



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Infección por Citomegalovirus en el Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos en la era del tratamiento anticipado: consideraciones actuales sobre la definición de grupos de riesgo y el diagnóstico

María Suárez-Lledó Grande

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

“Infección por Citomegalovirus en el Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos en la era del tratamiento anticipado: consideraciones actuales sobre la definición de grupos de riesgo y el diagnóstico”

Doctorando: María Suárez-Lledó Grande

Servicio de Hematología. Hospital Clínic Barcelona.

Directoras: Dra. Montserrat Rovira Tarrats

Dra. M^a Ángeles Marcos Maeso

Servicios de Hematología y Microbiología. Hospital Clínic, Barcelona

Tutora: Dra. M^a Ángeles Marcos Maeso

Servicio de Microbiología. Hospital Clínic, Barcelona

Medicina i Recerca Translacional. *Oncología i Hematología*

Universitat de Barcelona

11 de Noviembre 2019

ÍNDICE

Página

1. AGRADECIMIENTOS	7
2. MOTIVACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	9
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. El Citomegalovirus Humano	13
3.1.1. Generalidades y estructura	13
3.1.2. Transmisión, latencia, replicación y reactivación	15
3.1.3. Eliminación del CMV	17
3.2. El Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos	18
3.2.1. Aspectos históricos	18
3.2.2. Aspectos generales	19
3.2.3. Modalidades de TPH	19
3.2.4. Profilaxis de la Enfermedad de Injerto contra Receptor	24
3.2.5. Sistema Inmune y Reconstitución inmune post-TPH	27
3.2.5.1. Sistema Inmune	27
3.2.5.2. Reconstitución Inmune post-TPH	32
3.2.5.3. Respuesta Inmune frente a CMV	35
3.2.5.4. Reconstitución inmune CMV-específica post-TPH.....	36
4. CMV y Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos	37
4.1. Generalidades y Epidemiología	37
4.2. Factores de Riesgo de Infección por CMV	39
4.3. Manifestaciones clínicas de la Infección por CMV	41
4.4. Técnicas diagnósticas	43
4.5. Estrategias de tratamiento	48
4.6. Resistencias al tratamiento antiviral	53
4.7. Inmunoterapia celular	56
5. HIPÓTESIS DE TRABAJO	57
6. OBJETIVOS	61
7. RESULTADOS	65
7.1. Trabajo número 1	67
7.2. Trabajo número 2	75
7.3. Trabajo número 3	83
8. DISCUSIÓN	85
9. CONCLUSIONES	95
10. BIBLIOGRAFÍA	99

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS	Página
Figura 1. Estructura del CMV	13
Figura 2. Esquema del genoma del CMV y cascada de expresión genómica.....	15
Figura 3. Ciclo replicativo del CMV	16
Figura 4. Respuesta inmune frente al CMV.....	17
Figura 5. Estructura del cromosoma 6	20
Figura 6. Supervivencial global según compatibilidad HLA.....	21
Figura 7. Evolución de los trasplantes por tipo de donante a lo largo de los años. Experiencia reportada por el EBMT.....	22
Gráfica 1. Evolución del tipo de trasplante según la fuente de PH. Memoria anual de REDMO 2018.....	22
Gráfica 2. Evolución de los trasplantes de donante emparentado y el auge del trasplante familiar haploidéntico en la última década (Memoria anual de la ONT 2018).....	23
Figura 8. Efecto que produce el tipo de acondicionamiento sobre la recuperación hemoperiférica (mielotoxicidad), así como sobre el requerimiento transfusional.....	24
Figura 9. Mecanismo de acción de la Ciclofosfamida post-TPH.....	26
Figura 10. Componentes del Sistema Inmune.....	28
Figura 11. Esquema de la respuesta inmune (innata y adaptativa) generada frente a los diferentes estímulos (virus, bacterias, hongos, parásitos y antígenos propios).....	30
Figura 12. Respuesta humoral.....	31
Figura 13. Etapas de la reconstitución inmune post-TPH.....	32
Figura 14. Cronología de las complicaciones infecciosas causadas por los diferentes gérmenes según el período post-TPH correspondiente al estado de reconstitución inmune	34
Figura 15. Estadíos evolutivos de los linfocitos T CD8 citotóxicos de acuerdo a la fase evolutiva de la infección por CMV.....	36
Figura 16. Mecanismo de acción de los fármacos antivirales.....	52
Tabla 1. Mutaciones genotípicas más frecuentemente asociadas a resistencia antiviral...	55
Figura 17. Lugar de acción y genes involucrados en la resistencia genotípica del CMV los diferentes fármacos antivirales.....	55

ABREVIATURAS

Alo-TPH: Trasplante Alogénico de progenitores hematopoyéticos

ATG: Inmunoglobulina antitimocito o antitimoglobulina

BCR: Receptor de células B

CIBMTR: *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*

CPA: Célula presentadora de antígeno

CMV: Citomegalovirus

CMV-esp: Citomegalovirus específico

CyPT: Ciclofosfamida post-trasplante

D: Donante

DNA: ácido Dexosirribonucleico

EBMT: *European Blood and Marrow Transplantation*, grupo Europeo de TPH

ECIL: *European Conference on Infections in Leukemia*

EICR: Enfermedad de Injerto contra receptor

FOS: Foscarnet

GCV: Ganciclovir

GETH: Grupo Español de Trasplante Hemopoyético

GI: Gastrointestinal

Haplo-TPH: Trasplante haploidéntico

HLA: *Human Leucocyte Antigen*

VHH: Virus Herpes Humano

ICN: Inhibidor de calcineurina

IFN: Interferón

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

LBA: Lavado Broncoalveolar

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LMC: Leucemia mieloide crónica

Log: Logaritmo

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMF: Micofenolato de mofetilo

MO: Médula ósea

MTX: Metotrexato

NK: Natural killer

NF- κ β : necrosis factor kappa beta (vía inflamatoria)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR-RT: Protein Chain Reaction Real Time (PCR cuantitativa)

R: Receptor

SCU: Sangre de Cordón Umbilical

SP: Sangre periférica

TCR: Receptor de células T

TGF: Factor de crecimiento tumoral

TNF: Factor de necrosis tumoral

TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

TRECs: Receptor de células T para el reordenamiento del DNA

TReg: Linfocitos T reguladores

UI: Unidades Internacionales

VEB: Virus Epstein Barr

VGC: Valganciclovir

VHS: Virus herpes simple

SOS: Síndrome de obstrucción sinusoidal

VVZ: virus varicela zóster

μ g: microgramo

μ L: microlitro

AGRADECIMIENTOS

Probablemente se trate de la parte más difícil de la tesis porque es lo primero que lee el lector y ha de causar buena impresión (“bien empieza lo que bien acaba”). Y también porque no me gustaría dejarme a nadie fuera. He de reconocer que me siento muy afortunada de poder agradecer su colaboración a tantas personas. Quiero dar las GRACIAS:

A *Francesc, Gonzalo, Carmen y Laura* (equipo de TPH), porque al “cederme su tiempo” confiaron en que yo respondería.

A *Natalia, Laia, Ariadna, Marta, Anna y Núria* (enfermería), por sus mensajes de ánimo cada vez que pasaban cerca de mí, han sido de gran apoyo.

A *Laura*, por estar siempre dispuesta a ayudar y conseguirlo.

A *Manolo*, por su “soporte técnico” (SPPS) y sus ánimos.

A *Mayte y Consuelo* (en representación del Servicio de Limpieza), por procurar un lugar de trabajo digno y agradable que invitaba a aprovechar el tiempo.

A todos los *Doctores “Ph”*, que reviviendo el esfuerzo que les hizo madurar profesionalmente, compartieron recuerdos, ánimos y valiosos consejos.

A todos aquellos que aún no son *Doctores “Ph”*, en especial a Juan, Anna, Celia y Pedro, a quienes animo a ser los siguientes en emprender este camino.

A *Núria Martínez*, por tantas horas cambiando el mundo y por “provocar” en mí la responsabilidad de querer ser mejor ejemplo para las generaciones futuras.

A *Álvaro Urbano*, por su generosidad, por su disponibilidad a la hora de compartir conmigo su experiencia profesional y, sobre todo, por confiar en mí.

A *Montse y M^a Ángeles*, por ser algo más que las directoras de la tesis: Por sus consejos, su tiempo, por “dejarme hacer”, por corregirme y por acompañarme durante este tiempo.

A *los pacientes*, porque nos permiten crecer como médicos, investigadores y, sobre todo, como personas.

A *Laia, Núria y Blanca*, porque sin duda han sido y seguirán siendo la motivación más grande para seguir trabajando del mejor modo posible y que pueda servirles de ejemplo e inspiración en su futuro, de la misma manera que a mí me inspira el ejemplo de mis padres.

A *Jordi*, por su perseverancia y apoyo, por hacer suyos mis objetivos y, en definitiva, por hacer que sea más fácil avanzar juntos.

MOTIVACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

No podría decir una fecha exacta en la que me decidí a iniciar el camino de la tesis. Lo que sí que puedo decir es que recuerdo que ya desde la facultad empecé a oír esta palabra. Sin embargo, al acabar la carrera tenía clarísimo que yo me dedicaría a los pacientes y que no quería hacer la tesis. Pero, como dice la sabiduría popular “nunca digas de esta agua no beberé”...porque la vida da muchas vueltas. Y en una de esas vueltas me dejé caer en el Hospital Clínic a sabiendas que se trataba de un buen hospital donde aprendería mucho, que era mi objetivo: “formarme en un buen hospital para poder ofrecer la mejor asistencia a los pacientes”. Y creo que elegí bien... Enseguida me dí cuenta que la gente que trabaja aquí dedicaba mucho tiempo al estudio y a mejorar su conocimiento (de hecho durante un tiempo no tenía claro cuál era el horario que se había de cumplir). La verdad es que yo pensaba que tenía que aprovechar al máximo esos 4 años de especialidad (luego tendría que valerme por mí misma). Durante los años de residencia me fui convenciendo de que mejorar y perfeccionar mi formación profesional impactaba directamente en la vida de los pacientes (tanto en supervivencia global como en supervivencia fuera del hospital) y que mi contribución tenía que ser significativa ($p < 0,05$). Otro argumento que me rondaba por la cabeza para convencerme de hacer mejor las cosas es que en esta vida no todo es recibir, sino que también hay que dar (compartir). He tenido la suerte de que durante todo este tiempo me han acompañado siempre personas excelentes tanto a nivel profesional como personal, a las que sin pedir permiso, tomé como ejemplo, tan sólo espero no haberles defraudado. Mis padres nos inculcaron desde pequeños el espíritu de luchar para ser mejores en todos los aspectos de nuestra vida, porque sólo así podíamos servir mejor a los demás. Para ello se sirvieron de su propio ejemplo de superación personal y de las personas que cuidadosamente “escogieron” para colaborar en nuestra educación y formación (tanto en el colegio como fuera del colegio). Así que considero la tesis un tributo a mis padres y a los valores que nos transmitieron.

Una de las frases típicas que acompaña siempre a una tesis doctoral es la famosa “es peor que un parto”...y dada mi experiencia en el tema (de los partos, no de la tesis), me atrevo a aportar mi punto de vista, realizando esta comparación, no con el parto sino desde el inicio del embarazo, con el que encuentro más similitudes, a pesar de ser experiencias bien diferentes:

Primero, está el momento en el que uno se da cuenta de que el proceso ya ha empezado y que no hay marcha atrás...es una mezcla de sentimientos (alegría, temor, ilusión, dudas...). Durante los meses que dura el proceso (embarazo o tesis), intervienen diferentes personajes, todos ellos imprescindibles y sin cuya aportación no sería lo mismo. Por ejemplo, las directoras de la tesis que asumen las funciones de “comadrona” y te acompañan desde el principio hasta el final. Luego están los “grupos de parto” que son aquellas sesiones dedicadas a explicar situaciones futuras, maneras de hacer, aconsejar y compartir experiencias, donde prácticamente pueden incluirse todos aquellos que pasáis habitualmente por mi “despacho”. Otro momento que comparten ambas experiencias es cuando se va acercando el momento de dar a luz, en el que sólo tienes ganas de que todo acabe, porque no duermes bien por las noches, estás incómoda, has perdido la inspiración...y además te das cuentas que tras tanta dedicación y preparación...encuentras que falta alguna cosa...

Y por fin tras meses de espera, llega el momento y te das cuenta de lo acertada que es la frase “dar a luz”, porque efectivamente al traer una vida nueva al mundo, es luz en la oscuridad. Y sí,

la tesis también es “vida” (y luz) para los pacientes. Porque cuando nos tomamos en serio nuestra formación y profundizamos en nuestro conocimiento, no lo hacemos sólo por la satisfacción de aprender, si no porque así podemos (y debemos) mejorar la salud de los pacientes que ponen su vida en nuestras manos, desconocidas para ellos, confiando en nuestro buen hacer. Y de aquí se deduce la última similitud, y es que la tesis (al igual que ocurre con los hijos) es una responsabilidad para toda la vida. Y esa responsabilidad te lleva a seguir actualizando los conocimientos y a compartirlos, a adaptarse a las nuevas situaciones y a resolver los problemas.

Y sí, Jordi, al igual que en ocasiones anteriores, la tesis doctoral es “LA” tesis... ¡otra niña!

Con lo mencionado anteriormente quiero volver a insistir en que la motivación para la tesis doctoral ha sido el beneficio que se deriva de querer saber cómo y por qué mecanismos ocurren las complicaciones y las enfermedades, para poder buscar una solución, a ser posible en colaboración porque hace más eficaz la búsqueda, se potencian las virtudes individuales y se cubren los defectos. Y este beneficio ha de tener siempre una repercusión sobre los pacientes. Si hay algo que sólo me beneficia a mí (aunque sea desde un punto de vista curricular), es muy probable que la dirección no sea la correcta. El tema de tesis versa sobre una complicación infecciosa muy frecuente en los pacientes que reciben un trasplante de progenitores hematopoyéticos. De modo general, las complicaciones que ocurren después del trasplante son la enfermedad injerto contra receptor, las infecciones, la toxicidad relacionada con el procedimiento y la recaída de la enfermedad. Dentro de las complicaciones infecciosas, la infección por citomegalovirus es la más frecuente y afecta a más de la mitad de los pacientes y habitualmente nos acompaña durante 3 meses y en algunos pacientes hasta 6 meses. Es por ello que profundizar en el conocimiento de la misma puede resultar beneficioso.

Tenemos la suerte de tener una profesión que nos “obliga” a renovarnos constantemente, por lo que sentimos que avanzamos. Pero, además tenemos una profesión muy humana donde el contacto personal con los pacientes y con los compañeros de trabajo (en lo bueno y en lo malo, en la salud y en la enfermedad) crea los vínculos necesarios que nos ayudan a avanzar y a madurar. En definitiva, sólo tenemos que aprovechar las oportunidades que se nos presentan, porque si las dejamos pasar, es muy probable que después no vuelvan...Y quiero dejar por escrito estas reflexiones por si algún día “pierdo el norte” y se me olvida por qué me hice médico.

INTRODUCCIÓN

3.1 El Citomegalovirus Humano.

3.1.1 Generalidades y estructura.

El Citomegalovirus humano (CMV) pertenece a la subfamilia *Betaherpesviridae*, de la familia *Herpesviridae*, también denominado Herpesvirus Humano 5 (HHV-5). Debe su nombre al aumento de tamaño que produce sobre la célula que infecta. Al igual que otros virus de la familia, se caracteriza por permanecer latente tras la infección (ref 1).

Los viriones maduros del CMV son esféricos y miden entre 200 y 300 nm de diámetro. La arquitectura de los viriones del CMV es común a la de los otros herpesvirus y está compuesta por las siguientes estructuras: a) el *core*, donde se encuentra el genoma del virus, una molécula lineal de DNA bicatenario que contiene 235 kpb que codifica para 165 genes, constituyendo el genoma más grande de toda la familia *Herpesviridae*; b) la *nucleocápside*, que rodea al core, presenta una forma icosaedrica de 100-110 nm de diámetro y está formada por 12 pentámeros y 150 hexámeros; c) el *tegumento*, matriz de aspecto amorfo compuesta por fosfoproteínas que envuelve la cápside; d) la *membrana*, es una bicapa lipídica que rodea todas las estructuras anteriores y contiene abundantes glicoproteínas (gB, gH) implicadas en la entrada del virus a las células que infecta (Figura 1)(Ref 2,3).

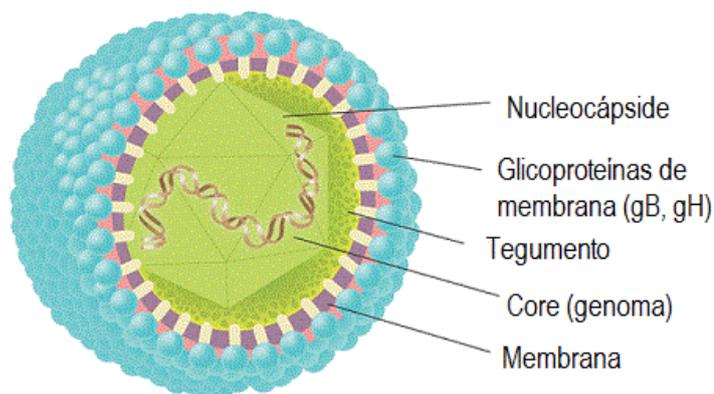


Figura 1. Estructura del CMV (ref 2)

La estructura del genoma del CMV corresponde a la clase E y consiste en 2 secuencias únicas, una larga (U_L , *Unique Long*) y una corta (U_S , *Unique Short*). Cada secuencia realiza una repetición directa terminal ("terminal"), existiendo una copia invertida o inversa de dicha secuencia en medio del genoma ("interna"). De esta manera, en la replicación del genoma del CMV, las secuencias U_L y U_S se van repitiendo de manera invertida e independiente, dando lugar a 4 posibles isómeros: *Terminal Repeat Long* (TR_L) con su respectiva secuencia invertida, *Internal Repeat Long* (IR_L); y lo mismo para la secuencia corta: *Terminal Repeat Short* (TR_S) y su respectiva secuencia invertida, *Internal Repeat Short* (IR_S). Se han identificado diversidad de genes que codifican para diferentes proteínas implicadas en diferentes fases de la replicación del genoma (ref 4). Así como también son diversos los mecanismos de activación de las diferentes vías de señalización implicadas, lo que tiene importancia para los mecanismos de

acción de los antivirales y los mecanismos de resistencia que se detallará en el capítulo correspondiente).

El *tegumento* contiene la mayor parte de las proteínas virales, siendo la proteína más abundante la fosfoproteína 65 (pp65), codificada por el gen UL83 (*Unique Long 83*). En el tegumento también se encuentran otras proteínas importantes en el ciclo replicativo e infectivo del CMV: la proteína pp71 (producto del gen UL82), que tiene un papel en la transactivación del virión; la proteína de maduración, pp150 (producto del gen UL32), la proteína más larga del tegumento (producto del gen UL48) y la pp28 (codificada por el gen UL99). La función de las proteínas presentes en el tegumento se puede dividir en 2 clases:

- a) Proteínas que juegan un papel estructural y son importantes para el ensamblaje de los viriones y el desensamblaje de las partículas durante la entrada del virus en la célula que infecta.
- b) Proteínas que modulan la respuesta a la infección por parte de la célula huésped (células infectada)

La bicapa lipídica (*membrana*) que envuelve el tegumento del virión, procede del retículo endoplasmático y aparato de Golgi de la célula infectada y contiene al menos 20 glicoproteínas virales que están implicadas en el anclaje y penetración del virus en la célula. Entre ellas se encuentran: glicoproteína B (gB), gH, gL, gM, gN y gO. (ref 4).

Cuando se produce la infección viral, la expresión genómica del CMV se lleva a cabo en una cascada de 3 fases (ref 5):

- a) En primer lugar se expresan los genes α o IE (*Inmediate-Early*), en las primeras 2 horas tras la infección. En esta fase se sintetizan las proteínas α (precoz inmediata), con actividad fundamentalmente reguladora de la replicación y transcripción de los genes *early*, de la segunda fase.
- b) En esta segunda fase, que ocurre en las primeras 24 horas tras la infección, los genes *early* codifican para las proteínas β (*Delayed-Early* o precoz retardada) con función enzimática reguladora de la replicación del DNA viral y de la expresión final de los genes de la tercera fase.
- c) Los genes de la tercera fase codifican para las proteínas γ o proteína tardía que se sintetizan después de las primeras 24 horas de la infección. Son las proteínas estructurales del virión, entre las que se encuentran las glicoproteínas de envuelta (gp), implicadas en las producción de anticuerpos neutralizantes, las proteínas de la cápside y del tegumento, fosfoproteínas (pp), como por ejemplo la pp65, principal diana para la producción de anticuerpos monoclonales que se utilizan en las pruebas diagnósticas (antigenemia).

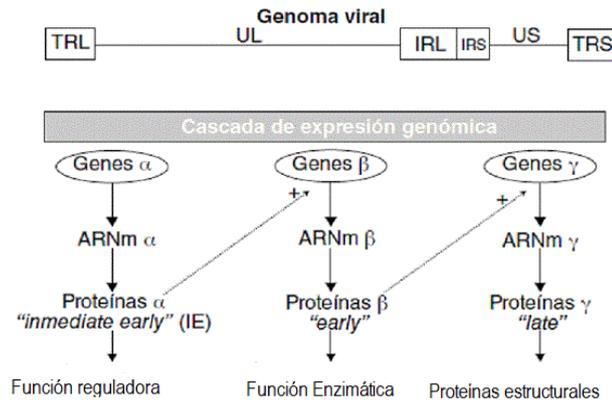


Figura 2. Esquema del genoma del CMV y cascada de expresión genómica (ref 5).

3.1.2 Transmisión, latencia, replicación y reactivación.

El Citomegalovirus se puede transmitir a través de la saliva, por contacto sexual, a través de la placenta, a través de la lactancia, por transfusión de hemoderivados así como, a través del trasplante de órgano sólido y de progenitores hematopoyéticos. La seroprevalencia en la población se sitúa entre 30-90% y aumenta con la edad. La primoinfección habitualmente es asintomática, tras ella el CMV establece un periodo prolongado de latencia y, es por ello, que periódicamente puede reactivarse.

El ciclo vital del CMV consiste en diferentes pasos (Figura 3) que se detallan a continuación. Primero, el CMV entra en la célula, bien por fusión directa o a través de vías endocíticas. Para ello, el virus se ancla a la célula gracias a la interacción entre las glicoproteínas virales presentes en la envoltura del CMV (gB, gH) y los receptores específicos que se encuentran en la superficie de la célula infectada. Posteriormente, se produce la fusión entre las membranas del CMV y la célula, con lo que se libera la nucleocápside en el interior del citoplasma y se traslada al núcleo, donde se libera el DNA viral. Ésto activa la expresión de los genes IE-1 e IE-2 que da lugar a la estimulación y acumulación de las diferentes funciones de síntesis viral. Con ello se activa la replicación y maduración del virus, dentro del núcleo de la célula infectada. A medida que el DNA viral se va replicando, se sintetiza la cápside que envuelve al DNA viral replicado y una vez encapsulado lo transporta del núcleo al citoplasma. Es aquí donde adquiere la envoltura que protege al resto de estructuras (virión, cápside y tegumento). Dicha envoltura procede del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi de la célula infectada. Finalmente el virus sale de la célula por exocitosis (ref 4, 6, 7).

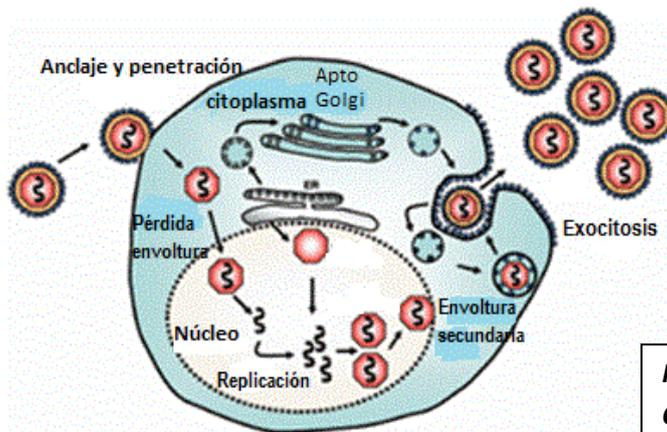


Figura 3. Ciclo replicativo del CMV (ref 4).

El CMV es capaz de infectar varios tipos celulares como células endoteliales, epiteliales (incluyendo células de la retina), células de músculo liso, fibroblastos, leucocitos y células dendríticas. Los mecanismos por los que el CMV permanece en estado latente y los mecanismos que llevan a que se reactive son poco conocidos (ref 4). Hay evidencia de que la expresión de genes virales durante la latencia es muy diferente con respecto a la de una infección activa (ref 8, 9, 20). Así mismo, se ha descrito que las células en las que el CMV permanece en latencia son mayoritariamente de estirpe mieloide (monocitos), aunque el sitio exacto se desconoce. Se ha detectado DNA viral en varios tipos celulares entre ellos: los monocitos y macrófagos, linfocitos, células CD34+, células dendríticas inmaduras y células endoteliales. Sin embargo, que el DNA se encuentre presente en el interior de algunas células no quiere decir que éste se encuentre en estado de replicación activa. Además, no todas las células tienen capacidad para favorecer la replicación viral. En este sentido, se ha relacionado la "permissividad" de las células para la replicación viral con el estado de diferenciación de las mismas (ref 10). De esta manera, las células diferenciadas (estadío madurativo más avanzado) permiten la replicación viral, mientras que en las indiferenciadas (inmaduras) el virus puede entrar pero no replicarse. Las células no permisivas no tienen ningún papel en la diseminación del virus.

En cuanto a los factores que controlan el estado de latencia, se han propuesto 3 posibles vías:

- 1) Tras el anclaje y entrada del virus en la célula, el CMV entra directamente en estado de latencia sin que exista expresión de nuevos genes virales.
- 2) El virus inicia una infección activa productiva, tras entrar en la célula, que se interrumpe de manera precoz y entra en latencia.
- 3) Tras la entrada del virus en la célula, éste expresa una serie de genes que no están asociados con una infección activa productiva pero que son necesarios para permanecer en estado latente.

En la infección latente no se produce una nueva progenie de virus, ya que algunos genes de la fase precoz (genes IE) están reprimidos, hecho que se ha descrito como posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Periódicamente, el CMV puede reactivarse y producir un nuevo ciclo. Los mecanismos por los que el CMV latente se activa provocando una reactivación se

desconocen aunque juegan un papel clave en la patogénesis de la infección. La reactivación por CMV se ha detectado en estados asociados a inmunosupresión, estrés, inflamación e infección por otros gérmenes. Parece que el $TNF\alpha$ actúa como mediador de la activación. El $TNF\alpha$ se une al receptor TNF de las células infectadas y provoca la activación de la vía de la *Protein Kinasa C* y del $NF-\kappa\beta$ que a su vez activa la transcripción de los genes IE del CMV y desencadena la replicación viral. Otras vías se pueden estimular por la producción de prostaglandinas, durante el curso de una inflamación, y llegar al mismo punto final (ref 4, 11-19).

3.1.3 Eliminación del CMV.

Aunque se ha demostrado que tanto la inmunidad innata como adaptativa están implicados en la respuesta inmune frente a la infección por CMV, la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T $CD8+$ es el mecanismo predominante para el control de la replicación viral y la eliminación del virus. Los linfocitos T $CD8$ reconocen los péptidos de proteínas virales (pp65 e IE-1, las más inmunodominantes) que son capaces de unirse a moléculas de HLA clase I. Estas moléculas HLA-I pueden presentar los antígenos virales de manera directa a través de las células infectadas o bien por células presentadoras de antígeno que adquieren el antígeno de las células infectadas lisadas. Este complejo molécula HLA-péptido viral es reconocido por los linfocitos T $CD8+$ a través de su receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Este reconocimiento del linfocito T está restringido a aquellos péptidos capaces de unirse a la molécula HLA correspondiente y que son presentadas en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno (CPA). Ello asegura que el reconocimiento sea específico. Tras el reconocimiento del antígeno viral, el linfocito T $CD8$ se activa y prolifera a células efectoras y memoria. Los linfocitos T $CD8+$ efectoras (citotóxicas), reconocen a través del TCR- antígeno específico la célula infectada, se une a ella y produce la citólisis de la misma mediante la producción de citocinas como $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$. Durante el proceso de respuesta inmune frente al CMV los linfocitos T $CD8$ pueden ayudarse de las células NK para la lisis de las células infectadas y de los linfocitos B para la neutralización de virus y la posterior adquisición de la memoria, a través de la producción de IgM (primoinfección) e IgG que es lo que nos permite identificar que la infección por CMV está resuelta y el huésped tiene memoria CMV-específica (serología IgG) (Figura 4) (ref 20-27).

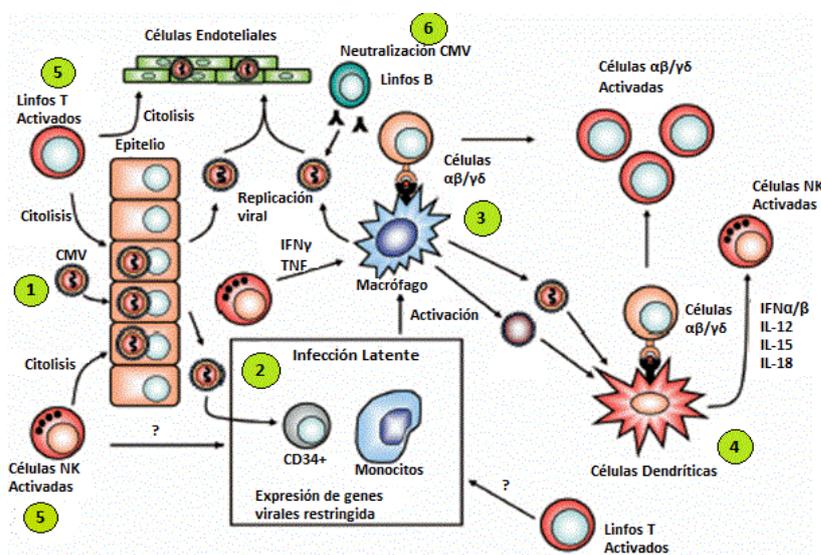


Figura 4. Respuesta

inmune frente al CMV.

