not reliably predict the response to therapy in this clinical setting. Rather, immunological monitoring appeared to perform better for this purpose. On the basis of our data, prospective studies involving larger cohorts of patients on an ad-

equated sampling schedule for GCV measurements seem to be warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants 09/1117 and 12/1992 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Solano C, Navarro D. 2010. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol.* 5:111–124. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.09.64>.
- van der Heiden PL, Kalpoe JS, Barge RM, Willemze R, Kroes AC, Schippers EF. 2006. Oral valganciclovir as pre-emptive therapy has similar efficacy on cytomegalovirus DNA load reduction as intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* 37:693–698. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705311>.
- Einsele H, Reusser P, Bornhäuser M, Kalhs P, Ehninger G, Hebart H, Chalandon Y, Kröger N, Hertenstein B, Rohde F. 2006. Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 107:3002–3008. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-09-3786>.
- Piketty C, Bardin C, Gilquin J, Mahe V, Kazatchkine MD, Chast F. 1996. Low plasma concentrations achieved with conventional schedules of administration of ganciclovir in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 174:188–190. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/174.1.188>.
- Piketty C, Bardin C, Gilquin J, Gairard A, Kazatchkine MD, Chast F. 2000. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. *Clin. Microbiol. Infect.* 6:117–120. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00014.x>.
- Scott JC, Partovi N, Ensom MH. 2004. Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther. Drug Monit.* 26:68–77. <http://dx.doi.org/10.1097/00007691-200402000-00014>.
- Perrottet N, Manuel O, Lamoth F, Venetz JP, Sahli R, Decosterd LA, Buclin T, Pascual M, Meylan P. 2010. Variable viral clearance despite adequate ganciclovir plasma levels during valganciclovir treatment for cytomegalovirus disease in D⁺/R⁻ transplant recipients. *BMC Infect. Dis.* 10:2. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-2>.
- Bedino G, Esposito P, Bosio F, Corradetti V, Valsania T, Rocca C, Pattonieri EF, Gregorini M, Rampino T, Dal Canton A. 2013. The role of therapeutic drug monitoring in the treatment of cytomegalovirus disease in kidney transplantation. *Int. Urol. Nephrol.* 45:1809–1813. <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-012-0293-y>.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, López-Aldeguer N, Hernández-Boluda JC, Remigia MJ, García-Noblejas A, Gimeno C, Navarro D. 2010. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8⁺ and CD4⁺ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 45:543–549. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2009.172>.
- 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. 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. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21799>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00797-08>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2010.330>.
13. Campanero MA, Sadaba B, García-Quetglas E, Azanza JR. 1998. Development and validation of a sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 706:311–317. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00666-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00666-X).
 14. Yoshida T1, Takahashi R, Imai K, Uchida H, Arai Y, Oh-ishi, T. 2010. A simple, sensitive determination of ganciclovir in infant plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. Sci.* 48:208–211. <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/48.3.208>.
 15. Fletcher C, Sawchuk R, Chinnock B, de Miranda P, Balfour HH, Jr. 1986. Human pharmacokinetics of the antiviral drug DHPG. *Clin. Pharmacol. Ther.* 40:281–286. <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.1986.177>.
 16. Emery VC, Hassan-Walker AF, Burroughs AK, Griffiths PD. 2002. Human cytomegalovirus (HCMV) replication dynamics in HCMV-naive and -experienced immunocompromised hosts. *J. Infect. Dis.* 185:1723–1728. <http://dx.doi.org/10.1086/340653>.
 17. Autmizguine J, Théoret Y, Launay E, Duval M, Rousseau C, Tapiéro B, Boivin G, Ovetchkine P. 2011. Low systemic ganciclovir exposure and preemptive treatment failure of cytomegalovirus reactivation in a transplanted child. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* 18:e257–e260.

Enumeration of NKG2C⁺ Natural Killer Cells Early Following Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients Does Not Allow Prediction of the Occurrence of Cytomegalovirus DNAemia

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

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

²Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación 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 the control of cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic stem cell transplant recipients has not been precisely characterized. The current study is aimed at investigating the potential role of NK cells expressing the activating receptor NKG2C in affording protection against the development of CMV DNAemia in patients exhibiting detectable CMV-specific CD8⁺ T-cell responses early following transplantation. A total of 61 nonconsecutive patients were included in the study. Peripheral levels of CD56^{bright}CD16^{-/low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells and CMV pp65/IE-1-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cells were enumerated by flow cytometry at days +30 and +60 after transplant. Neither the absolute number of NKG2C⁺ NK cells, nor that of CD56^{bright}CD16^{-/low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK-cell subsets at day 30 differed significantly between patients with or without subsequent CMV DNAemia. No significant correlation was found between levels of both NKG2C⁺ NK-cell populations and the peak CMV DNA load within subsequent episodes of CMV DNAemia. The data indicate that enumeration of NKG2C⁺ NK cells early after transplant is unlikely to be helpful in identifying those patients at highest risk of developing CMV DNAemia. Moreover, the data do not support a direct implication of NKG2C⁺ NK cells in preventing the development of CMV DNAemia. **J. Med. Virol. 87:1601–1607, 2015.**

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: cytomegalovirus; NK cells; IFN γ -producing CD8⁺ T-cells; active CMV infection; allogeneic stem cell transplantation

INTRODUCTION

While there is no doubt that cytomegalovirus (CMV)-specific functional CD8⁺ and CD4⁺ T-cells contribute significantly to protection from and resolution of CMV viremia in allogeneic stem cell transplant recipients [Solano and Navarro, 2010], the role of Natural Killer (NK) cells has not been elucidated. The human NK-cell compartment is highly heterogeneous and include different clonal populations displaying a wide array of NK receptors combinations. NK cells expressing the C-type lectin activating receptor NKG2C, coupled with CD94 have been reported to be detected in increased proportion in CMV-seropositive individuals with respect to their CMV-seronegative counterparts [Gumá et al., 2004].

Grant sponsor: FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain); Grant number: 09/1117; 12/1992.

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

Accepted 20 February 2015

DOI 10.1002/jmv.24198

Published online 19 March 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Yet, the magnitude of expansion of theNK-cell subset in CMV-seropositive individuals appears to vary widely. Two main subsets of mature NK cells have been described [Della Chiesa et al., 2013]. NKG2C⁺CD56^{bright}CD16^{-/low} NK cells express high levels of the inhibitory receptor NKG2A, but low levels of Killing Immunoglobulin Receptors (KIR). They are mainly found in lymphoid organs and produce high levels of immunoregulatory cytokines upon activation; nevertheless, these cells are poorly cytotoxic. In contrast NKG2C⁺CD56^{dim}CD16⁺ NK cells express high levels of KIR, are predominant in peripheral blood, and are naturally cytotoxic against virus-infected cells. Recent studies have shown the expansion of NKG2C⁺/CD94 associates with control of CMV infection in this clinical setting [Kuijpers et al., 2008; Barron et al., 2009; Lopez-Vergès et al., 2011; Muñoz-Cobo et al., 2012; Foley et al., 2012]. In this context, it was reported recently by our group that the resolution of CMV DNAemia in this clinical setting was associated frequently with a marked expansion of both NKG2C⁺CD56^{bright}CD16^{-/low} NK cells and NKG2C⁺CD56^{dim}CD16⁺ NK cells, which occurred concomitantly to that of both monofunctional and polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T-cells [Muñoz-Cobo et al., 2012]. A previous study by our group was aimed at determining whether NKG2C⁺ NK cells conferred 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. Peripheral blood levels of both NKG2C⁺ NK-cell populations measured at days 30 and 60 after transplant in patients who had or had not subsequent CMV DNAemia did not differ significantly. Thus, the data did not support a direct implication of NKG2C⁺ NK cells in preventing the development of CMV DNAemia [Muñoz-Cobo et al., 2014]. Other studies, nevertheless, concluded that NK cells may contribute significantly to protection from the occurrence of CMV DNAemia [Barron et al., 2009; Kheav et al., 2014]. This study was aimed at investigating further the potential role of NKG2C⁺ NK cells in the control of CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients, those who reconstituted CMV pp65/IE-1-specific CD8⁺ T-cell responses early after transplant.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A total of 61 nonconsecutive patients (see Table I for their demographic and clinical characteristics) are included in the current study, those who underwent allogeneic stem cell transplantation between 2010 and 2013 at the participating hospitals (Hospital Clínico Universitario, n=20; Hospital de La Princesa, n=22; Hospital Morales Meseguer, n=13; Hospital Ramón y Cajal, n=6). The study period comprised the first 100 days after transplant. The study was

TABLE I. Demographic and Clinical Characteristics of the Patients

Parameter	No. of patients (%)
Sex	
Male	37 (60.7)
Female	24 (39.3)
Underlying disease	
Acute myeloid leukemia	25 (41.0)
Non-Hodgkin's lymphoma	12 (19.7)
Myelodysplastic syndrome	4 (6.6)
Acute lymphocytic leukemia	5 (8.2)
Chronic lymphocytic leukemia	3 (4.9)
Multiple myeloma	4 (6.6)
Hodgkin's lymphoma	3 (4.9)
Aplastic anemia	1 (1.6)
Others	4 (6.6)
HLA-matching	
Matched	52 (85.2)
Mismatched	9 (14.8)
Donor type	
Related	34 (55.7)
Unrelated	27 (44.3)
Stem cell source	
Peripheral blood	57 (93.4)
Umbilical cord blood	2 (3.3)
Bone marrow	2 (3.3)
Conditioning regimen	
Myeloablative	31 (50.8)
Non-myeloablative	30 (49.2)
GvHD prophylaxis	
Cyclosporin A/Methotrexate	35 (57.3)
Cyclosporin A/Mycophenolate mofetil	3 (4.6)
Other combinations	23 (37.7)
CMV serostatus	
D+/R+	33 (54.1)
D-/R+	20 (32.8)
D+/R-	8 (13.1)
Acute GvHD	
0-I	47 (77.0)
II-IV	14 (23.0)

CMV, cytomegalovirus; D, donor; GvHD, graft versus host disease; HLA, human leukocyte antigen; R, recipient.

approved by the Ethics Committees. All patients gave their informed consent to participate in the study.

Management of CMV Infection

Monitoring of CMV DNA load in plasma was performed by plasma real-time PCR (CMV real-time PCR or Abbott RealTime CMV, both from Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, at Hospital Clínico Universitario or the LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, NJ, at the remaining hospitals), as reported elsewhere [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011; Muñoz-Cobo et al., 2012; Muñoz-Cobo et al., 2014]. The limit of detection of the Abbott QRT-PCR assays is approximately 25 copies/ml, while the limit of detection of the Roche QRT-PCR assay is approximately 150 copies/ml [Gimeno et al., 2008; Solano and Navarro, 2010; Bravo et al., 2011]. Therapeutic management of active CMV infection

(pre-emptive antiviral therapy) has also been detailed prior to this study [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011; Muñoz-Cobo et al., 2012; Muñoz-Cobo et al., 2014]. In brief, antiviral therapy was administered upon detection of >150 – $1,000$ CMV DNA copies/ml (depending upon the QRT-PCR employed and the patient's risk before CMV end-organ disease) and was discontinued after one or two consecutive negative (undetectable) PCR results. CMV DNAemia and active CMV infection are used interchangeably throughout the text.

Immunological Monitoring

NK-cell immunophenotyping was performed in heparinized whole blood samples in four-color analysis on a FACScant II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), as described previously [Muñoz-Cobo et al., 2012; Muñoz-Cobo et al., 2014]. CMV pp65/IE-1-IFN- γ -producing CD8⁺ T-cells were enumerated by intracellular cytokine staining (ICS), in line with a previously published protocol [Solano et al., 2008; Tormo et al., 2011]. CD8⁺ events were gated and then analyzed for the CD69 activation marker and IFN- γ production. The specific responses were considered to be those $>0.1\%$. The total number of CMV-specific IFN- γ CD8⁺ T-cells was calculated by multiplying the percentages of CMV-specific T-cells producing IFN- γ upon stimulation (after background subtraction) by the absolute CD8⁺ T-cell counts. Immunological monitoring was scheduled to be performed at days +30 and +60 following Allo-SCT. A number of specimens were not received from the participating centers, while a few more could not be analyzed due to technical problems.

Statistical Analysis

Data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS (version 20.0). Comparisons were carried out using the nonparametric Mann–Whitney U-test for unpaired continuous data and Fisher's exact test for categorical variables. The Spearman rank test was used for analyzing the correlation between continuous variables (the data were not log-transformed for these analyses). A *P*-value (two-tailed) <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

A total of 31 patients developed CMV DNAemia within the study period (first 100 days after allogeneic stem cell transplantation). Nine patients between day 0 and +30, 15 patients between days +30 and +60, and 7 patients between days +60 and +100. All these patients experienced a single episode of active CMV infection. Thus, a total of 22 patients had CMV DNAemia after the first immunological control (day +30), between days +30 to +100 (Median, day +49; Range, days +32 to +100). NK-cell counts at

day +30 were available from 20 out of these 22 patients and from all the patients ($n=30$) who had no CMV DNAemia during the study period. All these patients ($n=52$) displayed detectable CMV pp65/IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ T-cell responses at day +30 after transplantation (range, 0.035–75.1 cells/ μ l). As shown in Figure 1, neither the absolute number of NKG2C⁺ NK cells (panel A), nor that of CD56^{bright}CD16^{-/low} (panel B), and CD56^{dim}CD16⁺ (panel C) NKG2C⁺ NK-cell subsets differed significantly between patients with or without subsequent CMV DNAemia. It is of note that the percentage of CMV-seropositive patients receiving an allograft from CMV seropositive donors was comparable in both groups (54% in the group of patients with CMV DNAemia and 45.5% in the group of patients without CMV DNAemia, $P=0.6$). This fact is of relevance insofar as NK cells expressing the activating NKG2C receptor are highly enriched in CMV-infected individuals [Gumá et al., 2004]. In this context, a separate analysis of CMV D+/R+ and CMV D-/R+ groups failed to show statistically significant differences between NKG2C⁺ NK-cell counts in patients with or without subsequent CMV DNAemia (Table II). In the current cohort, this was also the case for CMV-specific CD8⁺ T-cells, although a trend toward lower levels of these cells, both in D+/R+ and D-/R+, was evident in patients experiencing CMV DNAemia subsequently (Table II).

No significant correlation was found between the levels of both NKG2C⁺ NK-cell populations at day +30 and the CMV DNA peak loads within episodes of CMV DNAemia occurring subsequently, within days +30 and +100 after transplant (Fig. 2) indicating that NK cell counts at day +30 are unlikely to predict the magnitude of CMV replication within subsequent episodes of active CMV infection.

In turn, as shown in Figure 3, the levels of CD56^{bright}CD16^{-/low} (A) and CD56^{dim}CD16⁺ (B) NKG2C⁺ NK cells measured at day +30 in patients with no prior CMV DNAemia (specimens available from 50 out of 52 patients) were not found to correlate significantly with the levels of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cells (also measured at day +30).

A total of 24 out of 31 patients who developed CMV DNAemia within the study period experienced the episode prior to the second immunological analysis (day +60), within days 0 to +60 (Median, 34 days; Range, 7–60 days). NK-cell counts at day +60 were available from 17 of these patients and from the 25 patients who had not developed CMV DNAemia at that time frame. As shown in Figure 1 (panels D, E, and F), NKG2C⁺ NK-cell levels were not significantly different in patients with or without a prior episode of CMV DNAemia. Nevertheless, as shown in Figure 4, a significant correlation was found between the levels of CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells (but not that of CD56^{bright}CD16^{-/low} NKG2C⁺ NK cells) and the CMV DNA peak load within these preceding episodes.

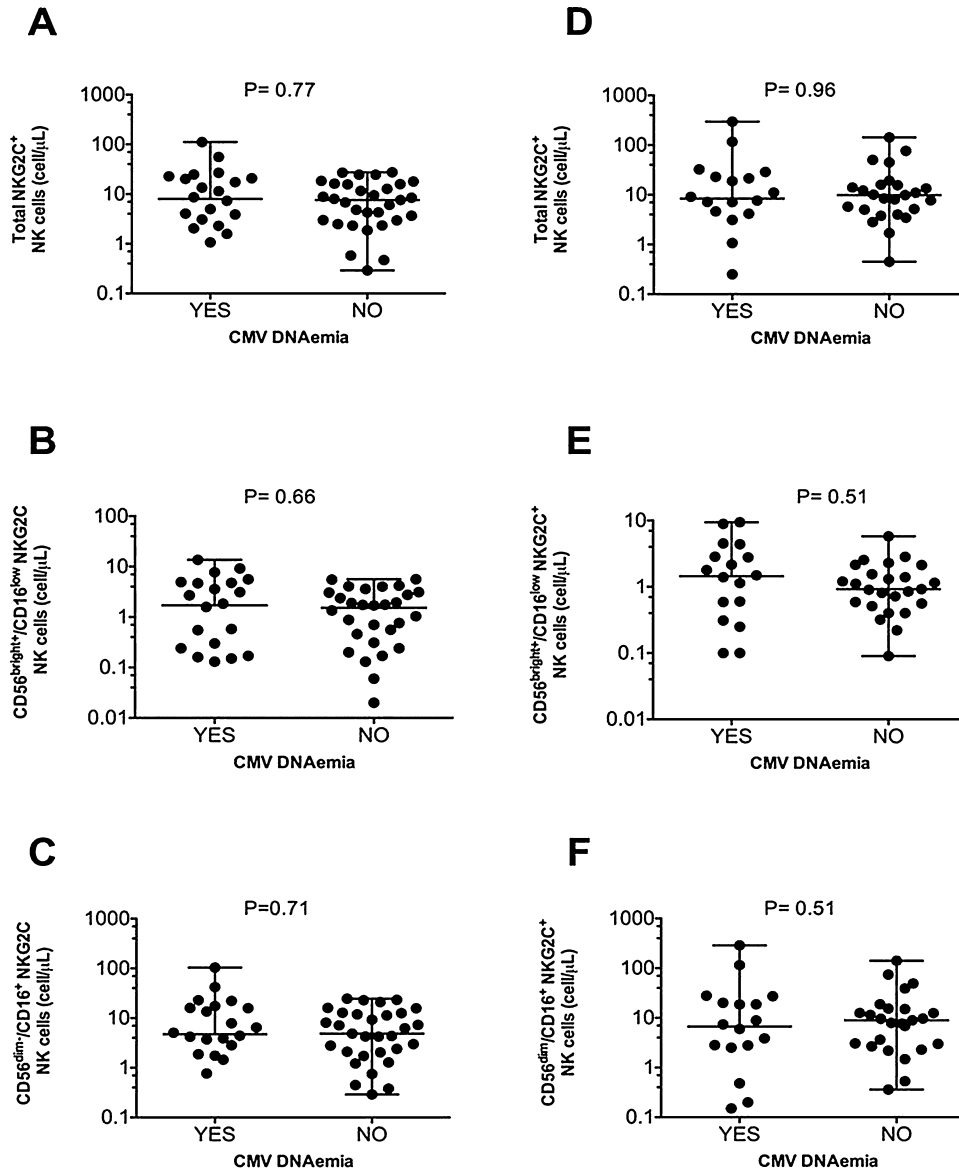


Fig. 1. Peripheral blood levels of total NKG2C⁺ NK cells (A), CD56^{bright}CD16^{-low} NKG2C⁺ NK cells (B), and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells (C) at day +30 following allogeneic stem cell transplantation in patients with a subsequent episode of CMV DNAemia developing between days +30 and +100 (blood specimens were available from 20 out of 22 patients) or without it (n = 30). Peripheral blood levels of total NKG2C⁺ NK cells (D), CD56^{bright}CD16^{-low} NKG2C⁺ NK cells (E), and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells (F) at day +60 after transplant in patients with prior CMV DNAemia (occurring between days 0 and +60; specimens were available from 17 out of 24 patients) and in patients who did not develop CMV DNAemia within the first 60 days after transplant (specimens were available from 25 patients). Bars represent median values. P-values (Mann–Whitney *t*-test) are shown.