El virus inicia la replicación en las células endoteliales (1), establece la latencia en monocitos y células mieloides (2). La diferenciación de los monocitos a macrófagos produce una infección productiva y activa los linfocitos T (3). Los antígenos virales se procesan por las células dendríticas (CPA) y activan a los linfocitos T (4). Los linfocitos T activados, las células NK (5) y los linfocitos B (6) participan en la eliminación del virus.

3.2 El Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos.

3.2.1 Aspectos históricos.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) se denomina así porque las células administradas a un paciente provienen de un donante sano diferente a dicho paciente o receptor y puede ser, emparentado (familiar) o no emparentado. A lo largo del tiempo, ha pasado de ser un procedimiento experimental a ser considerado un procedimiento estándar como tratamiento curativo de muchas enfermedades hematológicas -malignas, en su mayoría, y benignas- y de enfermedades no hematológicas, tanto genéticas como adquiridas que tienen su origen en algún trastorno del sistema inmune.

En el siglo XX comenzaron las investigaciones relacionadas con el TPH. Al final de la II Guerra Mundial tras las bombas atómicas, que causaron desgracias a muchos, se evidenció que el sistema hemopoyético es el más sensible a la radiación y que la exposición a radiación provocaba un fallo medular que provocaba la muerte (ref 28). De los experimentos realizados en ratones (Jacobson, ref 29) y en perros (Storb, ref 30) se demostraron conceptos que hoy en día se consideran básicos y sin los cuales no se entendería el TPH. Entre ellos: la eficacia de la médula ósea en repoblar la hemopoyesis es independiente de la vía por la que se infunde; la médula ósea es un órgano inmunológicamente competente que produce un ataque inmunológico, que hoy conocemos como Enfermedad Injerto Contra Receptor (EICR, ref 28) y que esta reacción está mediada genéticamente (sistema de histocompatibilidad -HLA-); el metotrexato (MTX) es capaz de prevenir y disminuir la EICR (ref 31,32); la ciclofosfamida es capaz de producir la inmunosupresión suficiente para favorecer el injerto; se establecieron las dosis de irradiación corporal total necesarias para permitir el injerto y que la irradiación corporal total fraccionada fuera más eficaz y menos tóxica; se demostró el mayor riesgo de fallo de implante con el busulfán (por lo que se separa 48-72h de la infusión de los progenitores hematopoyéticos); se describió la depleción linfoide y utilización de ATG, la importancia del tipaje y compatibilidad HLA en el éxito del TPH y en la supervivencia (de los perros). Otros conceptos importantes que concluyeron los experimentos fue la posibilidad de retirar la inmunosupresión tras alcanzar la inmunotolerancia y que la reconstitución inmune post-TPH ocurre alrededor de los 300 días del trasplante, excepto si se produce EICR (ref 28, 33).

El primer TPH alogénico en humanos lo realizó E. Donnall Thomas en 1957 (ref 34). Los primeros trasplantes se describieron en 1959, con donantes gemelos y de médula ósea. Inicialmente todos los trasplantes eran mieloablativos (ver página 23). Las primeras infusiones de médula ósea fracasaron por pérdida del injerto con reconstitución autóloga o por recaída. Tanto era así que en 1970, Bortin concluyó que el TPH no era eficaz (ref 35).

Sin embargo, con el mejor conocimiento del HLA, a finales de los años 60, la historia del TPH cambió y de manera progresiva se fueron incorporando conocimientos y experiencia en el manejo de este procedimiento tan complejo. Los primeros trasplantes eran mieloablativos y se instauró como régimen de acondicionamiento altas dosis de ciclofosfamida asociada a la irradiación corporal total o busulfán con ciclofosfamida (ref 36). Posteriormente, y debido a la necesidad de ofrecer un tratamiento curativo a pacientes de edad superior a 50 años, aparecieron los acondicionamientos de intensidad reducida (ref 37). Con esta estrategia se

demonstró que existía un efecto beneficioso del trasplante que no estaba asociada a la quimioterapia y radioterapia, sino a las propias células del donante, que es lo que se conoce como “efecto injerto contra tumor” (ref 38, 39). Hecho que se había observado con las infusiones de linfocitos del donante en las LMC recaídas post-TPH y que los estudios realizados en cerdos (Boston) y perros (Seattle) confirmaron posteriormente (Ref 40, 41).

En los años 70 se descubrió la ciclosporina, y se empezó a utilizar en los TPH en humanos en 1981 (ref 42, 43), para prevenir la EICR y se consolidó como esquema de profilaxis para EICR en combinación con el MTX. En 1989 se realizó el primer TPH de fuentes de progenitores hematopoyéticos diferentes a la médula ósea; de sangre periférica (Kesinger, ref 44) y de cordón umbilical (Gluckman, ref 45).

Con el descubrimiento del sistema HLA (Dausset, ref 46, 47) y la aparición de nuevas fuentes de progenitores hematopoyéticos (médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical) se crean los registros de donantes y los bancos de cordón umbilical a nivel nacional coordinados entre ellos a nivel internacional con el fin de que cuando un paciente sea candidato a un TPH, y no tenga donante familiar aceptable o disponible, se inicie la búsqueda de donante no emparentado a nivel internacional de manera coordinada. Posteriormente se crean organizaciones internacionales y nacionales como el EBMT, CIBMTR, GETH y sus grupos cooperativos de trabajo.

3.2.2 Aspectos generales.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se utiliza como tratamiento curativo de elección en enfermedades hematológicas -malignas, en su mayoría, y benignas- y en enfermedades no hematológicas, tanto genéticas como adquiridas que tienen su origen en algún trastorno del sistema inmune. De modo resumido consiste en substituir los progenitores hematopoyéticos defectuosos por unos progenitores hematopoyéticos sanos procedentes de otra persona.

Gracias a las mejoras tanto en el tratamiento de las hemopatías como en el tratamiento de soporte relacionado con las complicaciones que se derivan de este procedimiento, el número de trasplantes ha ido en aumento en los últimos años.

3.2.3 Modalidades de TPH.

3.2.3.1 Según el tipo de donante el TPH se clasifica en:

* **Emparentado**, donde el donante será un familiar de primer grado HLA idéntico (generalmente un hermano). La probabilidad de que un paciente tenga un donante familiar HLA idéntico es aproximadamente del 25% (dicha probabilidad se calcula aplicando la siguiente fórmula $1-3^n/4^n$, donde n es el número de hermanos, ref 49).

* **No emparentado**, en este caso el donante no tiene ninguna relación genética con el paciente y procede de los registros de donantes internacionales o de los bancos de cordón umbilical.

3.2.3.2 Según la identidad HLA:

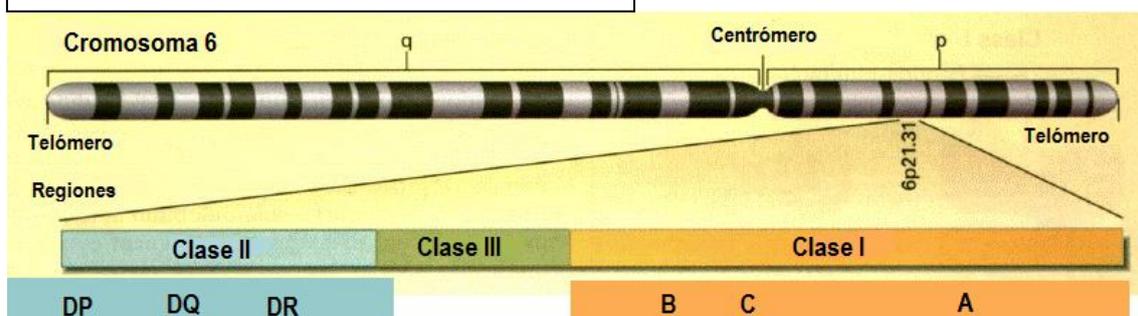
El sistema HLA es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de los humanos y engloba glicoproteínas de membrana y los genes que codifican para ellas. Las moléculas HLA son esenciales para la inmunidad. Sus principales funciones son la presentación de antígenos y provocar respuesta alérgica. Existe una gran diversidad de genes que codifican para proteínas dentro del sistema HLA, lo que hace que también sea diverso, debido a la estructura que presenta. Aunque se ha avanzado mucho en su conocimiento aún no se conoce completamente. Básicamente existen 2 tipos de moléculas HLA (ref 50, 51):

- HLA clase I, que codifican para las moléculas HLA A, B y C. Están presentes en todas las células nucleadas del organismo.
- HLA clase II, que codifican para las moléculas HLA DR, DQ y DP. Están presentes sólo en las células presentadoras de antígenos, fagocitos, algunas células endoteliales y linfocitos B.

La nomenclatura es diferente en función de si es clase I o clase II.

La familia de genes responsable de la codificación de proteínas del Sistema HLA A, B, C y DR (importante en el TPH) se encuentra en una región del cromosoma 6 (6p21.31) y se heredan en bloque, como un haplotipo único (Figura 5). De tal manera que hay 4 combinaciones posibles (2 haplotipos procedentes del padre y 2 haplotipos procedentes de la madre), de aquí se deduce que la probabilidad de tener un hermano HLA idéntico, con el que se comparten 2 haplotipos iguales es, aproximadamente, del 25%.

Figura 5. Estructura del cromosoma 6 (ref 50).



En base a la identidad HLA el TPH puede ser:

- **Trasplante familiar HLA idéntico**, generalmente hermano que comparte los 2 haplotipos con el paciente y por lo tanto, presenta los mismos antígenos de clase I (A, B y C) y de clase II (DR, DQ).
- **Trasplante de donante no emparentado HLA idéntico**, el donante es no emparentado pero comparte los antígenos A, B, C y DR, en este caso, al haber 2 alelos por cada antígeno, la compatibilidad se expresa o denomina como compatibilidad HLA 8 de 8

antígenos (8/8). Si además del A, B, C y DR, también comparte el antígeno DQ, se denomina compatibilidad HLA 10/10; si además comparte el antígeno DP (12/12) (ref 51).

- **Trasplante de donante no emparentado no idéntico**, cuando la identidad es inferior a 8/8 o 10/10. En el caso de que se trate de SCU, cuando la identidad sea inferior a 6/6.
- **Trasplante alternativo familiar no idéntico o haploidéntico**, tan sólo comparten un haplotipo con el paciente (ref 52, 101).

Cuanto mayor sea la identidad HLA entre donante y receptor mejores resultados están descritos con el trasplante. De esta manera, estudios comparativos han demostrado que el TPH de donante no emparentado idéntico (8/8 o 10/10) al igual que el de TPH de hermano HLA idéntico tiene mejor tasa de supervivencia global y mejor tasa de supervivencia libre de enfermedad con menor toxicidad que los TPH de donante no emparentado no idénticos. Cuántas más diferencias haya entre donante y receptor a nivel de compatibilidad HLA, el éxito del TPH se halla más comprometido (ref 53-58).

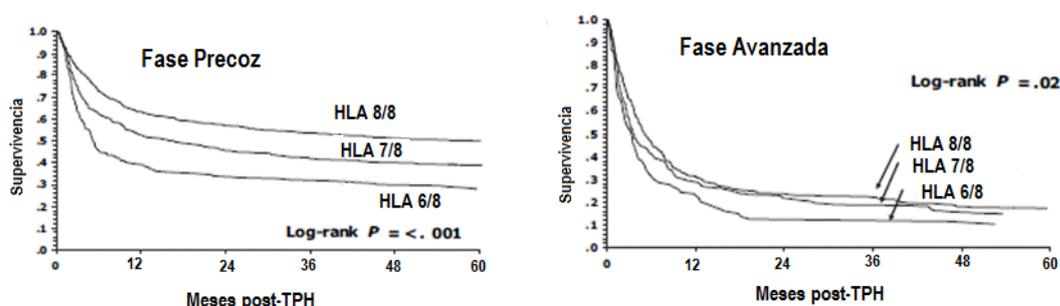


Figura 6. Supervivencia global según compatibilidad HLA. La supervivencia global es superior si la identidad HLA es mayor. Sobre todo, cuando el TPH se realiza en fase precoz de la enfermedad, donde la supervivencia al año del TPH es del 63% (HLA 8/8), 52% (HLA 7/8) y 39% (HLA 6/8) y la supervivencia global a los 5 años es del 50% (HLA 8/8), 39% (HLA 7/8) y 28% (HLA 6/8). Cuando la enfermedad que indica el TPH se encuentra en fase avanzada en el momento del TPH, no hay diferencia en la supervivencia global al año del TPH: 31% (HLA 8/8), 29% (HLA 7/8) y 24% (HLA 6/8) ni tampoco en la supervivencia a los 5 años: 17% (HLA 8/8), 15% (HAL 7/8) y 10% (HLA 6/8). (Lee et al, ref 53).

Recientemente estudios del EBMT han demostrado la eficacia y baja toxicidad de TPH de donante no emparentado con diferencias (7/8), gracias a las mejoras en la profilaxis de la EICR (Ruggeri et al, ref 59).

3.2.3.3 Según la fuente de progenitores hematopoyéticos:

El trasplante puede ser de: médula ósea (MO), sangre periférica (SP) o sangre de cordón umbilical (SCU). Cada fuente de progenitores hematopoyéticos tiene sus ventajas e inconvenientes. La MO era la más frecuentemente utilizada en los inicios del trasplante y el procedimiento debe su nombre a esta modalidad (trasplante de médula ósea). La recuperación hemoperiférica ocurre alrededor de los 21 días desde el trasplante, su bajo contenido en linfocitos T hace que la incidencia de EICR aguda y sobre todo, EICR crónica sea menor. Sin embargo, el inconveniente que presenta es que la celularidad que se obtiene es menor y esto puede comprometer el éxito del trasplante, por el riesgo de fallo de implante primario y por la lenta recuperación hemoperiférica. Así mismo, la dificultad para la obtención de los progenitores hematopoyéticos de MO (se realiza en quirófano con anestesia general para

conseguir la extracción de aproximadamente 1000 ml (15 ml/kg, ajustado al peso del receptor, de sangre medular) ha hecho que la sangre periférica sea la fuente de progenitores hematopoyéticos más utilizada en la actualidad. Para ello, al donante se le administran inyecciones de G-CSF (factor estimulante de colonias) que por un lado, favorece la producción de progenitores hematopoyéticos en la MO y, por otro, facilita que los progenitores anclados en la MO salgan al torrente sanguíneo, de donde se obtienen, a través de un procedimiento de aféresis de los mismos (ref 60-65). La sangre de cordón umbilical se ha utilizado como fuente alternativa cuando no era posible ninguna de las dos anteriores y hoy en día, debido al auge del trasplante haploidéntico familiar, cada vez es menos utilizada (Figura 7, gráficas 1 y 2)(ref 66).

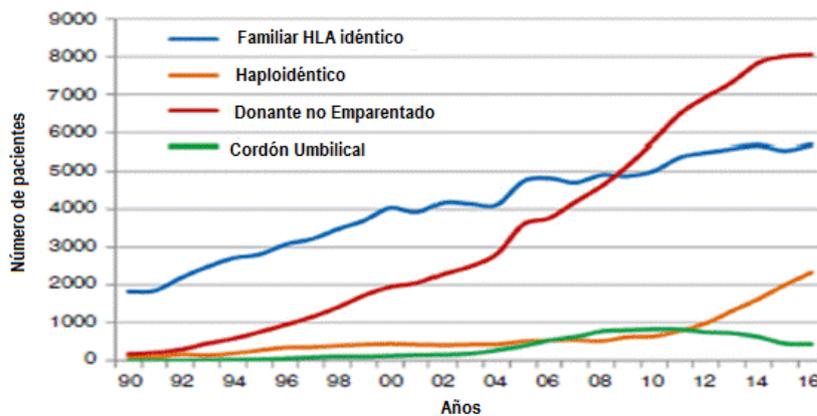
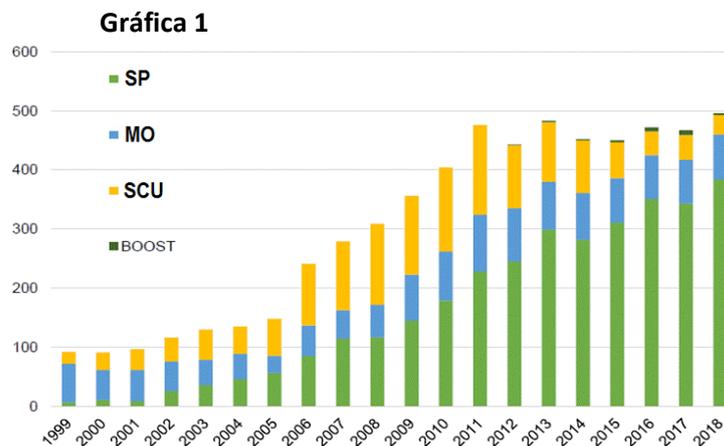


Figura 7. Evolución de los trasplantes por tipo de donante a lo largo de los años. Experiencia reportada por el registro europeo del EBMT (ref 66).



Gráfica 1. Muestra el aumento en el número de TPH y la evolución del tipo de trasplante según la fuente de PH en los últimos años, donde predomina el uso de la sangre periférica (datos obtenidos de la Memoria anual de REDMO 2018) (ref 67).



Gráfica 2. Muestra la evolución de los trasplantes de donante emparentado y el auge del trasplante familiar haploide en la última década (datos obtenidos de la Memoria anual de la ONT 2018) (ref 68).

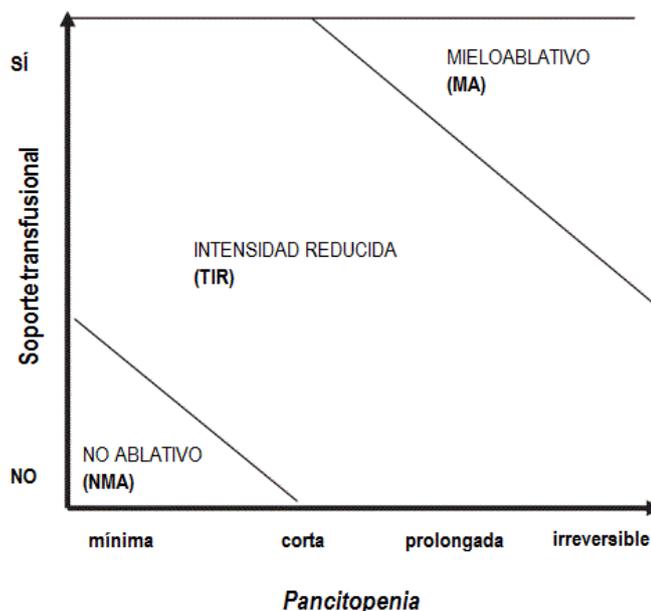
3.2.3.4 Según el acondicionamiento:

Previo a la infusión de los PH el paciente realiza un tratamiento de preparación, que se denomina “acondicionamiento”, para lo que se utiliza quimioterapia que puede combinarse con radioterapia dependiendo de la enfermedad hematológica por la que se realiza el trasplante. Según el tipo de acondicionamiento, el trasplante se clasifica en 3 tipos fundamentales (Figura 8):

- **Mieloablatoivo**, aquellos que no permiten la recuperación hematológica autóloga tras 4 semanas después de haber recibido el acondicionamiento.
- **Intensidad reducida**, la aplasia medular no es tan profunda ni duradera y la toxicidad asociada a la misma es menor.
- **No mieloablatoivo**, prácticamente no hay un efecto sobre la hemoperiferia del paciente y el éxito del trasplante depende de manera casi exclusiva del efecto de los linfocitos T del donante sobre la enfermedad hematológica (inmunoterapia).

Los acondicionamientos de intensidad reducida y no mieloablatoivo están diseñados para pacientes mayores de 55 años, que presentan co-morbilidad importante o que hayan recibido un trasplante previamente (ref 69-73).

En los últimos años han aparecido regímenes de acondicionamiento de toxicidad intermedia o intensidad reducida intensificada que han permitido ajustar aún más la eficacia mieloablatoiva con menor toxicidad, sin comprometer el éxito del TPH, es el caso de la administración de fludarabina en combinación con busulfán a dosis mieloablatoivas (4 dosis de busulfán de 3,2 mg/kg/día (ref 74-76, 78, 79).

**Figura 8.**

Efecto que produce el tipo de acondicionamiento sobre la recuperación hemoperiférica (mielotoxicidad), así como sobre el requerimiento transfusional. Adaptado de Bacigalupo et al (ref 77).

3.2.4 Profilaxis de Enfermedad Injerto contra Receptor.

La elección del donante se basa en la compatibilidad del Sistema HLA entre donante y receptor, escogiendo aquel donante que comparta la mayor parte de alelos del sistema HLA implicados en la respuesta inmune mayor (HLA A, B, C, DR y DQ). Dado que el sistema inmunitario que prevalecerá tras el TPH será el del donante, existe el riesgo de que este sistema inmune reconozca células del receptor, diferentes a las hemopoyéticas, como “patógenos” y que se desencadene una respuesta inmune contra ellas, es lo que se conoce como Enfermedad de Injerto contra Receptor (EICR), incluso en los parejas donante-receptor HLA idénticos, debido a los antígenos menores de histocompatibilidad. Se detalla a continuación las diferentes estrategias que se utilizan para la profilaxis de la EICR.

No farmacológicas:

Depleción linfoide T ex vivo: Para ello se realiza manipulación del injerto (progenitores hematopoyéticos) previo a su infusión. La técnica más estandarizada es la selección positiva de población CD34+, que es la que se infunde. De esta manera, no se infunde la población linfoide, y con ello se consigue disminuir de manera importante la incidencia de EICR. En los últimos años se han desarrollado técnicas de depleción linfoide T *ex vivo* más selectivas, sobre todo en el contexto del trasplante haploidéntico y también en población pediátrica. En estos casos la manipulación del injerto pre-infusión consiste en realizar una selección negativa de una población concreta como por ejemplo, selección de linfocitos T $\alpha\beta$ o selección de la población CD3+/CD19+, que se elimina del injerto antes de infundir al paciente (ref 80-84).

Farmacológicas:

Inhibidores de calcineurina: Ciclosporina y tacrólimus: ejercen inmunosupresión por diferentes vías, siendo la predominante la inhibición de la calcineurina. La calcineurina se estimula durante la activación de los linfocitos T por una serie de eventos en los que están involucrados el calcio y la calmodulina. Esto provoca la activación de la vía del Factor Nuclear de las células T Activadas (NFAT) que a su vez se asocia a otros factores de transcripción implicados en la producción de citocinas como la IL-2 predominantemente, IL-4, IL-10, e IL-17.

Por tanto, la inhibición de la calcineurina afecta la transcripción de citoquinas importantes en la respuesta inmune. La IL-2 en particular desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria, incluyendo el mantenimiento de las células T reguladoras y la diferenciación y supervivencia de las células T CD4+ y CD8+. Además actúa sobre la vía del NF- κ B que también está implicado en la producción de la IL-2, el factor de necrosis tumoral- β e interferón- γ . También se ha descrito que puede afectar a la funcionalidad de las células NK. El mecanismo predominante afecta a la funcionalidad de los linfocitos T (ref 84-87).

Micofenolato (MMF): es un pro-fármaco del ácido micofenólico (MPA), un inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). Esta es la enzima que limita la velocidad en la síntesis *de novo* de los nucleótidos de guanosina. Los linfocitos T y B son más dependientes de esta vía que otros tipos de células. Tiene un efecto citostático más potente sobre los linfocitos que sobre otros tipos de células. Este es el principal mecanismo por el cual ejerce su efecto inmunosupresor. Hay otros tres mecanismos implicados que pueden inducir la apoptosis de linfocitos T activados, lo que puede eliminar los clones de células que responden a la estimulación antigénica. Es capaz de suprimir la expresión de algunas moléculas de adhesión, disminuyendo así el reclutamiento de linfocitos y monocitos en los sitios de inflamación. Suprime las respuestas linfocíticas T a las células alogénicas y otros antígenos. El medicamento también suprime las respuestas primarias, pero no las secundarias, de los anticuerpos (ref 88).

Metotrexato (MTX): es un antimetabolito que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa e impide la conversión de ácido fólico en tetrahidrofolato. Inhibe la síntesis de DNA en la fase S del ciclo celular. También presenta otros efectos como la inhibición de la activación T, reduce la expresión de moléculas de adhesión y de diversas enzimas involucradas en la respuesta inmune, a través de la inhibición de la actividad metiltransferasa. Se utiliza como fármaco inmunosupresor en diferentes enfermedades autoinmunes y en el tratamiento de enfermedades hemato-oncológicas. En el contexto del TPH se utiliza en combinación con otros inmunosupresores (ref 89).

Rapamicina: también denominada sirólimus, es un potente inhibidor de la proliferación de células T, células B y producción de anticuerpos inducida por antígenos. El interés en el sirólimus como terapia inmunosupresora se deriva de su mecanismo de acción único, su perfil de efectos secundarios y su capacidad de sinergia con otros agentes inmunosupresores. El sirólimus bloquea la activación de la quinasa específica del ciclo celular, mTOR, lo que provocan el bloqueo de la progresión del ciclo celular (ref 90, 91).

La combinación Inhibidor de Calcineurina (ICN) y MTX ó MMF es la más frecuentemente empleada para la profilaxis de enfermedad injerto contra receptor.

Globulina Antitimocítica (ATG): es una estrategia de depleción linfocítica T *in vivo*. La eficacia del ATG depende de su capacidad para debilitar los linfocitos T. Su actividad inmunomoduladora se refleja en diversos efectos sobre el sistema inmunológico: elimina los linfocitos T (activación del complemento) o interfiere con su capacidad de activarse o de migrar a los tejidos; altera la funcionalidad de las células dendríticas; modula citoquinas y moléculas de adhesión y de superficie celular en órganos linfoides secundarios; provoca la apoptosis de linfocitos B y la inducción de linfocitos T reguladores y de células NK (ref 92, 93).

Alentuzumab (Campath): estrategia de depleción linfoide T *in vivo*, Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el antígeno CD52. El CD52 se expresa en la superficie de los linfocitos B, linfocitos T, células NK, monocitos, macrófagos y algunas células dendríticas. Además el CD52 es una molécula co-estimuladora en la activación de los linfocitos T CD4+ reguladores. La unión del anticuerpo con su antígeno provoca la destrucción de la célula que expresa el CD52 (en su mayoría linfocitos). Cuando se administra en el post-TPH, provoca un retraso en la reconstitución inmune, dado que el fármaco puede permanecer en la sangre a nivel linfocítico hasta 2 meses después del trasplante (ref 94, 95, 96).

Ciclofosfamida post-TPH: esta nueva estrategia de depleción linfoide T *in vivo* consiste en administrar altas dosis de ciclofosfamida en 1-2 días después de la administración de los PH (días +3 y +4 ó +5). La ciclofosfamida post-TPH (CyPT) destruye selectivamente los linfocitos T alo-reactivos y preserva los linfocitos no alo-reactivos (incluidos los linfocitos T reguladores), que son las responsables de la reconstitución inmune post-TPH así como el control de las infecciones (ref 97, 101, 142) (Figura 9). Esta estrategia se comenzó a utilizar en el contexto del trasplante haploidéntico con muy buenos resultados en términos de menor incidencia de EICR aguda y crónica y buena tolerancia. Por lo que en los últimos años se ha extendido esta modalidad de profilaxis de EICR a otros tipo de TPH, como los alogénicos de donante no emparentado tanto los no idénticos (7/8) como los idénticos (10/10) (Ref 59, 81, 84, 98-100, 102).

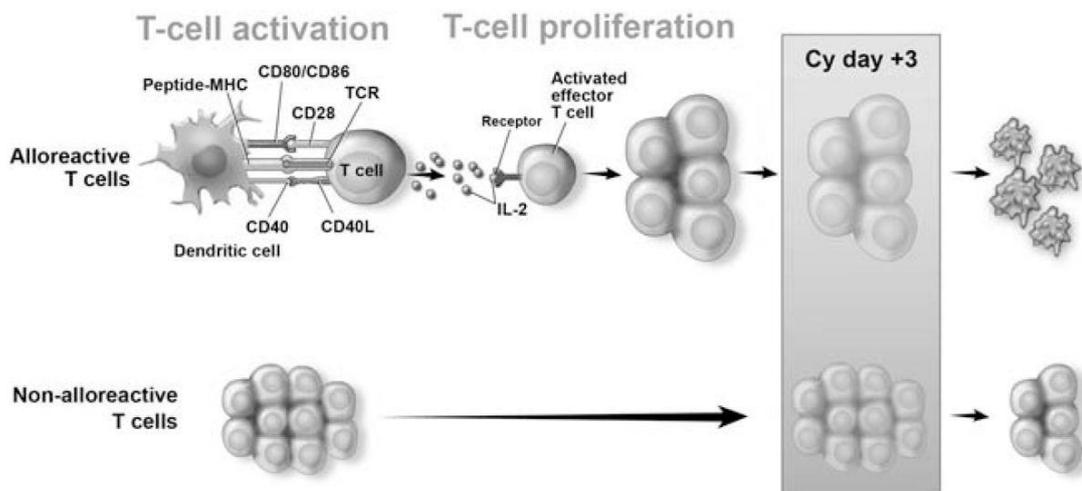


Figura 9. Mecanismo de acción de la Ciclofosfamida post-TPH. Cortesía de Luznik et al (ref 97).

El mecanismo de acción de la ciclofosfamida post-trasplante, se explica en 3 pasos:

1. De forma precoz post-trasplante, la ciclofosfamida **induce apoptosis de los linfocitos T aloreactivos**, rápidamente proliferativos, eliminando la alo-reactividad inicial. Aunque la ciclofosfamida, como agente alquilante actúa en todas las fases del ciclo celular, lo hace de forma más intensa en las fases G1 y S, por lo que su acción es mucho más intensa en los linfocitos en proliferación (aloreactivos). El efecto de la ciclofosfamida en los progenitores hematopoyéticos es mucho menos intenso, debido al alto contenido en la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), que convierte la mostaza fosforamida (metabolito activo de la ciclofosfamida) en un metabolito inactivo (la carboxiciclofosfosfamida) y por lo tanto su uso en

el post-trasplante es seguro en cuanto que no daña el injerto hematopoyético. De forma similar, los linfocitos T memoria también tienen una elevada concentración de ALDH por tanto les ofrece cierta resistencia a la ciclofosfamida.

2. Se produce una **expansión de linfocitos T reguladores** que controlan los linfocitos T aloreactivos residuales.

3. El tercer mecanismo para evitar la EICR es la producción de una **depleción clonal intratímica** de T de linfocitos que reconocen antígenos del receptor y que aseguran la tolerancia a largo plazo.

3.2.5 Sistema inmune y reconstitución inmune post-TPH.

De todo lo descrito anteriormente se deduce que el TPH es un procedimiento de elevada complejidad que somete al receptor del mismo a un estado de inmunosupresión severa y prolongada. Cuando se realiza un TPH, lo que imprime complejidad al procedimiento, es que en definitiva se realiza un cambio de sistema inmune. Es por ello que el estado de inmunosupresión en el que se encuentra el paciente tras el procedimiento es el más severo conocido y además, éste se prolonga hasta que el sistema inmune comienza de nuevo a funcionar.

3.2.5.1 Sistema inmune.

El sistema inmune es una compleja red de células y tejidos que trabajan de manera coordinada para proteger al organismo de diferentes patógenos (infecciosos o no). Está formado por la sangre, la médula ósea, el sistema linfático, el timo, el bazo, la piel y las mucosas. La respuesta inmune que genera está mediada tanto por células como por proteínas solubles. De modo general, las células implicadas en la respuesta inmune reconocen los patógenos o una parte de ellos (antígenos o proteínas) a través de receptores que se encuentran en la superficie celular. Dependiendo del tipo de respuesta que se genera, la respuesta inmune puede estar mediada por moléculas solubles y/o células que son las que provocan la eliminación del patógeno.

Las células del sistema inmune se originan en la médula ósea, donde muchas de ellas maduran (sistema innato). Los linfocitos T se originan en la médula ósea, maduran en el timo y de ahí migran a los tejidos, a través de la sangre y del sistema linfático. Durante esta circulación reciben diferentes señales, a través de sus receptores, que contribuyen a su supervivencia. Los órganos linfoides secundarios están formados por el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides de las mucosas (sistema adaptativo) (Figura 10) (ref 102-105).

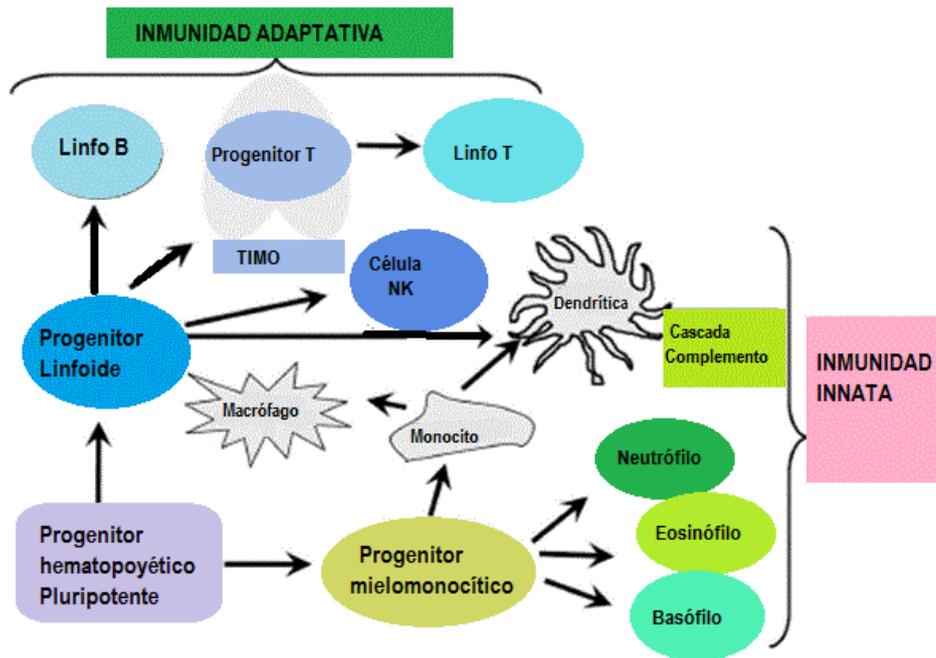


Figura 10. Componentes del Sistema Inmune (ref 136).

La respuesta inmune se divide en 2 tipos:

- **Respuesta innata (natural):** es inespecífica, se inicia durante las primeras horas en las que el antígeno aparece. Incluye barreras físicas (piel) y fisiológicas (pH), moléculas solubles y células inmunes. No generan memoria. Se activa a través de moléculas presentes en muchos antígenos. Para que se produzca el reconocimiento del patógeno, las células expresan unos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que identifican patrones moleculares asociados al patógeno o al daño tisular/celular que expresan los gérmenes (lipopolisacáridos) o que se liberan durante el daño o estrés celular. Las células inmunes que forman parte de la Inmunidad innata son: las células NK y el sistema fagocitario formado por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Estas últimas tienen, además, capacidad para poner en marcha la respuesta adaptativa, una vez fagocitado el patógeno, migran al órgano linfóide más cercano y realizan la presentación del antígeno.

Las moléculas solubles implicadas en la respuesta innata son las citocinas producidas por los macrófagos y células NK activadas. Tienen diferentes funciones: antiviral (IFN, IL-15 e IL-12), pro-inflamatoria (TNF, IL-1) y función reguladora (IL-10, TGF) (ref 102, 107).

- **Respuesta adaptativa (adquirida):** es una respuesta inmune antígeno-específica. Para que se produzca, primero el antígeno debe ser procesado y reconocido. El sistema inmune adaptativo genera células específicamente diseñadas para atacar ese antígeno. Esta respuesta mejora con la exposición repetida frente al antígeno y proporciona memoria específica frente al mismo, lo que hace que la respuesta futura frente a ese antígeno sea más eficiente. También se conoce como respuesta celular.

Las células implicadas en la respuesta adaptativa son los linfocitos T y B. Las citocinas implicadas en este tipo de respuesta son aquellas producidas por los linfocitos T (IL-2, IL-4, IFN, IL-5).

Los **linfocitos T** se generan en la médula ósea a partir de un progenitor linfoide común, y se diferencian en el timo. A través del torrente sanguíneo van a parar a los tejidos/órganos linfoides secundarios donde adquieren la diferenciación (antígeno-dependiente) para pasar de linfocitos T “naïve” a células efectoras y células memoria (último paso en su maduración).

Los linfocitos T reconocen secuencias cortas de aminoácidos derivados de los agentes patógenos cuando son presentados por las moléculas HLA en la superficie de la célula presentadora de antígeno (CPA). El receptor específico de célula T se llama TCR (receptor de antígeno de linfocito T). Cada célula T expresa un único TCR que está compuesto por 2 cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro. En la mayoría de los linfocitos T, el TCR está formado por una cadena α y una cadena β (TCR α/β). Y una pequeña parte está formado por una cadena γ y una cadena δ (TCR γ/δ). Este receptor tiene una región variable (V), que determina la especificidad frente al antígeno, y una región constante, proximal a la membrana de la célula T. A partir de un único progenitor linfoide se generan muchos linfocitos, cada uno con una especificidad diferente pero con un único receptor. El reconocimiento del antígeno, presentado por la molécula HLA, activa la señalización del TCR y es lo que confiere la especificidad frente al antígeno por parte del linfocito T.

La unión del receptor co-estimulador CD28 con su ligando B7 en la superficie de la CPA es necesaria para la activación del linfocito T. Se conocen multitud de moléculas que actúan de co-activadoras y co-inhibidoras que contribuyen de manera diferente en la activación del linfocito T pero, si no existe la estimulación mediada por el CD28, no se produce la activación de la célula T (ref 107). Los linfocitos T activados proliferan y excretan IL-2. Esta expansión clonal de los linfocitos T portadores del mismo TCR asegura la generación de un gran número de linfocitos T específicos frente al mismo antígeno (“naïve”), que tras varias divisiones se diferencian en **linfocitos T efectoras** (citotóxicos) y **linfocitos T memoria** (ref 109-114).

Los linfocitos T efectoras tienen una vida corta (días a semanas) y realizan funciones especializadas:

- **Linfocitos T CD8 citotóxicos**, inducen la apoptosis de las células infectadas por el virus tras el reconocimiento de péptidos de proteínas virales sintetizadas que se encuentran en el citosol de la célula y que son presentados por moléculas HLA clase I (ref 115, 116).
- **Linfocitos T CD4 “helper”**, se llaman así porque regulan la activación de los macrófagos, de los linfocitos T citotóxicos y de los linfocitos B, a través de la producción de diferentes citocinas, según el estímulo que las active. Reconocen péptidos de proteínas intracelulares (internalizadas por fagocitos) que son portadas por moléculas HLA clase II (ref 115, 116).

En el primer encuentro con el antígeno los linfocitos T CD8 “naïve” necesitan de la cooperación de los linfocitos T CD4 para desarrollar su potencial citotóxico. En un segundo encuentro, como ya se han diferenciado a célula T efectora, estos linfocitos T CD8 citotóxicos tienen un umbral de activación mucho más bajo (comparado con los “naïve”) y pueden cumplir con sus

funciones citotóxicas tras reconocer al antígeno, sin la necesidad de los linfocitos T CD4 "helper".

Según las citocinas presentes en el ambiente, los linfocitos T CD4 "naïve" se pueden diferenciar en diferentes subtipos de acuerdo a su funcionalidad. Los principales subtipos son los linfocitos T "helper" tipo 1 (**Th1**) y los T "helper" tipo 2 (**Th2**) que se caracterizan por la producción de IFN- α (Th1) e IL-4 (Th-2), respectivamente. Los linfocitos B "helper", también conocidos como linfocitos foliculares T "helper" (**TFH**) y el subtipo celular pro-inflamatorio (**Th17**) también tienen un papel en la respuesta inmune. Por último, los linfocitos T reguladores (**Treg**), como su nombre indica, son esenciales para regular la respuesta inmune y que ésta no sea exagerada así como para el desarrollo de la inmunotolerancia. Los **linfocitos CD4 Th1**, dirigidos/estimulados por citocinas proinflamatorias derivadas de las CPA (IL-12), liberan otras citocinas, como IFN- γ , dando lugar a la activación de macrófagos y linfocitos T CD8 citotóxicos. Mientras que los **linfocitos T CD4 Th2**, dirigidos/estimulados por la IL-4, producen citocinas implicadas en la activación de linfocitos B, regulando la inmunidad humoral (IL-4, IL-5 e IL-13) (Figura 11) (ref 117-119).

Una vez que el antígeno que ha provocado la activación de la respuesta inmune es eliminado, la mayoría de los linfocitos T efectores mueren por apoptosis. En ausencia del estímulo que les obliga a proliferar y que, por tanto, los mantiene con vida, desaparecen (ref 120). Los linfocitos T memoria tienen una vida larga y proporcionan una inmunidad más rápida y mejorada ante la re-exposición del antígeno (responden más rápido, ante una carga antigénica más baja, necesitan menos coestimulación y proliferan de una manera más vigorosa tras la exposición al patógeno, comparado con los linfocitos T CD4 "naïve").

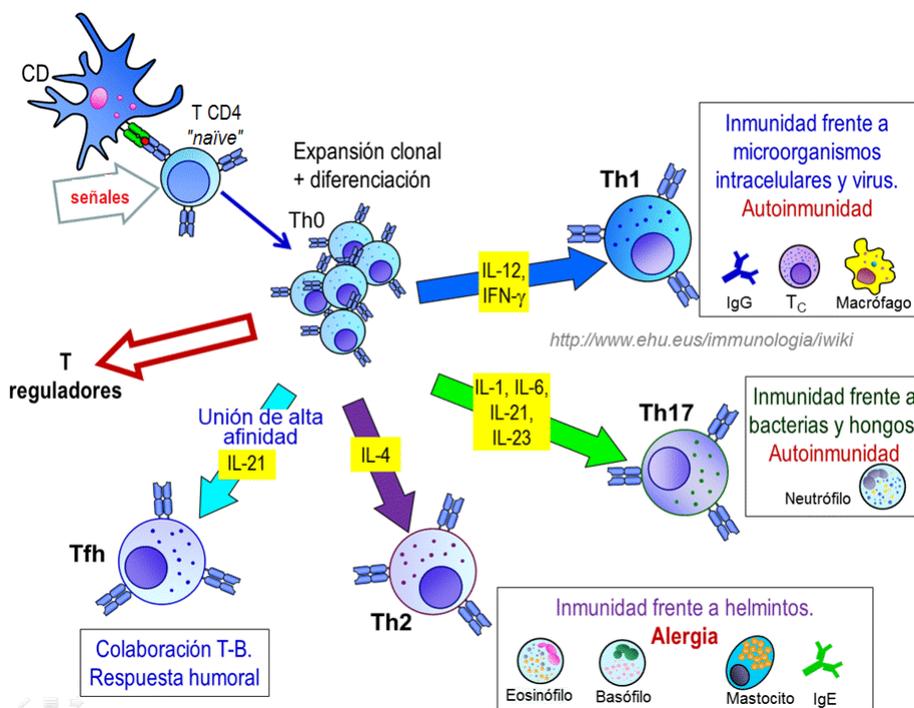


Figura 11. Esquema de la respuesta inmune (innata y adaptativa) generada frente a los diferentes estímulos (virus, bacterias, hongos, parásitos y antígenos propios) (ref 121).

Los linfocitos B se originan y se diferencian en la médula ósea a partir de un precursor de línea linfoide común. Se encuentran habitualmente en la sangre periférica (supone el 10% de los linfocitos circulantes en sangre periférica) y en los órganos linfoides secundarios, particularmente en el bazo. La activación de los linfocitos B promueve su diferenciación a células plasmáticas que son las que producen los anticuerpos aportando al sistema inmune la inmunidad humoral (ref 105, 125). Los anticuerpos son el producto que se secreta a partir del receptor de células B (BCR). Están formados por 4 cadenas de proteínas: 2 cadenas pesadas idénticas y 2 cadenas ligeras idénticas. Cada cadena tiene una región variable y una región constante. Los anticuerpos presentan una gran variabilidad de una molécula a otra, proporcionando la diversidad necesaria para el reconocimiento específico frente a los diferentes patógenos. Según el tipo de cadena existen 5 tipos de Inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgE, IgM e IgD. Los anticuerpos protegen de los patógenos provocando diferentes reacciones (Figura 12):

- Neutralización, se unen a ellos y bloquean su acceso a las células.
- Oponización, el anticuerpo se une al antígeno del patógeno (virus, bacteria) y favorece la fagocitosis por parte de su célula fagocitaria, que reconoce el anticuerpo, y con este reconocimiento ingiere y destruye el patógeno.
- Activación de la vía del complemento. El reconocimiento del antígeno extraño activa la cascada inflamatoria que termina en la apoptosis celular, a través de la creación de poros en la membrana celular. Existen 3 vías de activación: la vía clásica (se activa por complejos antígeno-anticuerpo), la vía de las lectinas (se activa por la presencia de ciertos azúcares presentes en la superficie de las bacterias) y la vía alternativa (no necesita anticuerpos para activarse) (ref 122-124).

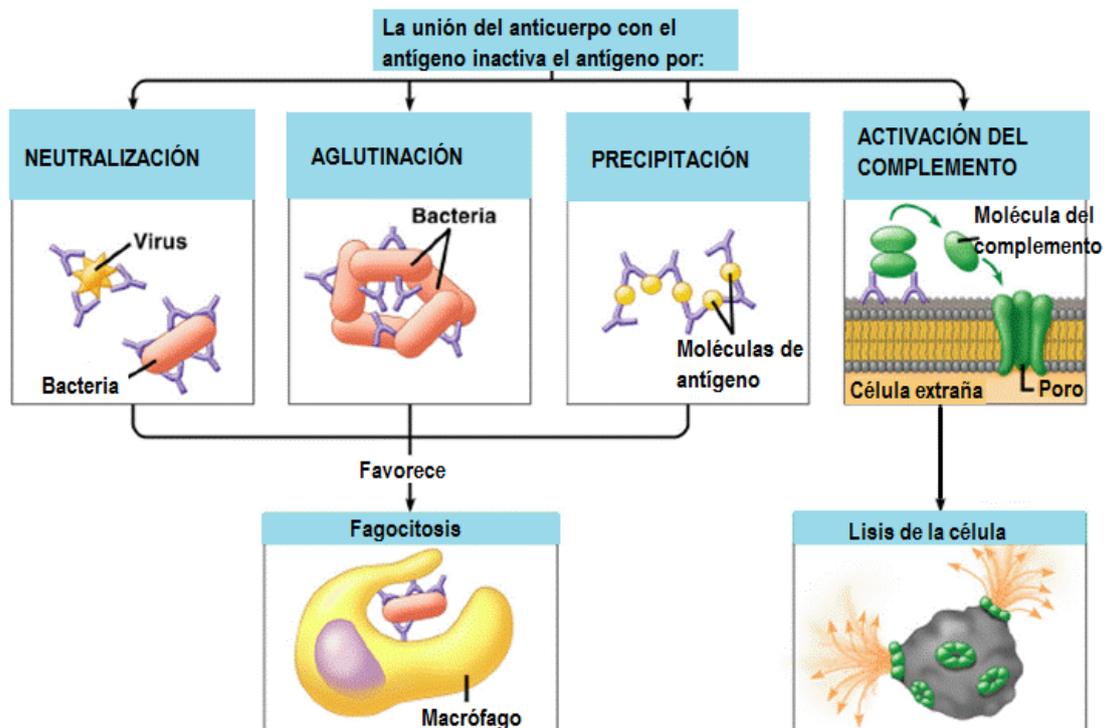


Figura 12. Respuesta humoral.

El tipo de respuesta inmune que se genera frente a proteínas virales es la respuesta celular mediada fundamentalmente por los linfocitos T CD8 citotóxicos. Sin embargo, tal y como se ha expuesto, la respuesta inmune es coordinada y están implicadas todas las células del sistema inmune en mayor o menor medida, lo que hace que un solo tipo celular sea insuficiente para una respuesta completa. O dicho, de otra manera, si las moléculas co-estimuladoras y las células colaboradoras (Linfocitos T CD4 “*helper*”) no están presentes o están presentes de manera insuficiente, la respuesta inmune frente al virus perderá calidad y eficacia. Igualmente, sin los linfocitos B la capacidad de crear memoria inmunológica se ve afectada.

3.2.5.2 Reconstitución Inmune post-TPH.

En el día 0 de TPH, tras la infusión de los progenitores hematopoyéticos por vía endovenosa, pasan al torrente sanguíneo y, a través de complejas vías de señalización, van a parar a la médula ósea, donde tiene lugar el injerto o implante, proceso que dura entre 14 y 21 días. Con el implante de los progenitores hematopoyéticos del donante se inicia el “renacer” del sistema inmune que ocurre de manera escalonada y progresiva, respetando las diferentes fases celulares y sus vías de interacción. De esta manera se favorece la maduración del sistema inmune de manera natural pero modulada y controlada por agentes externos, como el tratamiento inmunosupresor sistémico, que sin duda tiene un efecto directo “buscado y deseado” sobre el nuevo sistema inmune. Existe multitud de estudios que describen de manera detallada cómo y cuándo se produce esta reconstitución inmune post-TPH. Está descrito que las primeras células que aparecen son las de la inmunidad innata (neutrófilos, monocitos, NK) y esto tiene lugar en el primer mes post-TPH. Posteriormente y de una manera progresiva, se inicia la recuperación de los linfocitos T y B, que se inicia a partir del segundo y tercer mes post-TPH y se prolonga hasta los seis, e incluso 12 meses post-TPH (Figura 13).

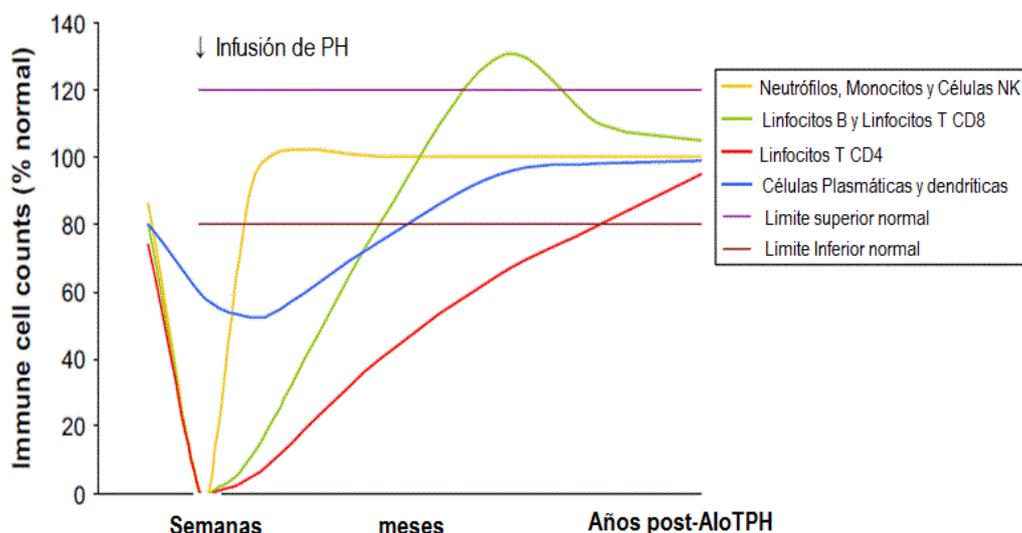


Figura 13. Etapas de la reconstitución inmune post-TPH (adaptado de Tomblin et 2009, ref 126)

Es por ello que las complicaciones infecciosas son frecuentes durante este periodo de reconstitución del sistema inmune y además los gérmenes causantes de las mismas “se aprovechan y respetan” estos tiempos de recuperación marcados por el sistema inmune. De esta manera se puede elaborar una cronología de acuerdo a los diferentes gérmenes causantes de la infección según el período post-TPH en el que se encuentre el paciente y teniendo en cuenta las complicaciones no infecciosas correspondientes a cada periodo del trasplante (precoz, intermedio y tardío) que influyen y condicionan un factor de riesgo determinante para las complicaciones infecciosas (Figura 14, ref 135).

De esta manera podemos dividir el post-trasplante (a partir del día de la infusión de progenitores hematopoyéticos) en 3 períodos (ref 126-136):

Post-trasplante precoz, el período correspondiente al primer mes, desde el día 0 hasta el día 30 post-TPH. Es el periodo de aplasia secundaria a la quimioterapia +/- radioterapia recibida en el acondicionamiento. Es el periodo de mayor inmunosupresión, cuando se inicia la recuperación hemoperiférica y, con ella, la reconstitución de la inmunidad innata. Las complicaciones infecciosas son fundamentalmente debidas a la neutropenia severa y los factores de riesgo asociados son los derivados del daño tisular secundario a fármacos (mucositis, colitis, síndrome de obstrucción sinusoidal, disfunción endotelial, EICR aguda) y asociadas al catéter venoso central. Los gérmenes más frecuentes son las bacterias (gram positivas y gram negativas), hongos (*Cándida sp* y *Aspergillus sp*) y virales (sobre todo virus herpes simple-VHS-). Es por ello que, durante este periodo se realiza profilaxis específica dirigida a prevenir las infecciones más prevalentes en este periodo, en especial, bacterias, hongos y VHS.

Post-trasplante intermedio, este período sucede desde el primer mes post-TPH hasta el tercer mes (día +100), aproximadamente. La recuperación hemoperiférica ya ha tenido lugar pero es el momento en el que se inicia (pero no se completa) la reconstitución de los linfocitos T y B. Se caracteriza por la presencia de linfopenia severa (linfocitos < 500 /mm³) y la complicación no infecciosa que se produce es fundamentalmente la enfermedad injerto contra receptor (EICR). Ambos aspectos (linfopenia y EICR, así como el tratamiento que se deriva de la EICR) predisponen a que las complicaciones infecciosas sean fundamentalmente virales, dada la deficiencia o ausencia de las células que reconocen y eliminan los antígenos virales. Otros patógenos implicados en las infecciones de este período son el *Pneumocystis Jirovecii*, *Aspergillus spp* (sobre todo los pacientes que presentan EICR y que realizan tratamiento con corticoides a altas dosis durante un periodo superior a 2 semanas) y al final del periodo los gérmenes encapsulados. Durante este periodo se mantiene la profilaxis antiinfecciosa dirigida a los patógenos más prevalentes en este periodo, con cotrimoxazol o Pentamidina Inhalada. En caso de corticoterapia por EICR está indicada realizar además profilaxis para prevenir *Aspergillus* con un triazol, como por ejemplo, posaconazol o voriconazol. Así mismo, está indicado realizar profilaxis antiviral para el virus varicela zoster (VVZ) en aquellos pacientes con serología positiva para el VVZ. Los Linfocitos T CD4 se reconstituyen más tarde que los linfocitos T CD8 (Ogonek et al, ref 136) pero estos últimos necesitan de la presencia de linfocitos T CD4+ “naïve” y del receptor de célula T para el reordenamiento del DNA (TREC), los cuales se encuentran disminuidos entre los 3-6 meses post-TPH.

Post-trasplante tardío, este período comprende desde los 3 meses hasta prácticamente 1 año post-TPH (o hasta retirada de la inmunosupresión sistémica). A su vez se puede dividir en 2 subperiodos: desde los *3-6 meses post-TPH* cuando tiene lugar la reconstitución de los linfocitos T de una manera más completa y funcional, dado que se completa la formación de TREGs y Tregs implicados en la respuesta inmune. Desde los *6 meses en adelante*, en la que se inicia la reconstitución de los linfocitos B. Este periodo se caracteriza por la hipogammaglobulinemia y el déficit de la inmunidad humoral. Durante este período los pacientes están a riesgo de presentar infecciones oportunistas por gérmenes encapsulados, en especial *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. La reconstitución de los linfocitos B pasa por la generación de linfocitos B “naïve” que a su vez son capaces de ir diferenciándose a linfocitos B, tras diferentes estímulos antigénicos a través de su receptor (BCR). Para finalizar, los linfocitos B memoria maduran a células plasmáticas capaces de producir anticuerpos. Este proceso de generación y maduración de linfocitos B es lento y puede prolongarse desde los 2 hasta los 5 años post-TPH.

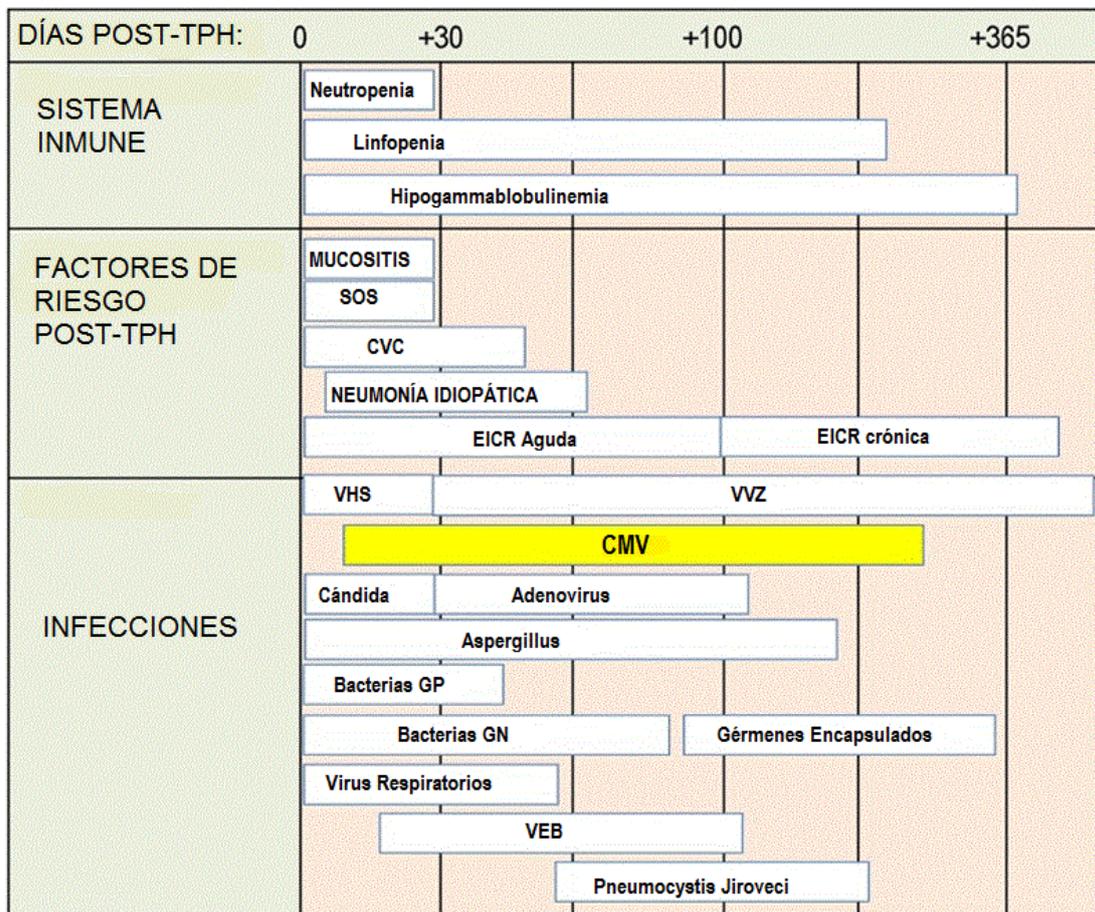


Figura 14. Cronología de las complicaciones infecciosas causadas por los diferentes gérmenes según el período post-TPH correspondiente al estado de reconstitución inmune (ref 135).