DISCUSSION

In a previous study, we investigated whether peripheral levels of CD56^{bright}CD16^{-low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells at day 30 after transplant correlated with protection from initial episodes of CMV DNAemia occurring afterwards—i.e., until day 100 after transplant—in patients lacking detectable CMV pp65/IE-1-specific CD8⁺ T-cell responses. The rationale behind

this strategy was that recovery of the NK cell populations occurs earlier than that of T-cells following Allo-SCT, while their functionality is relatively unaffected by immunosuppressive regimens targeting T-cells [Seggewiss and Einsele, 2010]. Thus, a direct involvement of NK cells would more likely be evident early after allogeneic stem cell transplantation, especially in patients with undetectable CMV-specific T-cell responses. The data contravened any case for a major role

TABLE II. NKG2C⁺ NK Cell and Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8⁺ T-Cell Counts at Day +30 After Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients With or Without Subsequent CMV DNAemia According to CMV-Serostatus of Donors and Recipients

CMV serostatus of donors (D) and recipients (R), no. of patients	Cell population (cells/ μ L)	CMV DNAemia ^a		P-value ^b
		Yes	No	
D+/R+ (33)	CD56 ^{bright} CD16 ^{-/low} NKG2C ⁺	2.70 (0.03–9.21)	2.57 (0.06–4.03)	0.50
	CD56 ^{dim} CD16 ⁺ NKG2C ⁺	6.47 (0–103.77)	8.03 (0.38–24.55)	0.86
	CMV pp65/IE-1 CD8 ⁺ T cells	0.84 (0.02–4.61)	1.11 (0.02–3.12)	0.85
D–/R+ (20)	CD56 ^{bright} CD16 ^{-/low} NKG2C ⁺	0.17 (0–13.65)	1.76 (0.13–5.61)	0.23
	CD56 ^{dim} CD16 ⁺ NKG2C ⁺	3.81 (0–42.21)	7.30 (0.75–22.88)	0.46
	CMV pp65/IE-1 CD8 ⁺ T-cells	0.47 (0.07–2.69)	0.99 (0.05–9.45)	0.29

CMV, Cytomegalovirus; D, donor; R, recipient.

^aEpisodes of CMV DNAemia developing between days +30 and +100 after transplant.

^bMann–Whitney U-test. A P-value (two-tailed) <0.05 was considered to be statistically significant.

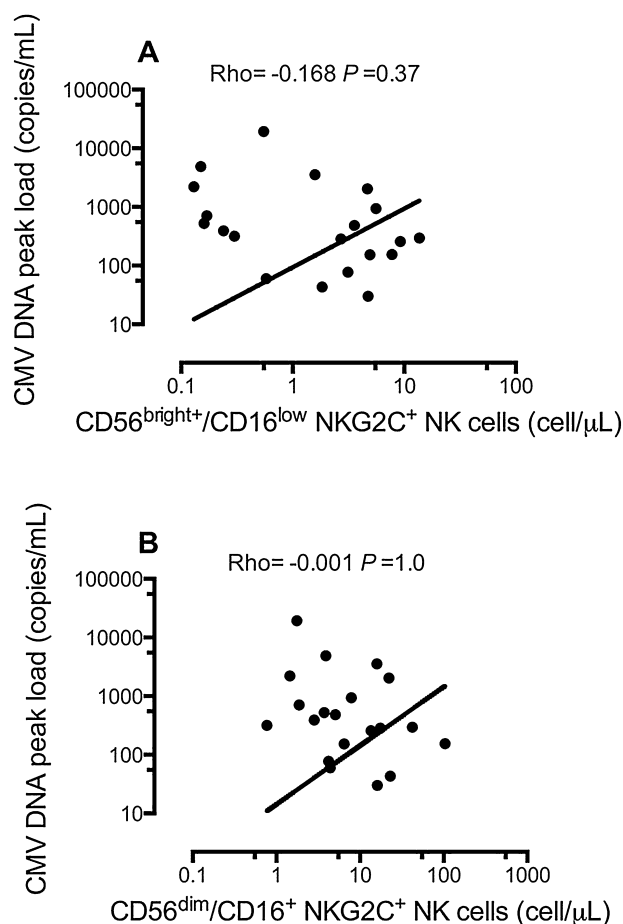


Fig. 2. Correlation between peripheral blood levels of CD56^{bright}CD16^{-/low} NKG2C⁺ NK cells (A) and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells (B) measured at day +30 following allogeneic stem cell transplantation in patients with no prior episode of CMV DNAemia (n = 22; specimens available from 20 patients) and plasma CMV DNA peak levels (copies/ml) within episodes of CMV DNAemia developing subsequently (between days +30 and +100). The Rho and P-values (Spearman rank test) are shown.

of NKG2C⁺ NK cells in providing protection against the occurrence of episodes CMV DNAemia.

In the current study, this conclusion was extended to a subset of patients displaying detectable CMV pp65/IE-1-specific T-cell responses early after transplant (day +30). In effect, NKG2C⁺ NK cell levels measured at day +30 after transplant did not differ significantly between patients with or without a subsequent episode of CMV DNAemia. In addition, the levels of both NKG2C⁺ NK-cell populations and the CMV DNA peak load within subsequent episodes of CMV DNAemia were not found to correlate significantly, indicating that enumeration of NKG2C⁺ NK cells does not allow inference of either the risk of CMV DNAemia or the level of virus replication within subsequent episodes. Data apparently contradicting those reported in the current study have been published. 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. Nevertheless, the NK-cell population subjected to analysis differed between the studies (CD16⁺/CD56⁺/CD69⁺/IFN- γ ⁺ vs. NKG2C⁺ NK cells in the current study).

Kheav et al., [2014] have provided data suggesting that, in CMV-seropositive Allo-SCT recipients, NKG2C⁺ NK cell levels at month 3 following transplantation may allow prediction of the risk of subsequent episodes of CMV reactivation. The current study differs from that of Kheav et al., [2014] in several aspects which may partially account for the discrepancies found between the studies: (i) immunological analyses were performed at days +30 and +60 following allogeneic stem cell transplantation, whereas in the quoted study, the first immunological analysis was performed at month 3; (ii) the presence of any level of CMV DNA in plasma (>25 copies/ml when the Abbot QRT-PCR was employed and >150 copies/ml when the Roche QRT-PCR assay was used) was categorized as an active CMV infection in the current study. Instead, active CMV infection (CMV reactivation) was defined as CMV DNA levels

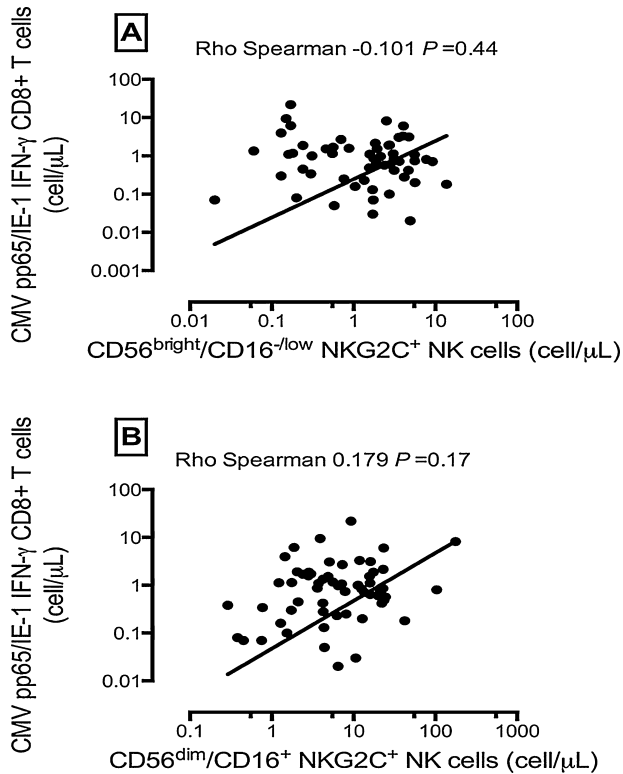


Fig. 3. Correlation between peripheral blood levels of CD56^{bright}CD16^{-low} (A) and CD56^{dim}CD16⁺ (B), NKG2C⁺ NK cells measured at day +30 in patients with no prior CMV DNAemia (n=52; specimens available from 50 patients), and the levels of CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T-cells (also measured at day +30). The Rho and P-values (Spearman rank test) are shown.

>1,000 copies/ml by Kheav et al., [2014], which in fact was the established cut-off for inception of pre-emptive antiviral therapy; (iii) in their study, both primary and recurrent episodes occurring after month 3 were taken into consideration for the analyses. In the current study only first episodes of active CMV infection developing within days +30 and +100 have been considered. In addition, CMV-specific T-cell immunity was not assessed in this study. Moreover, the current cohort included a few CMV-seronegative recipients (receiving an allograft from CMV-seropositive donors), whereas in the study by Kheav et al., [2014] only CMV-seropositive donors were enrolled.

In a previous study, in which NKG2C⁺ NK cells were enumerated on a weekly basis during episodes of active CMV infection, it was shown that expansion of CD56^{bright}CD16^{-low} and CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells occurs in most patients in parallel to CMV-specific CD8⁺ T-cells. The magnitude of such an expansion was found to be higher for the latter NKG2C⁺ NK-cell subset. Furthermore, both NKG2C⁺ NK-cell populations were found to correlate inversely with CMV DNA load during episodes of active CMV infection. In the current study, enumeration of NKG2C⁺ NK cells was performed at day +60, time at

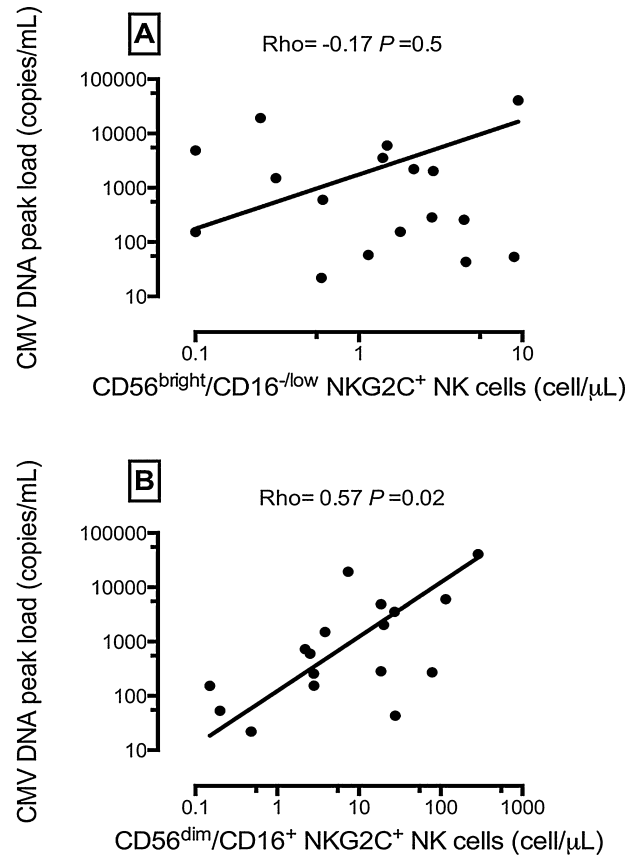


Fig. 4. Correlation between peripheral blood levels of CD56^{bright}CD16^{-low} (A) and CD56^{dim}CD16⁺ (B), NKG2C⁺ NK cells measured at day +60 following allogeneic stem cell transplantation in patients with prior CMV DNAemia (occurring within days 0 and +60; specimens were available from 17 out of 24 patients), and plasma CMV DNA peak levels (copies/ml) within these episodes. All patients experienced a single episode of CMV DNAemia. The Rho and P-values (Spearman rank test) are shown.

which most episodes had been already cleared. In this setting, although no significant differences were observed between the levels of both NKG2C⁺ NK-cell subsets in patients with prior CMV DNAemia and those found in patients without CMV DNAemia, a significant correlation was found between the levels of CD56^{dim}CD16⁺ NKG2C⁺ NK cells (but not that of CD56^{bright}CD16^{-low} NKG2C⁺ NK cells) and the CMV DNA peak load within preceding episodes of active CMV infection, thus suggesting that the level of virus replication might influence the magnitude of expansion of NKG2C⁺ NK cells displaying cytotoxic potential.

The current study has several limitations. Firstly, the relatively scarce number of patients developing CMV DNAemia in our cohort. Secondly, the functional capacity and the activation status of the NKG2C⁺ NK-cell populations were not investigated. Thirdly, two distinct QRT-PCR assays with different limit of detection were used. This is nevertheless

unlikely to undermine our conclusions given the closeness of the detection limit.

The advent of new drugs performing with a higher level of intrinsic activity against CMV and a superior safety profile (i.e., letermovir or maribavir) than otherwise conventional drugs (i.e., ganciclovir or foscarnet) may pave the way to the wider use of antiviral prophylaxis in the prevention of CMV end-organ disease in allogeneic stem cell transplant recipients. In such a scenario, the availability of biomarkers predicting the occurrence CMV viremia would allow the inception of antiviral prophylaxis on an individual basis according to the patient's risk (targeted prophylaxis). The data in the current study is in line with that recently published by our group [Muñoz-Cobo et al., 2014] and indicate, collectively, that enumeration of NK2C⁺ NK cells early after transplant is unlikely to be helpful in identifying those patients at highest risk of developing CMV DNAemia and in predicting the dynamics of CMV replication within episodes of active CMV systemic infection occurring subsequently. In addition, from a mechanistic point of view, our data do not support although cannot completely rule out, a direct implication of NKG2C⁺ NK cells in preventing the development of CMV DNAemia. Nevertheless, further studies are required to precisely define the role of NK cells in the control of CMV infection in the Allo-SCT setting.

ACKNOWLEDGMENTS

Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC). All the authors have critically reviewed the paper. The authors declare no conflicts of interest.

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.
- Bravo D, Clari MÁ, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, José Remigia M, Navarro D. 2011. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma Cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 49:2899–2904.
- Della Chiesa M, Falco M, Muccio L, Bertaine A, Locatelli F, Moretta A. 2013. Impact of HCMV infection on NK cell development and function after HSCT. *Front Immunol* 4:458.
- 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.
- 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* 104:3664–3771.
- Kheav VD, Busson M, Scieux C, Peffault de Latour R, Maki G, Haas P, Mazeron MC, Carmagnat M, Masson E, Xhaard A, Robin M, Ribaud P, Dulphy N, Loiseau P, Charron D, Socie G, Toubert A, Moins-Teisserenc H. 2014. Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 99:1860–1867.
- 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.
- Lopez-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+NKG2hi 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, Garcia-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.
- Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, de la Cámara R, Nieto J, López J, Amat P, Garcia-Noblejas A, Navarro D. 2014. An evaluation of the role of NKG2C⁺ natural killer cells in protection from cytomegalovirus DNAemia early following allogeneic stem cell transplantation. *J Med Virol* 86:806–811.
- 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, Garcia-Noblejas A, Alberola J, Tamarit A, Gimeno C, Navarro D. 2008. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 93:1434–1436.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J, Garcia-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.

Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8⁺ T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation

E. Giménez, B. Muñoz-Cobo, C. Solano, P. Amat, R. de la Cámara, J. Nieto, J. López, M.J. Remigia, A. Garcia-Noblejas, D. Navarro. Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8⁺ T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation.

Transpl Infect Dis 2015; 17: 361–370. All rights reserved

Abstract: *Background.* The functional profile of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells that associate with protection from and control of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients remains incompletely characterized.

Methods. We enumerated pp65 and immediate early (IE)-1-specific CD8⁺ T cells expressing interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and CD107a, by flow cytometry in 94 patients at days +30 and +60 after allo-SCT.

Results. Fifty of 94 patients had CMV DNAemia within the first 100 days after transplant. CMV-specific CD8⁺ T-cell responses (of any functional type) were more likely to be detected in patients who did not display CMV DNAemia than in those who did ($P = 0.04$). Qualitatively, no major differences in the functional signature of CMV-specific CD8⁺ T cells were noted between patients who had or did not have CMV DNAemia. Patients displaying levels of polyfunctional CD8⁺ T cells at day +30 >0.30 cell/ μ L had a lower risk of CMV DNAemia (positive predictive value 76%, and negative predictive value 43%).

Conclusion. The presence of polyfunctional CD8⁺ T cells (either expressing CD107a or not) was associated with lower levels of CMV replication, and higher frequency of self-resolved episodes. The data reported further clarify the role of polyfunctional CD8⁺ T cells in control of CMV DNAemia in allo-SCT recipients.

E. Giménez¹, B. Muñoz-Cobo¹, C. Solano^{2,3}, P. Amat², R. de la Cámara⁴, J. Nieto⁵, J. López⁶, M.J. Remigia², A. Garcia-Noblejas⁴, D. Navarro^{1,7}

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

Key words: cytomegalovirus; CMV DNAemia; allogeneic stem cell transplant; polyfunctional CD8⁺ T cells

Correspondence to:
David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain
Tel: 34 (96) 3864657
Fax: 34 (96) 3864173
E-mail: david.navarro@uv.es

Received 5 August 2014, revised 15 September 2014, 5 November 2014, 22 January 2015, accepted for publication 20 March 2015

DOI: 10.1111/tid.12391
Transpl Infect Dis 2015; 17: 361–370

The incidence of cytomegalovirus (CMV) end-organ disease in allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) recipients has dramatically decreased in the era of preemptive antiviral therapy (1); nevertheless, CMV DNAemia continues to be a frequent event that may have deleterious clinical consequences (1). Protection from CMV viremia and CMV end-organ disease in allo-SCT recipients is critically dependent upon the reconstitution of functional CMV-specific T-cell immunity (2–6).

T-cell reconstitution after allo-SCT is a biphasic process. In the early phase, T cells derived from the graft expand because of homeostatic proliferation. Later on, the thymus resumes T-cell neogenesis, thus providing the host with donor-derived naïve T cells with a completely diverse T-cell receptor (7, 8). Nevertheless, the extent to which this process occurs depends on donor age, conditioning regimen and graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis

regimen used, and the underlying disease, among other factors (8).

In this context, we previously showed that enumeration of the total number of interferon-gamma (IFN- γ)-producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells targeting the viral proteins pp65 and immediate early (IE)-1 by flow cytometry for intracellular staining allows discrimination between patients protected against CMV DNAemia from those who are not, with a high positive predictive value (PPV), but a modest negative predictive value (NPV) (9–12). These measurements, nevertheless, do not permit to distinguish between CMV-specific T cells exclusively producing IFN- γ from those displaying a wider array of functional capabilities (i.e., secretion of other cytokines or chemokines, such as tumor necrosis factor-alpha [TNF- α], macrophage inflammatory protein-1b [MIP-1 β], or interleukin [IL]-2, or degranulation). Increasing evidence shows that CD8⁺ and CD4⁺ T cells that exert multiple effector functions (polyfunctional) are superior to those exhibiting monofunctional properties in controlling acute and chronic viral infections, such as those caused by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus (13). The precise functional signature of CMV-specific T cells that protect from development of CMV DNAemia in the allo-SCT setting is incompletely understood, although preliminary data suggest that polyfunctional CD8⁺ T cells may also be more effective than monofunctional CD8⁺ T cells for that purpose (14–19).

The aim of this study was to determine the functional nature of CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells that associate with protection from and control of viral DNAemia early after allo-SCT.

Patients and methods

Patients

The current cohort consisted of 94 non-consecutive allo-SCT recipients who attended the participating hospitals between April 2010 and May 2012. None of these patients were included in an earlier study by our group (15). The median age of patients was 47 years (range 15–67). Relevant clinical and demographic data of the patients are summarized in Table 1. CMV-seronegative recipients (R–) receiving an allograft from CMV-seronegative donors (D–) were excluded from the study. The study period comprised the first 100 days after transplantation.