Sin embargo, aunque haya una reconstitución cuantitativa de estas células, la funcionalidad de las mismas así como la capacidad de realizar una respuesta inmune coordinada y eficaz, no ocurre necesariamente en el mismo momento. Como se ha explicado anteriormente, la respuesta inmune ocurre de una manera escalonada y en diferentes pasos. Las células del

sistema inmune requieren de un estímulo suficiente (antígeno), que en el microambiente se encuentren las citocinas capaces de iniciar la respuesta inmune celular, que estas células se activen y se diferencien en células efectoras. Es decir, existen multitud de pasos intermedios que se han de producir de manera correcta para que las células implicadas maduren y sean capaces de generar una respuesta inmune eficaz. Ésto explicaría que los pacientes presenten complicaciones infecciosas, a pesar de presentar una reconstitución inmune “numéricamente” o cuantitativamente correcta. Además, la EICR influye en la funcionalidad del sistema inmune inhibiendo las funciones de los linfocitos T, limita la diversidad del TCR, influye en el desarrollo de los linfocitos T (a través de los Tregs) y crea una disfunción en la producción de citocinas. Esta reconstitución funcional del sistema inmune es difícil de evaluar de manera objetiva con técnicas de laboratorio pero la deficiencia del mismo se pone de manifiesto en las complicaciones infecciosas que presentan los pacientes más allá del primer año post-TPH.

3.2.5.3 Respuesta Inmune frente a CMV.

Los linfocitos T CD8 citotóxicos son los encargados de controlar la replicación del CMV y eliminarlo del organismo, liberando IFN γ cuando entra en contacto con la célula infectada y la destruye. El reconocimiento de los antígenos virales (siendo los inmunodominantes el pp65, IE-1 e IE-2) por parte del sistema inmunológico induce una serie de cambios coordinados en los parámetros de los linfocitos incluyendo: cambios en las moléculas de la superficie celular, en las propiedades migratorias de los linfocitos, en la capacidad de proliferación y la citotoxicidad mediada por linfocitos T (ref 20, 26, 137). La persistencia del virus provoca respuestas funcionales muy diversas. Se ha demostrado que existe una evolución secuencial de los linfocitos T CD8+ CMV específicos durante la respuesta inmune frente al virus. Es decir, que los linfocitos T CD8+ pasan por diferentes fases evolutivas durante la infección, y estas fases se pueden identificar gracias a las moléculas de superficie que expresan en cada fase evolutiva de la respuesta inmune frente a la infección (Figura 15). Así los marcadores expresados en superficie por los linfocitos pasan de ser CD27+CD28+ en estadios tempranos, a ser CD27+CD28- en estadios intermedios y en etapas tardías son CD27-CD28-, debido a su alto contenido en perforinas y su citotoxicidad *ex vivo* directa. La expresión del receptor de señalización del ganglio linfático, CCR7, identifica los linfocitos T memoria central y los linfocitos T memoria efectoras. De esta manera, cuando se produce la estimulación de los linfocitos T al reconocer el antígeno del CMV, los linfocitos T “naive” (CD3+CD8+CCR7+CD45RA+) dan lugar a distintas poblaciones de linfocitos T memoria “central” (CCR7+CD45RO+), linfocitos T efectoras (CCR7-CD45RO+) y linfocitos T memoria diferenciados (CCR7-CD45RA+) con diferentes funciones efectoras (Moins- Teisserenc 2008, ref 138).

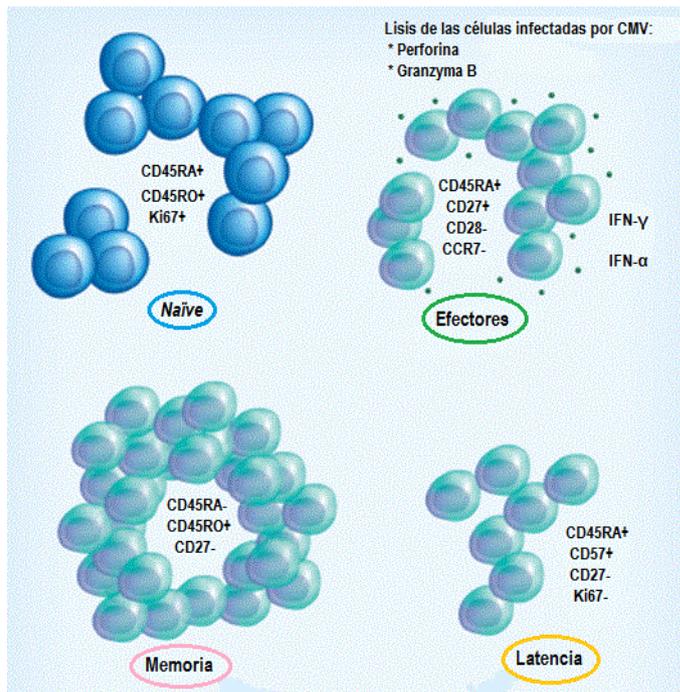


Figura 15. Estadios evolutivos de los linfocitos T CD8 citotóxicos de acuerdo a la fase evolutiva de la infección por CMV. Es posible identificar los diferentes subtipos de linfocitos en base a los marcadores de superficie que expresan (naïve, efectores, memoria y latencia). *Ref 20*

3.2.5.4 Reconstitución Inmune CMV-específica post-TPH.

A partir del 2º-3º mes post-TPH (60-90 días) se inicia la reconstitución de los linfocitos T, primero aparecen los linfocitos T CD8, posteriormente los linfocitos T CD4 (entre el 3º-6º mes post-TPH) y por último, los linfocitos B (a partir del 6º mes y hasta 2 años post-TPH), que son los implicados en la creación de la memoria frente al CMV. En situaciones de inmunosupresión la célula efectora (citotóxica) se agota y las células memoria se producen en menor cantidad. La inmunosupresión provoca que la primera respuesta inmune (célula efectora) sea deficitaria y, además, que ante la re-estimulación del antígeno, no tenga la misma capacidad para la expansión clonal debido a la falta de células (CD8, CD4 y B). El análisis de los subgrupos de CD4 y CD8 revela una pobre reconstitución a largo plazo tras el TPH. *Corre et al* (ref 139) demostraron que los linfocitos T CD8+ "naïve", diferenciados y memoria no se normalizan hasta 24 meses después del trasplante. En contraste, los linfocitos T CD8+ activados (HLA-DR+) se expanden de manera temprana después del trasplante con valores por encima del rango normal a partir de los tres meses después del trasplante en adelante. Del mismo modo, los linfocitos T CD4+ "naïve", diferenciados y memoria no se normalizan hasta 24 meses después del trasplante, mientras que los linfocitos T CD4+ activados (HLADR+) se normalizan a los nueve meses y se mantiene hasta 24 meses. Por último, los linfocitos B "naïve" (CD19+ CD27-) están dentro del rango normal a los seis meses y por encima del valor normal a los 24 meses, mientras que los linfocitos B memoria permanecen por debajo del rango normal durante los 24 meses post-TPH. La presencia de EICR aguda, y sobre todo crónica, contribuye a este enlentecimiento de la reconstitución inmune CMV específica, al entorpecer los diferentes pasos que tienen lugar en la respuesta inmune frente al virus, desde el reconocimiento hasta la evolución de los linfocitos de acuerdo a las fases evolutivas de la infección (*Corre et al 2010, ref 139*).

En los últimos años, se empieza a describir el efecto del TPH haploidéntico con ciclofosfamida post-TPH en la reconstitución inmune post-TPH. De modo resumido, en el post-TPH los linfocitos T se generan a través del timo y de la sangre periférica. Dado que el timo no tiene

ningún papel en adultos, la reconstitución inmune post-TPH depende de la expansión en sangre periférica de los linfocitos T maduros del injerto (Luo et al 2014, ref 140). La ciclofosfamida post-TPH destruye selectivamente los linfocitos T aloreactivos preservando los no aloreactivos (responsables de la reconstitución inmune). Se ha descrito que los monocitos reconstituyen rápido y mantienen niveles elevados durante el primer año. En cambio, los linfocitos totales recuperan lentamente y los niveles son más bajos hasta los 180 días post-TPH, siendo muy bajos los primeros 30 días. Los linfocitos T CD8 recuperan más rápido y alcanzan niveles normales a partir de 60 días post-TPH. Los linfocitos T CD4 “*helper*” recuperan lentamente y no alcanzan niveles normales hasta el primer año post-TPH y los linfocitos T CD4 “*naïve*” no recuperan hasta los 180 días post-TPH (a partir de esta fecha reconstituyen más rápido). Curiosamente, los linfocitos B (CD19+) prácticamente desaparecidos durante los primeros 90 días, reconstituyen lentamente y alcanzan niveles normales a los 10-12 meses post-TPH (Pei et al, 2017, ref 141). Comparando el efecto de la CyPT con otras modalidades de depleción linfocitaria (ATG), los pacientes que reciben ATG tienen los linfocitos CD4, α/β y T-reg más bajos durante los primeros 30 días pero a los 60 días post-TPH los linfocitos T CD4, CD8, γ/δ y NK son más altos en los pacientes que reciben ATG. Este efecto que ejerce la CyPT sobre la reconstitución inmune da lugar a un perfil de infecciones diferentes (Retiere et al, 2018, ref 142-147).

La falta de linfocitos T CD8 CMV-específicos predispone para infección por CMV, tanto precoz como tardía, y la reconstitución de los mismos protege frente al CMV. La falta de linfocitos T CD4 CMV específicos se asocia con el desarrollo de enfermedad por CMV tardía (> 100 días post-TPH) y a mortalidad relacionada con esta enfermedad por CMV (ref 148). Hay multitud de estudios que demuestran la importancia de la reconstitución inmune CMV-específica para el control de la infección por CMV en el TPH (ref 149-151). La ausencia de expansión clonal de linfocitos T CD8+ tras la primera infección por CMV se relaciona con persistencia de la carga viral en sangre (ref 149) y la presencia de niveles adecuados de linfocitos TCD8+/IFN+ tras la finalización del tratamiento antiviral se asocia a baja incidencia de infección recurrente (ref 152). Una reconstitución precoz de linfocitos T memoria CD4+ CMV específicos se asocia a incidencia baja de infección por CMV (ref 153).

4. CMV y Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos.

4.1 Generalidades y Epidemiología.

Los avances en los tratamientos antivirales, en las estrategias de tratamiento, especialmente con la introducción del “tratamiento anticipado” y, por supuesto, los avances en las técnicas utilizadas para la detección del virus (diagnóstico), han conseguido disminuir la incidencia de enfermedad por CMV desde el 35% hasta el 5% (en los primeros 100 días post-TPH) y 11% (durante el primer año post-TPH) (ref 154). Al disminuir la incidencia de enfermedad ha disminuido también la mortalidad derivada de la misma hasta un 2% (ref 148) en la actualidad, siendo la afectación pulmonar y del SNC las que presentan una mayor mortalidad asociada (alrededor del 50% y 90%, respectivamente) (ECIL 2017, ref 155).

A pesar de estos avances, la incidencia de infección por CMV se sitúa en torno al 60-70% con una mediana de reactivación de 45 días post-TPH. La incidencia de infección recurrente por CMV es del 30-40%. La denominada infección "mantenida" por CMV, es decir, carga viral mantenida que obliga a prolongar el tratamiento antiviral, ocurre en casi la mitad de los pacientes que reactivan el CMV. La incidencia de infección tardía por CMV, la que ocurre a partir de los 100 días del TPH (4-6 meses post-TPH), no es bien conocida y se sitúa entre el 4%-15% según las series (ref 156, 157, 158). Diversos estudios han descrito que tanto la profilaxis antiviral, recomendada en estos pacientes (sobre todo con ganciclovir, aunque también con aciclovir) como la EICR, pueden retrasar la reconstitución inmune CMV-específica post-TPH (ref 159, 160). Esta inmunodeficiencia CMV-específica tras la retirada de la profilaxis contribuye a un aumento en la incidencia de infección y, sobre todo, de enfermedad por CMV tardía así como de la mortalidad relacionada con la enfermedad por CMV. Es muy importante realizar el diagnóstico de la infección tardía, ya que el desarrollo de la enfermedad en este momento del TPH tiene la misma mortalidad que en la forma precoz (138, 139, 154).

Es por todo ello, que si bien la mortalidad asociada al CMV es baja (2%), la morbilidad derivada de la infección por CMV así como de su tratamiento es elevada y muy difícil de cuantificar de una manera real y fiable. Dicha morbilidad dificulta el manejo del paciente y asocia efectos directos e indirectos que pueden contribuir a la mortalidad relacionada con el procedimiento y a disminuir la supervivencia global del paciente tras el TPH.

La patogenia de la infección y enfermedad por CMV es compleja, derivada de las diferentes interacciones entre el virus y el sistema inmune. Esta interacción está mediada a través de diferentes mecanismos, como el efecto que provoca el virus sobre la expresión del HLA, la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión (ref 160). Es lo que se conoce como los efectos indirectos del CMV que no son más que una consecuencia de los efectos inmunosupresores e inflamatorios del virus sobre el sistema inmune (ref 161). Estos mecanismos podrían explicar el riesgo aumentado de infecciones bacterianas y fúngicas que presentan los pacientes con infección por CMV. Igualmente, el tratamiento antiviral con ganciclovir así como la propia infección por CMV puede provocar mielosupresión y esto favorece infecciones y hemorragias (ref 162-164). También se ha descrito asociación entre la presencia de infección por CMV y el desarrollo de EICR tanto aguda como crónica y viceversa. Parece claro que la presencia de EICR por sí sola, así como por el tratamiento que reciben los pacientes para su control, que supone aumentar la inmunosupresión, aumenta el riesgo de infección y de enfermedad por CMV (ref 165).

Por otro lado, en los pacientes que reciben un TPH con depleción linfocitaria T, con el que se consigue disminuir la EICR, la presencia de infección por CMV aumenta el riesgo de desarrollar EICR, tanto aguda como crónica. La posible explicación tiene que ver con que son los linfocitos T los que controlan la replicación viral, por lo que si están proliferando para controlar el CMV, es posible que otra población de linfocitos T proliferen también contra antígenos del receptor, provocando la EICR. Otros estudios han hipotetizado sobre el papel que juega la activación de las células NK tanto en el control del CMV (sugieren protección frente a CMV), como el hecho de que esta activación de las células NK, provocada por la agresión del CMV, favorezca el desarrollo de EICR (ref 166).

Otros autores han relacionado el daño que provoca el CMV sobre el endotelio vascular con el aumento del riesgo cardiovascular de estos pacientes (ref 167).

En cuanto al efecto beneficioso o protector de la infección del CMV sobre la recaída de la enfermedad hematológica, es un tema muy discutido y controvertido (ref 168). Este efecto beneficioso se ha podido demostrar sólo en pacientes que se realizan el TPH por una leucemia aguda mieloblástica; en este caso, aquellos pacientes que presentan infección por CMV, presentan menor recaída de la enfermedad, tiene mayor supervivencia libre de enfermedad pero mayor mortalidad no relacionada con la recaída (ref 169). Como posibles explicaciones se ha hipotetizado sobre el propio estímulo alogénico que hace que el CMV se reactive; que sea debido a la estimulación y expansión de los linfocitos T CMV-específicos del donante (Thomson et al, ref 170); o bien que los linfocitos T $\gamma\delta$ que se generan a raíz de la reactivación del CMV sean capaces de reconocer tanto al CMV como las células blásticas y generar una respuesta inmune contra ellas (Schoper W, 2013 ref 171). Ésta sería quizá la explicación más factible, desde el punto de vista inmunológico. También se ha dicho que este efecto protector se ve cuando el CMV reactiva en los primeros 100 días post-TPH (ref 172, 173). Sin embargo, el supuesto efecto beneficioso de la infección por CMV sobre la recaída no se ha confirmado en grandes series como el EBMT o CIBMTR (ref 175).

Independientemente de los efectos que provoca el CMV en los pacientes que reciben un TPH, existe evidencia en la literatura y conocimiento a nivel internacional que avala que los pacientes seropositivos para el CMV que reciben un TPH tienen peor pronóstico que los pacientes seronegativos (ref 174-179). Además existe un efecto negativo sobre la supervivencia global cuando el donante es seronegativo y el paciente es seropositivo, aunque este hecho sólo se ha podido demostrar en los TPH mieloablatoivo de donante no emparentado (ECIL-2017 ref 155, 180, 181).

4.2 Factores de Riesgo de Infección por CMV.

El estado serológico de donante y receptor es el principal factor de riesgo de infección por CMV en el trasplante alogénico. Especialmente cuando el receptor es positivo y existe discrepancia con su donante; y es común a todos los tipos de trasplante alogénico, bien sea de donante familiar o de donante no emparentado, idéntico o no idéntico, incluido los TPH haploidénticos (ref 182, 183). De esta manera y en base a la serología pre-TPH, se estratifican a los pacientes en diferentes grupos de riesgo (ref 184):

Alto riesgo: Se define así a la situación en la que el donante es CMV negativo y el receptor es CMV positivo. En este escenario, existe la posibilidad de la reactivación, dado que el paciente tiene CMV latente en su organismo pero, la inmunidad encargada de eliminar el virus cuando éste reactive no tiene la memoria inmunológica frente al virus. Por tanto, no existe control inmunológico y además la primera respuesta inmune tiene lugar en el marco de un sistema inmune deficitario. En estos casos la incidencia de infección por CMV se ha descrito que puede ser superior al 80%, especialmente en los acondicionamientos mieloablatoivos.

Riesgo Intermedio: en la que el donante es CMV positivo y el receptor también es CMV positivo. En cuyo caso, el CMV tiene capacidad para reactivar a través de la infección latente tanto del donante como del receptor pero, la inmunidad presente en el post-TPH tiene

linfocitos memoria CMV específicos, por lo que aunque será deficitaria será más eficaz que si no hubiera memoria. La incidencia de infección por CMV en esta población es en torno al 50%.

Bajo riesgo: donde tanto el donante como receptor son CMV negativos. En esta situación la incidencia de infección por CMV se ha descrito <20% (variable según las series, entre 0% y 20%) y sobre todo está relacionada con la transfusión de hemoderivados y en población pediátrica.

A este factor de riesgo que viene impuesto por el estado serológico del paciente, hay que sumarle otros factores relacionados con el TPH que, básicamente, incrementan, contribuyen o prolongan la inmunosupresión propia del procedimiento. Entre ellos se encuentran: la depleción linfocitaria T (en cualquiera de sus formas), la linfopenia, la presencia de EICR, el tratamiento con corticoides y el uso de sangre de cordón umbilical como fuente de PH (ref 185-188).

Requieren mención especial los corticoides y la EICR, como factores de riesgo. Se ha demostrado que tanto la EICR como los corticoides aumentan el riesgo de CMV, tanto infección como enfermedad, porque afectan a la producción de linfocitos T, tanto CD4 como CD8 (ref 188) e incluso hay autores que han demostrado que los pacientes que realizan tratamiento corticoideo a altas dosis presentan niveles más bajos de linfocitos CD4 y esto predispone a tener más enfermedad por CMV. También es extensa la bibliografía que confirma que los pacientes con EICR tienen más CMV y que los pacientes que desarrollan EICR gastrointestinal tienen más enfermedad CMV gastrointestinal (ref 189-192). Sin embargo, teniendo en cuenta que la corticoterapia a altas dosis es el tratamiento de primera línea de la EICR, tanto aguda como crónica, resulta muy difícil, por no decir imposible, diferenciar el efecto e impacto real que ejerce cada uno de los factores por separado. Del mismo modo, se desconoce si este efecto afecta de la misma manera a todos los pacientes en función de su estado serológico previo (ref 193-197).

Respecto a la infección recurrente por CMV, los factores de riesgo asociados son los relativos al estado de inmunosupresión del paciente tales como EICR, corticoides, inmunosupresión sistémica y linfopenia. Estos mismos son los factores de riesgo para la enfermedad por CMV y además, hay que sumarle la infección recurrente y/o la presencia de carga viral mantenida a pesar de tratamiento antiviral correcto (infección refractaria o demostración de resistencia a fármacos antivirales). La presencia de carga viral elevada en el momento del diagnóstico de la infección por CMV se asocia a necesidad de más días de tratamiento antiviral anticipado para negativizar la DNAemia (ref 193, 198, 199).

En relación a la infección tardía, los principales factores de riesgo son: la presencia de DNAemia durante los 3 meses previos o lo que es lo mismo, haber presentado una infección por CMV previa, la presencia de linfopenia (sobre todo de linfocitos CD4), la presencia de EICR, pacientes seropositivos que han recibido tratamiento antiviral profiláctico sobre todo con ganciclovir (ref 200-204).

La depleción linfocitaria T en todas sus modalidades contribuye a la supresión de la funcionalidad de todos los linfocitos T, que son los que controlan las infecciones virales y la EICR. Merece especial mención la nueva modalidad de depleción linfocitaria T que se realiza con la administración de la ciclofosfamida a dosis altas después del trasplante. En cualquiera de las

situaciones, la reconstitución deficiente de la inmunidad adaptativa después de un TPH haploidéntico continua siendo motivo de estudio y está asociada a un aumento de riesgo de infecciones bacterianas, fúngicas y virales (CMV) (ref 140, 205-207). En cuanto al CMV, se ha descrito que la incidencia de infección permanece invariable (60-70%) pero ésta ocurre antes (mediana 30-35 días según las series) y requieren más días de tratamiento antiviral para control de la DNAemia (incidencia mayor de infección refractaria).

4.3 Manifestaciones clínicas de la Infección por CMV.

Con el fin de poder reportar de manera adecuada y uniforme el impacto del CMV en el TPH, se han descrito de manera consensuada, definiciones de infección y enfermedad por CMV a lo largo de los años. El primer reporte data de 1993, dentro de la Conferencia Internacional del CMV y se han ido actualizando en 1995 y 2002 (ref 192). Las definiciones de Ljungman et al 2002 (ref 192) se han utilizado de manera universal en el contexto del TPH. Los avances en el diagnóstico (técnicas diagnósticas) y manejo del CMV han dado lugar a la última actualización en las definiciones de infección y enfermedad por CMV (*Ljungman et al, 2017 ref 208*):

Infección por CMV, se define como el aislamiento del virus, la detección de proteínas virales (antígenos) o la detección del ácido nucleico del CMV en cualquier líquido corporal o muestra de tejido.

Replicación CMV, se puede utilizar para indicar que existe evidencia de multiplicación del virus. A veces se utiliza este término en lugar de Infección por CMV.

Primoinfección, primera detección de infección por CMV en un paciente previamente seronegativo.

Infección recurrente, se define como una nueva infección por CMV en un paciente que previamente ha tenido una infección por CMV documentada y a quien no se le ha detectado el virus durante un intervalo de al menos 4 semanas durante la vigilancia activa

Re-infección, detección de infección por una cepa de CMV diferente a la que causó la infección inicial.

Reactivación de CMV, es cuando 2 cepas de CMV (la causante de la infección previa y la de la actual) son indistinguibles tanto por secuenciación de regiones específicas del genoma como utilizando técnicas moleculares de genes polimórficos. En la práctica clínica habitual se utiliza indistintamente los términos reactivación e infección por CMV para referirse a un episodio de infección por CMV.

Enfermedad, se define como signos y síntomas de daño orgánico y detección del CMV en el tejido afecto (ref 192, 208). Para la detección del virus en el tejido existen peculiaridades diagnósticas en función del tejido. Los avances en la definición del diagnóstico en las últimas décadas vienen determinados por las mejoras en las técnicas diagnósticas. Recientemente se ha propuesto la nueva clasificación de enfermedad *probada, probable y posible* para todas las manifestaciones de enfermedad (ECIL 2017, ref 155). Esta nueva categorización es especialmente útil en las manifestaciones pulmonar y gastrointestinal y supone un primer paso en el reconocimiento de la técnicas moleculares basadas en la PCR-RT como técnicas válidas en el diagnóstico de enfermedad orgánica por CMV.

Enfermedad Gastrointestinal, la enfermedad *probada* requiere síntomas gastrointestinales superiores y/o inferiores y además lesiones macroscópicas de la mucosa (úlceras, erosiones, edema o eritema) junto a la evidencia documentada de CMV en tejidos obtenidos por histopatología, aislamiento del virus, cultivo rápido, inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación del DNA. La enfermedad *probable* requiere síntomas gastrointestinales superiores y/o inferiores, además de pruebas documentadas de CMV en el tejido (utilizando las mismas técnicas mencionadas anteriormente) pero sin lesiones macroscópicas de la mucosa; y la enfermedad *posible* se define como la detección de niveles altos de DNA viral mediante PCR-RT en el tejido gastrointestinal, en presencia de síntomas gastrointestinales, especialmente cuando en la muestra de sangre obtenida al mismo tiempo no contiene DNA de CMV (ref 179, 187).

Enfermedad Pulmonar, se define con la presencia de síntomas, imagen radiológica compatible y aislamiento del virus en el lavado broncoalveolar (LBA) por diferentes técnicas (cultivos, citología, PCR-RT) (ref 209).

La neumonía *probada* requiere presencia de signos y síntomas de neumonía, por ejemplo nuevos infiltrados en la imagen radiológica, hipoxia, taquipnea, y/o disnea junto con la presencia documentada de CMV en tejido pulmonar mediante aislamiento del virus, cultivo, histología, IHQ o técnicas de hibridación del DNA viral.

La neumonía *probable* se define como la detección de CMV mediante aislamiento del virus, cultivo en LBA o cuantificación de DNA viral (PCR-RT) en LBA junto con la presencia de signos y síntomas de neumonía. No existe evidencia suficiente para definir un punto de corte en la carga viral para el diagnóstico. La carga viral en LBA puede variar dependiendo del procedimiento (fibrobroncoscopia) para extraer la muestra y de la severidad de la neumonía (impacta en los valores predictivos). Hay un único estudio realizado en pacientes que reciben un TPH que muestra una correlación entre carga viral en LBA y el diagnóstico de neumonía por CMV y describe un punto de corte válido para este diagnóstico (ref 210).

Retinitis por CMV: para el diagnóstico es suficiente con el diagnóstico visual que realiza el oftalmólogo, es decir, no se requiere confirmación histológica ni mediante cultivo del humor vítreo. La retinitis citomegálica es poco frecuente (0,5%) y se caracteriza por aparecer en el post-TPH tardío, generalmente después de los 3 meses post-TPH. La definición de retinitis probada requiere de signos oftalmológicos característicos y evaluados por un oftalmólogo experimentado. En el caso de que la presentación sea atípica o no sea posible la evaluación por un oftalmólogo experimentado, se recomienda que el diagnóstico sea complementado o confirmado mediante la detección del CMV en el humor vítreo por PCR-RT (ref 211).

Encefalitis y ventriculitis, la definición de enfermedad *probada* requiere síntomas neurológicos y la detección del CMV en tejido mediante aislamiento del virus, cultivo, IHQ, técnicas de hibridación del DNA viral o PCR-RT. Y enfermedad *probable* requiere síntomas neurológicos, pruebas de imagen anormales o electroencefalograma compatible con encefalitis y detección del CMV en LCR (sin evidencia de contaminación sanguínea en LCR) (ref 212).

Otras manifestaciones de enfermedad orgánica, el CMV puede afectar a otros órganos y la definición de enfermedad orgánica se basa en la presencia de síntomas y la detección de CMV por aislamiento del virus, cultivo, IHQ o por técnicas de hibridación del DNA viral en la biopsia

del órgano/tejido afecto. Entre estas manifestaciones poco frecuentes se encuentran: hepatitis, cistitis, miocarditis y pancreatitis.

En general para el desarrollo de enfermedad orgánica es necesario que exista una exposición mantenida y prolongada al virus, de aquí que la aparición de enfermedad sea en el post-TPH tardío (>100 días). Por tanto, la replicación viral constante y mantenida (infección por CMV con mala respuesta al antiviral) o bien la infección recurrente (más de 2 episodios de reactivación por CMV) son factores de riesgo para presentar afectación orgánica en general. Tanto la manifestación pulmonar como la ocular ocurren habitualmente durante un episodio de infección activa en sangre. Algún pequeño porcentaje de casos de retinitis por CMV pueden ocurrir con carga viral en sangre negativa. En la enfermedad gastrointestinal hasta un 30% de casos ocurre sin evidencia de replicación viral en sangre.