The study was approved by the Review Board and Ethics Committees of the participating hospitals. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Demographic and clinical characteristics of the patients

Parameter	No. of patients (%)
Gender	
Male	63 (67.0)
Female	31 (33.0)
Underlying disease	
Acute myeloid leukemia	34 (36.2)
Non-Hodgkin's lymphoma	20 (21.3)
Myelodysplastic syndrome	9 (9.6)
Acute lymphocytic leukemia	8 (8.5)
Chronic lymphocytic leukemia	6 (6.4)
Multiple myeloma	5 (5.3)
Hodgkin's lymphoma	6 (6.4)
Aplastic anemia	3 (3.2)
Others	3 (3.2)
HLA matching	
Matched	80 (85.1)
Mismatched	14 (14.9)
Donor type	
Related	60 (63.8)
Unrelated	34 (36.2)
Stem cell source	
Peripheral blood	86 (91.5)
Bone marrow	8 (8.5)
Conditioning regimen	
Myeloablative	50 (53.2)
Non-myeloablative	44 (46.8)
Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis	
Cyclosporine/Methotrexate	62 (66.0)
Cyclosporine/Mycophenolate mofetil	5 (5.3)
Other combinations	27 (28.7)
CMV serostatus	
D+/R+	46 (48.9)
D–/R+	24 (36.2)
D+/R–	14 (14.9)
Acute GVHD	
0–I	58 (61.7)
II–IV	36 (38.3)
Receipt of corticosteroids >1 mg/kg	
Yes	11 (11.7)
No	83 (88.3)

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

Table 1

Written informed consent was obtained from the next of kin on behalf of the minors enrolled in the study.

Management of active CMV infection

During the study period, monitoring of plasma CMV DNAemia was performed once a week by using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay (CMV real-time PCR, Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, USA, or LightCycler CMV Quant Kit, Roche, Branchburg, New Jersey, USA), as previously described (11, 20, 21). The limits of detection of these assays are 25 and 150 CMV DNA copies/mL, respectively. Patients with active CMV infection (any level of CMV DNAemia) were preemptively treated with oral valganciclovir (900 mg/12 h), intravenous ganciclovir (5 mg/kg/12 h), or foscarnet (intravenous 60 mg/kg/12 h) upon detection of >500 CMV DNA copies/mL. Antiviral therapy was discontinued after 2 consecutive negative (undetectable) PCR results. CMV DNA loads measured by the Abbott and the Roche real-time PCR assays are quite comparable, differing by <0.5 log₁₀ copies/mL across the entire range of quantitation (21).

Enumeration of functional CMV-specific CD8⁺ T cells

Quantitation of CMV-specific CD8⁺ T cells expressing 1 or more of the following markers – IFN- γ , TNF- α , or CD107a – was performed by intracellular staining, as previously described (15). Two sets of overlapping peptides spanning the entire sequences of pp65 and IE-1 were used as the specific antigenic stimulus. For each sample, we acquired an overall number of 10,000 events in the gate of CD3⁺ CD8⁺ (subject to total individual lymphocyte counts). For enumeration of the different CMV-specific CD8⁺ T-cell subpopulations, all measurements were background subtracted, taking into account the frequency of cells producing cytokines/CD107a in the absence of antigenic stimulation. Only those samples with >10 events and response magnitudes >3 times that of the corresponding control were considered positives. Polyfunctional CD8⁺ T cells were those that were positive for IFN- γ and TNF- α . On the basis of previous reports, the expression of CD107a was not considered a surrogate marker of cytotoxicity, but rather as a marker of T-cell activation (22, 23).

Statistical analysis

The data were analyzed with the aid of the statistical package SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, Illinois,

USA). Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U*-test. The Spearman's rank test was used to analyze correlations between continuous variables. Frequency comparisons for categorical variables were carried out using the χ^2 test (Fisher's exact test). Two-sided exact *P*-values are reported. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant. Receiver operating characteristics curve analysis was also performed with the SPSS program.

Results

Incidence of CMV DNAemia

A total of 50 of 94 patients (53.2%) developed 1 (*n* = 45) or more (*n* = 5) episodes of CMV DNAemia within the first 100 days after transplant (median day +36; range days +6 to +100). In this cohort, receipt of an unrelated allograft was significantly associated with a higher incidence of CMV DNAemia (*P* = 0.05). In addition, D+/R– patients had a significantly lower incidence of CMV DNAemia in comparison with their D–/R+ or D+/R+ counterparts (*P* = 0.02). Neither human leukocyte antigen-matching, source of stem cells, conditioning regimen, donor CMV serostatus (in CMV-seropositive recipients, R+), GVHD prophylaxis regimen, nor the occurrence of severe acute GVHD were significantly related to development of CMV DNAemia (data not shown).

Twenty of these patients experienced an episode of CMV DNAemia prior to the day of the first immunological analysis, scheduled to be performed at day +30. The remaining 30 patients developed the episode between days +30 and +60 (*n* = 20) or between days +60 and +100 (*n* = 10). All of these latter patients were CMV seropositive (R+).

Functional profiles of CMV-specific CD8⁺ T cells in patients with or without CMV DNAemia

We first enumerated CMV pp65 and IE-1-specific monofunctional CD8⁺ T cells producing either IFN- γ , TNF- α , or mobilizing the lysosomal protein CD107a upon *ex vivo* antigenic stimulation, and all possible combinations of functional CMV-specific CD8⁺ T cells in patients who did or did not develop CMV DNAemia. Immunologic analyses were performed at a median of 30 days (range 25–45 days) and at a median of 60 days (range 57–80 days) after allo-SCT. Representative flow cytometry plots are shown in Figure 1. Blood speci-

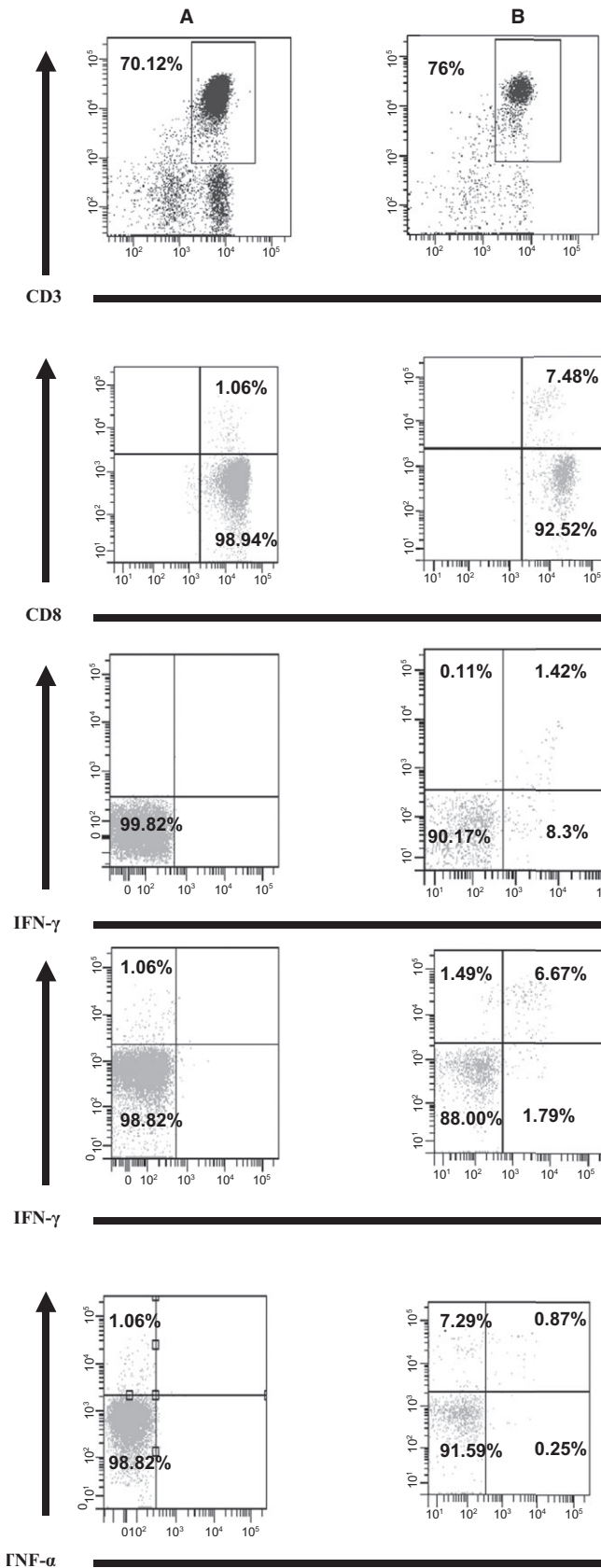


Fig. 1. Representative flow cytometry plots for patients (A) displaying exclusively monofunctional cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses (CD107a⁺), and (B) mono- and polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T-cell responses. IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor.

mens for analysis were available from 26 patients developing CMV DNAemia after the time of the first immunological monitoring, and from 43 patients who had no detectable CMV DNAemia within the study period.

CMV-specific CD8⁺ T-cell responses (of any functional type) were more likely to be detected ($P = 0.04$) in patients who did not go on to develop CMV DNAemia (26 and 23 of 43 patients at days +30 and +60, respectively) than in those who did so (10 of 26 patients, at day +30). Qualitatively, no major differences in the functional signature of CMV-specific CD8⁺ T cells were noted between patients with or without subsequent CMV DNAemia (Table 2); nevertheless, the level of polyfunctional CD8⁺ T cells at day +30 in patients who had a subsequent episode of CMV DNAemia was lower (median 0.12 cell/ μ L; range 0.02–1.67 cells/ μ L) than that in patients who did not (median 0.44 cell/ μ L; range 0.02–49.06 cells/ μ L), although statistical significance was not reached ($P = 0.32$). Analogously, the levels of polyfunctional CD8⁺ T cells expressing simultaneously CD107a were also lower in the former patients (median 0.11 cell/ μ L; range 0.01–1.42 cells/ μ L) than in the latter patients (median 0.23 cell/ μ L; range 0.02–25.9 cells/ μ L) ($P = 0.37$).

Among patients with CMV DNAemia developing after day +30, the presence of polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T cells, either expressing or not expressing CD107a at day +30, was associated with lower levels of CMV replication, as judged by the magnitude of the initial and peak CMV DNA loads within episodes (Table 3). Furthermore, patients able to clear the episode of CMV DNAemia without the need of antivirals were more likely to exhibit polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T-cell responses at day +30 (6 of 13; 46.2%) than those who required the inception of preemptive antiviral therapy (3 of 13; 23.1%). This difference, however, did not reach statistical significance ($P = 0.22$).

Impact of demographic and clinical factors on the acquisition of CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cell responses

Next, we investigated whether the reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific polyfunctional CD8⁺ T-cell

Functional profiles of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells at days 30 and 60 after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) in patients with or without subsequent CMV DNAemia

CD8 ⁺ T-cell population	No. of patients with detectable responses (%)		
	Day +30 ¹	Day +60 ²	Day +30 ³
	CMV DNAemia		
	No	No	Yes
Total CD107a	15 (57.7)	11 (47.8)	5 (50.0)
Total TNF- α	25 (96.2)	22 (95.7)	10 (100)
Total IFN- γ	26 (100)	23 (100)	10 (100)
Monofunctionals	25 (96.2)	23 (100)	10 (100)
CD107a	14 (53.8)	10 (43.5)	4 (40.0)
TNF- α	23 (88.5)	22 (95.7)	10 (100)
IFN- γ	25 (96.2)	23 (100)	10 (100)
Monofunctionals exclusively ⁴	8 (30.8)	6 (26.1)	1 (10.0)
CD107a	2 (25.0)	1 (16.7)	0 (0.0)
TNF- α	7 (87.5)	6 (100)	1 (100)
IFN- γ	8 (100)	6 (100)	1 (100)
Polyfunctionals ⁵	17 (65.4)	17 (73.9)	9 (90.0)
Polyfunctionals ⁵ plus CD107a	10 (38.5)	11 (47.8)	3 (30.0)
Monofunctionals plus Polyfunctionals	7 (26.9)	6 (26.1)	6 (60.0)
CD107a plus IFN- γ /TNF- α	3 (42.9)	0 (0.0)	2 (33.3)
TNF- α plus IFN- γ /TNF- α	5 (71.4)	6 (100)	6 (100)
IFN- γ plus IFN- γ /TNF- α	6 (85.7)	6 (100)	6 (100)

¹Data (number of patients and percentage) from 26 patients without CMV DNAemia (between days 0 and +100 after allo-SCT) displaying detectable CMV-specific CD8⁺ T-cell responses.

²Data (number of patients and percentage) from 23 patients without CMV DNAemia (between days 0 and +100 after allo-SCT) displaying detectable CMV-specific CD8⁺ T-cell responses.

³Data (number of patients and percentage) from 10 patients with detectable CMV-specific CD8⁺ T-cell responses at day +30 after allo-SCT and developing a subsequent episode of CMV DNAemia.

⁴Patients displaying monofunctional CD8⁺ T-cell responses, but lacking polyfunctional CD8⁺ T-cell responses.

⁵CMV-specific CD8⁺ T cells producing simultaneously IFN- γ and TNF- α .

IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor; CD107a, degranulation marker.

Table 2

responses either at day +30 or +60 after transplant was influenced by demographic factors, or by certain pre-transplant and post-transplant clinical conditions. As CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T cells are known to

arise and expand in response to CMV replication (15), patients who had an episode of CMV DNAemia prior to the time of immunological monitoring were excluded from the analyses. The data are shown in Table 4.

None of the parameters subjected to analysis appeared to have an impact on the rate of acquisition of CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cell responses (either expressing or not expressing the degranulation marker CD107a). On the basis of a previous report (14), we investigated the potential effect of donor (D) CMV-serostatus on the reconstitution of polyfunctional T-cell responses. A trend toward a more frequent development of polyfunctional T cells was observed in D+/R+ than in D-/R+ allo-SCT recipients, although statistical significance was not reached ($P = 0.62$).

Correlation between total IFN- γ -producing and polyfunctional CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells

We next sought to determine whether enumeration of total CMV-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells allowed the estimation of the size of polyfunctional CD8⁺ T-cell responses in patients who did not develop CMV DNAemia. A modest (P -value varying between 0.37 and 0.72) although significant correlation ($P < 0.01$) was found between the total number of CMV-specific CD8⁺ T cells producing IFN- γ and the number of polyfunctional (either CD107a⁺ or CD107a⁻) CD8⁺ T cells.

Clinical value of the enumeration of the different functional subsets of CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells for predicting protection against the development of CMV DNAemia

The clinical utility of the measurement of the different functional populations of CMV-specific CD8⁺ T cells was assessed by calculating their PPV and NPV for the occurrence of CMV DNAemia (PPV, detectable response and absence of CMV DNAemia, and NPV, undetectable response and presence of CMV DNAemia, respectively). At day +30, the detection (at any level) of total CMV-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells had a PPV and NPV of 72.2% and 48.5%, respectively. These figures were 71% and 47% for total TNF- α -producing CD8⁺ T cells, 75% and 43% for CD8⁺ T cells mobilizing the lysosomal protein CD107a, 65% and 40% for polyfunctional CD8⁺ T cells, and 66% and 47%, for polyfunctional CD8⁺ T cells expressing CD107a, respectively. Receiver operating characteristics curve analysis

Relationship between the presence or absence of different functional subsets of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T cells and initial and peak CMV DNA loads within episodes of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients

Parameter	Polyfunctionals ¹		<i>P</i> -value ²	Polyfunctionals ¹ plus CD107a		<i>P</i> -value ²
	Yes (<i>n</i> = 9)	No (<i>n</i> = 17)		Yes (<i>n</i> = 3)	No (<i>n</i> = 23)	
Median peak CMV DNA load, copies/mL (range)	295 (30–19,266)	1592 (133–83,665)	0.04	58 (30–77)	1592 (133–83,665)	0.006
Median initial CMV DNA load, copies/mL (range)	155 (2–3540)	575 (4–83,665)	0.05	28 (2–77)	528 (4–83,665)	0.02

¹CMV-specific CD8⁺ T cells producing simultaneously IFN- γ and TNF- α .
²Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U*-test. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Table 3

indicated that the optimal cutoff value of polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T (either CD107a⁺ or CD107a⁻) for discriminating between patients who either had or did not have CMV DNAemia after day +30 was 0.3 cell/ μ L (PPV 75%; NPV 40%). In accordance with previously reported data from our group (12, 14), levels of total CMV-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells at day +30 >1 cell/ μ L predicted the absence of CMV DNAemia during the study period (PPV 100%; NPV 53%).

Discussion

Limited data are available on the precise functional nature of CMV-specific CD8⁺ T cells that are associated with protection from the occurrence of CMV DNAemia. In this study, we prospectively examined the functional signatures of CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells circulating in peripheral blood from patients with or without detectable viral DNAemia within the first 100 days after allo-SCT. Consistent with previous studies, we found that CMV-specific CD8⁺ T-cell responses of any functional type were more likely to be detected in patients without CMV DNAemia than in patients who went on to develop it (11, 12), and that among patients with CMV DNAemia, the presence of polyfunctional CD8⁺ T cells was associated with lower levels of CMV replication within the episodes (14).

Several novel observations arose from this study. First, no relevant qualitative differences in the functional profile of CMV-specific CD8⁺ T cells were observed between patients developing a subsequent episode of CMV DNAemia and those who did not, although a trend toward a lower frequency of polyfunctional CD8⁺ T cells, either expressing or not expressing CD107a, was seen in the former patients. Thus, the data

suggested that polyfunctional CD8⁺ T cells are highly effective not only in controlling CMV replication but also that their mere presence does not necessarily predict protection against the development of CMV DNAemia.

Second, a non-negligible fraction of patients (around one-third) who did not develop CMV DNAemia displayed exclusively monofunctional CD8⁺ T-cell responses, suggesting that the simultaneous presence of a combination of single-cytokine-producing CD8⁺ T cells, particularly those secreting IFN- γ or TNF- α , may suffice to prevent the occurrence of active systemic CMV infection in certain patients.

Third, the rate of reconstitution of polyfunctional CD8⁺ T-cell responses (both CD107a⁺ and CD107a⁻) early after allo-SCT in patients with no detectable CMV DNAemia during the study period was not significantly associated with any demographic, pre-transplant or post-transplant clinical parameter, not even with the donor CMV serostatus, or the cumulative dose of corticosteroids received for treatment of severe GVHD, as previously reported (14). This discrepancy may have been a result of the limited number of D-/R+ patients (*n* = 13) or patients receiving high-dose corticosteroid therapy (>1 mg/kg, *n* = 4) in our cohort.

Fourth, we found that the PPV and NPV of the detection of total IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (and also total TNF- α -producing CD8⁺ T cells) for the occurrence of CMV DNAemia were comparable to those of the detection of polyfunctional CD8⁺ T cells (either CD107a⁺ or CD107a⁻). This was previously shown by our group for IFN- γ -producing CD8⁺ T measured by the QuantiFERON CMV assay (24).

It can also be inferred from our data that the analysis of the expression of CD107a is dispensable, given that the predictive values of detection of pp65/IE-1 polyfunctional CD8⁺ T cells are virtually the same, regardless of

whether CD107a is expressed or not. The value of the measurement of the total number of IFN- γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells for estimating the degree of

immune competence against CMV has been questioned (14, 17–22, 25–27). Despite this, the clinical value of the enumeration of pp65/IE-1-specific IFN- γ CD8⁺ T cells

Impact of demographic and clinical factors on the acquisition of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8⁺ T-cell responses

Parameter	Polyfunctionals ¹			Polyfunctionals ¹ plus CD107a		
	Yes (n = 23)	No (n = 21)	P-value ²	Yes (n = 10)	No (n = 34)	P-value ²
Age, median (range)	40 (20–60)	41 (15–61)	0.88	39 (20–60)	42 (15–61)	0.81
Gender, no. (%)			0.10			0.08
Male	12 (42.9)	16 (57.1)		4 (14.3)	24 (85.7)	
Female	11 (68.8)	5 (31.2)		6 (37.5)	10 (62.5)	
Underlying disease, no. (%)			0.62			0.64
Acute myeloid leukemia	8 (53.3)	7 (46.7)		4 (26.7)	11 (73.3)	
Non-Hodgkin's lymphoma	5 (62.5)	3 (37.5)		1 (12.5)	7 (87.5)	
Myelodysplastic syndrome	2 (40.0)	3 (60.0)		1 (20.0)	4 (80.0)	
Acute lymphocytic leukemia	1 (25.0)	3 (75.0)		1 (25.0)	3 (75.0)	
Chronic lymphocytic leukemia	1 (33.3)	2 (66.7)		0 (0.0)	3 (100.0)	
Multiple myeloma	2 (100.0)	0 (0.0)		1 (50.0)	1 (50.0)	
Hodgkin's lymphoma	3 (60.0)	2 (40.0)		1 (20.0)	4 (80.0)	
Aplastic anemia	0 (0.0)	1 (100.0)		0 (0.0)	1 (100.0)	
Others	1 (100.0)	0 (0.0)		1 (100.0)	0 (0.0)	
HLA matching, no. (%)			0.34			0.91
Matched	20 (50.0)	20 (50.0)		9 (22.5)	31 (77.5)	
Mismatched	3 (75.0)	1 (25.0)		1 (25.0)	3 (75.0)	
Donor type, no. (%)			0.58			0.82
Related	17 (50.0)	17 (50.0)		8 (23.5)	26 (76.5)	
Unrelated	6 (60.0)	4 (40.0)		2 (20.0)	8 (80.0)	
Stem cell source, no. (%)			0.92			0.26
Peripheral blood	21 (52.5)	19 (47.5)		10 (25.0)	30 (75.0)	
Bone marrow	2 (50.0)	2 (50.0)		0 (0.0)	4 (100.0)	
Conditioning regimen, no. (%)			0.58			0.03
Myeloablative	15 (55.6)	12 (44.4)		9 (33.3)	18 (66.7)	
Non-myeloablative	8 (47.1)	9 (52.9)		1 (5.9)	16 (94.1)	
Acute GVHD prophylaxis, no. (%)			0.36			0.43
Cyclosporine/Methotrexate	16 (47.1)	18 (52.9)		7 (20.6)	27 (79.4)	
Cyclosporine/Mycophenolate mofetil	1 (50.0)	1 (50.0)		0 (0.0)	2 (100.0)	
Other combination	6 (75.0)	2 (25.0)		3 (37.5)	5 (62.5)	
CMV serostatus, no. (%)			0.62			0.72
D+/R+	11 (61.1)	7 (38.9)		5 (27.8)	13 (72.2)	
D–/R+	6 (46.2)	7 (53.8)		2 (15.4)	11 (84.6)	
D+/R–	6 (46.2)	7 (53.8)		3 (23.1)	10 (76.9)	
Acute GVHD, no. (%)			0.39			0.56
0–I	18 (56.2)	14 (43.8)		8 (25.0)	24 (75.0)	
II–IV	5 (41.7)	7 (58.3)		2 (16.7)	10 (83.3)	

Table 4 Continued

Parameter	Polyfunctionals ¹		P-value ²	Polyfunctionals ¹ plus CD107a		P-value ²
	Yes (n = 23)	No (n = 21)		Yes (n = 10)	No (n = 34)	
Receipt of corticosteroids >1 mg/kg, no. (%)			0.34			0.91
Yes	3 (75.0)	1 (25.0)		1 (25.0)	3 (75.0)	
No	20 (50.0)	20 (50.0)		9 (22.5)	31 (77.5)	

¹CMV-specific CD8⁺ T cells producing simultaneously IFN- γ and TNF- α .
²Frequency comparisons for categorical variables were carried out using the χ^2 test (Fisher's exact test). P-values are reported. A P-value <0.05 was considered statistically significant.
 HLA, human leukocyte antigen; GVHD, graft-versus-host disease; D, donor; R, recipient; IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor.

Table 4

was demonstrated in a pilot experience aimed at evaluating a strategy of combined immunological and virological monitoring for the guidance of preemptive antiviral therapy (28). The reasons accounting for the apparent discrepancy between our data and those of others are uncertain, but may be related to the use of different antigenic stimuli for the *ex vivo* activation of CMV-specific CD8⁺ T cells, the nature of the cytokines evaluated, and perhaps the characteristics of patients. Determination of a threshold value for any functional CMV-specific CD8⁺ T-cell population predicting protection against the development of CMV DNAemia with maximum specificity (PPV 100%) is highly desirable from a clinical standpoint. In this sense, in accordance with earlier findings from our group (9, 11), we found that the levels of CMV-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells at day +30 >1 cell/ μ L predicted the absence of CMV DNAemia up to day +100 (PPV 100%; NPV 53%). Nevertheless, the measurement of polyfunctional (either CD107a⁺ or CD107a⁻) CMV-specific CD8⁺ T cells was less discriminative. Thus, our data further demonstrated the reliability of enumerating CMV-specific IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells for predicting protection against the occurrence of CMV DNAemia.

The data presented herein must be interpreted taking into consideration several facts. First, the expression of other cytokines (i.e., IL-2 and MIP-1 β), which may be instrumental for protection (24–26), was not assessed in the present study. Second, data obtained in the murine mCMV model indicate that viral reactivation at the mucosal and organ sites precede involvement of the systemic compartment (29). It is uncertain to what extent the functional pattern of circulating CMV-specific CD8⁺ T cells reflects that of those present in the tissue compartment. Third, only functional CMV-specific CD8⁺ T cells targeting pp65 and IE-1 were measured in the current study. It is likely that other

CMV proteins elicit CD8⁺ T-cell responses that may be relevant in the control of CMV infection (30). Fourth, CMV-specific polyfunctional CD4⁺ T cells, which are known to be crucial in mediating long-term protection against CMV infection in the allo-SCT setting, were not measured in this study (19). Fifth, it has been recently shown that the synthesis and release of cytokines by T cells is a dynamic process that follows a programmatic rather than a random course. In this context, polyfunctional responses by T cells result from sequential release of cytokine T cells, rather than by secretion of multiple cytokines simultaneously (31, 32). This fact has practical consequences for immune monitoring, as the functionality attributed to a given T-cell clone may be misclassified within a particular time frame (31).

The major limitation of this study is its relatively modest sample size. In addition, the functional nature of CMV pp65 and IE-1-specific CD8⁺ T cells that associate with protection from late-onset CMV DNAemia (developing later than day 100 after transplant) was not investigated. This is undoubtedly of clinical interest in patients at high risk of late CMV end-organ disease, such as those developing severe acute or chronic GVHD.

In summary, the data reported in this study further clarify the immune mechanisms involved in preventing the occurrence of CMV DNAemia in allo-SCT recipients, and, in this sense, they may be helpful in optimizing preemptive antiviral therapy strategies based on combined virologic and immunologic monitoring.

Acknowledgements:

Financial support: This research was supported by two grants (09/1117 and 12/1992) from FIS (Fondo de

Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). Paula Amat is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

Author contribution: E.G., B.M.-C., and P.A. performed the molecular and immunological analyses. C.S., R.dL.C., J.N., J.L., M.J.R., and A.G.N. were the attending physicians at the different participating centers. C.S. and D.N. designed the study. E.G. and D.N. analyzed the data, and D.N. wrote the manuscript. All authors listed critically reviewed the manuscript before submission.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* 2010; 5 (2): 111–124.
- Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 307 (1): 7–13.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78 (5): 1373–1380.
- Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; 83 (7): 1971–1979.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg P. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; 257 (5067): 238–241.
- Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; 99 (11): 3916–3922.
- Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; 115 (19): 3861–3868.
- Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117 (25): 6768–6776.
- Solano C, Benet I, Clari MA, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8⁺ and CD4⁺ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica* 2008; 93 (9): 1434–1436.
- 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 (3): 543–549.
- Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46 (11): 1437–1443.
- Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN-gamma 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 (7): 1208–1215.
- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* 2006; 211: 236–254.
- 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 (25): 6465–6476.
- Muñoz-Cobo B, Solano C, Benet I, et al. 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* 2012; 84 (2): 259–267.
- Guerrero A, Riddell SR, Storek J, et al. Cytomegalovirus viral load and virus-specific immune reconstitution after peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18 (1): 66–75.
- Król L, Stuchlý J, Hubáček P, et al. Signature profiles of CMV-specific T cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46 (8): 1089–1098.
- Lacey S, La Rosa C, Zhou W, et al. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and immediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; 194 (10): 1410–1421.
- 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 (2): 248–256.
- 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 (10): 3311–3318.
- Bravo D, Clari MÁ, Costa E, et al. Comparative evaluation of three automated systems for DNA extraction in conjunction with three commercially available real-time PCR assays for quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (8): 2899–2904.
- Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 2004; 199 (7): 925–936.
- Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 2012; 119 (12): 2754–2763.
- Clari MÁ, Muñoz-Cobo B, Solano C, et al. Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific

- gamma interferon-producing CD8(+) T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19 (5): 791–796.
25. Makedonas G, Hutnick N, Haney D, et al. Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog* 2010; 6 (3): e1000798.
 26. Nebbia G, Mattes FM, Smith C, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4⁺ and pp65 CD8⁺ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8 (12): 2590–2599.
 27. Lachmann R, Bajwa M, Vita S, et al. Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *J Virol* 2012; 86 (2): 1001–1009.
 28. Solano C, Benet I, Remigia MJ, et al. Immunological monitoring for guidance of preemptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: a pilot experience. *Transplantation* 2011; 92 (4): e17–e20.
 29. Shanley JD, Jordan MC, Cook ML, Stevens JG. Pathogenesis of reactivated latent murine cytomegalovirus infection. *Am J Pathol* 1979; 95 (1): 67–80.
 30. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202 (5): 673–685.
 31. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109 (5): 1607–1612.
 32. Newell EW, Sigal N, Bendall SC, Nolan GP, Davis MM. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8⁺ T cell phenotypes. *Immunity* 2012; 36 (1): 142–152.

Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting

Estela Giménez,¹ † Pilar Blanco-Lobo,² † Beatriz Muñoz-Cobo,¹ Carlos Solano,³ Paula Amat,³ Pilar Pérez-Romero² and David Navarro^{1,4}

Correspondence

David Navarro
david.navarro@uv.es

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

²Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

³Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain

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

The role cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells and that of antibodies neutralizing virus epithelial infection (AbNEI) in the control of CMV DNAemia was investigated in 39 CMV-seropositive allogeneic stem-cell transplant (Allo-SCT) recipients with ($n=24$) or without ($n=15$) CMV DNAemia. AbNEI levels were monitored prospectively by means of a neutralization assay employing retinal epithelial cells (ARPE-19) and the recombinant CMV strain BADrUL131-Y4. Quantification of CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells (expressing two or three of the following markers: IFN- γ , TNF- α and CD107a) in whole blood was performed by flow cytometry for intracellular cytokine staining. We found no differences in the dynamic pattern of AbNEI in patients with or without subsequent CMV DNAemia. Baseline and peak AbNEI titres were not predictive of the dynamics of CMV replication within episodes. No correlation was found between CMV DNA loads and AbNEI levels during episodes of CMV DNAemia ($\rho=0.09$; 95 % confidence interval -0.52 to 0.64 ; $P=0.78$). The detection of pp65/IE-1 CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells was associated with low-level virus replication within subsequent episodes of CMV DNAemia. Interestingly, the presence of AbNEI titres (inverse) $>4.7 \log_2$ was predictive of the occurrence of CMV DNAemia (sensitivity, 83 %; specificity, 80 %). Our findings add insight to the role of humoral and cellular immunity in the control of CMV infection in an Allo-SCT setting.

Received 5 March 2015

Accepted 28 May 2015

INTRODUCTION

Protection from and clearance of cytomegalovirus (CMV) viraemia in allogeneic stem-cell transplant (Allo-SCT) recipients is critically dependent upon the reconstitution and adequate expansion, respectively, of functional CMV-specific T-cells (Solano & Navarro, 2010). Whether CMV-specific antibodies exerting antiviral activities contribute in a relevant way to these purposes has not been elucidated. In this context, the beneficial effect of the administration of CMV-specific human hyperimmunoglobulin on minimizing the incidence and fatal outcome of CMV end-organ

disease, claimed in this clinical setting, has never been proven conclusively (Guglielmo *et al.*, 1994). Furthermore, contradictory data have been published on the role of CMV-specific neutralizing antibodies in the prevention or control of CMV viraemia (Muñoz *et al.*, 2001; Schoppel *et al.*, 1998; Volpi *et al.*, 1999); in these studies, neutralizing antibodies were quantified by means of a classical neutralization assay involving the use of the CMV AD169 strain and human-derived fibroblasts, which mostly measures antibody levels against gB and the glycoprotein complex gH–gL, both essential for infection of human fibroblasts (Vanarsdall *et al.*, 2008). Recently, the virion glycoprotein complex gH–gL–pUL131A–pUL130–pUL128 has been shown to be required

†These authors contributed equally to this work.

for infection of endothelial, epithelial and myeloid cells (Gerna *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2004; Ryckman *et al.*, 2008a, b; Wang & Shenk, 2005a), all of which are key targets for CMV pathogenesis in the human host. Neutralizing antibodies targeting this pentameric complex are known to display a much higher potency in neutralizing virus infection of epithelial and endothelial cells than those against gB (Macagno *et al.*, 2010). The AD169 strain of CMV carries a defective UL131 ORF, and thus antibodies against this pentameric complex are not measured in the classical neutralization assay (Hahn *et al.*, 2004). Antibodies against neutralizing epitopes of the complex gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128 have been shown to correlate with virus control in immunocompetent individuals (Lilleri *et al.*, 2012) and protection from fetal CMV transmission (Lilleri *et al.*, 2013). Here, we investigated in parallel the role of CMV-specific antibodies that neutralize epithelial cell infection (AbNEIs) and that of CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells in the control of CMV DNAemia in a cohort of Allo-SCT recipients.

RESULTS

Incidence of CMV DNAemia

A total of 24 out of 39 patients (61.5 %) developed a first episode of CMV DNAemia within the first 100 days after Allo-SCT (median 30 days; range 26–42 days). All episodes

were eventually controlled. Twelve episodes required the administration of pre-emptive antiviral therapy. CMV DNAemia was spontaneously cleared in the remaining 12 patients.

Kinetics of CMV-specific AbNEIs in patients with or without CMV DNAemia

We first assessed the kinetics of AbNEIs in patients with or without subsequent CMV DNAemia. Sequential sera ($n=60$) were available from 18 patients subsequently having CMV DNAemia (median, three per patient; range, two to eight per patient). Serial sera ($n=76$) from 15 patients with no CMV DNAemia (median, five per patient; range, three to eight per patient) obtained within a comparable time frame were also available for analysis and served as controls. The kinetic profiles of AbNEIs did not differ notably between patients in the study groups (Fig. 1a, b). CMV-specific AbNEI levels were found to remain stable in 13/18 and 10/15 patients with or without subsequent CMV DNAemia, respectively ($P=0.73$). Increasing, decreasing or fluctuating levels of AbNEI levels were observed at comparable frequencies among individuals belonging to both groups ($P\geq 0.5$). Data on CMV (AD169)-specific IgG levels, as measured by chemiluminescent assay (CLIA), were available from 31 patients (median, three samples per patient; range, one to six samples). All sera having detectable AbNEIs were also reactive by the CMV IgG CLIA. As shown in Fig. 1(c, d), the kinetics

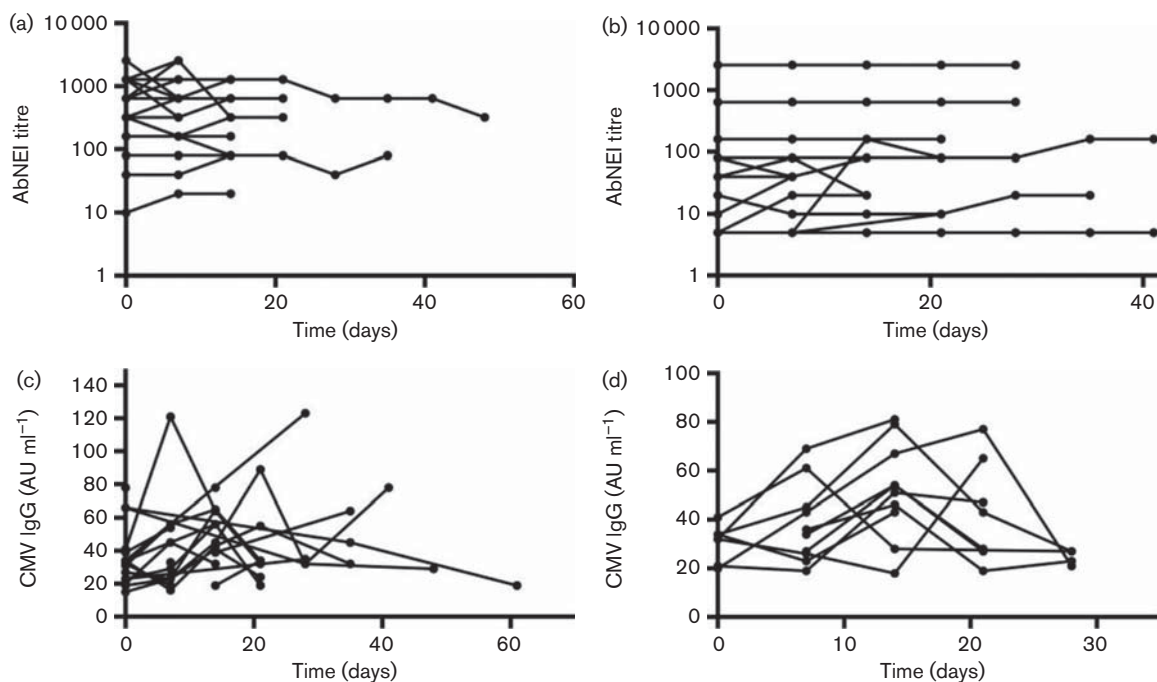


Fig. 1. Kinetics of CMV-specific AbNEIs and CMV (AD169)-specific IgGs as measured by CLIA in Allo-SCT recipients who did (a and c, respectively) or did not (b and d, respectively) develop a subsequent episode of CMV DNAemia. Data from patients with more than one available specimen are shown. AU, absorbance units.

pattern of CMV IgG antibodies was found to be comparable in patients with or without subsequent CMV DNAemia, with a rather similar number of patients displaying stable, increasing or decreasing antibody levels in both study groups.

Quantification of CMV-specific AbNEIs allows anticipation of the occurrence of CMV DNAemia

We next investigated whether AbNEI levels measured either at the time of or early after Allo-SCT were indicative of the risk of CMV DNAemia. The data for each patient of the cohort are shown in Table 1. We found that both baseline (median, day 0; range, day -1 to 16) and peak (median, day 14; range, days 0–32) AbNEI levels were significantly higher in patients who went on to develop CMV DNAemia than in those who did not (Fig. 2a, b, respectively). Receiver operating characteristics (ROC) curve analyses indicated that a cut-off titre of 4.7 log₂ (1/120) for both baseline and peak AbNEIs discriminated fairly well (sensitivity, 83 %; specificity, 80 %) between patients with or without subsequent CMV DNAemia (Fig. 3). In fact, the odds ratio for developing CMV DNAemia was 20.0 [95 % confidence interval (CI) 3.81–105.11] for patients with AbNEI titres above the referred threshold. In contrast, both baseline and peak CMV-specific IgG titres were comparable in both study groups (Fig. 2c, d). Thus, a CMV IgG threshold level discriminating between patients with or without subsequent CMV DNAemia could not be established. Of note was the fact that patients displaying baseline and peak AbNEI titres either above or below this cut-off were comparable in terms of pre-transplant and post-transplant clinical factors known to modulate the risk of CMV DNAemia (data not shown).

The dynamics of CMV DNAemia is not influenced by CMV-specific AbNEIs

We then investigated whether AbNEI levels measured prior to the occurrence of CMV DNAemia allowed the inference of the dynamics of virus replication within episodes. As shown in Table 2, neither initial nor peak plasma CMV DNA loads differed significantly between patients displaying baseline or peak AbNEI levels above or below a titre of 4.7 log₂. Likewise, the need for pre-emptive antiviral therapy and the duration of episodes of CMV DNAemia were not associated with AbNEI levels. Furthermore, no significant correlation was observed between peak AbNEI levels and peak plasma CMV DNA loads ($\rho = -0.27$; 95 % CI -0.74 to 0.38; $P = 0.40$).