4.4 Técnicas diagnósticas.

4.4.1 Diagnóstico de Primoinfección por CMV.

La determinación de anticuerpos específicos frente al CMV nos permite conocer el estado serológico de los pacientes que tiene relevancia en la estratificación del riesgo de infección post-TPH. Las técnicas de ELISA y quimioluminiscencia (CLIA) automatizadas son los métodos más utilizados. Cuando ocurre la primoinfección, las IgM aparecen antes que las IgG y perduran entre 3 y 6 meses posteriormente. Se ha demostrado que las IgMs pueden detectarse cuando ocurre una reactivación o recurrencia, o como resultado de una reactividad cruzada o estimulación en el transcurso de otras infecciones virales, por lo que no es del todo fiable a la hora de determinar el “momento infeccioso” frente al CMV en el que se encuentra el paciente. Para diagnosticar con precisión la primoinfección frente a una infección pasada la mejor opción es detectar la seroconversión de las IgGs. Las IgGs frente a CMV aparecen después de las IgMs y perduran toda la vida, por lo que la presencia de IgG frente a CMV determina que el paciente ha pasado una infección por CMV y que presenta inmunidad frente a él y que éste permanece en estado de latencia dentro de las células. Por tanto, cuando este paciente con IgG CMV positiva recibe un TPH será susceptible de presentar una replicación de este virus, y por tanto, una reactivación del mismo. La detección de las serologías (IgM e IgG) para CMV es útil en el diagnóstico de primoinfección pero, no se deben utilizar para diagnosticar reactivación ni enfermedad por CMV.

4.4.2 Diagnóstico de Infección por CMV.

En el paciente inmunodeprimido existe correlación entre la cantidad de virus en la sangre cuando éste replica (lo que se conocía como viremia) y la probabilidad de desarrollar enfermedad por el virus. A principios de los años 90, diversos estudios demostraron que los leucocitos polimorfonucleares eran los “transportadores del CMV” durante la infección activa por este virus. Por ello se empezaron a desarrollar técnicas capaces de identificar estas células (polimorfonucleares) infectadas por el virus para poder calcular la “cantidad de virus” (viremia) que estaba provocando la infección y así poder conocer la probabilidad de desarrollar enfermedad por CMV. La primera técnica descrita para detectar viremia fue el cultivo celular, mediante “*Shell-vial*”, en el que se incubaba una cantidad conocida de polimorfonucleares con fibroblastos (línea celular). Cuando se identificaba efecto citopático, la muestra se cultivaba con anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes dirigidos contra proteínas específicas del

virus (pp72/IE-1). La viremia se calculaba en base a la detección de esta inmunofluorescencia emitida por las células infectadas. Actualmente está en desuso por su baja sensibilidad y por tratarse de una técnica muy laboriosa (ref 213).

Posteriormente, se demostró que la proteína pp65 del CMV era la más abundante en los núcleos de los polimorfonucleares de los pacientes inmunodeprimidos en los que se detectaba viremia. Gracias a la antigenemia pp65, técnica de inmunoensayo en la que mediante anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos contra la proteína pp65, se podían identificar las células polimorfonucleares infectadas. Fue la técnica estándar de detección de CMV en sangre durante muchos años, debido a su sensibilidad, estandarización en la interpretación y reproducibilidad. Demostró su utilidad en el diagnóstico de infección, para iniciar tratamiento antiviral y para definir la duración del mismo, así como para monitorizar la respuesta al tratamiento. Además, mostraba una buena correlación entre la cantidad de células infectadas detectadas en la sangre por este medio y la probabilidad de desarrollar enfermedad viral. El inconveniente que presentaba era que en situaciones de neutropenia, hecho frecuente en el paciente sometido a un TPH, la sensibilidad era muy baja, dado que precisaba de la presencia de polimorfonucleares y no era valorable en esta situación (ref 214-216).

Por último, el desarrollo de técnicas moleculares para la detección del DNA, sobre todo aquellas basadas en la amplificación y detección del genoma a tiempo real ("*Polymerase Chain Reaction real-time*", PCR-RT), se han convertido en el estándar para la cuantificación de la carga viral en sangre (lo que se denomina DNAemia, detección de DNA viral en sangre). Son técnicas más sensibles con límites de detección muy bajos y con un riesgo muy reducido de contaminación de la muestra, porque tanto la amplificación como la cuantificación del virus se realiza en un circuito cerrado. Tiene utilidad para el diagnóstico de infección/reactivación por CMV, para el inicio de tratamiento anticipado, la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección del fracaso del tratamiento que, en ocasiones indica la realización de un estudio de resistencias (ref 217-220). Sin embargo, a medida que han ido apareciendo y perfeccionándose las técnicas de PCR-RT, se ha puesto en evidencia la gran variabilidad que existe entre laboratorios, debido a la multitud de PCR-RT desarrolladas. Lo cual hace muy difícil estandarizar los puntos de corte y pone de manifiesto que a partir de una misma muestra, según la PCR-RT realizada, la carga viral pueda variar hasta 3 log₁₀ de diferencia (ref 221, 222). En noviembre de 2010 se describió el "Estándar Internacional" para las técnicas de amplificación de DNA de CMV aprobado por la OMS, en un intento de armonizar la cuantificación de la DNAemia y reducir esta variabilidad intra e interlaboratorio. Este "estándar internacional" describe un calibrador para cada una de las PCR-RT que se realizan y teniendo en cuenta los diferentes tipos de muestras (plasma o sangre) y el tratamiento que deben recibir las muestras para una correcta interpretación del resultado. De esta manera, los laboratorios y fabricantes pueden calibrar el resultado obtenido con su PCR-RT con el estándar internacional y así poder estandarizar la carga viral de manera universal (unidades internacionales por mililitro) (ref 223). Con ello, se ha conseguido reducir la variabilidad aunque no la elimina completamente. En este sentido se detalla a continuación determinados aspectos técnicos que afectan a la interpretación del resultado y que contribuyen a que persista la variabilidad en la carga viral. A modo de ejemplo:

- a) Muestra: plasma o sangre total. Habitualmente las cargas virales obtenidas en muestras de sangre total son más altas que las de plasma. La sangre total no ofrece ninguna ventaja sobre el plasma (Ref 224). La recomendación es que el mejor tipo de muestra para la realización de la técnica, sea plasma. Porque la variabilidad de la carga viral es menor, y ello es debido a que el plasma es un medio aséptico, por tanto la detección de DNA indica infección (ref 225, 226).
- b) Métodos de extracción del DNA: es mejor un método de extracción automatizado que manual.
- c) Selección de “*primers*” y sondas: el objetivo es detectar la secuencia de genes así como la longitud de la secuencia amplificada; ello influye directamente en el límite de detección y de cuantificación elegido por el laboratorio así como el rango de valores de cada técnica. Ello tiene una implicación directa en la variabilidad de la carga viral. Si la PCR-RT analiza fragmentos/secuencias cortas de DNA (< 100 pb) suelen tener carga virales muy altas y no se puede descartar que fragmentos de DNA viral producto de su destrucción estén incrementando esa carga viral. Esto no ocurre con las PCR-RT que analizan secuencias de DNA más largas (> 100 pb) que habitualmente se corresponden con cargas virales más bajas (ref 225, 226).
- d) Frecuencia de determinación: la vida media del DNA viral es de 3-8 días en las muestras de plasma. Por lo que una vez instaurado el tratamiento anticipado ante la evidencia de replicación viral, se recomienda realizar el primer control de DNAemia a los 7 días de tratamiento. Si se realiza demasiado pronto tras el inicio del tratamiento antiviral, puede seguir siendo positiva e incluso puede haber un incremento en la carga viral por la vida media larga del DNA viral. Lo que puede dar lugar a una mala interpretación de los resultados y considerarse como fracaso terapéutico. Este fenómeno se denomina “aumento paradójico” (ref 221).

4.4.3 Diagnóstico de Enfermedad por CMV.

En las últimas décadas, los avances en la definición del diagnóstico de enfermedad se han visto facilitados por las mejoras en las técnicas diagnósticas. La PCR-RT se ha implementado como técnica diagnóstica en diferentes tejidos y muestras, lo que ha permitido que se incorporara como herramienta válida en el diagnóstico de diferentes manifestaciones de enfermedad. Así, para la afectación del SNC la confirmación del CMV, mediante PCR-RT o cultivo celular, en el líquido cefalorraquídeo es necesaria para el diagnóstico. Para la retinitis por CMV, la PCR-RT sobre el humor acuoso se considera válida para el diagnóstico pero no es necesaria (dado que en esta entidad, el diagnóstico visual oftalmológico es suficiente para el diagnóstico). El papel de la PCR-RT en el diagnóstico de la afectación pulmonar y gastrointestinal, es la que ha protagonizado mayor controversia y estudios recientes. En el diagnóstico de la neumonía citomegálica mediante el lavado broncoalveolar, el valor de la PCR-RT está mejor definido (ref 210, 227). Sin embargo, el papel de la PCR-RT en tejido gastrointestinal está más controvertido, y es motivo de estudio hasta que exista evidencia suficiente que avale su validez

y fiabilidad (ref 228-233). A continuación revisaremos los métodos diagnósticos para la enfermedad gastrointestinal por CMV.

En la actualidad, la enfermedad gastrointestinal es la manifestación más frecuente de enfermedad por CMV en el paciente que recibe un TPH. El diagnóstico se basa en la detección del virus en el tejido afecto, con la realización de una biopsia para histopatología y análisis para cultivo, aislamiento del virus o inmunohistoquímica (IHQ) (ref 234, 235).

Respecto a la histopatología, la detección del CMV mediante la tinción de hematoxilina y eosina (HE) del tejido gastrointestinal identifica la presencia de inclusiones virales clásicas del CMV. Sin embargo, a menudo no son aparentes; por lo tanto, la mayoría de los centros utilizan la IHQ para detectar el CMV. La IHQ se considera el “*gold standard*” para la detección del CMV en tejido. La IHQ consiste en realizar una tinción de la muestra tisular con anticuerpos específicos contra el virus, de tal manera que si el virus está presente en el tejido, al observar al microscopio, las células infectadas se ven resaltadas de un color específico. La fiabilidad de la IHQ depende del observador y de que la técnica se realice correctamente, dado que puede haber patrones de tinción atípicos que den lugar a una interpretación errónea.

La detección del CMV mediante métodos moleculares como la PCR-RT es rápida, altamente sensible y objetiva. Sin embargo, el papel de la PCR-RT no está bien definido en las muestras tisulares. Al igual que ocurre con la PCR-RT para detectar DNAemia, existen multitud de técnicas de PCR-RT para detectar virus en tejido. Sin embargo no todas ellas están validadas. La extracción de DNA de la muestra puede ser manual o automática, el medio de conservación de la muestra determina si es necesario realizar un pre-tratamiento de la muestra previo a su procesamiento. El tipo de muestra (LBA, humor vítreo, gastrointestinal, LCR) influye en la interpretación del resultado; incluso las unidades de medida son diferentes para los diferentes tejidos (en humor vítreo, LCR y LBA es copias/ml, mientras que en muestra gastrointestinal es copias/ μ g). La principal desventaja que se le atribuía a la PCR-RT en tejido era su bajo valor predictivo positivo que se derivaba de la posibilidad de contaminación de la muestra, hecho que afectaba fundamentalmente a las muestras de BAL y tejido gastrointestinal. En ambas localizaciones (pulmonar y gastrointestinal) existe la posibilidad de que, en el momento de obtener la muestra, se contamine con muestra sanguínea, tanto por la fragilidad del tracto respiratorio y digestivo, como por la presencia de úlceras con hemorragia activa en el caso de la colitis citomegálica. Son técnicas muy sensibles, rápidas y específicas. Por último y debido a la falta de estudios específicos, no existe un umbral definido para la carga viral sobre la que se pueda basar el diagnóstico de la enfermedad por CMV, y éste es uno de los motivos por los que la PCR-RT en tejido intestinal todavía es un método controvertido.

4.4.4 Monitorización inmunológica del CMV post-TPH.

Dada la importancia de una adecuada reconstitución inmune CMV específica para el control de la infección por CMV, es de gran valor la posibilidad de realizar un análisis de la inmunidad CMV-específica en el post-TPH. Ello es útil para diseñar estrategias individualizadas de profilaxis, tratamiento y definir su duración. Tal y como se ha explicado anteriormente (ver apartado 3.2.5.3), los linfocitos T CD8 expresan marcadores de superficie diferentes según el momento evolutivo de la infección por CMV, lo que nos permite identificar a los linfocitos efectores de los linfocitos memoria y de los linfocitos “*naïve*”. Los linfocitos T CD8 citotóxicos o

efectores, liberan IFN γ cuando producen la citólisis de la célula infectada por el virus. Por tanto, al identificar los linfocitos T CD8+/IFN γ + circulantes en el torrente sanguíneo podemos cuantificar la funcionalidad de esta respuesta inmune frente al CMV (ref 236-241). Existen diferentes técnicas para medir la cantidad de linfocitos T CD8 citotóxicos que liberan IFN γ en presencia de CMV (inmunidad CMV específica), se detallan a continuación:

- a) *Tetrámeros de CMV ó Cuantificación de los linfocitos T CD8+/CD4+ CMV específicos mediante la utilización de tetrámeros HLA-A2 NLV de CMV.* A partir de sangre total, se incuban las células mononucleadas con el complejo tetramérico HLA A*0201 CMV pp65, formado por 4 péptidos, y los anticuerpos monoclonales anti-CD8, anti-CD4, anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-CD45. Posteriormente, se identifican los linfocitos CD8+ y CD4+ (que serán a su vez CD45+, TCR $\alpha\beta$ +) y se mide la proporción de los mismos que se unen al complejo tetramérico del CMV a través de su visualización ligada a fluorocromos, por citometría de flujo. El resultado se emite en células/ μ l (ref 240, 242, 243). La principal limitación de esta técnica es que su eficacia depende del HLA del paciente y, aunque hay disponibles muchos kits comerciales para los HLA más frecuentes, no existen para todos los HLA, por lo que no tiene una aplicabilidad universal.
- b) *Cuantificación de linfocitos T CD8+/CD4+ que producen interferón (IFN γ) en presencia de CMV.* A partir de sangre total, se estimula la muestra (1.000.000 células mononucleadas o bien 0,5 ml de sangre total) con los péptidos pp65 e IE-1 del CMV. Se añaden los correceptores CD28 y CD49d. Se incuba a 37°C durante 6h. Posteriormente, se añaden los anticuerpos monoclonales anti-IFN γ , anti-CD69, anti-CD8, anti-CD3 y anti-CD4. Finalmente se mide la cantidad de linfocitos CD8+/IFN γ + y de linfocitos CD4+/IFN γ + a partir de su visualización ligada a fluorocromos por citometría de flujo. El resultado final se emite como número absoluto (células/ μ l), al que se llega a través de la proporción de linfocitos CD8+/CD4+ IFN γ + y la cantidad de linfocitos totales. Con ello podemos medir la cantidad de linfocitos CD8+ y CD4+ que producen IFN γ tras ser estimulados por el CMV. Y, por tanto, sería reflejo de la respuesta inmune específica frente a CMV. Se considera resultado positivo cuando hay > 1 célula/ μ l (ref 149, 152).
- c) *QuantIFERON[®].* Mide la respuesta inmune T-celular en base a la cantidad de IFN γ secretado por los linfocitos T CD8 tras estimulación en condiciones *in vitro*. A partir de 3ml de sangre total, se incuba la muestra durante 16-24h a 37°C en 3 tubos (1ml por tubo), proporcionados en el Kit de QuantIFERON[®] que presentan: estímulo antigénico específico con más de 25 péptidos de CMV (tubo 1); estímulo no específico (HLA-I, tubo 2) y sin estimular (tubo 3). Tras la incubación, la detección es por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Para cuantificar el IFN γ se hace una curva estándar con diluciones seriadas de interferón y se analizará con el *software* proporcionado en el Kit por el fabricante. Los resultados que se obtienen del análisis pueden ser: **positivo**, responde al estímulo específico del CMV con producción adecuada de IFN γ (hay inmunidad CMV-específica); **negativo**, responde al estímulo general pero, no produce suficiente cantidad de IFN γ con el estímulo específico de CMV (no tiene inmunidad CMV específica); **indeterminado**, no responde ni al estímulo general ni al específico frente a CMV (podría corresponder a un fallo técnico o bien, que el paciente no

presente inmunidad de ningún tipo) (ref 244, 245). La principal limitación de esta técnica es que, en presencia de linfopenia, hecho frecuente en el post-TPH, pierde sensibilidad y especificidad, es decir, hay más resultados indeterminados.

- d) ELISPOT: técnica similar al QuantiFERON que mide la respuesta inmune T celular. Para ello analiza un cantidad concreta de polimorfonucleares (a partir de sangre total en EDTA se realiza separación celular por Ficoll) que son estimuladas con péptidos de CMV. Esta técnica mide la cantidad de IFN γ que es producida por los linfocitos T CD8+ y CD4+ estimulados. Por lo que es un reflejo de la inmunidad CMV-específica de linfocitos TCD8+ y TCD4+, aunque no es capaz de diferenciar entre ambas poblaciones quién es la responsable de la respuesta inmune (ref 213, 246, 247).

La técnica que realiza una lectura más real y fiable es la citometría de flujo que mide los linfocitos T CD8+/CD4+/IFN γ + (descrita como técnica b), dado que es capaz de identificar la población que está actuando contra el CMV y además es capaz de definir si alguna de las subpoblaciones es deficitaria. Sin embargo, es una técnica laboriosa y costosa que requiere personal experimentado para interpretar correctamente el resultado y para el procesamiento de la muestra (manual). Las técnicas de QuantiFERON y ELISPOT también son fiables en el resultado y tienen la ventaja de que son automatizadas y reproducibles. Es por ello que en las últimas recomendaciones de la ECIL-7 (ref 155) mencionan la utilidad de ambas técnicas para evaluar la inmunidad CMV-específica y poder realizar monitorización inmunológica que guíe el tratamiento. Siendo conscientes de que son técnicas que no están disponibles en todos los centros, la ECIL-7 reconoce la utilidad de la monitorización inmunológica para guiar el tratamiento antiviral pero, no realiza una recomendación general y universal (ref 155).

4.5 Estrategias de tratamiento.

La infección por CMV presenta una morbilidad elevada en el paciente receptor de un TPH, por lo que existen diferentes estrategias encaminadas tanto a disminuir la incidencia de la infección por CMV (profilaxis), como a realizar un tratamiento precoz en el momento en el que se detecta la DNAemia (tratamiento anticipado) para disminuir la incidencia de enfermedad orgánica, y a realizar tratamiento antiviral prolongado cuando se produce la afección de algún órgano (tratamiento de enfermedad por CMV).

La primera “estrategia” frente al CMV no es farmacológica, y se realiza en el momento de escoger el donante, si es que existe esta posibilidad. En los receptores seronegativos para el CMV se recomienda escoger un donante que también sea seronegativo. Para los receptores seropositivos se recomienda, en la medida de lo posible, escoger un donante que sea seropositivo (ref 154, 248, 249).

El siguiente paso es limitar la posibilidad de transmisión, para lo cual tiene especial importancia la leucodepleción o irradiación de hemoderivados destinados al soporte transfusional de los pacientes (ref 154, 248, 249).

4.5.1 Profilaxis.

Esta estrategia está diseñada para disminuir la incidencia de infección/reactivación por CMV en el post-TPH y se recomienda realizar profilaxis antiviral durante los primeros 100 días post-TPH (momento en el que se produce la reconstitución de los linfocitos). El fármaco más utilizado hasta el momento ha sido el aciclovir a altas dosis (800 mg/8h vo o bien 500 mg/m²/8h ev). La toxicidad renal asociada al fármaco ha hecho difícil mantener dicho tratamiento de manera prolongada e ininterrumpida, siendo frecuente la suspensión temporal de la profilaxis para reiniciar una vez resuelto el deterioro renal. No todos los centros realizan profilaxis anti-CMV. Otro fármaco utilizado en profilaxis es el ganciclovir o valganciclovir, su uso en profilaxis disminuye en gran medida la alternativa terapéutica en caso de presentar infección/reactivación CMV, así como la inducción a resistencias y su especial toxicidad no es menospreciable. Por todo ello no se recomienda. A pesar de que la recomendación de hacer profilaxis de infección es una opción, en la práctica asistencial la toxicidad y la mala tolerancia de los fármacos disponibles dificultan en gran medida el cumplimiento de esta medida y por ello la eficacia de esta estrategia es baja, lo que hace que existan muchos centros de TPH que no realizan profilaxis anti-CMV (ref 250, 251).

Letemovir es un nuevo fármaco antiviral que ha demostrado su eficacia en profilaxis (Marty et al, ref 252). Consigue disminuir la tasa de infección/reactivación por CMV en los primeros 100 días (el grupo placebo presenta una tasa de infección por CMV del 70% frente al 37,5% en el grupo letermovir) sin toxicidad asociada; no se ha descrito mielotoxicidad ni nefrotoxicidad, lo que facilitará en gran medida que la profilaxis se pueda mantener durante 3 meses. Existen algunos aspectos que requiere de un estudio más profundo y que podría influenciar en su eficacia como, por ejemplo, la detección de resistencias antivirales al fármaco. Actualmente, su uso no está aprobado todavía en España (apartado 4.5.4 *Fármacos antivirales* para más detalle a cerca del fármaco).

4.5.2 Tratamiento anticipado.

Es la estrategia anti-CMV utilizada de manera más universal y estandarizada en todos los centros de trasplante del mundo, debido a la baja eficacia de la profilaxis anti-CMV y a lo no disponibilidad de los nuevos fármacos (ref 253). EL objetivo del tratamiento anticipado es disminuir la incidencia de enfermedad orgánica (daño orgánico). Consiste en iniciar tratamiento antiviral frente a CMV cuando se produce infección/reactivación por el mismo. Para ello, se realiza monitorización viral, mediante realización de PCR-RT en sangre o plasma con frecuencia semanal durante los primeros 3 meses post-trasplante y cada 15 días hasta los 6 meses post-trasplante a todos los pacientes que reciben un TPH. Cuando se detecta infección por CMV (PCR-RT > 1.000 UI/ml o bien carga viral en ascenso > 500 UI/ml en 2 ó más determinaciones), se inicia tratamiento anticipado para disminuir el riesgo de enfermedad por CMV. La duración mínima del tratamiento de la infección por CMV es de dos semanas siempre que se consiga la negativización de la carga viral. En caso de persistir PCR-RT positiva, el tratamiento se prolonga hasta que sea negativa.

Algunos autores han descrito el beneficio de iniciar tratamiento antiviral anticipado cuando se detecta duplicación de la carga viral en menos de 2 días, cuando ésta se encuentra por debajo del límite habitual de inicio de tratamiento (< 1.000 UI/ml) (Solano et al, ref 254, 255). Iniciar

tratamiento anticipado en esta situación, permite un control de la carga viral rápido y con una duración de tratamiento antiviral inferior a 14 días, lo que repercute en menor toxicidad.

Los fármacos disponibles más utilizados para realizar esta estrategia son el ganciclovir a dosis de 5 mg/kg/12h (o su equivalente oral, valganciclovir 900 mg/12h) y el foscarnet a dosis de 60 mg/kg/12h.

4.5.3 Tratamiento antiviral de la enfermedad por CMV

Se inicia tratamiento antiviral cuando se diagnostica enfermedad por CMV (afectación orgánica). La duración mínima recomendada del tratamiento antiviral son 4 semanas, siempre que exista evidencia de resolución de la misma bien sea a nivel clínico como confirmado por exploraciones complementarias. Los fármacos utilizados para el tratamiento son los mismos disponibles para el tratamiento anticipado. La elección de un fármaco u otro dependerá del contexto del paciente: valores hemoperiféricos, función renal, comorbilidad, facilidad en la administración de fármacos, vía oral. Al tratarse de una afección orgánica, se recomienda iniciar el tratamiento antiviral por vía endovenosa para asegurar biodisponibilidad del fármaco en plasma. La duración recomendada del tratamiento es realizar, a ser posible, 4 semanas de tratamiento, y si no, al menos un mínimo de 3 semanas. En el caso de la neumonía por CMV se recomienda administrar inmunoglobulinas endovenosas asociadas al tratamiento antiviral (ref 154, 248-250).

4.5.3.1 Mantenimiento

Consiste en realizar tratamiento antiviral a dosis más bajas una vez finalizado el tratamiento de la enfermedad por CMV. Se recomienda realizar tratamiento de mantenimiento después de un primer episodio de enfermedad por CMV. Sin embargo, no existe consenso sobre el fármaco de elección, aunque en general se prefiere continuar con el mismo fármaco utilizado para el tratamiento de la enfermedad. Tampoco existen recomendaciones concretas ni consenso sobre la dosis del fármaco ni la duración del tratamiento de mantenimiento. Otra situación clínica donde se podría plantear realizar mantenimiento es cuando el paciente ha presentado al menos 2 reactivaciones de CMV y está bajo tratamiento prolongado con corticoides.

4.5.4 Fármacos antivirales.

El fármaco más utilizado en primera línea para el tratamiento de la infección por CMV es el ganciclovir (GCV) o, su equivalente oral, el Valganciclovir (VGC). Foscarnet y cidofovir se consideran fármacos de segunda línea indicados en el tratamiento del CMV cuando el ganciclovir no se puede administrar por citopenias o por fracaso de tratamiento de la infección por CMV (ref 250).

Ganciclovir es un análogo sintético de la 2'-desoxiguanosina que inhibe la replicación de los virus herpes *in vitro* e *in vivo*. Por tanto tiene actividad antiviral frente al CMV, los virus herpes simple 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), el herpes virus 6, 7 y 8 (HHV-6, HHV-7, HHV8), el virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la varicela zoster (VVZ) y el virus de la hepatitis B (VHB). De formulación endovenosa.

En las células infectadas por CMV, la proteinquinasa vírica UL97 fosforila primero el ganciclovir a monofosfato de ganciclovir. Posteriormente es fosforilado por varias quinasas celulares que

producen trifosfato de ganciclovir; el cual se metaboliza lentamente dentro de la célula infectada por el CMV. La triple fosforilación de ganciclovir ocurre preferentemente dentro de las células infectadas por el virus. La actividad viroestática del ganciclovir se debe a la inhibición de la síntesis del DNA viral al inhibir la DNA polimerasa (ref 256-258).

El principal efecto secundario conocido, y a veces efecto limitante de tratamiento, es la mielotoxicidad. Se recomienda ajustar la dosis de fármaco en función del filtrado glomerular, a partir de < 50 ml/min para reducir toxicidad. También se recomienda realizar dosis ajustada al peso del paciente. En la formulación endovenosa (ev), es decir el GCV, la dosis recomendada es 5 mg/kg de peso cada 12 horas. En la mayoría de ocasiones obliga al ingreso hospitalario para su administración. Sin embargo, el valganciclovir, profármaco del GCV, es de formulación oral (vo), más utilizada al poder administrarse ambulatoriamente, la dosis estándar es 900 mg cada 12 horas. Cada comprimido contiene 450 mg de VGC. No se recomienda su utilización en caso de peso < 55 kg, o filtrado glomerular < 50 ml/min, debido a la dificultad para realizar el ajuste de dosis (ref 259).

Foscarnet es un agente antiviral de amplio espectro, que tiene actividad contra los virus del grupo herpes incluyendo VHS tipos 1 y 2, VHH-6, VVZ, VEB y el CMV, así como algunos retrovirus, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (inhibe la DNA polimerasa) (ref 258). De formulación endovenosa.

Foscarnet ejerce su actividad antiviral mediante la inhibición directa de la DNA polimerasa del CMV sin que afecte a las DNA polimerasas celulares. No precisa activación (fosforilación) por la timidina quinasa, u otras quinatas, por lo que cepas de CMV resistentes a ganciclovir pueden ser sensibles a foscarnet. El principal efecto secundario del foscarnet es la toxicidad renal que se puede manifestar como insuficiencia renal (empeoramiento de la creatinina) o diselectrolitemia (alteraciones hidroelectrolíticas). También es relativamente frecuente la presencia de úlceras uretrales. Estos efectos secundarios obligan a suspender el tratamiento. La toxicidad gastrointestinal es menos frecuente y en la mayoría de los casos no requiere la suspensión del fármaco.

Cidofovir es un análogo citidínico que presenta actividad *in vitro* e *in vivo* frente al CMV. Es activo frente a VHS, adenovirus y poliomavirus BK. De formulación endovenosa.

Cidofovir suprime la replicación del CMV mediante inhibición selectiva de la síntesis del DNA viral por inhibición selectiva de la DNA polimerasa del CMV. EL cidofovir es un fosfonato que, en el interior de la célula se fosforila y pasa a ser difosfonato (metabolito activo de cidofovir).

El efecto antiviral prolongado que caracteriza al cidofovir es debido a la semivida de sus metabolitos (17-87 horas).

El principal efecto secundario del cidofovir es la toxicidad renal.

Los descritos anteriormente son los antivirales disponibles, con el perfil de toxicidades descrito. Se han desarrollado 3 nuevos antivirales cuyo mecanismo de acción se detalla a continuación, aunque no están disponibles en la práctica asistencial (Figura 16):

Maribavir, es un inhibidor directo de la proteína quinasa que codifica el gen UL97. De formulación oral. La función de esta quinasa (enzima) es facilitar la salida de los viriones del

núcleo al citoplasma. Al inhibir la salida del virión al citoplasma no se completa la formación del mismo (no hay adquisición de membrana y tegumento), por lo que se interrumpe la replicación viral. Tiene acción contra el CMV pero no contra otros virus de la familia herpes. No fue capaz de demostrar su eficacia en profilaxis debido a un mal diseño del estudio pero sí como tratamiento anticipado y para infección por CMV resistente o refractaria. No produce mielotoxicidad ni nefrotoxicidad, siendo el principal efecto secundario la disgresia y molestias gastrointestinales (ref 260, 261).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que la administración conjunta con ganciclovir está contraindicada. La quinasa codificada por el gen UL97 es la enzima que fosforila el ganciclovir a su monofosfato permitiendo que después complete la triple fosforilación (a través de otras enzimas) para ser activo. Dado que maribavir es inhibidor de UL97, inhibiría también la fosforilación del GCV, necesaria para su actividad antiviral.