We next investigated the kinetics of AbNEI levels relative to that of CMV DNA load during episodes of CMV DNAemia. A total of 110 sera (median, 7.5; range, 2–24) from 20 patients with CMV DNAemia were available for analysis. No correlation was found between AbNEI levels and plasma CMV DNA loads ($\rho = 0.09$; 95 % CI -0.52 to 0.64; $P = 0.78$). In fact, AbNEI levels remained constant in

14/22 episodes in the face of decreasing CMV DNAemia levels. In the remaining eight episodes, decreasing ($n = 4$), fluctuating ($n = 3$) or increasing levels of AbNEI levels were seen. The dynamics of AbNEI levels in patients without CMV DNAemia were similar (stable levels in 11/13 patients). Likewise, CMV IgG levels were not correlated with CMV DNA load within episodes of active CMV infection ($\rho = 0.19$; 95 % CI -0.28 to 0.74; $P = 0.68$).

CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells modulate the rate of CMV replication within episodes of active CMV infection

T-cell immunity data were available from 29 out of the 39 patients included in the cohort, of whom 19 had CMV DNAemia within the study period. Seven out of these 19 patients developed CMV DNAemia prior to the first immunological monitoring time point and were excluded from the analyses reported below. The data for each patient are shown in Table 1, and representative flow cytometry plots of these patients are depicted in Fig. 4. The prevalence of detectable polyfunctional CD8⁺T-cell responses (any combination of bifunctional T-cells and/or trifunctional T-cells) was found to be comparable in patients with or without subsequent CMV DNAemia (8/12 in patients with CMV DNAemia and 6/10 in patients without CMV DNAemia; $P = 0.87$). CMV-specific polyfunctional CD8⁺T-cell levels did not differ significantly between patients with or without subsequent CMV DNAemia (median, 0.31 cells μl^{-1} ; range, 0.02–2.60 cells μl^{-1} ; and median, 0.62 cells μl^{-1} ; range, 0.02–2.01 cells μl^{-1} , respectively; $P = 0.91$). Nevertheless, as shown in Table 3, patients displaying detectable polyfunctional CD8⁺T-cell responses at day 30 after Allo-SCT had lower initial and peak CMV DNA loads in subsequent episodes of CMV DNAemia than those who did not, although a statistical significance was not reached. Furthermore, episodes of CMV DNAemia in the latter patients lasted significantly longer than those in the former patients.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study assessing the potential role of CMV-specific AbNEIs in the control of CMV infection in an Allo-SCT setting. Prior studies measuring CMV-specific antibodies neutralizing fibroblast infection failed to provide convincing evidence of a role for these antibodies in either the prevention or clearance of CMV viraemia (Muñoz *et al.*, 2001; Schoppel *et al.*, 1998; Volpi *et al.*, 1999). Here, we performed a neutralization assay in which neutralizing antibodies probably target epitopes within one or more of the components of the glycoprotein complex gH-gL-pUL131A-pUL130-pUL128 or even epitopes on gB that are specifically involved in pH-dependent triggering and/or with interactions between gB and the pentameric glycoprotein complex. Our data suggested that CMV-specific AbNEIs are unlikely to play

Table 1. Relevant clinical, serological and immunological data from Allo-SCT recipients included in the study

Patient no.	CMV serostatus	CMV DNAemia	Antiviral therapy	CMV peak load (copies ml ⁻¹)/CMV DNAemia (duration in days)	Log ₂ baseline AbNEI titre/peak AbNEI titre*	Polyfunctional CD8 ⁺ T-cells (cells µl ⁻¹)†
1	D ⁺ R ⁺	Yes	Yes	1062/45	7.85/7.85	NA
2	D ⁻ R ⁺	Yes	Yes	13165/40	7.85/7.85	NA
3	D ⁺ R ⁺	Yes	Yes	3656/89	5.77/5.77	0.00‡
4	D ⁺ R ⁺	Yes	Yes	40851/73	5.77/5.77	5.83‡
5	D ⁻ /R ⁺	Yes	Yes	1108/57	3.69/4.38	0.00‡
6	D ⁺ R ⁺	Yes	Yes	17270/150	NA/NA	0.00‡
7	D ⁺ R ⁺	Yes	Yes	2842/36	7.15/7.15	1.10
8	D ⁻ /R ⁺	Yes	Yes	1455/142	5.77/5.77	0.06
9	D ⁻ /R ⁺	Yes	Yes	2039/124	5.77/5.77	0.23
10	D ⁻ /R ⁺	Yes	Yes	4873/127	6.46/6.46	0.15
11	D ⁺ /R ⁻	Yes	Yes	4828/30	2.30/3.00	0.00
12	D ⁻ /R ⁺	Yes	Yes	2094/34	5.77/6.46	0.00
13	D ⁻ R ⁺	Yes	No	272/115	6.46/6.46	NA
14	D ⁺ R ⁺	Yes	No	725/64	7.15/7.15	NA
15	D ⁺ R ⁺	Yes	No	94/19	NA/NA	NA
16	D ⁺ R ⁺	Yes	No	106/23	5.08/5.08	2.49‡
17	D ⁺ R ⁺	Yes	No	74/44	6.46/7.15	1.66‡
18	D ⁻ /R ⁺	Yes	No	277/49	3.69/3.69	0.00‡
19	D ⁺ R ⁺	Yes	No	144/67	7.15/7.15	0.00
20	D ⁺ R ⁺	Yes	No	53/18	7.15/7.85	0.94
21	D ⁺ R ⁺	Yes	No	593/36	6.46/6.46	0.31
22	D ⁻ /R ⁺	Yes	No	60/7	7.15/7.15	0.02
23	D ⁺ R ⁺	Yes	No	53/7	4.38/4.38	1.49
24	D ⁺ R ⁺	Yes	No	907/41	5.08/5.08	0.00
25	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	6.46/6.46	NA
26	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	5.08/5.08	NA
27	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	3.00/3.00	NA
28	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	1.61/5.08	NA
29	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	1.61/1.61	NA
30	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	3.69/4.38	0.79
31	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	7.85/7.85	0.74
32	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	4.38/4.38	0.09
33	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	2.30/3.69	0.02
34	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	1.61/3.00	0.49
35	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	4.38/4.38	2.01
36	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	3.69/4.38	0.00
37	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	1.61/3.00	0.00
38	D ⁺ R ⁺	No	NA	NA	1.61/1.61	0.00
39	D ⁻ /R ⁺	No	NA	NA	1.61/1.61	0.00

D, donor; R, recipient; NA, not applicable.*AbNEI titre (inverse) in patients with or without subsequent CMV DNAemia.

†Total cell count of polyfunctional CD8⁺T-cells (expressing two or more of the following markers: IFN- γ /TNE- α , IFN- γ /CD107a) at day 30 after transplant as determined by flow cytometry for intracellular cytokine staining.

‡Patients with CMV DNAemia prior to the time of immunological monitoring.

a major role in either the prevention or resolution of CMV DNAemia. First, the dynamic pattern of AbNEI levels in patients who later developed CMV DNAemia was indistinguishable from that seen in patients who did not. Secondly, the kinetics and the level of CMV replication within episodes of CMV DNAemia were independent of AbNEI

levels measured prior to the occurrence of CMV DNAemia. Thirdly, no apparent relationship between CMV DNA load kinetics and AbNEI level dynamics was observed within episodes of CMV DNAemia. In fact, stable AbNEI levels were frequently seen concomitant with decreasing CMV DNA load levels.

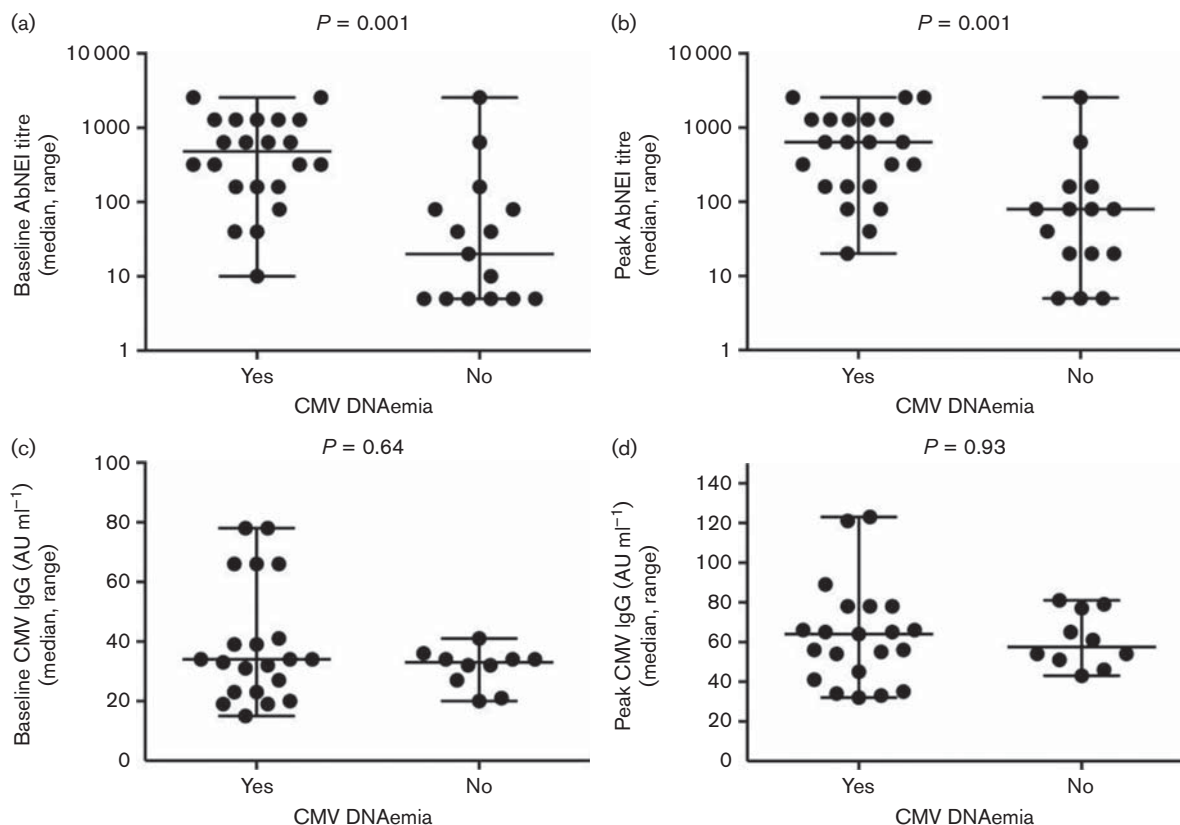


Fig. 2. Baseline and peak CMV-specific antibodies neutralizing epithelial infection (AbNEI) titres (a, c) and CMV IgGs as measured by CLIA (c, d) in Allo-SCT recipients who did (Yes) or did not (No) develop a subsequent episode of CMV DNAemia. Bars represent median titres and the range of antibody titres. Two-sided exact *P* values are shown. AU, absorbance units.

Strikingly, patients exhibiting high baseline and peak AbNEI levels were more likely to develop CMV DNAemia. In fact, a cut-off AbNEI level was established (titre of 4.7 log₂) that discriminated fairly well (specificity and sensitivity ≥ 80 %) between patients with or without subsequent CMV DNAemia. In contrast, the levels of CMV (AD169)-specific IgGs measured by CLIA were not predictive of the occurrence of CMV DNAemia. In our opinion, if AbNEIs displayed a relevant role in conferring protection against CMV viraemia, the opposite phenomenon would be expected to occur, as has been shown for CMV-specific functional T-cells (Solano *et al.*, 2008; Tormo *et al.*, 2010a, b, 2011). Several non-mutually exclusive explanations may account for this finding. First, CMV reactivation at tissue or mucosal sites occurring either during conditioning or very early after transplant may have boosted residual memory B-cells in the recipient or memory B-cells transferred within the allograft (Yamazaki *et al.*, 2014) to produce antibodies with such functional properties. Secondly, baseline serum levels of AbNEIs may reflect latent viral load, which ultimately determines the overall risk of CMV reactivation (Forster *et al.*, 2010; Reddehase *et al.*, 1994). Thirdly, the possibility exists that a fraction

of the antibodies quantified in the neutralization assay employed in the current study may enhance CMV infectivity in this clinical setting. In this sense, CMV-specific antibodies of low neutralizing activity have been shown to enhance human placental infection by allowing receptor-mediated transcytosis of CMV-IgG complexes that retain infectivity by Fc receptors (Maidji *et al.*, 2006).

New compounds exhibiting higher intrinsic activity against CMV and a better safety profile than (val)ganciclovir have been developed (Boeckh *et al.*, 2015). This has renewed interest in antiviral prophylaxis for the prevention of CMV-related morbidity in Allo-SCT recipients (Chemaly *et al.*, 2014). The identification of biomarkers predicting the occurrence of CMV viraemia (particularly those episodes requiring the administration of pre-emptive antiviral therapy) would allow the inception of antiviral prophylaxis on an individual basis according to the patient's risk (targeted prophylaxis). In this context, quantification of AbNEIs may serve this purpose.

There is increasing evidence to show that polyfunctional T-cells are superior to those exhibiting monofunctional properties in controlling acute and chronic viral infections, such as

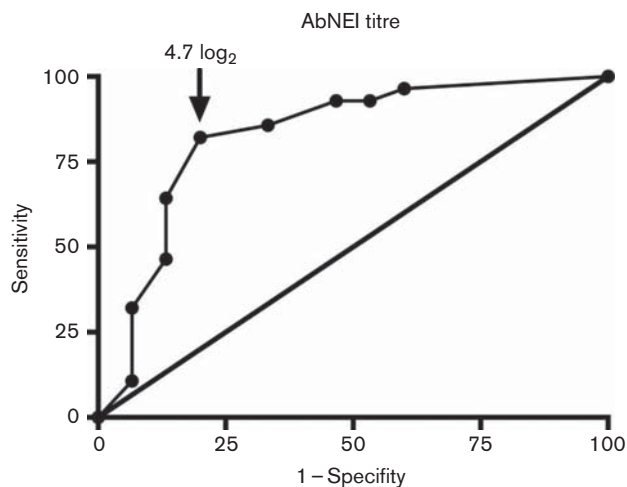


Fig. 3. ROC curve analysis for CMV-specific AbNEIs (ROC curves for baseline and peak antibody titres were similar) indicating the optimal cut-off value (titre of $4.7 \log_2$) for discriminating between patients with or without subsequent CMV DNAemia (sensitivity, 83 %; specificity, 80 %). Dots represent different \log_2 antibody titres.

those caused by human immunodeficiency virus and hepatitis C virus (Harari *et al.*, 2006). Nevertheless, little is known about the relevance of polyfunctional CD8⁺ T-cells in the control of CMV infection in an Allo-SCT setting. Preliminary evidence suggests that these cells may exert a major role in the control of CMV replication episodes (Lacey *et al.*, 2006; Lilleri *et al.*, 2008; Król *et al.*, 2011; Muñoz-Cobo *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008). Data on CMV (pp65/IE-1)-specific CD8⁺ T-cell immunity were available from a number of patients who either did or did not develop a subsequent episode of CMV DNAemia. In our clinical setting, the occurrence of CMV DNAemia could not be reliably predicted on the basis of either the presence or absence of detectable polyfunctional CD8⁺ T-cell responses or the total number of CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cells. Nevertheless, the mere presence

of these functional T-cell types was associated with lower levels of CMV replication within episodes of active CMV infection, and hence with a shorter duration of episodes. This is in line with previously published data (Lilleri *et al.*, 2008; Muñoz-Cobo *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009), and further highlights the crucial role of adaptive T-cell immunity in the control of CMV viraemia in Allo-SCT recipients.

The apparent lack of contribution of CMV-specific AbNEIs to the control of CMV infection in the CMV-seropositive Allo-SCT setting reported here is in contrast to that seen in the context of primary CMV infection during pregnancy (Lilleri *et al.*, 2012, 2013). In this latter setting, fetal CMV transmission was found to correlate with delayed generation of maternal antibodies to the gH/gLpUL128-130-131 complex during primary infection. Taken together, these data point to a more efficient role of AbNEIs in the control of CMV replication in the immunocompetent CMV-naïve host than in that occurring in chronically infected immunosuppressed individuals as a result of virus reactivation or reinfection. Further studies are needed to shed light on this issue.

It is increasingly being appreciated that immune mechanisms exerting control over CMV infection are possibly redundant (Solano & Navarro, 2010). In this sense, data obtained in the murine cytomegalovirus model have indicated that adoptive transfer of memory B-cells from immune animals protected T-cell- and B-cell-deficient RAG-1^{-/-} mice from lethal challenge. This strategy was also effective in protecting from an already ongoing viral infection (Klenovsek *et al.*, 2007). In this context, it is of note that almost 50 % of patients in our cohort exhibited detectable CMV-specific polyfunctional CD8⁺ T-cell responses. Hence, our conclusions must be taken in the context of our particular group of patients and should not be extrapolated to patients displaying distinct immunological backgrounds.

In summary, our data argue against a major role of CMV-specific AbNEIs in the control of CMV infection in an Allo-SCT setting, whilst reinforce the relevance of T-cell immunity

Table 2. Kinetics of CMV DNAemia in patients displaying baseline and peak CMV-specific AbNEIs either below or above a titre of $4.7 \log_2$

Parameter	Baseline AbNEI \log_2 titre (inverse)		P value*	Peak AbNEI \log_2 titre (inverse)		P value*
	<4.7	>4.7		<4.7	>4.7	
Median initial CMV DNA load [copies ml ⁻¹ (range)]	52 (16–91)	54 (10–188)	0.76	51 (16–91)	55 (10–188)	0.41
Median peak CMV DNA load [copies ml ⁻¹ (range)]	693 (53–4828)	985 (53–40851)	0.67	1108 (53–17270)	907 (53–40851)	0.72
Median duration of CMV DNAemia [days (range)]	39.5 (7–57)	44.5 (7–150)	0.30	49 (7–150)	44 (7–142)	0.89

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

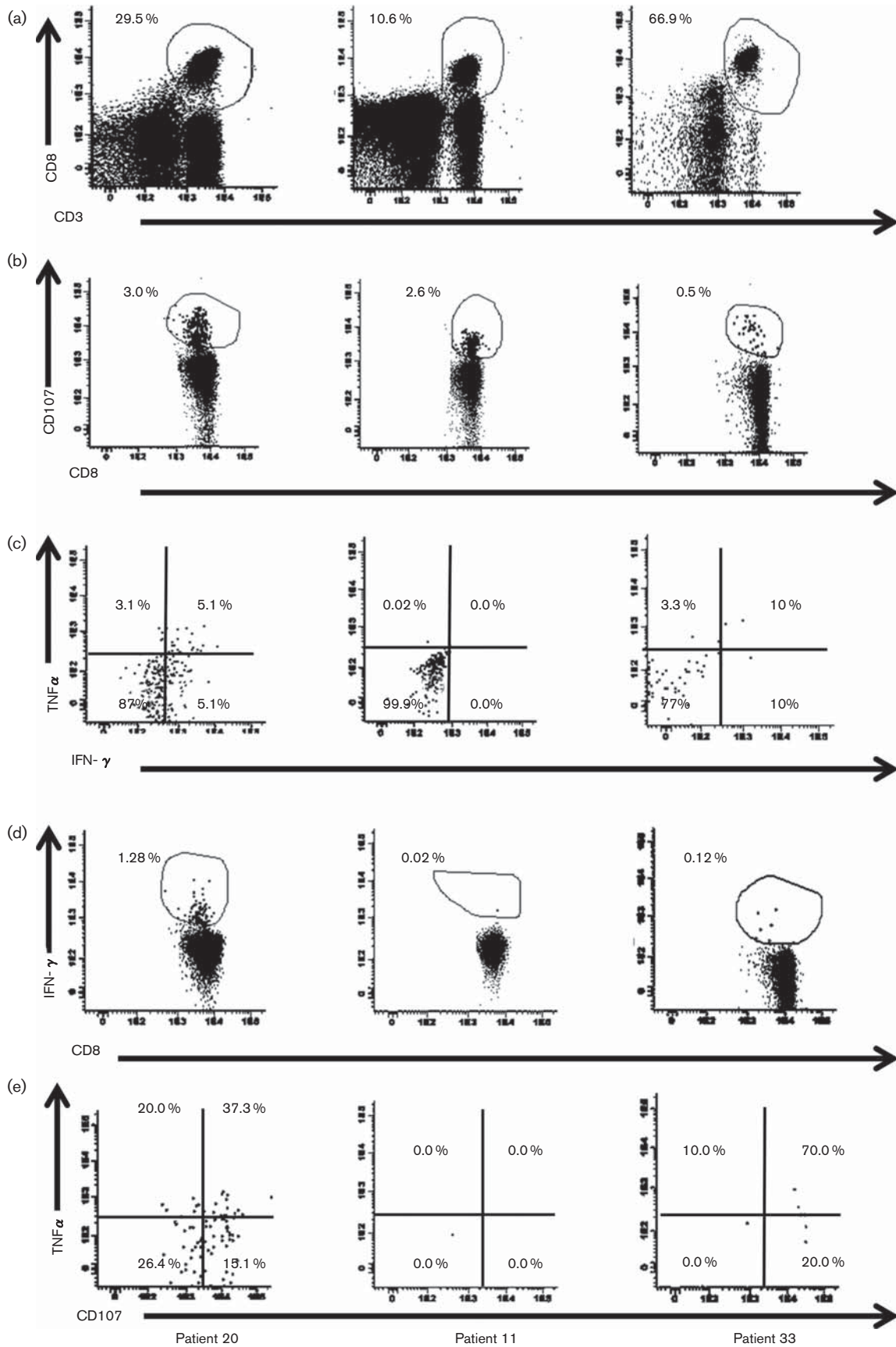


Fig. 4. Gating strategy for enumeration of CMV pp65 and IE-1-specific polyfunctional CD8⁺T-cell responses and representative flow cytometry plots. Flow cytometry plots belonging to four different patients included in the cohort (patients 20, 11 and 33 in Table 1) are shown. Blood specimens of these patients were stimulated, stained and acquired on different days. Cells were gated on forward/side-scatter characteristics to identify viable lymphocytes (not shown), followed by gating on CD3⁺/CD8⁺ cells (a), CD8⁺/CD107a (b), CD8⁺/IFN- γ (d) and CD8⁺/TNF- α (not shown). CD8⁺/CD107a-expressing T-cells were further analysed for their expression of TNF- α and IFN- γ (c). In turn, CD8⁺/IFN- γ T-cells were analysed for their expression of TNF- α and CD107a (e).

for that purpose. Further studies involving larger cohorts are nevertheless needed to either confirm or refute our observations.

METHODS

Patients. The current cohort consisted of 39 non-consecutive CMV-seropositive Allo-SCT recipients (20 males and 19 females) undergoing Allo-SCT (peripheral blood, $n=34$; umbilical cord blood, $n=4$; bone marrow, $n=1$) for haematological malignancy at the Hospital Clínico Universitario de Valencia between 2010 and 2013. The median age of patients was 52 years (range, 25–66 years). Donors were HLA matched (71.8%) or HLA mismatched (28.9%). The conditioning regimen was non-myeloablative in 71.8% of transplants. Donors were CMV seropositive in 23 cases and CMV seronegative in the remaining 16 cases. No patients received intravenous immunoglobulins during the study. The study period comprised the first 100 days following transplantation. Only initial episodes of CMV DNAemia were considered for the analyses reported here. The study was approved by the local Review Board and Ethics Committee. All patients gave written informed consent prior to participation in the study.

Management of CMV infection. Monitoring of plasma CMV DNAemia was performed once a week using a real-time PCR assay (CMV real-time PCR or Abbott RealTime CMV; Abbott Molecular) (Clari *et al.*, 2013; Giménez *et al.*, 2014; Gimeno *et al.*, 2008). Patients were treated pre-emptively with antivirals as described previously (Solano *et al.*, 2008; Tormo *et al.*, 2010a, b, 2011). CMV DNAemia (active CMV infection) was defined as the detection of any level of CMV DNA in plasma. The duration of a given episode of CMV DNAemia was that between the day of the first positive PCR result and the day of the first negative (undetectable) result.

Cells and virus. Human ARPE-19 retinal pigment epithelial cells (ATCC CRL-2302) were cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL) supplemented with 10% FCS (HyClone Laboratories), 10 000 IU penicillin l⁻¹, 10 mg streptomycin (Gibco-BRL) l⁻¹. CMV strain BADrUL131-Y4 was kindly provided by Dr T. Shenk (Princeton University, USA). This strain is derived from a bacterial artificial chromosome clone of the CMV strain AD169 genome that was modified in *Escherichia coli* to express a functional UL131 protein, which permits replication in either ARPE-19 or MRC-5 cells (Hahn *et al.*, 2003; Wang & Shenk, 2005b). Viral titres of CMV BADrUL131-Y4 were determined by limiting dilution in 96-well plates using MRC-5 cells.

Neutralization assay. A neutralization assay was performed following a previously published protocol with some modifications (Cui *et al.*, 2008). Heat-inactivated sera were serially diluted (twofold) in DMEM (from 1:5 to 1:2560). Fifty microlitres of the respective serum dilution was incubated in triplicate (for 2 h at 37 °C) with the BADrUL131-Y4 virus inoculum (m.o.i. of 0.5 in 50 μ l DMEM). Virus-antibody mixtures were then added to confluent ARPE-19

monolayers previously seeded in 96-well microtitre plates (clear/flat-bottomed 96-well plates; Costar). Infected and mock-infected cells were used as positive and negative controls, respectively. After 48 h of incubation at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, the cells were washed and fixed with cold PBS:acetone solution diluted 1:4. Cells were stained with a p72 [immediate-early protein 1 (IE-1)]-specific mAb (clone 8B1.2; Millipore) diluted 1:2000 and washed with PBS+0.05% Tween 20. An HRP-conjugated IgG anti-mouse secondary antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1:1000 was added. One hundred microlitres of peroxidase substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate, Supersensitive, for ELISA; Sigma-Aldrich) was added to the mixture and incubated for 15 min. The reaction was stopped with 50 μ l 0.5 M sulfuric acid and the absorbance was measured in a microplate reader with a 450–490 nm filter. The mean (triplicate) serum dilution inhibiting virus infectivity by 50% or more with respect to infected cell controls was reported as the neutralizing antibody titre. Sera were scheduled to be obtained on a weekly basis. Variation in antibody titres of >1 log₂ were deemed to be significant. A total of 338 sera were subjected to analysis.

CMV antibody assay. CMV (AD169)-specific IgG antibodies were measured by a CLIA (Chemiluminescent Architect CMV IgG assay; Abbott) following the recommendations of the manufacturer. IgG antibody levels >6 absorbance units ml⁻¹ were considered reactive. Variations in CMV IgG levels >20% (the interassay coefficient of variation, as reported by the manufacturer, +2 SD) were considered to be significant.

Enumeration of polyfunctional CMV-specific CD8⁺ T-cells.

Quantification of pp65 and 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) CMV-specific CD8⁺ T-cells was performed by flow cytometry for intracellular cytokine staining at day +30 after transplant, as described previously (Muñoz-Cobo *et al.*, 2012). Briefly, whole blood samples (0.5 ml) were simultaneously stimulated with two sets of 15mer overlapping peptides encompassing the sequence of pp65 and IE-1 CMV proteins (1 μ g ml⁻¹ per peptide), obtained from JPT peptide Technologies (Berlin, Germany), in the presence of 1 μ g ml⁻¹ of co-stimulatory mAbs to CD28 and CD49d, an anti-CD107a mAb coupled to allophycocyanin (APC), brefeldin (5 μ g ml⁻¹) and monensin (1 μ M) for 6 h at 37 °C. The specimens were maintained at room temperature until stimulation, which was performed within 24 h after sampling. 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 -phycoerythrin). All antibodies and solutions were purchased from Becton Dickinson. The cells were stored at 4 °C in PBS+1% formaldehyde, acquired within 4 h in a BD FACScantoII flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems) and analysed with the program BD FACS Diva Software (BD Biosciences). Negative controls (absence of peptide stimulation) were processed in parallel for all experiments. After initial gating on lymphocytes, cells were selected

Table 3. Dynamics of CMV DNAemia in patients with or without detectable CMV-specific polyfunctional CD8⁺T-cells

Parameter	Detectable CMV-specific polyfunctional CD8 ⁺ T-cells*		P value†
	Yes	No	
Median initial CMV DNA load [copies ml ⁻¹ (range)]	52 (33–83)	60 (10–188)	0.40
Median peak CMV DNA load [copies ml ⁻¹ (range)]	350 (53–40851)	1455 (60–17270)	0.33
Median duration of CMV DNAemia [days (range)]	30 (7–73)	57 (7–150)	0.05

*Polyfunctional CD8⁺T-cells [expressing two (bifunctional) or three (trifunctional) of the following markers: IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /CD107a] at day +30 after transplant as determined by flow cytometry for intracellular cytokine staining. Detectable responses were considered as those that were >0.1 % (mean + 2 SD of CMV-seronegative controls) after background subtraction for IFN- γ -, TNF- α - and CD107a-expressing CD8⁺T-cell populations.

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

on the basis of CD3⁺ and CD8⁺ staining, and then further gated based on the expression of IFN- γ , TNF- α and CD107a (see Fig. 4). Boolean gating analysis was performed to enumerate the frequencies of all possible combinations. 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 (detectable) responses were considered as those that were >0.1 % (mean + 2 SD of CMV-seronegative controls) for IFN- γ -, TNF- α - and CD107a-expressing CD8⁺T-cell populations. Polyfunctional CD8⁺T-cells were those that were positive for two (bifunctional) or three (trifunctional) markers.

Statistical analysis. Data were analysed with the aid of the statistical package SPSS version 20.0 (SPSS). Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U* test. Spearman's rank test was used to analyse correlations between continuous variables. Two-sided exact *P* values are reported. *P* < 0.05 was considered statistically significant. ROC curve analysis was also performed with the SPSS program.

ACKNOWLEDGEMENTS

P. A. is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC). B. M.-C. holds a fellowship (Agustín Pumarola) from S.E.I.M.C. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). The authors thank Michael McConnell for critical reading of the manuscript. This research was supported by grants from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). (12/1992 and 11/01357) This work was also supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III – co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

REFERENCES

Boeckh, M., Murphy, W. J. & Peggs, K. S. (2015). Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* **21**, 24–29.

Chemaly, R. F., Ullmann, A. J., Stoelben, S., Richard, M. P., Bornhäuser, M., Groth, C., Einsele, H., Silverman, M., Mullane,

K. M. & other authors (2014). Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* **370**, 1781–1789.

Clari, M. A., Bravo, D., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., Giménez, E., Benmarzouk-Hidalgo, O. J., Pérez-Romero, P. & Navarro, D. (2013). Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **75**, 207–209.

Cui, X., Meza, B. P., Adler, S. P. & McVoy, M. A. (2008). Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine* **26**, 5760–5766.

Forster, M. R., Trgovcich, J., Zimmerman, P., Chang, A., Miller, C., Klenerman, P. & Cook, C. H. (2010). Antiviral prevention of sepsis induced cytomegalovirus reactivation in immunocompetent mice. *Antiviral Res* **85**, 496–503.

Gerna, G., Percivalle, E., Lilleri, D., Lozza, L., Fornara, C., Hahn, G., Baldanti, F. & Revello, M. G. (2005). Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8⁺T cells. *J Gen Virol* **86**, 275–284.

Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., Navarro, D. & Tang, Y.-W. (2014). Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* **52**, 654–656.

Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernández-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., Furió, S., Calabuig, M., Tormo, N. & Navarro, D. (2008). Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* **46**, 3311–3318.

Guglielmo, B. J., Wong-Beringer, A. & Linker, C. A. (1994). Immune globulin therapy in allogeneic bone marrow transplant: a critical review. *Bone Marrow Transplant* **13**, 499–510.

Hahn, G., Jarosch, M., Wang, J. B., Berbes, C. & McVoy, M. A. (2003). Tn7-mediated introduction of DNA sequences into bacmid-cloned cytomegalovirus genomes for rapid recombinant virus construction. *J Virol Methods* **107**, 185–194.

Hahn, G., Revello, M. G., Patrone, M., Percivalle, E., Campanini, G., Sarasini, A., Wagner, M., Gallina, A., Milanese, G. & other authors

- (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* **78**, 10023–10033.
- 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**, 236–254.
- Klenovsek, K., Weisel, F., Schneider, A., Appelt, U., Jonjic, S., Messerle, M., Bradel-Tretheway, B., Winkler, T. H. & Mach, M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* **110**, 3472–3479.
- 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.
- Lacey, S. F., La Rosa, C., Zhou, W., Sharma, M. C., Martinez, J., Krishnan, A., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., Longmate, J. & other authors (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**, 1410–1421.
- Lilleri, D., Fornara, C., Chiesa, A., Caldera, D., Alessandrino, E. P. & 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.
- 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**, 1324–1331.
- Lilleri, D., Kabanova, A., Revello, M. G., Percivalle, E., Sarasini, A., Genini, E., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Corti, D. & Gerna, G. (2013). Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS One* **8**, e59863.
- Macagno, A., Bernasconi, N. L., Vanzetta, F., Dander, E., Sarasini, A., Revello, M. G., Gerna, G., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2010). Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol* **84**, 1005–1013.
- Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Tabata, T. & Pereira, L. (2006). Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol* **168**, 1210–1226.
- Muñoz, I., Gutiérrez, A., Gimeno, C., Farga, A., Alberola, J., Solano, C., Prósper, F., García-Conde, J. & Navarro, D. (2001). Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein B (gB)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from HCMV active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant. *J Med Virol* **65**, 77–84.
- Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Benet, I., Costa, E., Remigia, M. J., de la Cámara, R., Nieto, J., López, J., Amat, P. & other authors (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.
- Reddehase, M. J., Baltesen, M., Rapp, M., Jonjic, S., Pavić, I. & Koszinowski, U. H. (1994). The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* **179**, 185–193.
- Ryckman, B. J., Chase, M. C. & Johnson, D. C. (2008a). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14118–14123.
- Ryckman, B. J., Rainish, B. L., Chase, M. C., Borton, J. A., Nelson, J. A., Jarvis, M. A. & Johnson, D. C. (2008b). Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol* **82**, 60–70.
- Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H. & Mach, M. (1998). Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **178**, 1233–1243.
- Solano, C. & Navarro, D. (2010). Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* **5**, 111–124.
- Solano, C., Benet, I., Clari, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., Hernández-Boluda, J. C., Remigia, M. J., Jarque, I. & other authors (2008). Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon(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, M. A., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., López-Aldeguer, N., Hernández-Boluda, J. C. & other authors (2010a). Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN(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., Garcia-Noblejas, A., Clari, M. A., Chilet, M., López, J. & other authors (2010b). Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN(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., Garcia-Noblejas, A., Muñoz-Cobo, B., Costa, E. & other authors (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.
- Vanarsdall, A. L., Ryckman, B. J., Chase, M. C. & Johnson, D. C. (2008). Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *J Virol* **82**, 11837–11850.
- Volpi, A., Pica, F., Gentile, G., Capobianchi, A., Frascchetti, M. & Martino, P. (1999). Neutralizing antibody response against human cytomegalovirus in allogeneic bone marrow-transplant recipients. *J Infect Dis* **180**, 1747–1748.
- Wang, D. & Shenk, T. (2005a). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18153–18158.
- Wang, D. & Shenk, T. (2005b). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol* **79**, 10330–10338.
- Yamazaki, R., Tanaka, Y., Nakasone, H., Sato, M., Terasako-Saito, K., Sakamoto, K., Akahoshi, Y., Nakano, H., Ugai, T. & other authors (2014). Allotype analysis to determine the origin of cytomegalovirus immunoglobulin-G after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* **16**, 904–913.
- Zhou, W., Longmate, J., Lacey, S. F., Palmer, J. M., Gallez-Hawkins, G., Thao, L., Spielberger, R., Nakamura, R., Forman, S. J. & other authors (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.

Plasma metabolomics profiling for the prediction of cytomegalovirus DNAemia and analysis of virus–host interaction in allogeneic stem cell transplant recipients

Daniel Monleón,¹ Estela Giménez,² Beatriz Muñoz-Cobo,² José Manuel Morales,¹ Carlos Solano,^{3,4} Paula Amat³ and David Navarro^{2,5}

Correspondence
David Navarro
david.navarro@uv.es

¹Metabolomic and Molecular Image Laboratory, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

²Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

³Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

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

⁵Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Metabolomics analysis of biofluids is increasingly being recognized as a useful tool for the diagnosis and management of a number of infectious diseases. Here we showed that plasma metabolomics profiling by untargeted ¹H nuclear magnetic resonance may allow the anticipation of the occurrence of cytomegalovirus (CMV) DNAemia in allogeneic stem cell transplant. For this purpose, key discriminatory metabolites were total glutathione, taurine, methylamine, trimethylamine *N*-oxide and lactate, all of which were upregulated in patients eventually developing CMV DNAemia. The overall classification accuracy (predictability) of the projection to latent structure discriminant analysis (PLS-DA) model in cross-validation technical replicates was 73 %. Increased levels of alanine, lactate and total fatty acids, and a shift in the fatty acid profile towards unsaturated species, were observed in patients with detectable CMV DNA in plasma. The classification accuracy of this PLS-DA model in cross-validation technical replicates was 81 %. Plasma metabolomics profiling may prove useful for identifying patients at highest risk for CMV DNAemia thus allowing early inception of antiviral therapy.

Received 6 August 2015
Accepted 2 September 2015

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is a leading cause of morbidity and mortality in allogeneic stem cell transplant recipients (Allo-SCT) (Solano & Navarro, 2010). In this clinical setting, pre-emptive antiviral therapy is currently the preferred first-choice strategy for the prevention of CMV end-organ disease over universal antiviral prophylaxis (Solano & Navarro, 2010). Nevertheless, the recent advent of new antivirals such as letermovir and maribavir, with increased intrinsic activity against CMV and better safety profiles with respect to conventional drugs (i.e. ganciclovir and foscarnet) (Boeckh *et al.*, 2015) has renewed interest in antiviral prophylaxis. In that context, the identification of biomarkers predicting the occurrence of CMV viraemia would allow the inception of antiviral prophylaxis on an individual basis according to the patient's risk (targeted prophylaxis). This strategy might offer advantages over universal prophylaxis, including cost savings.

Metabolomics analysis of biofluids by either targeted or untargeted nuclear magnetic resonance (NMR)- or MS-based methods is being increasingly recognized as a useful tool for the diagnosis, prediction of the clinical course or monitoring of antimicrobial therapy efficacy in a number of infectious diseases, including human immunodeficiency virus infection, malaria, tuberculosis, urinary tract infection, sepsis and congenital CMV infection (Noto *et al.*, 2014; Pacchiarotta *et al.*, 2012). Furthermore, metabolomics permits the assessment of host–pathogen metabolic interactions from which new therapeutic strategies may be derived (Noto *et al.*, 2014). The current proof-of-principle study was aimed at determining the potential utility of plasma metabolomics fingerprinting to predict the occurrence of CMV DNAemia in Allo-SCT recipients. We also investigated the effect of CMV replication within episodes of active systemic CMV infection in the plasma metabolome.

RESULTS

Features of CMV DNAemia

The study cohort included a total of 34 patients who developed CMV DNAemia at a median of 28 days after Allo-SCT (range, 2–70 days) and 19 who did not. None of the former patients developed CMV end-organ disease within the study period (the first 100 days after Allo-SCT). The median plasma CMV DNA peak load within episodes of CMV DNAemia was 8370 IU ml⁻¹ (range, 31–182 120 IU ml⁻¹). Twenty-three out of 34 episodes were treated pre-emptively with antivirals. In total, 23 episodes had been resolved (CMV DNAemia clearance) at the end of the study period. In this cohort, patients with or without CMV DNAemia did not differ significantly in terms of demographics, type of transplant, stem cell source, conditioning regimen, CMV serostatus of donor and recipient, graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis regimen or incidence of acute GvHD of any severity (not shown).