Brincidofovir, o también conocido CMX-001. A la estructura del cidofovir se añade una cadena lipídica que permite el paso a través de la membrana celular liberando el cidofovir en el interior de la célula, en lugar de en el plasma. Por ello el perfil de toxicidad es diferente: no produce mielotoxicidad ni nefrotoxicidad. Siendo el principal efecto secundario los trastornos gastrointestinales (diarrea). Actúa igualmente inhibiendo la replicación del DNA viral por inhibición la DNA polimerasa (ref 262). De formulación oral.

Letermovir, inhibe el complejo terminasa (subunidad UL56, UL51, UL89). Durante el ciclo replicativo del DNA viral, se van sintetizando hebras de DNA, que contienen concavidades con un extremo de inicio y extremo final (longitud algo mayor a una unidad de genoma). Uno de estos extremos se une a una proteína que lo empuja dentro de la cápside. Cuando la cápside está llena, las enzimas del complejo terminasa reconocen las secuencias de empaquetamiento en el DNA, escinden el DNA en ese punto y sella el orificio con la cápside (ref 252, 258, 263-268). De formulación oral.

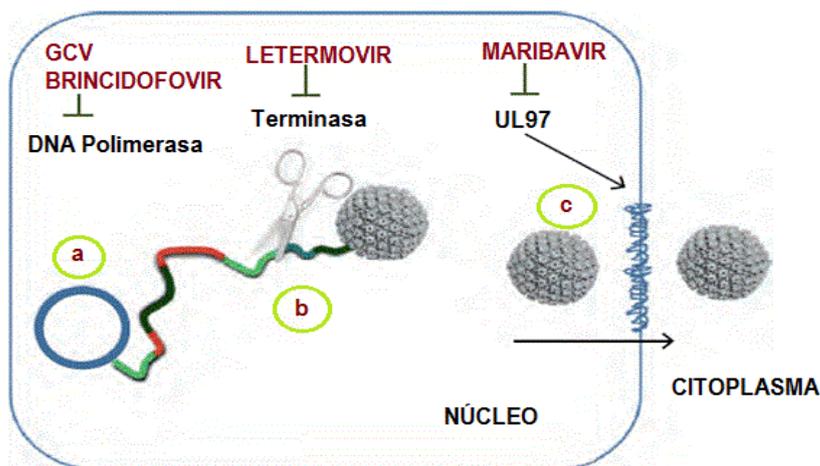


Figura 16. Mecanismo de acción de los fármacos antivirales (Adaptado de Griffiths and Lumley, ref 258). Durante la replicación del virus (representado como un círculo), la DNA polimerasa sintetiza las hebras de DNA con las concavidades de una longitud determinada (representadas en colores diferentes). Los antivirales actúan en diferentes momentos de la producción del virión: inhibiendo la DNA polimerasa (a), inhibiendo el complejo terminasa (b) o impidiendo el paso del virión del núcleo al citoplasma (inhibiendo la UL97 quinasa) (c), por lo que no se completa la formación de un nuevo virus.

4.6 Resistencias al tratamiento antiviral.

A pesar de los avances en las estrategias del tratamiento frente a CMV y que existen nuevos fármacos disponibles y en desarrollo, la infección por CMV no siempre responde adecuadamente al tratamiento. Ello puede deberse a que el paciente está severamente inmunodeprimido (reconstitución inmune deficitaria), por ausencia de niveles adecuados en plasma o bien, debido a la presencia de mutaciones genotípicas que confieran resistencia a los fármacos (ref 148, 156, 167). La sospecha de resistencia farmacológica se basa precisamente en la falta de respuesta o en una respuesta inadecuada al tratamiento antiviral. La incidencia de resistencias a los fármacos antivirales es variable, no está bien descrita y la evidencia es escasa. Algunos estudios han descrito una incidencia de infección persistente por CMV (PCR-RT positiva en sangre a pesar de >3 semanas de tratamiento antiviral) del 29% en TPH con depleción linfocitaria T (Almyroudis et al, ref 269, 270). Otros estudios describen una incidencia de resistencia primaria a ganciclovir (genotípica) que varía del 5% en el TPH convencional (Eid et al, 271) al 15% en los TPH haploidénticos (Shmueli E et al, ref 272) (ref 273-276).

La presencia de resistencias al tratamiento antiviral conlleva al fracaso del tratamiento antiviral y pone en riesgo al paciente de progresar de infección a enfermedad por CMV lo que impacta en el pronóstico del paciente (ref 167). Recientemente se ha descrito que los pacientes que reciben un TPH y presentan infección por CMV refractaria en los primeros 100 días post-TPH tienen una incidencia mayor de enfermedad por CMV (12%) y de mortalidad no relacionada con la recaída (17%) que aquellos que no presentan infección por CMV refractaria (ref 277).

Dada la problemática que genera la presencia de resistencias en la práctica asistencial así como las implicaciones terapéuticas y pronósticas, recientemente se ha elaborado un documento de consenso donde se describen los factores de riesgo para resistencia y se proponen las definiciones de infección por CMV *resistente* y *refractaria* (Chemaly et al, ref 278).

4.6.1 Factores de Riesgo para infección por CMV resistente.

La identificación de los factores de riesgo que predisponen a desarrollar una infección por CMV resistente al tratamiento antiviral permite realizar de manera más rápida el diagnóstico y el manejo de la misma. Los factores de riesgo que se han descrito asociados a resistencia son:

- a) *Dependientes del paciente*: exposición prolongada a antivirales (> 3 meses), haber recibido tratamiento anti-CMV previamente, infección recurrente por CMV, absorción o biodisponibilidad inadecuada del fármaco, inadecuada conversión del fármaco antiviral a su metabolito activo, variabilidad en la eliminación del fármaco, nivel subterapéutico del fármaco, mal cumplimiento del tratamiento, depleción linfocitaria T, TPH haploidéntico o de cordón umbilical, reconstitución inmune retardada, serología de alto riesgo (D-/R+), presencia de EICR activa, edad (jóvenes) e inmunodeficiencia congénita (ref 279).
- b) *Dependientes del virus*: carga viral en ascenso a pesar de > 2 semanas de tratamiento antiviral adecuado, carga viral mantenida a pesar de tratamiento adecuado, aumento

de la carga viral después de un descenso inicial bajo tratamiento antiviral adecuado, carga viral baja intermitente, carga viral muy elevada.

4.6.2 *Infección por CMV Refractaria.*

Se categoriza en 4 definiciones que tiene en cuenta aspectos clínicos y de laboratorio que indican una respuesta subóptima al tratamiento antiviral, evalúa signos y síntomas así como la carga viral:

1.- *Infección Refractaria*, carga viral que aumenta ($> 1 \log_{10}$) entre el valor más alto de carga viral de la primera semana y el de la segunda semana, después de 2 semanas de tratamiento antiviral adecuado.

2.- *Infección Refractaria Probable*, se define como carga viral persistente (misma carga viral o aumento de carga viral $< 1 \log_{10}$) después de 2 semanas de tratamiento correcto.

3.- *Enfermedad orgánica refractaria*, empeoramiento de los signos y síntomas o progresión a enfermedad orgánica después de, al menos, 2 semanas de tratamiento antiviral adecuado.

4.- *Enfermedad refractaria Probable*, ausencia de mejoría de signos y síntomas tras 2 semanas de tratamiento adecuado.

4.6.3 *CMV Resistente a los fármacos antivirales.*

La resistencia a fármacos antivirales se define como alteración genética del CMV que disminuye la susceptibilidad a 1 o más antivirales. Esta disminución en la susceptibilidad al fármaco a su vez, es definida por medición de la concentración de antiviral necesaria para reducir el crecimiento del virus en un 50% en el cultivo celular. Sin embargo, la realización de este análisis de susceptibilidad farmacológica no es viable técnicamente en la práctica dado que requiere estandarización, tiempo y disponibilidad. Por lo que el test de resistencia se realiza por análisis de secuencias de genes (genotípico). Por lo general, se realiza en la misma muestra de plasma donde se ha detectado la DNAemia, preferiblemente con carga viral alta ($> 1.000 \text{ UI/ml}$) para poder amplificar secuencias más largas y mejorar el rendimiento de la técnica. Las mutaciones más frecuentemente involucradas en resistencias antivirales se detallan a continuación (Tabla 1, Figura 17):

Tabla 1. Mutaciones genotípicas más frecuentemente asociadas a resistencia antiviral.

Gen CMV	Lugar de acción	Resistencia antiviral
UL97*	Protein-Kinasa	Ganciclovir, valganciclovir, maribavir
UL54**	DNA-Polimerasa	Ganciclovir, valganciclovir, cidofovir, foscarnet, brincidofovir
UL27‡	Regulación ciclo celular	Maribavir (bajo nivel)
UL51/UL56/UL89 ¹	Escisión y empaquetamiento del DNA	Letermovir

*ref 280, **ref 281, ‡ref 271, 266

La presencia de CMV resistente a tratamiento antiviral es un problema que irá en aumento. Teniendo en cuenta los factores de riesgo (exposición previa a antivirales, DNAemia persistente, reconstitución inmune deficitaria), es recomendable anticiparse al problema. Por ejemplo, utilizando fármacos nuevos tanto en profilaxis (letermovir) sobre todo en pacientes de alto riesgo, como en el tratamiento una vez se confirma la sospecha de resistencia, mediante la combinación de fármacos antivirales o con fármacos nuevos (maribavir, ha demostrado su eficacia en infección refractaria, ref 282). Otras estrategias que pudieran ser de utilidad son modular la inmunosupresión o reducirla en la medida de lo posible o bien mediante la inmunoterapia anti-CMV.

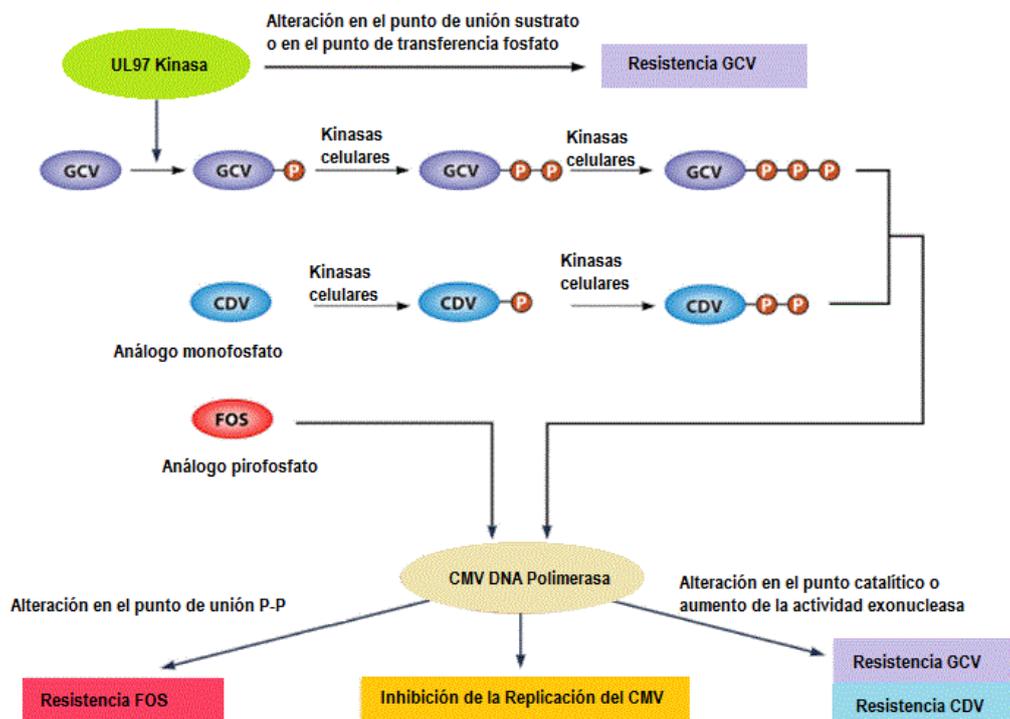


Figura 17. Lugar de acción y genes involucrados en la resistencia genotípica del CMV los diferentes fármacos antivirales (ref 274).

4.7 Inmunoterapia celular

La respuesta inmune celular frente a CMV mediada por linfocitos T CD8 citotóxicos es la principal implicada en la eliminación del virus. En el post-TPH se produce la reactivación del CMV latente en un momento en el que la reconstitución de linfocitos aún no ha tenido lugar. Multitud de estudios han demostrado la factibilidad de realizar infusión de linfocitos T CD8 efectores con eficacia en el control de la infección, asociado siempre a tratamiento antiviral (ref 283-289). Aunque es una estrategia atractiva por haber demostrado su eficacia sin toxicidad asociada, existen varias limitaciones: la producción es costosa y requiere tiempo; esta estrategia pierde su eficacia en pacientes que reciben corticoterapia (para quienes supone una contraindicación). Existen 2 modalidades de inmunoterapia anti-CMV:

1.- Realizar linfoaféresis a un donante seropositivo que puede ser emparentado o no emparentado ("Third Party") con el paciente, pero que presentan cierta compatibilidad HLA, al menos en uno o dos alelos (HLA A, B). Si no existe esta mínima identidad HLA, no se produce el reconocimiento del antígeno viral por el linfocito T CD8 (a través del TCR). Estos linfocitos se someten *in vitro* a una estimulación antigénica repetida (habitualmente con antígenos pp65 e IE-1) con la intención de crear una población de linfocitos T CD8+ específicos frente al CMV y con capacidad efectora. Una vez conseguida la población, proceso que dura aproximadamente 3-4 semanas, se procede a la infusión de estas células por vía endovenosa al paciente.

2.- A partir de un donante seropositivo, se realiza linfoaféresis y posteriormente una selección positiva de la población de linfocitos T CD8+/IFN γ +, presentes en ese momento en el donante.

Posteriormente, sin manipulación previa ni estimulación *in vitro*, se procede a su administración endovenosa en el paciente para que una vez esta población entre en contacto con el virus en el interior del organismo del paciente (*in vivo*), se produzca la expansión clonal con la estimulación *in vivo* de la población infundida.

Principal limitación es el elevado coste y laboriosidad del procedimiento. Está contraindicado en pacientes que realizan tratamiento con corticoides. La indicación de esta terapia celular queda circunscrita a situaciones especiales: imposibilidad para tratamientos antivirales por toxicidad, mutaciones que confieren resistencia a antivirales o fracaso terapéutico de los fármacos antivirales (ref 283-289).

En las últimas décadas se ha experimentado diferentes técnicas de terapia celular adoptiva para mejorar la eficacia de la misma y la accesibilidad. En la actualidad continúa siendo un campo en estudio (experimental) y no disponible en la mayoría de los centros de TPH.

En el momento actual, existe la intención de crear "bancos" de linfocitos que contengan la mayoría de alelos HLA para acortar los tiempos de producción y para que, a poder ser, todos los pacientes que precisen de este tratamiento puedan recibirlo (ref 290).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS TRABAJO 1:

La administración de corticoides a altas dosis influye en la incidencia de infección por CMV. El impacto del efecto inmunosupresor debida a la administración de corticoides a dosis altas sobre la infección por CMV en un paciente sometido a TPH, es diferente según el estado de inmunización CMV pre-TPH. Su conocimiento puede ayudar a controlar mejor la infección y a disminuir la morbilidad asociada a la misma. La administración de corticoides a altas dosis altera la reconstitución inmune CMV-específica.

HIPÓTESIS TRABAJO 2

En presencia de síntomas gastrointestinales la detección de citomegalovirus (CMV) en tejido gastrointestinal, mediante PCR cuantitativa, debería ser igual de útil que la IHQ, considerada la técnica *“gold estándar”* en el diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV. Dado que la PCR-RT es más rápida y objetiva, permitiría establecer un diagnóstico fiable y precoz, lo que beneficiaría al paciente.

HIPÓTESIS TRABAJO 3

La ciclofosfamida post-TPH influye de manera diferente sobre la cronología y el modo de presentación de la infección por CMV, sobre la respuesta al tratamiento anticipado y sobre la incidencia de enfermedad por CMV, provocando un cambio en la epidemiología de este virus en el TPH.

OBJETIVOS

OBJETIVOS TRABAJO 1:

- 1.- Analizar el efecto de la administración de corticoides a altas dosis sobre la incidencia de infección, enfermedad e infección recurrente por CMV en el TPH.
- 2.- Analizar el efecto de los corticoides a altas dosis sobre la epidemiología del CMV según los diferentes estados serológicos de CMV del donante y el receptor para riesgo de infección por CMV definidos por la serología CMV pre-TPH de donante y receptor.
- 3.- Analizar el efecto de la administración de corticoides a altas dosis sobre la reconstitución inmune global y la respuesta inmune CMV-específica

OBJETIVOS TRABAJO 2:

- 1.- Definir la utilidad de la PCR-RT de CMV en tejido intestinal para el diagnóstico de enfermedad por CMV.
- 2.- Comparar la técnica de PCR-RT con las técnicas utilizadas hasta ahora para el diagnóstico de enfermedad intestinal por CMV (inmunohistoquímica y cuerpos de inclusión), en términos de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo.
- 3.- Definir un punto de corte, medido en número de copias de DNA viral, que indique el diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV de manera fiable de acuerdo a las nuevas definiciones de enfermedad gastrointestinal por CMV.

OBJETIVOS TRABAJO 3

- 1.- Analizar el efecto de la administración de la Ciclofosfamida post-TPH como profilaxis de EICR sobre la epidemiología y presentación de la infección por CMV en el TPH.
- 2.- Analizar el efecto de este fármaco sobre la incidencia de infección, infección recurrente y enfermedad por CMV.
- 3.- Analizar la incidencia de resistencias, tanto clínicas como biológicas, al tratamiento antiviral en los pacientes que recibieron CyPT como profilaxis de EICR.

RESULTADOS



Deleterious Effect of Steroids on Cytomegalovirus Infection Rate after Allogeneic Stem Cell Transplantation Depends on Pretransplant Cytomegalovirus Serostatus of Donors and Recipients



María Suárez-Lledó^{1,*}, Núria Martínez-Cibrián¹, Gonzalo Gutiérrez-García¹, Veselka Dimova-Svetoslavova², Ma Angeles Marcos², Beatriz Martín-Antonio^{3,4}, Alejandra Martínez-Trillos¹, Neus Villamor^{3,5}, Laura Rosiñol^{1,3}, Carmen Martínez^{1,3,4}, Francesc Fernández-Avilés^{1,3,4}, Carolina García-Vidal⁶, Álvaro Urbano-Ispizua^{1,3,4}, Montserrat Rovira^{1,3,4}

¹ Hematology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

² Clinical Microbiology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

³ Institut d'Investigació Biomèdica August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Institut Josep Carreras, Barcelona, Spain

⁵ Hematopathology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

⁶ Infectious Diseases Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

Article history:

Received 22 February 2018

Accepted 1 May 2018

Key Words:

Steroids

CMV infection

CMV-specific immune response

Allo-SCT

CMV Serology

ABSTRACT

This study examined the impact of prednisone (PDN) on cytomegalovirus (CMV) infection after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) according to donor and recipient CMV serostatus. Seventy-five patients underwent allo-SCT from June 2010 to July 2012. The risk of CMV infection according to donor and recipient serostatus was defined as follows: high risk (HR; D-/R+), intermediate risk (IR; D+/R+ and D+/R-), and low risk (D-/R-). Forty-five patients (60%) developed CMV infection, and 46 patients (61%) received steroids (PDN \geq 1 mg/kg/day) to treat acute graft-versus-host disease. CMV infection was more common in those treated with steroids than in those not treated with steroids (70% versus 44%, respectively, $P < .05$). Overall, 40% of patients had recurrent CMV infection (50% PDN versus 24% no PDN, $P < .05$). Steroids had no impact on the incidence of CMV infection or its recurrence in HR patients; however, steroids did prolong the need for antiviral treatment. The incidence of CMV infection in IR patients was higher in those receiving PDN (80% PDN versus 41% no PDN, $P = .01$); recurrence rates were also higher (55% PDN versus 18% no PDN, $P = .02$). We analyzed CMV-specific immune reconstitution in the first 22 patients of the series and observed that patients on steroids had lower levels of CMV-specific lymphocytes TCD8 ($P < .05$ on days +60, +100, and +180) and that CMV-specific immune reconstitution (defined as lymphocytes CD8/IFN \geq 1 cell/ μ L) was achieved later (after day +100 post-SCT) in the steroid group.

© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection is an important complication after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT), with an estimated incidence of 40% to 70%; however, the introduction of preemptive therapy has reduced the rate of mortality to 2% [1–4]. However, CMV infection is associated with high morbidity related to antiviral treatment and to the CMV infection itself; both cause myelosuppression and associated infections [5]. Moreover, recurrent CMV infection is common (about 40%

of cases), and almost 9% of allo-SCT patients are diagnosed with CMV disease. Therefore, reducing morbidity related to CMV is important because many patients undergoing allo-SCT are fragile due to transplant-related toxicity and associated complications, particular graft-versus-host disease (GVHD) [6].

The main risk factor for CMV infection is pre-allo-SCT donor and recipient CMV immune serostatus, particularly for those receiving an unrelated-donor transplant and myeloablative conditioning regimens [7]. Other risk factors associated with CMV infection are due to severe immunosuppression and include prolonged lymphocytopenia and acute GVHD [8–10]. Nearly 50% of allo-SCT recipients develop acute GVHD, for which the first-line therapy is high-dose steroids. Evidence supports the importance of an adequate CMV-specific immune

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 2092.

* Correspondence and reprint requests: María Suárez-Lledó, MD, Hematology Department, Hospital Clínic Barcelona, Carrer Villarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. (M. Suárez-Lledó).

E-mail address: msuarez@clinic.cat (M. Suárez-Lledó).

<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.05.001>

1083-8791/© 2018 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

reconstitution to control CMV infection (mediated by CD8⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes) [11–19]. However, the influence of steroids on CMV-specific immune reconstitution and its correlation with CMV infection risk is unclear. The impact of steroids on CMV infection, along with CMV disease, CMV clinical follow-up, and recurrent infection, has not been studied.

Therefore, the aim of this study was to better understand how the dynamics of CMV infection affect its incidence and evolution and CMV-specific immunity in allo-SCT patients, focusing on the impact of high-dose steroids as treatment of acute GVHD. Identifying these risk factors may help us to improve treatment and also to define the length of the antiviral treatment for CMV infection and reduce the related morbidity.

METHODS

The study was conducted at Hospital Clínic in Barcelona. All consecutive patients who underwent an allo-SCT from June 2010 to July 2012 were included. All patients were prospectively recruited and followed. Demographic characteristics, SCT type, CMV serostatus, conditioning regimen, source of stem cells, GVHD prophylaxis, CMV infection, CMV disease, and CMV recurrence were recorded. Global and CMV-specific immune reconstitution analyses were performed in a group of 22 patients at +30, +60, +100, and +180 days after allo-SCT. The study was approved by the Ethic Committee of the Hospital Clínic of Barcelona and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent.

Definitions

CMV infection was defined as a CMV DNA viral load (in blood samples) > 1000 IU/mL as detected by PCR. CMV disease was defined as signs and symptoms of organ damage and detection of CMV in affected tissue (by immunohistochemistry) obtained by endoscopic biopsy [20]. Clinical follow-up of CMV infection was performed to measure the number of days post-SCT to CMV infection, the CMV viral load on day 1 (copies/mL), and the number of days of antiviral treatment. CMV recurrent infection was defined as new detection of CMV infection in a patient who has had previously documented infection and who has not had virus detected for an interval of at least 4 weeks during active surveillance [20,21]. High-dose steroid was defined as ≥ 1 mg/kg/day corticosteroids for at least 14 days. According to donor/recipient CMV serostatus, patients were classified as high risk (HR; donor's CMV serology was negative and the recipient's CMV was positive [D–/R+]), intermediate risk (IR; donor's CMV serology was positive and recipient's was either positive or negative [D+/R+ and D+/R–]), and low risk (LR; donor's CMV serology was negative and recipient's was also negative [D–/R–]).

Microbiologic Assessment

CMV serostatus (IgG CMV) before allo-SCT was assessed in all donors and recipients. Quantitative PCR (Q-CMV Real Time Complete Kit; Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Italy) was used to detect CMV infection in plasma and was carried out in the Microbiology Department. All patients were monitored weekly for CMV infection during the first 6 months or while under immunosuppressive treatment and twice a week if they developed GVHD or were on steroids. All patients received prophylactic treatment with high-dose acyclovir until day +100. Prophylactic treatment for HR patients was acyclovir given at a high dose (500 mg/m² every 8 hours) and for IR patients was low-dose acyclovir (250 mg/m² every 12 hours). Preemptive treatment was started when CMV DNA (PCR) reached >1000 IU/mL. Ganciclovir or valganciclovir were the first-line drugs, whereas foscarnet was used for patients with neutropenia and/or thrombocytopenia. Initial treatment duration was 14 days if PCR became negative. If CMV PCR remained positive, treatment was administered until the PCR became negative.

Immunologic Assessment

Quantification of T CD8⁺CD4⁺ lymphocytes that release IFN- γ in the presence of CMV

Mononuclear cells were isolated from heparinized peripheral blood using Ficoll and then cryopreserved until further analysis. Once thawed, cells were stimulated with pp65 peptide and IE-1 (6 μ L each; these are overlapping 15-mer peptides obtained from JPT Peptide Technologies [Berlin, Germany]) that were reconstituted at 1 μ L/peptide/mL).

After addition of co-receptors CD28 and CD49d, BrefeldinA was added and cells were incubated at 37°C for 6 hours. Then, anti-IFN- γ (FITC), anti-CD69 (PE), anti-CD8 (Per-CP-Cy5.5), and anti-CD3 (APC) monoclonal antibodies were added (all were provided in the FastImmune 4-color kit; BD Biosciences), according to the manufacturer's recommendations. Stained cells were analyzed using a FACSCanto cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), and 10,000 total events (1000 CD69⁺ events) were acquired. Finally, the CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocyte populations within the total

lymphocyte were assessed and the results were expressed as absolute number (cells/ μ L). Thus, it was possible to measure the number of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes that produced IFN- γ after exposure to CMV. This should reflect the CMV-specific immune response. A count of >1 cell/ μ L was considered a positive response [22,23].

Global immune reconstitution analysis

Mononuclear cells were isolated from EDTA-anticoagulated peripheral blood using Ficoll and cryopreserved before further analysis. Once thawed at 37°C, B lymphocytes (CD45⁺/CD19⁺) and natural killer cells (CD3⁺/CD56⁺) were identified using anti-CD45 (APC), anti-CD19 (FITC), anti-CD3 (PerCP), anti-CD56 (PE) monoclonal antibodies (all from BD Biosciences). CD8 and CD4 lymphocytes were identified using anti-CD45 (APC), anti-CD3 (PerCP), anti-CD8 (FITC), and anti-CD4 (PE) monoclonal antibodies (all from BD Biosciences). Flow cytometry was performed using a FACSCanto cytometer (BD Bioscience).

Statistical Analysis

Patients were divided into 2 groups: those treated with steroids (steroid group) and those not treated with steroids (nonsteroid group). The following variables were analyzed: CMV infection rate, CMV disease, clinical follow-up of CMV infection, CMV recurrence, and CMV-specific immune reconstitution. Quantitative variables were reported as the median (interquartile range) and categorical variables as absolute numbers (percentages). The chi-square or Fisher's exact test was used to compare categorical variables, and Student's *t*-test or the nonparametric Mann-Whitney *U* was used to assess continuous and quantitative parameters. The level of significance was set at *P* < .05. All statistical analyses were performed using SPSS version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Over the study period, 75 consecutive adults who underwent allo-SCT were evaluated. Patient- and transplant-related characteristics are summarized in Table 1.

Forty-five of 75 patients (60%) developed CMV infection. The median time to CMV infection was +45 days (range, +20 to +84) after allo-SCT. Ganciclovir or valganciclovir was the first-line treatment for 93% of patients, whereas foscarnet was administered to 17% of patients. CMV disease was diagnosed in 7 of 75 patients (9%). All had gastrointestinal involvement, as assessed by clinical features (diarrhea, bleeding, abdominal pain) and by immunohistochemical detection of CMV in gastrointestinal biopsies. Thirty patients (40%) experienced CMV recurrence, with a median number of 3 episodes (range, 2 to 5) per patient.

Table 2 details the relationship between donor/recipient pre-allo-SCT serostatus and CMV infection, CMV disease, and CMV recurrence. HR patients had a higher incidence of CMV infection than IR patients (88% versus 62%, *P* < .05); similar results were observed in terms of recurrent infections (64% versus 38% *P* < .05). Thirteen of 75 patients included in the study belonged to the LR patients group, and none of them developed CMV infection. In our series conditioning regimen, GVHD prophylaxis, mismatched HLA donor, and antithymocyte globulin did not have significant effect on the incidence of CMV infection or recurrence.

Effect of Steroids on CMV Infection

Forty-six of 75 patients (61%) received high-dose steroids, all for acute GVHD. Patients in the steroid group had a higher incidence of CMV infection than those in the nonsteroid group (32/46 [70%] versus 13/29 [44%], respectively; *P* < .05). There was no significant differences in CMV disease between the groups (5/46 [11%] versus 2/29 [7%]).