Plasma metabolomics profile that associates with the presence of CMV DNAemia

To determine whether the presence of CMV DNA in the systemic compartment was associated with a specific plasma metabolomics profile, we analysed NMR spectra of 105 plasma specimens with detectable CMV DNA from 34 patients (test specimens; median CMV DNA load, 5621 IU ml⁻¹; range, 556–182 120 IU ml⁻¹) and 292 with undetectable levels of CMV DNA obtained within a comparable time frame (control specimens). The former specimens were obtained within the first month following detection of CMV DNAemia at approximately 1-week intervals (median, three specimens per patient; range, two to five specimens per patient). Forty-two metabolites corresponding to non-overlapping and clearly defined peaks of the spectrum were analysed. A chemometric projection to latent structure discriminant analysis (PLS-DA) model (three latent variables) provided a differential global metabolic profile for samples with detectable CMV DNA. The score plots showed that specimens containing CMV DNA were clearly distinguishable from specimens not containing it (Fig. 1a). The goodness of fit of the model was high with an R^2X (cumulative) of 0.514 and an R^2Y (cumulative) of 0.711, and its predictability for discriminating between test and control specimens, as inferred by the cumulative Q^2 (0.592), was good (models with $Q^2 \geq 0.4$ are considered to reliably predict phenotypic differences between comparative groups). In this context, the fact that the values of the parameters describing the PLS-DA model were positive indicated the existence of a reasonably robust metabolic difference between specimens with or without detectable CMV DNA. The classification accuracy of the model in cross-validation technical replicates was 81 %, further emphasizing its high predictability.

Spectral regions and peaks with the highest contribution to the loadings plot (VIP scores ≥ 1), ordered by their relative contribution to the model, are shown in Fig. 2(b). These peaks were quantified and further analysed. Fig. 1(c) shows the percentage of increase or decrease of each selected metabolite between test (samples positive for CMV DNA) and control (not containing CMV DNA) specimens. In turn, Table 1 shows the relative content of each metabolite (displaying a VIP score ≥ 1) with respect to the total metabolite content in specimens with or without detectable CMV DNA. Eight out of the 15 metabolites with a VIP score ≥ 1 were found to be present in concentrations that differed significantly between test and control specimens. Specifically, two metabolites involved in fatty acid metabolism (total fatty acids, polyunsaturated fatty acids), two extramitochondrial metabolites (lactate, alanine), cell antioxidants (total glutathione) and acetate were upregulated in specimens containing CMV DNA, whereas lysine was downregulated.

Systemic bacterial infections are known to have an impact on the plasma metabolomic profile, which is somewhat reminiscent of that described above (Mickiewicz *et al.*, 2014). We thus investigated whether the prevalence of bacteraemic infections (due to both Gram-negative and Gram-positive micro-organisms) occurring immediately prior to (within the previous week) or within episodes of CMV DNAemia was different from that seen in the absence of CMV DNAemia (within a comparable window of time). Bacteraemia was diagnosed in nine patients with concurrent or subsequent CMV DNAemia and in ten patients not developing CMV DNAemia ($P=1.0$).

Plasma metabolomic profiling for the prediction of the occurrence of CMV DNAemia

We next investigated the power of plasma metabolomics profiling for discriminating between patients who eventually developed CMV DNAemia from those who did not. A total of 134 plasma specimens were available from the former patients (test specimens: median, four specimens; range one to eight specimens). All these specimens were obtained prior to the detection of CMV DNAemia. Most of these (90 %) were collected within the first 30 days after transplantation. In turn, 100 samples obtained within a comparable window of time were available from patients who did not develop CMV DNAemia (control specimens: median, four specimens; range, three to six specimens). Again, a total of 42 metabolites were screened. A PLS-DA model (three latent variables) was built on these samples to discriminate between test and control specimens. A fairly robust metabolic difference was observed between test and control specimens (Fig. 2a). The goodness of fit of the model was very high, with an R^2X (cumulative) of 0.943, and an R^2Y (cumulative) of 0.861, and its predictability was acceptable (Q^2 cumulative of 0.491).

Spectral regions and peaks with the highest contribution to the loadings plot (VIP scores ≥ 1) are shown in Fig. 2(b).

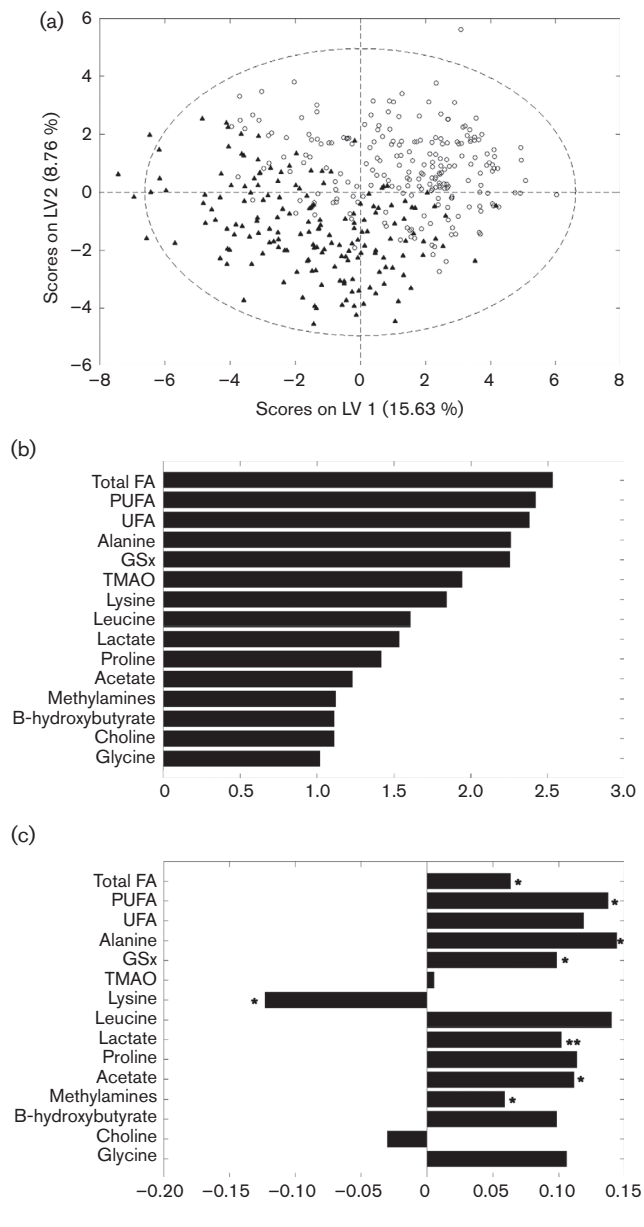


Fig. 1. Plasma metabolomic profile that associates with the presence of CMV DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. (a) PLS-DA scores plot in the new latent variables (LV) coordinates of specimens containing CMV DNA (black triangles) and those with undetectable levels of CMV DNA (white circles). The percentage of variance explained by the new LV (representative of variance introduced in the data by the presence of CMV DNAemia) is between parentheses. Outliers are included in the graph. (b) Metabolites contributing the most to the PLS-DA model (VIP score ≥ 1) ordered by their relative contribution (VIP score: x -axis values) to the model. (c) Relative changes in the concentration of metabolites with VIP scores ≥ 1 between samples containing CMV DNA (test group) and specimens lacking CMV DNA (control group). The changes were calculated as the differences between the mean values for specimens containing CMV DNA and those for samples lacking CMV DNA normalized to the mean values for specimens not containing CMV DNA. Positive and negative values in the x -axis mean that the mean

As shown in Fig. 2(c) and Table 2, six out of the ten metabolites with a VIP score ≥ 1 were found to be present in concentrations that differed significantly between test and control specimens; these were two cellular antioxidants (taurine, total glutathione; GSx), several microbial metabolites (choline, methylamine, trimethylamine *N*-oxide; TMAO) and extramitochondrial metabolite (lactate) all of which were significantly upregulated in plasma specimens from patients subsequently developing CMV DNAemia. Lysine and isoleucine were downregulated in test specimens, although statistical significance was not reached. The overall classification accuracy of the PLS-DA model in cross-validation technical replicates was 73 %.

We next investigated the kinetics of metabolites contributing most significantly to the PLS-DA model (VIP score ≥ 1 and $P < .$). This investigation was aimed at determining whether a single time point analysis early after Allo-SCT would allow for the anticipation of the eventual occurrence of CMV DNAemia with sufficient robustness. Fig. 3 shows the kinetics data for the five metabolites most significantly upregulated in test specimens (choline, methylamine, total GSx, TMAO and taurine). The data indicated that overall these metabolites were present in higher concentrations in test specimens than in control specimens from the first week after transplant over the entire follow-up period, although occasionally an inverted ratio of certain metabolites, such as methylamine, taurine and total GSx, was seen at one or more time points. In this context, a PLS-DA model built on specimens obtained at a median of 22 days after Allo-SCT (range 18–28 days) (week 3 in Fig. 3) displayed a predictability of 68 % in cross-validation technical replicates. PLS-DA models based on single specimens obtained at other time points performed rather unsatisfactorily (data not shown).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study is the first to use plasma metabolomics fingerprinting for anticipating the occurrence of CMV DNAemia and evaluating the potential impact of CMV viraemia in the plasma metabolome in the clinical setting of the Allo-SCT. We identified a plasma metabolomic profile by means of ^1H NMR spectroscopy that may allow the anticipation of the development of CMV DNAemia. By analysing the ^1H NMR spectra of a

concentration for a given metabolite in the test group is larger or lower, respectively, than that in the control group. The represented numeric values $\times 100$ correspond to the percentage of increase or decrease for each metabolite. The statistical significance of the differences at the 0.05 level was tested using an ANOVA two-tailed test with Bonferroni correction for multiple testing ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). FA, fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; GSx, total glutathione; TMAO, trimethylamine *N*-oxide.

Table 1. Relative individual metabolite contents with respect to the total metabolite content in specimens with or without detectable CMV DNA

Metabolite*	No detectable CMV DNA		Detectable CMV DNA		P value†
	Mean	SD	Mean	SD	
Total fatty acids	0.0018	0.0001	0.0020	0.0002	0.021
Polyunsaturated fatty acids	0.0038	0.0006	0.0047	0.0012	0.023
Unsaturated fatty acids	0.0044	0.0033	0.0050	0.0017	0.081
Alanine	0.0053	0.0012	0.0061	0.0011	0.032
Total glutathione	0.0015	0.0006	0.0017	0.0004	0.021
Trimethylamine N-oxide	0.0016	0.0007	0.0016	0.0003	0.065
Lysine	0.0039	0.0001	0.0034	0.0002	0.033
Leucine	0.0040	0.0013	0.0046	0.0008	0.078
Lactate	0.0047	0.0008	0.0054	0.0005	0.008
Proline	0.0044	0.0014	0.0053	0.0011	0.084
Acetate	0.0073	0.0023	0.0081	0.0015	0.038
Total methylamines	0.0114	0.0033	0.0118	0.0022	0.041
B-hydroxybutyrate	0.0028	0.0009	0.0031	0.0007	0.052
Choline	0.0059	0.0018	0.0056	0.0014	0.077
Glycine	0.0035	0.0012	0.0038	0.0008	0.092

*Spectral region intensities with VIP scores ≥ 1 in the PLS-DA model for discriminating between samples with or without detectable CMV DNA are listed. Mean and SD values are shown.

†The statistical significance of the differences was tested using an ANOVA test with Bonferroni correction for multiple testing. $P < 0.005$ was considered significant.

number of plasma specimens from patients who eventually developed CMV DNAemia, obtained prior to the detection of plasma CMV DNA, and a set of plasma samples from control patients (not developing CMV DNAemia) we were able to build a fairly robust PLS-DA model that allowed discrimination between test and control samples. The overall classification accuracy (predictability) of this model in cross-validation technical replicates was 73 %. Up to ten metabolites mostly contributed to the model (VIP score ≥ 1). Of these, six metabolites were significantly upregulated in specimens from patients who eventually had CMV DNAemia. These were methylamines, especially TMAO, taurine, total GSx and lactate. TMAO is an obligatory downstream metabolite of gut microbiota. Accumulation in the systemic circulation of TMAO has been linked to bacterial translocation, which can occur due to altered intestinal barrier function or bacterial overgrowth (both known to occur in Allo-SCT), and hence to heightened inflammatory responses and oxidative stress (Tang *et al.*, 2014). Both taurine and GSx are potent anti-inflammatory molecules that are generated in response to pro-inflammatory states (Tabas & Glass, 2013). In turn, lactate, a normal end point of the anaerobic breakdown of glucose, has been shown to increase in blood following bacterial LPS administration (Michaeli *et al.*, 2012); inflammation triggers CMV reactivation (Cook *et al.*, 2006), thus it could be hypothesized that the risk of CMV DNAemia in the Allo-SCT setting might be directly related to the net state of systemic inflammation after transplant. In this context, plasma levels of the aforementioned metabolites may be reflective of the magnitude

of either systemic inflammation (methylamines), ongoing compensatory anti-inflammatory responses (taurine and total GSx) or both. In this sense, both taurine and total GSx are well known cellular antioxidants which are overproduced upon cell injury (Tilton *et al.*, 2011). In addition, taurine is involved in osmoregulation and cell volume control and can be excreted by the cell in response to the CMV-induced increase in cell volume (Locci *et al.*, 2013). Kinetics analyses of these metabolites (and overall that of all metabolites displaying VIP scores ≥ 1 in the PLS-DA model) revealed that the plasma metabolomics signature described by our PLS-DA model was identifiable quite early after Allo-SCT (between 1 and 2 weeks after transplant), although the finest discrimination between test and control specimens was observed when those were obtained at a median of 22 days after Allo-SCT. In this sense, a PLS-DA model built on specimens obtained at that window of time displayed a predictability of 68 % in cross-validation technical replicates. It must be stressed, nevertheless, that the strength of our approach resides in the biosignature itself, which is based upon a combination of small metabolic variations, rather than in the concentrations of individual metabolites.

A renewed interest in antiviral prophylaxis for the prevention of CMV-related morbidity following Allo-SCT has recently emerged due to the advent of new drugs with increased intrinsic activity against CMV and better safety profiles in comparison with classical anti-CMV drugs (Boeckh *et al.*, 2015). The main goal of antiviral prophylaxis is to abrogate CMV replication in tissues and

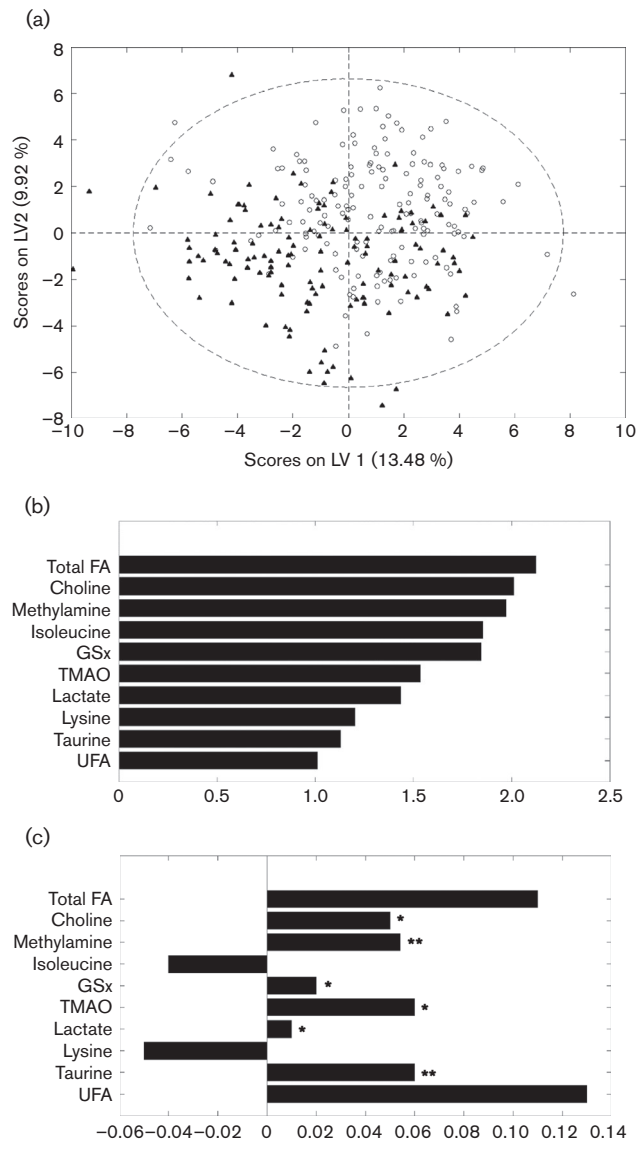


Fig. 2. Prediction of the occurrence of CMV DNAemia by plasma metabolomics fingerprinting. (a) PLS-DA scores plot in the new latent variables (LV) coordinates of specimens from patients subsequently developing CMV DNAemia (black triangles) and those from patients not doing obtained within a comparable time frame (white circles). The percentage of variance explained by the new LV (representative of variance introduced in the data by the development of CMV DNAemia) is between parentheses. Outliers are included in the graph. (b) Metabolites contributing the most to the PLS-DA model (VIP score ≥ 1) ordered by their relative contribution (VIP score: x -axis values) to the model. (c) Relative changes in the concentration of metabolites with VIP scores ≥ 1 between samples from patients subsequently developing CMV DNAemia (test group) and specimens from patients not having CMV DNAemia within the study period. The changes were calculated as the differences between the mean values for test specimens and control samples normalized to the mean values for control specimens. Positive and negative values in the x -axis mean that the mean concentration for a given metabolite in the test group is larger or lower, respectively, than that in the control

organs harbouring the virus in a latent state, avoiding virus dissemination to the systemic compartment. Since universal prophylaxis strategies lead inevitably to overtreatment, the identification of biomarkers anticipating the occurrence of CMV viraemia would allow the inception of antiviral prophylaxis on an individual basis according to the patient's risk (targeted prophylaxis). The potential clinical significance of our findings remains to be proven and should be weighted in this particular context.

A chemometric PLS-DA model built on samples with and without detectable CMV DNA showed a good discriminative power and predictability (the classification accuracy of this model in cross-validation technical replicates was 81%), and revealed the presence of metabolites that appeared to be upregulated during active systemic CMV infection. Fatty acid metabolism, tricarboxylic acid cycle (TCA), oxidative stress response and microbial metabolism are among the metabolic cores that were found to be closely associated with the presence of CMV DNAemia. Although the interpretation of metabolic profiles in terms of global metabolism is not straightforward, our results suggested increased metabolic fluxes for glycolysis, TCA and fatty acid biosynthesis during episodes of CMV DNAemia. We observed increased levels of alanine, lactate and total fatty acids and a shift in the fatty acid profile towards unsaturated species. Our data, however, do not conclusively prove that CMV replication was the force specifically driving the reported changes in the plasma metabolome. In this context, no plasma specimens obtained at the time of CMV DNAemia clearance were analysed. In this sense, reversal of the plasma metabolomic profile associated with CMV DNAemia would have provided a stronger causal link between CMV replication and the specific metabolome profile described. Experiments addressing this issue are currently under way. Previous *in vitro* studies reported increased levels of alanine and acetyl-CoA and increased fatty acid biosynthesis in human fibroblasts infected with CMV, probably related to disruption of mitochondrial networks (Munger *et al.*, 2008; Vastag *et al.*, 2011). The metabolomic pattern found in CMV infected cells *in vitro* does not entirely overlap with that found in the current study in human plasma specimens. It is likely that other factors, in addition to CMV replication itself, may have an impact on the metabolomics signature found in plasma specimens from patients with CMV viraemia. In this context, the occurrence of bacteraemia, known to have an impact on the plasma metabolomic profile somehow reminiscent to that described above (Mickiewicz *et al.*, 2014), either

group. The represented numeric values $\times 100$ correspond to the percentage of increase or decrease for each metabolite. The statistical significance of the differences at the 0.05 level was tested using an ANOVA two-tailed test with Bonferroni correction for multiple testing (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). FA, Fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; UFA, unsaturated fatty acids; GsX, total glutathione; TMAO, trimethylamine N-oxide.