There were no differences in the median number of days post-SCT to CMV infection (45 versus 46, *P* = .69), in the median CMV viral load on the first day of CMV infection (4084 IU/mL versus 3600 IU/mL, *P* = .64), or the median maximal CMV viral load (9792 IU/mL versus 5721 IU/mL, *P* = .96) between the steroid group and the nonsteroid group, respectively. Patients in

Table 1
Patient- and Transplant-Related Characteristics

	Total	Steroid	No Steroid
Patients	75	46 (61)	29 (39)
Male/female	45/30	25/21	20/9
Median age, yr (range)	48 (18-66)	45 (18-66)*	57 (20-66)*
SCT type			
Sibling HLA identical	30 (40)	15 (32)	15 (52)
UNR matched	29 (39)	21 (46)	10 (34)
UNR mismatched	16 (21)	10 (22)	4 (14)
CMV serostatus donor/recipient			
HR (D-/R+)	25 (33)	18 (39)	7 (24)
IR (D+/R+ and D+/R-)	37 (50)	20 (43)	17 (58)
LR (D-/R-)	13 (17)	8 (17)	5 (17)
Conditioning regimen			
Myeloablative	29 (39)	21 (45)	8 (28)
Cy/TBI	25 (33)	19 (41)	6 (21)
Bu/Cy	1 (2)	1 (2)	0
BEAM	3 (4)	1 (2)	2 (7)
Nonmyeloablative	46 (61)	25 (55)	21 (72)
Fludarabine/melphalan	17 (22)	11 (25)	6 (20)
Fludarabine/busulfan	15 (20)	7 (15)	8 (27)
Ida-FLAG/melphalan	12 (16)	7 (15)	5 (17)
Fludarabine/TBI	2 (3)	0	2 (7)
Source of stem cells			
Peripheral blood	68 (91)	41 (90)	27 (94)
Bone marrow	4 (5)	3 (6)	1 (3)
Cord blood	3 (4)	2 (4)	1 (3)
GVHD prophylaxis			
Cyclosporine A/methotrexate	26 (35)	16 (35)	10 (34)
Cyclosporine A/mycophenolate	49 (65)	28 (65)	21 (66)
With ATG	14 (19)	10 (23)	4 (13)

Values are n (%) unless otherwise defined. UNR indicates unrelated donor; UNR mismatched, 7/8 when differences were on HLA-A, -B, -C, or -DR; Cy, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; BEAM, BCNU (carmustine), etoposide, cytarabine, melphalan; Ida-FLAG, idarubicin, fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor; ATG, antithymocyte globulin (rabbit). ATG was used in UNR mismatched and cord blood.

* $P < .05$.

Table 2
Relationship Between Donor/Recipient Pre-Allo-SCT Serostatus and CMV Infection, CMV Disease, and CMV Recurrence

	HR (n=25)	IR (n=37)	LR (n=13)
CMV infection n=45	22 (88)	23 (62)	0 (0)
CMV GI disease n=7	3 (12)	4 (11)	0 (0)
CMV recurrence n=30	16 (64)	14 (38)	0 (0)

Values are n (%). GI indicates gastrointestinal.

the steroid group required longer antiviral treatment than those in the nonsteroid group (median, 21 days [range, 14 to 40] versus 14 days [range, 14 to 21]; $P < .05$). Finally, patients in the steroid group experienced more recurrence of CMV infection than those in the nonsteroid group (23/46 [50%] versus 7/29 [24%], respectively; $P < .05$).

In steroid group CMV infection always occurred after steroid treatment was started. Median time from steroid treatment to CMV infection was 16 days (range, 4 to 40). For HR patients the median time was 12.5 days (range, 4 to 30) and for IR patients, 18 days (range, 4 to 40).

Table 3 compares CMV infection, CMV disease, CMV clinical follow-up, and CMV recurrence rates between HR and IR patients in the steroid and nonsteroid groups according to donor/recipient CMV serostatus. Significant differences in the incidence of CMV infection and recurrence were observed only

in IR patients (a higher incidence of CMV infection and recurrence was observed in the steroid group). For HR patients with CMV infection, those in the steroid group required more days of antiviral treatment to resolve the infection than those in the nonsteroid group. Eleven patients required a second-line treatment due to a lack of response (2 patients) or toxicity to first-line treatment (9 patients); all were in the steroid group.

Effect of Steroids on CMV-Specific Immune Response

A total of 22 prospective patients were included in the analysis (14 patients in the steroid group and 8 patients in the nonsteroid group).

Global immune reconstitution analysis

Patients in the steroid group had fewer B lymphocytes at day +100 post-SCT than those in the nonsteroid group (median B lymphocyte count, 235 cells/ μ L versus 1.55 cells/ μ L, respectively; $P = .004$). No significant differences between groups were observed at day +180 post-SCT in B lymphocyte counts. There were no significant differences in the CD8 cell counts at day +100 among patients in the steroid group and nonsteroid group (median CD8 T cells, 10.5 cells/ μ L versus 20.25 cells/ μ L) and day +180 post-SCT (median CD8, 44 cells/ μ L versus 24 cells/ μ L), and cell counts were normal. Similar results were found for CD4 lymphocyte counts at +100 days post-SCT (median CD4, 15.15 cells/ μ L versus 18.95 cells/ μ L) and +180 days post-SCT (median CD4, 11.25 cells/ μ L versus 20.5 cells/ μ L). No differences were found in natural killer lymphocyte counts (Table 4).

Reconstitution of CMV-specific CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes after SCT is shown in Figure 1. As expected, no CMV-specific immune response were detected at +30 and +60 days post-SCT because of the lack of lymphocyte recovery (which takes place for up to 2 months post-SCT). Patients in the steroid group had fewer CMV-specific CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes at all stages after allo-SCT than patients in the nonsteroid group ($P < .05$). Reconstitution of CMV-specific CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes was observed at +100 days post-transplantation in the nonsteroid group and at +180 days post-transplantation in the steroid group ($P = .01$).

CMV-specific immune response in HR and IR patients according to study groups are shown in Figure 2. Patients in the nonsteroid group had greater numbers of CMV-specific CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes than patients in the steroid group, although the results were not statistically significant because of the low number of patients (we observed significant differences only in CD8⁺/IFN- γ ⁺ and CD4⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes in HR patients at +100 days post-SCT; $P = .05$). As expected, no CMV-specific immune responses were detected in LR patients.

DISCUSSION

Previous immune status of donor and/or recipient against CMV remains the main risk factor for CMV infection after allo-SCT. Thus, patients were classified into 3 groups according to their risk of CMV infection: HR (D-/R+), IR (D+/R+ and D+/R-), and LR (D-/R-). Here, we found that the incidence of CMV infection differed according to serologic status, ranging from 88% in HR patients to 62% in IR patients and 0% in LR patients ($P = .023$). Steroids are another well-known factor that affects CMV infection. However, our most prominent finding was that steroids did not influence the incidence of CMV infection in HR. By contrast, steroid administration significantly increased the incidence of CMV infection in IR patients.

Table 3

CMV Infection, CMV Disease, CMV Clinical Follow-Up, and CMV Recurrence in Steroid Group and Nonsteroid Group in HR and IR Patients According to Donor/Recipient CMV Serostatus

	Steroid	Nonsteroid	P
HR patients (n = 25)	18	7	
CMV infection (n = 22)	16 (89)	6 (86)	.58
CMV disease (n = 3)	2 (11)	1 (14)	.58
Clinical follow-up of CMV infection			
Median days post-SCT to CMV infection (range)	46 (21-83)	44 (28-34)	.76
Median viral load on day 1 of CMV infection, UI/mL (range)	5797 (1076-907,780)	4660 (1000-8800)	.76
Median maximum viral load, UI/mL (range)	10,800 (1200-907,780)	6220 (1000-96,000)	.64
Days of antiviral treatment	21	14	.03
CMV recurrence (n = 16)	12 (66)	4 (57)	.54
IR patients (n = 37)	20	17	
CMV infection (n = 23)	16 (80)	7 (41)	.015
CMV disease (n = 4)	3 (16)	1 (5)	.32
Clinical follow-up of CMV infection			
Median days post-SCT to CMV infection (range)	45 (20-67)	44 (36-64)	.75
Median viral load on day 1 of CMV infection, UI/mL (range)	3566 (1000-80,000)	3360 (2000-376,000)	.31
Median maximum viral load, UI/mL (range)	6272 (1000-80,000)	3360 (2400-376,000)	.43
Days of antiviral treatment	14	14	.35
CMV recurrence (n = 14)	11 (55)	3 (18)	.02

Values are n (%) unless otherwise defined.

Any factor that increases immunosuppression, such as GVHD, steroids, lymphocytopenia, or T cell depletion, represents an additional risk factor for CMV infection. We confirmed that high-dose steroids increases the risk of CMV infection, as well as its recurrence. Of interest, we found that the influence of steroids on the risk of CMV infection impacts mainly IR patients. Thus, IR patients in the steroid group had a higher incidence of CMV infection than those not receiving steroids ($P < .05$). By contrast, in HR patients CMV infection rate was similar in both study groups and was not influenced by steroid treatment. To the best of our knowledge, these data have not been published previously.

Immune reconstitution after allo-SCT begins with innate immunity reconstitution over the first month. Reconstitution of CD8⁺ and CD4⁺ T cells and B lymphocytes begins within the second month and progresses until the third month; for this reason some groups recommend CMV prophylaxis with high-dose acyclovir until day +100 [2-4]. The CMV-specific immune reconstitution study allowed us to confirm that CMV-specific immunity was not detected in any patient, at days +30 and +60

after allo-SCT. This is probably because CD4/CD8 lymphocyte reconstitution takes place after the second month after allo-SCT [8,24,25]. Steroids might affect the host immune response to CMV via complex immunosuppressive effects, including lymphopenia, CD4 depletion, impaired immune cell cytotoxicity, or Th1/Th2 dysregulation of T helper cells [26-28]. Here, we show that patients on steroids had low numbers of CD8⁺/IFN⁺ lymphocytes, although the number of total lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺) in the peripheral blood was normal, suggesting that steroids may have a direct effect on CMV-specific immune responses.

These findings may have therapeutic implications with respect to the application of support measures: All HR patients and IR patients on steroids should receive similar prophylactic treatment. To reduce the incidence of CMV recurrence, a good option may be to maintain antiviral treatment after induction therapy while the patient is on steroids. Measurement of CMV-specific immunity may be useful to adapt the length of the antiviral treatment, so that antiviral treatment can be stopped if CMV-specific immunity is detected. Finally, patients on

Table 4

Global Immune Reconstitution Assay

	Total CD8 Lymphocytes						Total CD4 Lymphocytes					
	+100 Days Post-SCT			+180 Days Post-SCT			+100 Days Post-SCT			+180 Days Post-SCT		
	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P
Median	10.5	20.25	.19	44	24	.02	15.15	18.95	.40	11.25	20.5	.01
Range	2-35	7.5-47.5		28.5-57	6.5-36.5		1.5-48.5	13.4-23.5		8-14	17.5-27.5	
	Total B Lymphocytes						Total Natural Killer Lymphocytes					
	+100 Days Post-SCT			+180 Days Post-SCT			+100 Days Post-SCT			+180 Days Post-SCT		
	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P	Steroid	No Steroid	P
Median	.235	1.55	.004	1.3	3.5	.32	7.25	8.47	.30	6.75	6	.38
Range	.03-1.1	.62-2.4		.3-2	.6-17		3.5-34.5	7.3-15.6		5.8-13	2-8.2	

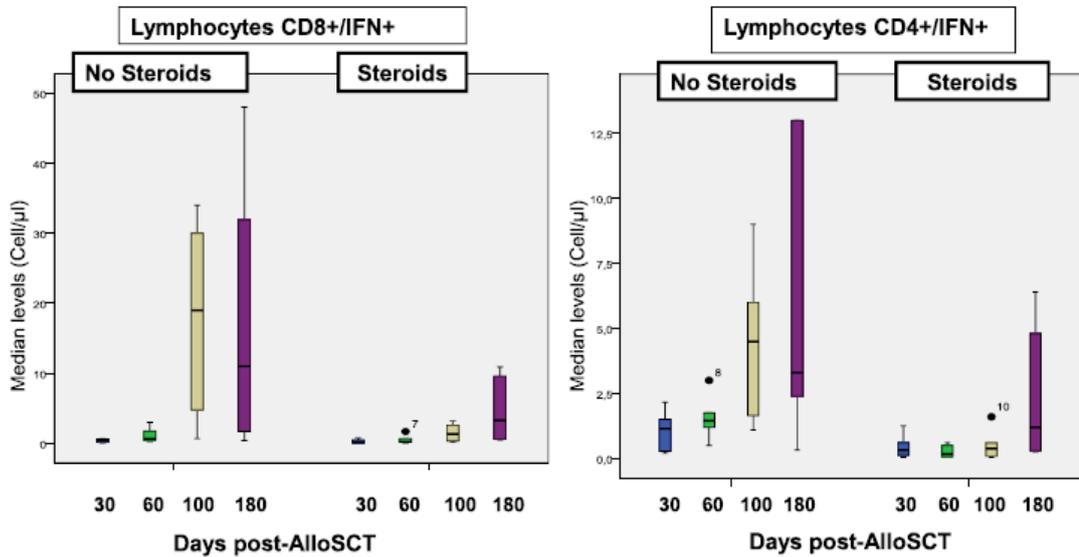


Figure 1. Post-SCT CMV-specific lymphocyte levels in both study groups.

steroids with uncontrolled CMV viral load, CMV recurrence, or antiviral toxicity would be candidates for immunotherapy with infusion of CMV-specific lymphocytes. In this case steroids should be stopped to enhance efficacy. The biggest limitation of this study is the relatively small sample size, and therefore these results should be confirmed in a larger series of patients.

In conclusion, IR patients receiving steroids experienced the same rate of CMV infection as HR patients. Patients on steroids had lower numbers of CMV-specific lymphocytes but

similar numbers of CD8 lymphocytes than patients not receiving steroids. This finding suggests that steroids may have a direct impact on CMV-specific immune reconstitution, which may explain the increased risk of CMV infection in IR patients on steroids.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the “Emili letang” scholarship program of the Hospital Clinic of Barcelona and the Institut Josep Carreras for their support during the period June 2010 to June 2011.

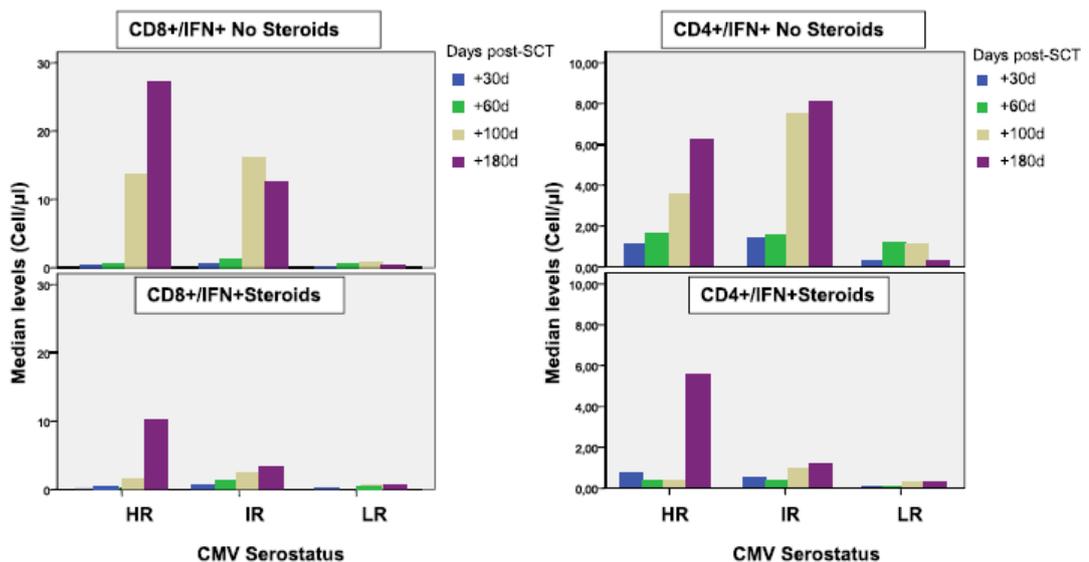


Figure 2. Post-SCT CMV-specific lymphocyte levels according to CMV serostatus in both study groups.

Financial disclosure: The authors have nothing to disclose.
Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

REFERENCES

- Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Review. Bone Marrow Transplant.* 2008;42:570–572.
- Ljungman P, Reusser P, De la Cámara R, et al. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:1075–1081.
- Ljungman P, De la Cámara R, Cordonnier C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with haematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:227–240.
- Boeckh M, Ljungman P. How we treat CMV in hematopoietic cell transplant recipients? *Blood.* 2009;113:5711–5719.
- Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood.* 1997;90:2502–2508.
- Einsele H, Mielke S, Grigoleit GU. Diagnosis and treatment of cytomegalovirus 2013. *Curr Opin Hematol.* 2014;21:470–475.
- Ljungman P, Brand R, Hoek J, et al. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis.* 2014;59:473–481.
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1143–1238.
- Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011;25:151–169.
- Zaia JA. *Cytomegalovirus Infection.* Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation, 4th ed Blackwell; 2009.
- Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B, et al. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74B:211–220.
- Avetisyan G, Aschan J, Häggglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:865–869.
- Eid AJ, Brown RA, Hogan WJ, et al. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2009;11:519–528.
- 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 transplantation and immune control of viral infection. *Haematologica.* 2008;93:248–256.
- Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R, et al. Immune monitoring with iTAg MHC tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood.* 2010;116:1655–1662.
- Gratama JW, van Esser JWJ, Lamers GHJ, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood.* 2001;98:1358–1364.
- Jaskula E, Dlubek D, Duda D, Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Lange A. Interferon gamma 13-CA-repeat homozygous genotype and low proportion of CD4+ lymphocytes are independent risk factors for cytomegalovirus reactivation with high number of copies in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1296–1305.
- Moss P, Khan N. CD8+ T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol.* 2004;65:456–464.
- Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJG, Carmichael AJ. Identification of naïve or antigen-experienced human CD8+ T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8+ T cell response. *J Immunol.* 2002;168:5455–5464.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1094–1097.
- Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2017;64:87–91.
- 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.* 2009;45:543–549.
- Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active infection. *J Med Virol.* 2010;82:1208–1215.
- Pourghaysari B, Piper KP, McLarnon A, et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:853–861.
- Zhou W, Longmate J, Lacey SF, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood.* 2009;113:6465–6476.
- Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, et al. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. *Int J Hematol.* 2010;91:877–885.
- Pastore D, Delia M, Mestice A, et al. Recovery of CMV-specific CD8+ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;17:550–557.
- Lacey SF, Diamond DJ, Zaia JA. Assessment of cellular immunity to human cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:433–447.

7.1. Trabajo número 1

El primer trabajo trata sobre los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de infección por CMV. El haber estado en contacto con el CMV antes del TPH, evidenciada por la seropositividad para el CMV pre-TPH en el paciente y sobre todo, cuando existe disparidad de serologías entre donante y receptor (donante negativo y receptor positivo), es el principal factor de riesgo para presentar infección por CMV. La inmunosupresión es otro factor de riesgo bien conocido que favorece la reactivación del virus. El TPH proporciona un estado de inmunosupresión severa secundaria a los fármacos inmunosupresores que recibe el paciente, a la deficitaria reconstitución inmune post-TPH y a la presencia de EICR sobre todo por su tratamiento, corticoides a altas dosis. Alrededor del 50% de los pacientes que reciben un TPH desarrollan una EICR, cuya primera línea de tratamiento son los corticoides a altas dosis. La adecuada reconstitución inmune CMV-específica es fundamental para el control de la infección por CMV.

El estudio plantea que los corticoides a altas dosis aumentan el riesgo de infección por CMV y pretende estudiar el efecto de dichos corticoides en la infección por CMV según el riesgo serológico de donante y receptor. Además, conocer el efecto de los corticoides sobre la reconstitución inmune CMV específica post-TPH. Ello ayudaría a individualizar las estrategias de profilaxis y tratamiento de acuerdo al riesgo que presenta cada paciente.

Las definiciones de infección, infección recurrente y enfermedad por CMV así como la estratificación de los pacientes por grupos de riesgo de infección según las serologías de CMV de donante y receptor (alto, intermedio y bajo) están de acuerdo a las definiciones internacionales, que se utilizan de manera estándar (definidas en el apartado 4.2 y 4.3).

Para la medición de la inmunidad CMV-específica, se realizó mediante citometría de flujo, la cuantificación de los linfocitos T CD8 y CD4 productores de IFN γ tras estimulación con antígenos virales del CMV (ver apartado 4.4.4. Monitorización inmunológica, técnica b). De esta manera, se realizó una medición de la respuesta citotóxica del linfocito T frente al antígeno viral, dado que la producción de IFN γ sólo ocurre cuando el linfocito T CD8 efector ejerce su capacidad citolítica. Esta capacidad efectora actúa contra el CMV porque la muestra ha sido expuesta exclusivamente a antígenos del CMV. Para obtener el valor absoluto de linfocitos T CD8+/IFN γ +, se calcula el porcentaje obtenido a partir de los linfocitos absolutos presentes en la analítica del día de la extracción de la muestra. Se realizó también un estudio de reconstitución inmune global (+100 y +180 días) por citometría de flujo.

Se analizaron 75 pacientes que realizaron un TPH en nuestro centro durante el periodo 2010-2012. Para el análisis del efecto de los corticoides sobre la infección por CMV se dividieron en 2 grupos: aquellos pacientes que recibieron corticoides a altas dosis (PDN > 1 mg/kg/día durante > 14 días) y los que no recibieron corticoides. Se analizó la incidencia de infección, infección recurrente, enfermedad y evolución clínica de la infección por CMV.

La incidencia de infección por CMV de acuerdo al riesgo serológico fue del 88% en los pacientes de alto riesgo, 62% en los de riesgo intermedio y de 0% en los de bajo riesgo. Los pacientes que recibieron tratamiento con corticoides presentaron una incidencia superior de infección por CMV (70% vs 44%) y de infección recurrente por CMV (50% vs 24%) que aquellos que no recibieron corticoides ($p < 0,05$). En el análisis por subgrupos según las serologías de

CMV pre-TPH, el tratamiento con corticoides no tuvo impacto en la incidencia de infección, infección recurrente y enfermedad por CMV en los pacientes de alto riesgo pero sí necesitaron más días de tratamiento antiviral para resolver la infección (21 días vs 14 días). En los pacientes de riesgo intermedio, los que recibieron corticoides presentaron mayor incidencia de infección por CMV (80% vs 41%, $p=0,015$) y de infección recurrente (55% vs 18%, $p=0,02$). La mediana de tiempo entre el inicio del tratamiento con corticoides y el desarrollo de infección por CMV fue de 16 días (12,5 días en los de alto riesgo vs 18 días los de riesgo intermedio).

El análisis de reconstitución inmune CMV-específica mostró que no se detecta inmunidad CMV-específica durante los primeros 2 meses en ningún paciente (determinaciones de los días +30 y +60 post-TPH). Los pacientes que recibieron corticoides presentaron niveles más bajos de linfocitos T CD8+/IFN γ + y de linfocitos CD4+/IFN γ +. Además la reconstitución inmune CMV-específica se detectó más tarde en aquellos pacientes que recibieron corticoides (+180 días vs +100 días post-TPH). En el análisis de reconstitución inmune global, no hubo diferencias en los niveles de linfocitos T CD8+, CD4+ y NK (días +100 y +180 post-TPH) entre los pacientes que tomaban corticoides y los que no. Los niveles de linfocitos B fueron más bajos en el día +100 post-TPH en los pacientes que recibieron corticoides ($p=0,04$).

En el apartado de “Discusión” se explica la relevancia de estos hallazgos así como las conclusiones más relevantes del estudio.



ELSEVIER

Biology of Blood and Marrow Transplantation

journal homepage: www.bbmt.org

Quantitative PCR Is Faster, More Objective, and More Reliable Than Immunohistochemistry for the Diagnosis of Cytomegalovirus Gastrointestinal Disease in Allogeneic Stem Cell Transplantation

María Suárez-Lledó^{1,*}, María Ángeles Marcos^{2,3,4}, Miriam Cuatrecasas^{3,5}, Josep Antoni Bombi^{3,5}, Francesc Fernández-Avilés^{1,3,6}, Laura Magnano¹, Núria Martínez-Cibrián¹, Noemi Llobet¹, Laura Rosiñol^{1,3,6}, Gonzalo Gutiérrez-García^{1,3}, Sofía Jorge¹, Carmen Martínez^{1,3,6}, Montserrat Rovira^{1,3,6}, Álvaro Urbano-Ispizua^{1,3,6}

¹ Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Hematology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

² Clinical Microbiology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

³ Institut d'Investigació Biomèdica August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ University of Barcelona, Institute for Global Health (ISGlobal), Barcelona, Spain

⁵ Pathology Department, Hospital Clínic Barcelona, Barcelona, Spain

⁶ Institut Josep Carreras, Campus Clínic, Barcelona, Spain

Article history:

Received 9 April 2019

Accepted 12 July 2019

Keywords:

Possible CMV disease

Quantitative PCR

Gastrointestinal tissue

Allo-SCT

ABSTRACT

Diagnosis of gastrointestinal (GI) cytomegalovirus (CMV) disease relies on the presence of GI symptoms and detection of CMV, mainly by immunohistochemistry (IHC), in GI biopsy specimens. Thus, in a symptomatic patient, a positive CMV-IHC result is accepted as a diagnosis of CMV disease. However, a positive CMV-PCR in GI tissue is considered "possible" CMV disease. Therefore, it would be very useful if, in practice, both techniques showed equal sensitivity and reliability. This is because PCR has many practical advantages over IHC for detecting CMV. The aim of this study was to compare quantitative PCR with IHC for the diagnosis of GI CMV disease. A total of 186 endoscopic GI biopsy specimens from 123 patients with GI symptoms after an allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT; 2004–2017) were analyzed by IHC and PCR on 113 paraffin-embedded and 73 fresh samples. The results were then compared. Of the patients with macroscopic lesions in the mucosa and CMV-IHC-positive biopsy specimens (eg, "proven" CMV disease, n = 28), all but 1 were CMV-PCR positive. Of the patients without macroscopic lesions in the mucosa and CMV-IHC-positive biopsy specimens (eg, probable CMV disease, n = 4), only 1 was CMV-PCR positive. Eight patients had CMV-IHC-negative/CMV-PCR-positive gut biopsy specimens. These cases fall within the current definition of possible CMV disease. In 6 of these 8 cases (75%), the viral load in GI tissue was very high (>10,000 copies/ μ g). Taken together, the results from the proven and probable cases revealed that CMV-PCR shows the same sensitivity (100%), specificity (98%), and positive (93%) and negative predictive value (100%) as CMV-IHC. Detection of CMV in fresh GI mucosa by quantitative PCR is as useful as IHC for the diagnosis of GI CMV disease. The results show that quantitative PCR has the same sensitivity, specificity, and positive/negative predictive value as IHC.

© 2019 American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection and CMV disease after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) are associated with significant morbidity. Since the introduction of pre-emptive anti-CMV therapy for CMV-seropositive recipients, the incidence of CMV disease during the first year after allo-SCT

has decreased from approximately 35% to 8% to 10% [1]. Well-known risk factors associated with CMV disease include CMV seropositivity, development of graft-versus-host disease (GVHD), prednisone treatment, and depletion of T cells from the graft [2–7]. The gastrointestinal (GI) system is the organ most frequently involved in CMV disease, usually the lower tract. Concomitant diagnosis of GVHD and GI CMV disease is common, but signs and symptoms of GI CMV disease (eg, diarrhea, vomiting, anorexia, bleeding, and abdominal pain) are often indistinguishable from those of GI GVHD. Ulcers extending into the gut mucosa are seen upon endoscopy, but these macroscopic findings are common to both GVHD and viral

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 6.

* Correspondence and reprint requests: María Suárez-Lledó, MD, Hematology Department, Hospital Clínic Barcelona, Carrer Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain.

E-mail address: msuarezl@clinic.cat (M. Suárez-Lledó).

<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.07.016>

1083-8791/© 2019 American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc.

disease [8,9]. However, studies suggest that ulcers are a more common GI CMV disease than GVHD, especially if the upper GI tract is affected [10,11].

The difficulty in distinguishing between GVHD and CMV disease in clinical practice obligates for GI CMV disease diagnosis the detection of CMV in biopsy specimens by histopathology, culture, virus isolation, or immunohistochemistry (IHC) [12].

Detection of CMV by hematoxylin and eosin (H&E) staining of GI tissue depends on the presence of classic CMV viral inclusions. However, viral inclusions are often not apparent; therefore, IHC is used by most centers to detect CMV. Thus, IHC is considered the gold standard for CMV detection in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue [13]. However, IHC can lead to an equivocal interpretation due to atypical staining patterns. Therefore, the value of IHC for detecting bona fide CMV infection depends on the observer, a fact that contributes to inter- and intralaboratory variability. It is suggested that in such cases, molecular methods (ie, quantitative PCR) could be complementary [14,15]. In addition, IHC for detecting inclusions in FFPE sections takes longer (at least 48 hours) than PCR (at least 24 hours).

Current methods used to diagnose CMV disease include DNA hybridization and PCR. Detecting CMV using molecular methods such as quantitative PCR (qPCR) is fast, highly sensitive, and more objective than IHC [16–19]. It is surprising, therefore, that the role of qPCR for diagnosis of CMV disease remains unclear.

New definitions of CMV disease, which were designed originally to harmonize terminology for clinical trials, can be applied to the setting of allo-SCT in cases of pneumonia and GI CMV disease. This definition establishes 3 new categories: proven, probable, and possible CMV disease (see Methods). Of note, high viral DNA levels detected in tissue by qPCR in a patient showing clinical symptoms are defined as possible CMV disease, particularly when a blood sample taken at the same time is negative for CMV [20]. Due to the lack of specific studies, there is no defined threshold for the viral load upon which a diagnosis of CMV disease (either pneumonia or GI) can be based [1,20,21,22].

Here, the hypothesis was that qPCR would have sensitivity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) at least similar to that of the current gold standard (IHC) for detection and diagnosis of GI CMV disease. We also hypothesized that by comparing the results obtained after IHC and qPCR of GI samples, we could define a cutoff viral load in GI tissue that would facilitate diagnosis and follow-up of GI CMV disease.

METHODS

General

We analyzed data from patients with GI symptoms who received an allo-SCT and, as a result, had an endoscopic procedure performed. Biopsy specimens of GI tissue were examined by histology, IHC, and qPCR. In addition, data obtained from electronic medical records were analyzed. The study was carried out in 2 steps.