Table 2. Relative individual metabolite contents with respect to the total metabolite content in specimens from patients subsequently developing CMV DNAemia and in those from patients not doing so

Metabolite*	No subsequent CMV DNAemia		Subsequent CMV DNAemia		P value†
	Mean	SD	Mean	SD	
Total fatty acids	0.0021	0.0082	0.0024	0.0070	0.142
Choline	0.0039	0.0020	0.0041	0.0018	0.038
Methylamine	0.0046	0.0017	0.0048	0.0016	0.008
Isoleucine	0.0053	0.0016	0.0051	0.0016	0.051
Total glutathione	0.0015	0.0002	0.0016	0.0002	0.033
Trimethylamine N-oxide	0.0016	0.0005	0.0017	0.0006	0.039
Lactate	0.0038	0.0004	0.0039	0.0004	0.041
Lysine	0.0039	0.0022	0.0037	0.0024	0.123
Taurine	0.0046	0.0012	0.0049	0.0014	0.009
Unsaturated fatty acids	0.0046	0.0023	0.0052	0.0021	0.079

*Spectral region intensities with VIP scores ≥ 1 in the PLS-DA model for discriminating between samples with or without detectable CMV DNA are listed. Mean and SD values are shown.

†The statistical significance of the differences was tested using the ANOVA test with Bonferroni correction for multiple testing. $P < 0.005$ was considered significant.

immediately prior to or during active CMV infection, however, did not appear to have contributed significantly to this effect in our cohort. Nevertheless, this extent cannot be definitively ruled out by our data. In addition, the incidence rate of aGvHD, which may also have an impact on the plasma metabolome, was not significantly different in patients with or without CMV DNAemia. Nevertheless, further studies are required to consistently demonstrate that CMV is directly responsible of these changes in the plasma metabolome.

It is of note that the plasma metabolomic profile reported herein is also reminiscent, although not entirely overlapping, to that observed in urine from newborns with congenital CMV infection (Locci *et al.*, 2013).

Limitations of the current study are the following: (i) the study cohort was relatively small for this type of study; (ii) patients in the current cohort were relatively heterogeneous in terms of demographics (age, in particular) and known risk factors for CMV viraemia and CMV end-organ disease, such as the type of transplant, the source of stem cells and the presence or absence of GvHD; nevertheless, none of these factors was significantly associated with the occurrence of CMV DNAemia in the current cohort; and (iii) no cross-validation analyses using samples from an independent cohort were performed; this seems a stringent requirement for validation of our data. Studies addressing this issue are currently under way.

In summary, the data suggest that plasma metabolomics profiling may allow early identification of Allo-SCT recipients prone to develop active systemic CMV infection, and in this sense it could be a useful ancillary tool for guiding the inception of antiviral prophylaxis (targeted prophylaxis).

In addition, our study revealed interesting insights about the potential effect of active systemic CMV infection in the host metabolome. Whether this knowledge may be of interest in the clinical management of CMV infection in this transplant setting remains to be determined.

METHODS

Patients. The current cohort consisted of 53 non-consecutive patients who underwent Allo-SCT for haematological disorders at the Haematology unit of the Hospital Clínico Universitario (HCU) of Valencia between 2010 and 2013. The lack of available plasma specimens for metabolomics profiling was the only criterion for patient exclusion. The median age of patients was 49 years (range 18–69 years). Relevant clinical and demographic data of the patients are summarized in Table 3. The study period comprised the first 100 days following transplantation. Only initial (first) episodes of CMV DNAemia (active systemic CMV infection) were considered for the analyses described herein. The study was approved by the HCU-Fundación INCLIVA Ethics Committee. All patients gave their informed consent to participate in the study.

Management of active CMV infection. Monitoring of plasma CMV DNAemia was performed by real-time PCR (CMV real-time PCR or Abbott RealTime CMV; Abbott Molecular) as previously described (Giménez *et al.*, 2014; Tormo *et al.*, 2011). The limits of detection and quantification of both assays are approximately 20 copies ml^{-1} (95 % confidence interval). Patients were treated preemptively with antivirals following a previously detailed protocol (Giménez *et al.*, 2014; Tormo *et al.*, 2011). Briefly, pre-emptive antiviral therapy with oral valganciclovir (900 mg over 12 h), intravenous ganciclovir (5 mg kg^{-1} over 12 h) or intravenous foscarnet (60 mg kg^{-1} over 12 h) was initiated upon detection of either a CMV DNA load > 500 copies ml^{-1} (when CMV surveillance was performed with the CMV PCR kit; until May 2012) or > 1000 copies ml^{-1} (when CMV monitoring was performed with the new Abbott

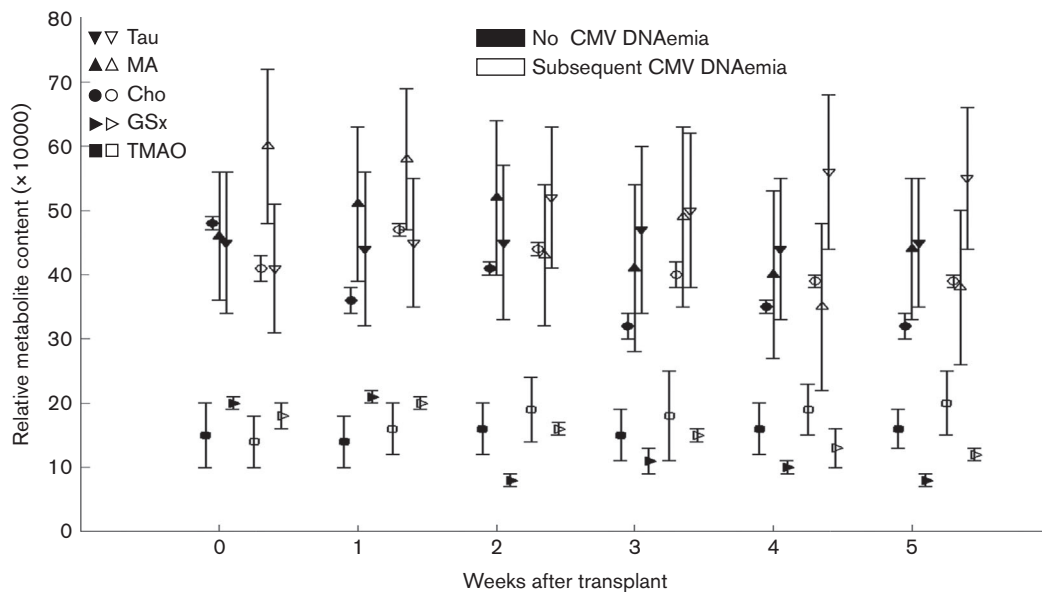


Fig. 3. Kinetics pattern of five metabolites (total fatty acids, FA, with squares; choline, Cho, with circles; methylamine, MA, with triangles; isoleucine, Ile, with inverted triangles; and total glutathione, GSx, with lateral triangles) significantly upregulated in specimens from patients who eventually developed CMV DNAemia. Mean and SD of the relative individual metabolites content ($\times 10\,000$) in specimens from patients either developing (white) or not developing (black) subsequent CMV DNAemia are depicted. The time points at which plasma metabolomics profiling was determined were the following: time point 0, median day 0 (range day -2 to day 2 after Allo-SCT); time point 1, median day 7 (range days 5–10); time point 2, median 13 days (range days 12–17 days); time point 3, median day 22 (range, days 18–28); time point 4, median day 30 (range, days 30–35); time point 5, median day 38 (range, days 36–43). The number of patients with/or without subsequent CMV DNAemia included in each time point analysis was the following; time point 0 (34/19); time point 1 (27/19); time point 2 (26/19); time point 3 (21/19); time point 4 (14/19); time point 5 (5/14).

Real Time CMV assay; since May 2012), and discontinued after two consecutive negative (undetectable) PCR results. CMV monitoring was performed at least once a week until day 100. Plasma CMV DNAemia values were normalized to the first WHO International Standard for CMV for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays (National Institute for Biological Standards and Control), and reported in IU ml^{-1} . The conversion factor (copies ml^{-1} to IU ml^{-1}) for each real-time PCR assay was calculated previously (Clari *et al.*, 2013).

Definitions. A bloodstream bacterial infection (bacteraemia) was defined as the isolation of a bacterial pathogen from at least one blood culture. Two sets of blood cultures (BD BACTEC Plus Aerobic/F and BD BACTEC Plus Anaerobic/F; Becton Dickinson) were drawn upon occurrence of fever ($>37\text{ }^{\circ}\text{C}$) and/or the presence of clinical signs or symptoms of infection. For coagulase-negative staphylococci and other common skin contaminants, two sets of positive blood cultures were required.

Plasma sample collection. Whole blood was collected by arm venepuncture between 8.00 and 9.00 into EDTA-treated collection tubes. The patients had not intentionally exercised in the 3 days prior to sampling, and continued to eat their habitual diet without unusual deviations. After mixing carefully, the samples were centrifuged (within the next 60 min following blood collection) at approximately 1000 g for 10–15 min. Plasma were then separated and an aliquot conserved (less than 1 h after separation) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until metabolomic analysis. Plasma employed for metabolomic analysis had not been thawed previously (Kamlage *et al.*, 2014).

NMR spectroscopy. Plasma specimens were thawed on ice immediately before metabolomics sample preparation and profiling. Fifty microlitres of D_2O were added to 500 μl plasma and an aliquot of 500 μl was taken and placed in a 5 mm NMR tube. This procedure was performed by an automatic sample handler Gilson 215 (Gilson) and took no longer than 2 min per sample. Thawed samples were kept at $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a SampleJet (Bruker GmbH) sampler exchanger before measurement and never longer than 2 h. ^1H -NMR spectra were recorded in a Bruker Avance DRX 600 spectrometer (Bruker GmbH) operating at 600.13 MHz with a 1 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ TX1 probe, calibrated using standard reference samples of alanine 10 mM and creatine 10 mM. Field homogeneity was tuned by semi-automated shimming for each sample following the instructions of the manufacturer. Samples were measured at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A single-pulse pre-saturation experiment was acquired in all samples. A total of 256 FIDs (free induction decay) were collected into 64 000 data points with a spectral width of 14 p.p.m. and the recycle delay of 1 s. Water signal was saturated with a weak irradiation during the recycle delay. Before Fourier transformation, the free induction decay was multipled by a 0.3 Hz exponential line broadening. Spectral chemical shift referencing on the alanine CH_3 doublet signal at 1.475 p.p.m. was performed in all spectra. We normalized the binned data to total spectral area. We used available spectral databases and two-dimensional NMR experiments to aid structural identification of relevant metabolites. All spectra were processed using MNOVA (Mestrelab) and transferred to MATLAB (MathWorks) using in-house scripts for data analysis. NMR has been shown to display $>98\%$ reproducibility (Dumas *et al.*, 2006; Bodi *et al.*, 2012; D. Monleón, unpublished data), allowing systematic detection of small changes (even $<5\%$).

Table 3. Demographic and clinical characteristics of the patients in this study

CMV, cytomegalovirus; D, donor; GvHD, graft-versus-host disease; HLA, human leukocyte antigen; R, recipient.

Parameter	No. of patients (%)
Sex	
Male	32 (60.4)
Female	21 (39.6)
Underlying disease	
Acute myeloid leukaemia	20 (37.7)
Non-Hodgkin's lymphoma	12 (22.6)
Myelodysplastic syndrome	1 (1.9)
Acute lymphocytic leukaemia	2 (3.8)
Chronic lymphocytic leukaemia	10 (18.8)
Multiple myeloma	0 (0)
Hodgkin's lymphoma	3 (5.7)
Aplastic anaemia	3 (5.7)
Others	2 (3.8)
HLA-matching	
Matched	40 (75.5)
Mismatched	13 (24.5)
Donor type	
Related	27 (51)
Unrelated	26 (49)
Stem cell source	
Peripheral blood	39 (73.6)
Umbilical cord blood	9 (17)
Bone marrow	5 (9.4)
Conditioning regimen	
Myeloablative	30 (56.6)
Non-myeloablative	23 (43.4)
GvHD prophylaxis	
Cyclosporin A/Methotrexate	22 (41.5)
Cyclosporin A/Mycophenolate mofetil	4 (7.5)
Other combinations	27 (51)
CMV serostatus	
D+/R+	25 (47.2)
D-/R+	20 (37.7)
D+/R-	2 (3.8)
D-/R-	6 (11.3)
Acute GvHD	
0-I	31 (58.5)
II-IV	22 (41.5)

Metabolomics analysis. The chemical shift regions including resonances between 0.50 and 4.70 and between 5.5 and 9.5 were investigated. The EDTA regions (2.53–2.58, 3.1–3.3 and 3.6–3.7 p.p.m.) were also excluded from the bucketing and multivariate analysis. The spectra were normalized to total aliphatic spectral area to eliminate differences in metabolite total concentration. The spectra were binned into 0.01 p.p.m. buckets (6 Hz) and mean centred for multivariate analysis. Projection to Latent Structures for Discriminant Analysis (PLS-DA) was applied to binned NMR spectra datasets (PLSToolbox; Eigenvector) for detecting differential biosignatures (Trygg *et al.*, 2007). The main advantage of PLS-DA models is that the main sources of variability in the data are modelled by the so-called latent variables, and consequently, in their associated scores and loadings,

allowing the visualization and understanding of different patterns and relations in the data (Trygg *et al.*, 2007). From a mathematical point of view, PLS-DA is a supervised extension of principal component analysis used to distinguish two or more classes by searching for variables (X matrix) that are correlated with class membership (Y matrix). In this approach the axes are calculated to maximize class separation and can be used to examine separation that would otherwise be across three or more principal components. For evaluation of accuracy of the models, cross-validation was performed on the whole dataset. Cross-validation enables an assessment of the optimal complexity of a model and allows an estimation of the performance of a model when it is applied to unknown data. For a given dataset, cross-validation involves a series of experiments, hereby called subvalidation experiments, each of which involves the removal of a subset of individuals from a dataset, construction of a model using the remaining objects in the dataset, and subsequent application of the resulting model to the removed objects. Therefore, each subvalidation experiment involves testing a model with objects that were not used to build the model. Typical cross-validation involves more than one subvalidation experiment by selection of different subsets of individuals for model building and model testing. In this study, PLS-DA models were cross-validated by technical replication of the whole process on 25 random data splits. The accuracy was calculated by averaging the classification success of all these technical replicates on the selected set of samples. The quality of the models is described by R^2X , R^2Y and Q^2 . R^2X or R^2Y is defined as the proportion of variance in the data explained by the models and indicates goodness of fit (ranging from 0 to 1; the model improves as approaches to 1). Q^2 is defined as the proportion of variance in the data predictable by the model and thus indicates predictability, calculated by cross-validation procedure (Holmes *et al.*, 2008). Although Q^2 also ranges between 0 and 1, it usually is lower than 0.7 as the value reaches a plateau when data are overfitted. More detail about the chemometric modelling can be found elsewhere (Bodi *et al.*, 2012; Borrás *et al.*, 2011). Signals belonging to the metabolites contributing the most to VIP scores in the models ($VIP \geq 1$) were integrated and quantified using semi-automated in-house MATLAB 7.4 (Mathworks) peak-fitting routines. These fitting routine were based on Levenburg–Marquard optimization procedures. The target function for the optimization included experimental spectra measured for standard solutions of selected metabolites with complex multiplet patterns and theoretically generated Lorentzian-shape signals for those metabolites with simpler spectral patterns. The metabolic levels were expressed as total relative metabolic content (calculated as the integral of the selected metabolite divided by the sum of all integrals in the spectra). The statistical significance of the differences at the 0.05 level was tested using an ANOVA two-tailed test with Bonferroni correction for multiple testing. Statistical analyses were performed using SPSS 15.0 (SPSS) and GraphPad Statmate 5.0 (GraphPad Software).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) (FIS 12/01992), and a grant from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (SAF2014-52875-R). P. A. is a research fellow of the Asociación Española contra el Cáncer (AECC).

REFERENCES

Bodi, V., Sanchis, J., Morales, J. M., Marrachelli, V. G., Nuñez, J., Forteza, M. J., Chaustre, F., Gomez, C., Mainar, L. & other authors (2012). Metabolomic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic resonance spectroscopy of peripheral blood

- serum: a translational study based on transient coronary occlusion models. *J Am Coll Cardiol* **59**, 1629–1641.
- Boeckh, M., Murphy, W. J. & Peggs, K. S. (2015).** Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* **21**, 24–29.
- Borrás, C., Monleón, D., López-Grueso, R., Gambini, J., Orlando, L., Pallardó, F. V., Santos, E., Viña, J. & Font de Mora, J. (2011).** RasGrf1 deficiency delays aging in mice. *Aging (Albany, NY)* **3**, 262–276.
- Clari, M. Á., Bravo, D., Costa, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Remigia, M. J., Giménez, E., Benmarzouk-Hidalgo, O. J., Pérez-Romero, P. & Navarro, D. (2013).** Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **75**, 207–209.
- Cook, C. H., Trgovcich, J., Zimmerman, P. D., Zhang, Y. & Sedmak, D. D. (2006).** Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol* **80**, 9151–9158.
- Dumas, M. E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Stamler, J., Elliott, P. & other authors (2006).** Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* **78**, 2199–2208.
- Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P., Navarro, D. & Tang, Y. -W. (2014).** Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* **52**, 654–656.
- Holmes, E., Loo, R. L., Stamler, J., Bictash, M., Yap, I. K., Chan, Q., Ebbels, T., De Iorio, M., Brown, I. J. & other authors (2008).** Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* **453**, 396–400.
- Kamlage, B., Maldonado, S. G., Bethan, B., Peter, E., Schmitz, O., Liebenberg, V. & Schatz, P. (2014).** Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem* **60**, 399–412.
- Locci, E., Noto, A., Lanari, M., Lazzarotto, T., Fanos, V. & Atzori, L. (2013).** Metabolomics: a new tool for the investigation of metabolic changes induced by cytomegalovirus. *J Matern Fetal Neonatal Med* **26** (Suppl. 2), 17–19.
- Michaeli, B., Martinez, A., Revely, J. P., Cayeux, M. C., Chioléro, R. L., Tappy, L. & Berger, M. M. (2012).** Effects of endotoxin on lactate metabolism in humans. *Crit Care* **16**, R139.
- Mickiewicz, B., Duggan, G. E., Winston, B. W., Doig, C., Kubes, P., Vogel, H. J. & Alberta Sepsis Network (2014).** Metabolic profiling of serum samples by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock. *Crit Care Med* **42**, 1140–1149.
- Munger, J., Bennett, B. D., Parikh, A., Feng, X. J., McArdle, J., Rabitz, H. A., Shenk, T. & Rabinowitz, J. D. (2008).** Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol* **26**, 1179–1186.
- Noto, A., Dessi, A., Puddu, M., Mussap, M. & Fanos, V. (2014).** Metabolomics technology and their application to the study of the viral infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* **27** (Suppl. 2), 53–57.
- Pacchiarotta, T., Deelder, A. M. & Mayboroda, O. A. (2012).** Metabolomic investigations of human infections. *Bioanalysis* **4**, 919–925.
- Solano, C. & Navarro, D. (2010).** Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virol* **5**, 111–124.
- Tabas, I. & Glass, C. K. (2013).** Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**, 166–172.
- Tang, W. H., Wang, Z., Fan, Y., Levison, B., Hazen, J. E., Donahue, L. M., Wu, Y. & Hazen, S. L. (2014).** Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J Am Coll Cardiol* **64**, 1908–1914.
- Tilton, C., Clippinger, A. J., Maguire, T. & Alwine, J. C. (2011).** Human cytomegalovirus induces multiple means to combat reactive oxygen species. *J Virol* **85**, 12585–12593.
- Tormo, N., Solano, C., Benet, I., Nieto, J., de la Cámara, R., López, J., Garcia-Noblejas, A., Muñoz-Cobo, B., Costa, E. & other authors (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.
- Trygg, J., Holmes, E. & Lundstedt, T. (2007).** Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res* **6**, 469–479.
- Vastag, L., Koyuncu, E., Grady, S. L., Shenk, T. E. & Rabinowitz, J. D. (2011).** Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog* **7**, e1002124.