First, a retrospective analysis of data from patients receiving allo-SCT between 2004 and 2009 was done. IHC results at the time of diagnosis (obtained from medical records) and PCR results obtained from paraffin-embedded samples of the same biopsy specimens stored in the institution's biobank were examined. This group is referred to hereafter as "paraffin samples."

Second, data from patients receiving allo-SCT between 2010 and 2017 were prospectively assessed. Data were collected up until 1 year post-transplant. The results obtained by IHC and qPCR analysis of GI samples taken during the same endoscopic procedure were analyzed. Hereafter, this group is referred to as "fresh samples."

For every patient, qPCR analysis of CMV in blood samples was performed up until 180 days post-transplant; these data were included in the analysis. At this institution, when an allo-SCT patient develops GI symptoms, stool cultures are taken and tested for bacteria, fungi, or viral infections (including *Clostridium difficile*, adenovirus, and rotavirus). If GI symptoms persist and cultures are negative (results are obtained within 48–72 hours), an endoscopic procedure is performed.

Microbiological Assessment

CMV serology (immunoglobulin G CMV) had been made in all donors and recipients before the allo-SCT. qPCR (Q-CMV Real Time Complete Kit; Nanogen Advanced Diagnostics, Buttiglieria, Italy) was performed to detect CMV infection in both plasma and tissue. This was carried out in the Microbiology Department. All patients were monitored weekly for CMV infection during the first 6 months post-allo-SCT or while on immunosuppressive treatment. Patients who developed GVHD or were on steroids were monitored twice a week. Pre-emptive treatment was started when CMV DNA in blood samples reached >1000 IU/mL. When patients were enrolled and data were analyzed, the international conversion factor for PCR-CMV was not defined. Therefore, analysis was based on the PCR results themselves. Data are shown with the international conversion factor applied (value: PCR local laboratory × 0.8).

Definitions (Ljungman et al CID, 2017 [20])

CMV infection is defined as isolation of virus or detection of viral proteins (antigens) or CMV nucleic acid in any body fluid or tissue specimen.

GI CMV disease is subcategorized as follows: proven disease requires upper and/or lower GI symptoms plus macroscopic mucosal lesions (ulcers, sores, edema, or erythema), plus documented evidence of CMV in tissue obtained by histopathology, virus isolation, rapid culture, IHC or DNA hybridization. Probable disease requires upper/lower GI symptoms plus documented evidence of CMV in tissue (using the same techniques as mentioned above) but without macroscopic mucosal lesions. Possible disease requires detection of high viral DNA levels by qPCR in GI tissue (in the presence of GI symptoms), particularly when a blood sample obtained at the same time does not contain CMV DNA.

Endoscopic Procedure

A multiple biopsy endoscopic study was performed using an Olympus CF-H185-L (Hamburg, Germany) endoscope. A macroscopic description of the GI tract was recorded. Samples were taken during the endoscopic procedure and sent to the pathology department for IHC (formol) and to the microbiology department for microscopic and qPCR-CMV analysis (saline serum).

Immunohistochemistry

FFPE samples from multiple endoscopic biopsy specimens were examined. At least 3 sections (each 5 μm thick) were processed. H&E was used for conventional morphologic examination. IHC staining was performed using a monoclonal antibody specific for CMV (1:1 dilution; Dako, Carpinteria, CA). A result was considered positive if more than 1 cell was detected. The median time from endoscopic biopsy to diagnosis was 72 hours (range, 48 to 120 hours).

qPCR

We analyzed a minimum of 5 cuts 5 μm thick for paraffin samples and a minimum of 10 mg of tissue for fresh samples (recommended sample size by manufacturer is 10 to 40 mg). A pretreatment for paraffin samples was required before purification of DNA from tissue. The cuts were treated with 1200 μL xylene, and after vortexing and centrifugation, the supernatant was removed. Then, 1200 μL ethanol was added, and again after vortexing and centrifugation, the supernatant was removed. The sample preparation procedure and purification of genomic DNA from paraffin-embedded tissue and fresh tissue were performed with the EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's specifications and using the Bio-Robot EZ1 (Qiagen). The concentration of DNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm in a spectrophotometer.

Plasma samples (500 μL) were extracted using the Qiagen Qiaamp DNA Mini Kit on a QiaSymphony system (Qiagen).

The extraction efficiency was verified by adding an internal control to each sample (tissue and plasma), and an external negative control was used to detect possible contamination.

qPCR (Q-CMV Real Time Complete Kit; Nanogen Advanced Diagnostics) was used to detect CMV infection in plasma and tissue using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Limit of detection of the DNA amplification allows detection of the presence of 10 CMV DNA copies per PCR reaction. The positive results of tissue sample were expressed as copies per microgram of DNA [23].

A result was considered positive if more than 1000 copies/μg of DNA were detected. The median time from endoscopic procedure to diagnosis report was 48 hours (range, 36 to 72 hours).

Statistical Analysis

Quantitative variables were reported as the median (interquartile range) and categorical variables as absolute numbers (percentages). The sensitivity, specificity, and PPV/NPV of IHC and qPCR were compared. Sensitivity measures the proportion of actual positives correctly identified as such, whereas specificity measures the proportion of actual negatives correctly identified as such. The PPV and NPV are the proportions of positive and negative results from diagnostic tests that are truly positive and truly negative, respectively. The chi-square or Fisher exact test was used to compare categorical variables.

and Student *t* test or the nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to assess continuous and quantitative parameters. The level of significance was set at $P < .05$. All statistical analyses were performed using SPSS version 22.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL).

RESULTS

Between January 2004 and August 2017, 688 patients received an allo-SCT at the Hospital Clinic of Barcelona. The study was approved by the Ethic Committee of the Hospital Clinic of Barcelona and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent. Of the 688 patients, 123 (18%) fulfilled the following criteria: GI symptoms, underwent an endoscopic procedure, and tissue analyzed by both IHC and PCR. The median time from allo-SCT to development of GI symptoms was 90 days (range, 45 to 270 days). A total of 186 GI biopsy samples were analyzed (Figure 1).

Patient demographics and transplant characteristics are shown in Table 1.

Of the 186 samples (113 paraffin samples and 73 fresh samples) analyzed, endoscopic examination identified 88 (47%) as having macroscopic mucosal lesions (ulcers, edema, or erythema). Most of the samples, 149 (80%) (91 paraffin samples and 58 fresh samples), belonged to the lower tract, and only 37 (20%) samples (22 paraffin samples and 15 fresh samples) corresponded to the upper tract. GVHD was diagnosed in 32 (36%); GI CMV disease in 29 (33%), 27 (94%) of the lower and 2 (6%) of the upper tract; mycophenolate toxicity in 2 (2%); and other infections (viral, bacteria, or fungi) in 18 (20%). Normal mucosa was identified in the remaining 98 samples (53%). Of these, GVHD was diagnosed in 38 (38%); GI CMV disease in 12 (12%), 11 (91%) of the lower and only 1 (9%) of the upper tract; mycophenolate toxicity in 1 (1%); and other infections (viral, bacteria, and fungi) in 7 (7%).

The diagnosis of GI CMV disease was done when GI symptoms were present together with detection of CMV (by IHC) in the biopsy specimens. This definition was applied in both the paraffin and fresh samples groups.

Paraffin Samples Group

In total, 113 samples from 63 patients were analyzed retrospectively. GI CMV disease was diagnosed in 14 patients (22%); overall, this amounted to 20 episodes of CMV disease, almost

all from the lower tract (90%). In 17 of these episodes, patients presented with macroscopic lesions in the GI mucosa, and CMV was detected in endoscopic biopsy specimens by IHC [16] and/or inclusion bodies were detected by H&E [3]; therefore, there were 17 episodes of proven CMV GI disease. In the other 3 episodes of CMV disease, patients had GI symptoms but no macroscopic lesions in the GI tract; CMV-IHC of endoscopic biopsy tissue was positive. These were defined as probable GI CMV disease ($n = 3$).

GVHD was diagnosed in 25 patients (40%); infections other than CMV were diagnosed in 8 patients (13%). Other diagnoses were toxicities related to mycophenolate (1.5%) and/or radiotherapy (1.5%) (Table 2). The remaining 14 cases (22%) had no specific diagnosis.

At this time, PCR techniques on tissue were not available. For this reason, there were only cases of proven and probable CMV disease. Retrospectively, CMV-PCR was performed in the paraffin samples as described in the Methods.

Among the proven CMV cases ($n = 17$), CMV-PCR was positive in 16 (94%). However, for the 3 probable CMV cases, PCR was negative in all of them; these PCR results were considered false negatives. For the cases in which PCR of paraffin-embedded gut tissue was positive, the median CMV load was 1910 copies/ μg (range, 1250 to 311,640 copies/ μg). CMV-PCR in blood samples taken at the same time was positive in 65% of cases.

There were 3 additional patients (CMV-IHC negative in the gut) in whom CMV-PCR was positive in the endoscopic biopsy specimens. Of these, 2 had a low viral load in the tissue (1335 and 3119 copies/ μg). Both tissue results were interpreted as false positives. One of these 3 patients had a CMV-PCR positive and CMV-IHC negative (viral load in tissue 4089 copies/ μg) but undetectable viral load in blood (defined as possible CMV disease according to the new definition by Ljungman et al. [20]). In this case, endoscopy was repeated 10 days later because symptoms persisted; endoscopy identified macroscopic lesions in the gut, and both CMV-IHC and CMV-PCR of biopsy tissue were positive. Therefore, this case was finally diagnosed as proven CMV disease. Therefore, IHC showed a sensitivity of 95%, a specificity of 97%, a PPV of 86%, and an NPV of 99% for GI CMV disease. PCR in the gut biopsy specimens showed a sensitivity of 80%, a specificity of 97%, a PPV of 84%, and an NPV of 96%.

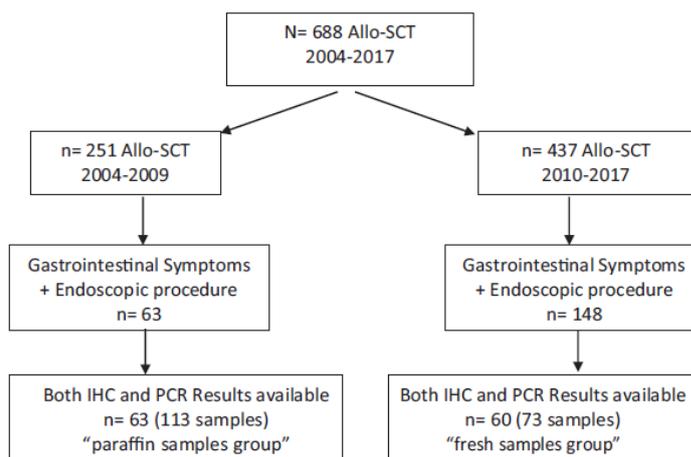


Figure 1. Inclusion criteria.

ARTICLE IN PRESS

4

M. Suárez-Lledó et al. / Biol Blood Marrow Transplant 00 (2019) 1–6

Table 1
Patients and Transplant-Related Characteristics

Characteristic	Total	Paraffin	Fresh
Patients, No.	123	63	60
Male/Female, No.	72/51	36/27	36/24
Age, median (range), y	53 (22–68)	53 (23–65)	53 (22–68)
SCT type, No. (%)			
Sibling HLA identical	59 (48)	32 (50)	27 (45)
Haplofamiliar	4 (3)	0 (0)	4 (6)
UNR matched	36 (29)	17 (27)	19 (32)
UNR mismatched	24 (20)	14 (22)	10 (17)
Conditioning regimen, No. (%)			
Myeloablative	43 (35)	24 (38)	19 (32)
Cy/TBI	31 (25)	21 (33)	10 (16)
Bu/Cy	7 (5)	3 (5)	4 (7)
BEAM	4 (3)	3 (5)	1 (2)
Flu/Bu4	4 (3)	0 (0)	4 (7)
Nonmyeloablative	80 (65)	39 (62)	41 (68)
Flu/Bu3	24 (21)	7 (11)	17 (28)
Flu/Mel	34 (27)	19 (30)	15 (25)
IdaFLAG	16 (13)	10 (16)	6 (10)
Flu/TBI 8 Gy	2 (2)	0 (0)	2 (3)
Flu/TBI 2 Gy	1 (1)	0 (0)	1 (2)
Source of stem cells, No. (%)			
Peripheral blood	111 (91)	57 (91)	56 (93)
Bone marrow	7 (6)	4 (6)	3 (5)
Cord blood	3 (3)	2 (3)	1 (2)
GVHD prophylaxis, No. (%)			
CNI/MTX	37 (30)	24 (38)	13 (22)
CNI/mycophenolate	83 (68)	39 (62)	44 (73)
CNI (tacrolimus)	3 (2)	0 (0)	3 (5)
ATG	24 (20)	17 (27)	7 (12)
PT-Cy	11 (10)	0 (0)	11 (19)
CMV serostatus, No. (%)			
High risk (D–/R+)	38 (31)	20 (32)	18 (30)
Intermediate risk (D+/R+)	71 (58)	34 (54)	37 (62)
Low risk (D–/R–)	14 (11)	9 (14)	5 (8)

SCT indicates stem cell transplantation; UNR, unrelated; Cy, cyclophosphamide; TBI, total-body irradiation; Bu, busulfan; BEAM, BCNU (carmustine), etoposide, cytarabine, and melphalan; Flu, fludarabine; Bu4, Busulphan 4 days; Bu3, Busulphan 3 days; Mel, melphalan; IdaFLAG, idarubicin, fludarabine, cytarabine, and G-CSF; CNI, calcineurin inhibitor; MTX, methotrexate; ATG, antithymocyte globulin; PT-Cy, post-transplant cyclophosphamide.

Fresh Samples

Seventy-three samples from 60 patients were analyzed prospectively. GI CMV disease was diagnosed in 10 patients (16%), all from the lower tract. Of them, there were 12 episodes where patients presented with macroscopic lesions in the gut mucosa and IHC detected CMV in biopsy tissue (all 12 episodes were designated proven CMV disease). One patient with no

macroscopic lesions in the gut was CMV-IHC positive (probable CMV disease). Finally, in 8 episodes, CMV-PCR of biopsy tissue was positive but CMV-IHC was negative; therefore, these were considered possible CMV disease. Of these 8 patients, 4 (50%) had macroscopic lesions in the gut. All proven, probable, and possible cases received antiviral treatment (total of 21 episodes from 13 patients).

GVHD was diagnosed in 31 patients (52%). Other infections were diagnosed in 20 (27%) cases, as well as toxicity related to mycophenolate (3%), Post-transplant lymphoproliferative disorder (4%), and nonspecific inflammatory features (16%) (Table 3).

CMV-PCR in tissue from proven and probable CMV disease cases (12 and 1, respectively) was positive in all of them (100%), with a median viral load of 184,627 copies/ μ g (range, 1250 to 5,483,875 copies/ μ g). Blood PCR was positive in 85% of these cases. There were 8 possible CMV disease cases with a median viral load in gut samples of 100,242 copies/ μ g (range, 1940 to 483,261 copies/ μ g); of these, 62% had a positive CMV-PCR in blood. Of these 8 cases, 2 had a low viral load in tissue (1940 copies/ μ g and 3976 copies/ μ g). In the first case, blood PCR was negative and antiviral treatment was given. Of note, 3 patients with mucosal ulcers and who were CMV-IHC negative/CMV-PCR positive (possible) underwent a repeat endoscopic procedure 7 days later; the samples taken then were CMV-IHC positive (proven CMV disease). Taking together all the results, viral load in tissue was >10,000 copies/ μ g in 70% (9/13) of the patients with proven/probable CMV disease and in 75% (6/8) of the patients with possible CMV disease.

Concomitant GVHD in the gut specimen was evident in 7 proven/probable CMV disease cases and in 5 possible CMV disease cases. In 6 patients, diagnosis of both GVHD and GI CMV disease was made at the same time (when the patient developed GI symptoms). In the remaining patients, GVHD was diagnosed previously. The median time from GVHD diagnosis to diagnosis of GI CMV disease was 40 days. There were no significant differences in the median viral load in gut specimens from proven/probable CMV disease cases with or without concomitant GVHD (503,841 copies/ μ g versus 1,847,126 copies/ μ g, $P = .314$) in possible CMV disease cases with or without GVHD (100,242 copies/ μ g versus 113,565 copies/ μ g, $P > .99$). Coinfection was detected in a similar percentage of proven and possible CMV disease cases (33% versus 37%, respectively).

When analyzing proven and probable CMV disease, we found that CMV-PCR of fresh gut samples had the same sensitivity (100%), specificity (98%), PPV (93%), and NPV (100%) as CMV-IHC for the diagnosis of GI CMV disease.

DISCUSSION

CMV disease is not a common complication after allo-SCT, but it is associated with significant morbidity and mortality. GI tract problems are the most common presentation, almost always restricted to the lower tract. For both novel and classical diagnostic criteria, a patient must show clinical symptoms

Table 2
Comparison of Results from IHC and PCR in GI Samples in CMV GI disease in the Retrospective Analysis of the Paraffin Samples Group

Paraffin Samples (n = 113) Retrospective	Microscopic Findings, No. (%)			qPCR Tissue, No. (%)	qPCR Blood, No. (%)
	GVHD	Infection	Other	Positive	Positive
No CMV GI disease (n = 93)	39 (42)	14 (15)	3 (3)	3 (3)	8 (9)
CMV GI disease (n = 20)	7 (35)	0 (0)	0 (0)	16 (80)	13 (65)
Proven (n = 17) (symptoms, IHC+, mucosa lesions)	6 (35)	0 (0)	0 (0)	16 (95)	9 (53)
Probable (n = 3) (symptoms, IHC+, normal mucosa)	1 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)

ARTICLE IN PRESS

M. Suárez-Lledó et al. / Biol Blood Marrow Transplant 00 (2019) 1–6

5

Table 3
Comparison of Results from IHC and PCR in GI Samples in CMV GI Disease in the Prospective Analysis of the Fresh Samples Group

Fresh Samples (n = 73) Prospective	Microscopic Findings, No. (%)			qPCR Tissue, No. (%)	qPCR Blood, No. (%)
	GVHD	Infection	Other	Positive	Positive
No CMV GI disease (n = 52)	26 (50)	12 (23)	5 (9)	1 (2)	5 (10)
CMV GI disease (n = 13)	7 (54)	4 (31)	0 (0)	13 (100)	11 (84)
Proven (n = 12) (symptoms, IHC+, mucosa lesions)	7 (58)	4 (33)	0 (0)	12 (100)	10 (83)
Probable (n = 1) (symptoms, IHC+, normal mucosa)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Possible CMV disease (n = 8) (symptoms, IHC–, PCR+ in gut biopsy)	5 (62)	3 (37.5)	0 (0)	8 (100)	5 (62)

Table 4
Management for Treatment in Possible GI CMV Disease Based on PCR

Viral Load Tissue	Viral Load Plasma	Diagnosis	Treatment
Any > 10,000 copies/ μ g	Any	Possible CMV disease	CMV disease
< 10,000 copies/ μ g	Any > 1000	CMV infection	Pre-emptive*
< 10,000 copies/ μ g	Undetectable	Indeterminate	Wait and see*

* Repeat endoscopic procedure if GI symptoms persist.

for a confirmed diagnosis. However, the signs and symptoms affecting the upper/lower GI tract are indistinguishable from those associated with GVHD. Therefore, we have to look for other distinctive signs; this is where endoscopic biopsy can be helpful. Some authors [10] report that macroscopic findings such as ulcers are associated with GI CMV disease; however, this has not been confirmed. Here, we found that 70% of patients with GI CMV disease had ulcers, although ulcers are more commonly associated with GVHD.

The next step toward a diagnosis is detection of CMV in tissue. IHC is the gold-standard method for histopathologic diagnosis. The introduction of PCR as a diagnostic tool for CMV has led to its incorporation for diagnosing GI CMV disease. According to the new classification, a CMV-PCR-positive tissue is considered possible CMV disease [20].

All diagnostic methods have limitations. The quality of the sample is the main determinant of a reliable result. PCR is a molecular method that requires DNA extraction from the sample, followed by quantification of this DNA. Automated extraction and quantification of viral DNA greatly reduce the possibility of error and make the technique more objective and reproducible. By contrast, IHC requires interpretation by a pathologist, and the results can vary depending on the thickness of the section; therefore, several sections are used to reduce the impact of this limitation.

In our experience, PCR works better for fresh samples than for paraffin-embedded samples. Formalin is not a suitable medium for microbiologic tests, particularly if DNA analysis is required. Moreover, DNA extraction is more difficult in the presence of paraffin, a substance that also inhibits PCR reactions.

Another limitation of PCR is deciding on an appropriate cutoff for the viral load. Different confounding factors may influence quantification of viral DNA (eg, GVHD and/or other infections). In our experience, the viral load during most GI CMV disease episodes (proven, probable, and possible) was very high. Indeed, in 70% of cases, the blood PCR result was positive. There was no significant difference in median viral load between those with GVHD and those without, bearing in mind that the number of patients analyzed in this setting was small (n = 41).

From the data obtained herein, we defined a possible threshold for the viral load in gut specimens for the diagnosis of possible GI CMV disease. Because in 75% of possible CMV disease cases, the viral load in tissue was higher than > 10,000 copies/ μ g, we suggest the following (see Table 4):

- Any result > 10,000 copies/ μ g in tissue could be considered GI CMV disease, regardless of the result of PCR in blood, and treated as CMV disease.
- If viral load in tissue is < 10,000 copies/ μ g and PCR-CMV in blood is positive, it could be considered CMV infection and pre-emptive therapy should be started. If GI symptoms persist after 7 to 10 days of antiviral treatment, re-evaluate with a new endoscopy.
- If viral load in tissue is < 10,000 copies/ μ g and PCR-CMV in blood is negative, we would suggest a “wait-and-see” approach, and if gastrointestinal symptoms persist after 7 to 10 days, re-evaluate with a new endoscopy.

In summary, the data presented herein show that detection of CMV in fresh GI mucosa using quantitative PCR has the same sensitivity, specificity, PPV, and NPV as IHC for the diagnosis of proven and probable CMV disease. Therefore, PCR is as useful and reliable as IHC for GI CMV disease diagnosis and is faster and more objective. It is important to point out that there is a trend of higher viral load in proven/probable versus possible GI CMV disease, suggesting that possible CMV disease could be an early diagnosis. In this line, note that there were 3 possible CMV disease cases that, in a second biopsy 7 days later, developed a proven CMV disease.

This would be a step forward in clinical practice in patients undergoing allo-SCT, as it would allow starting treatment of GI CMV disease more promptly (with a diagnosis of possible CMV disease) than in proven or probable CMV disease. Finally, an attempt to define a cutoff for PCR-CMV in tissue to initiate antiviral treatment could be $\geq 10,000$ copies/ μ g, in view of the results obtained. The qPCR could also be useful for monitoring the response of the treatment and to define treatment duration. More studies are needed to confirm these findings of CMV-PCR in tissue and to implement it in clinical practice.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

There are no conflicts of interest to report.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the department of digestive endoscopy for their efforts, dedication, and help with patient care. They also thank the biobank of our institution for support and cooperation.

Financial disclosure: The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- Einsele H, Mielke S, Grigoleit GU. Diagnosis and treatment of cytomegalovirus 2013. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(6):470–475.
- Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009;113(23):5711–5719.
- Ljungman P, Brand R, Hoek J, et al. Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2014;59(4):473–481.
- Ljungman P, Reusser P, de la Camara R, et al. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(11):1075–1081.
- Schmidt-Hieber M, Labopin M, Beelen D, et al. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood*. 2013;122(19):3359–3364.
- El-Cheikh J, Devillier R, Crocchiolo R, et al. Impact of pretransplant donor and recipient cytomegalovirus serostatus on outcome for multiple myeloma patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1) e2013026.
- George B, Pati N, Gilroy N, et al. Pretransplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2010;12(4):322–329.
- Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):151–169.
- Cho BS, Yahng SA, Kim JH, et al. Impact of cytomegalovirus gastrointestinal disease on the clinical outcomes in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease in the era of preemptive therapy. *Ann Hematol*. 2013;92(4):497–504.
- Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T, et al. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol*. 2010;16(23):2907–2912.
- Yin YM, Wu T, Ji SQ, et al. Cytomegalovirus enteritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [in Chinese]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;32(8):516–520.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34(8):1094–1097.
- Mills AM, Guo FP, Copland AP, Pai RK, Pinsky BA. A comparison of CMV detection in gastrointestinal mucosal biopsies using immunohistochemistry and PCR performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(7):995–1000.
- McCoy MH, Post K, Sen JD, et al. qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of gastrointestinal biopsies. *Hum Pathol*. 2014;45(1):48–53.
- Einsele H, Ehninger G, Hebart H, et al. Incidence of local CMV infection and acute intestinal GVHD in marrow transplant recipients with severe diarrhoea. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14(6):955–963.
- Arai Y, Kondo T, Kitano T, et al. Usefulness of quantitative PCR in biopsy specimens for early therapeutic intervention in gastro-intestinal cytomegalovirus infections after allogeneic stem cell transplantation [in Japanese]. *Rinsho Ketsueki*. 2014;55(12):2400–2407.
- Okahara K, Nagata N, Shimada T, et al. Colonic cytomegalovirus detection by mucosal PCR and antiviral therapy in ulcerative colitis. *PLoS One*. 2017;12(9) e0183951.
- Zagorowicz E, Przybysz A, Szlak J, Magdziak A, Wieszczy P, Mróz A. Detection of cytomegalovirus by immunohistochemistry of colonic biopsies and quantitative blood polymerase chain reaction: evaluation of agreement in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2018;53(4):435–441.
- Genzenmueller T, Henke-Gendo C, Schlué J, Wedemeyer J, Huebner S, Heim A. Quantification of cytomegalovirus DNA levels in intestinal biopsies as a diagnostic tool for CMV intestinal disease. *J Clin Virol*. 2009;46(3):254–258.
- Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, et al. Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2017;64(1):87–91.
- Boeckh M, Stevens-Ayers T, Travi G, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in bronchoalveolar lavage fluid from hematopoietic stem cell transplant recipients with CMV pneumonia. *J Infect Dis*. 2017;215:1514–1522.
- Schlischewsky E, Fuehner T, Warnecke G, et al. Clinical significance of quantitative cytomegalovirus detection in bronchoalveolar lavage fluid in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(1):60–69.
- Yoshino T, Nakase H, Ueno S, et al. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1516–1521.

7.2. Trabajo número 2

La enfermedad gastrointestinal es la manifestación más frecuente de enfermedad por CMV en la actualidad. El diagnóstico concomitante con la EICR aguda gastrointestinal es frecuente. Además, los signos y síntomas de la enfermedad del CMV gastrointestinal, por ejemplo, diarrea, vómitos, hemorragia digestiva y dolor abdominal, a menudo son indistinguibles de los de la EICR gastrointestinal.

La dificultad para distinguir entre EICR y CMV basándonos sólo en las manifestaciones clínicas (signos y síntomas) ha propiciado que el diagnóstico se base en la detección del virus en el tejido afecto, mediante la realización de una biopsia para análisis histopatológico y para cultivo, aislamiento del virus o detectar el virus por inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ se considera el “*gold estándar*” para la detección del CMV en tejido gastrointestinal. Sin embargo, la IHQ no es infalible y puede llevar a una interpretación equívoca debido a patrones de tinción atípicos. Además el valor de la IHQ para detectar la infección por CMV depende del observador lo que contribuye a la variabilidad entre laboratorios. Se sugiere que, en estos casos, los métodos moleculares (es decir, la PCR-RT) podrían ser complementarios.

La detección del CMV mediante métodos moleculares como la PCR cuantitativa es rápida, altamente sensible y más objetiva que la IHQ. A pesar de ello, sorprende que la PCR-RT siga siendo una técnica controvertida para el diagnóstico de la enfermedad por CMV.

Las nuevas definiciones de la enfermedad por CMV, diseñadas originalmente para armonizar la terminología de los ensayos clínicos, pueden aplicarse en la práctica asistencial del TPH en los casos de neumonía y enfermedad gastrointestinal. Esta definición establece tres nuevas categorías: enfermedad por CMV *probada*, *probable* y *posible*. Cabe destacar que la detección de carga viral elevada (DNA viral) en el tejido por PCR-RT en un paciente con síntomas clínicos se define como “posible enfermedad por CMV”, especialmente cuando en la muestra de plasma tomada al mismo tiempo es negativa para el CMV. Debido a la falta de estudios específicos, no existe un umbral definido para la carga viral sobre la que se pueda basar el diagnóstico de la enfermedad por CMV (ver apartado 4.4.3 técnicas diagnósticas).

De los 688 pacientes que recibieron un TPH alogénico en nuestro centro (2004-2017), 123 presentaron síntomas gastrointestinales, por lo que se les realizó una biopsia intestinal vía endoscópica y sobre esta muestra de tejido gastrointestinal se realizó tanto IHQ como PCR-RT para poder comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas. El estudio se llevó a cabo en dos tiempos: *Primero* se realizó un análisis *retrospectivo* (n=63 pacientes y 113 muestras de tejido gastrointestinal, durante 2004-2009). El resultado histológico y de la IHQ se obtuvo de la revisión de las historias clínicas de los pacientes que recibieron un TPH y a los que se les realizó una endoscopia por síntomas gastrointestinales. A partir de las muestras sobrantes de ese estudio endoscópico (criopreservadas en parafina en el Biobanco de nuestra institución) se realizó, *a posteriori*, el análisis con PCR-RT.

A la vista de los resultados de este estudio retrospectivo, se realizó en un *Segundo* tiempo, el estudio prospectivo (n=60 pacientes y 73 muestras de tejido gastrointestinal, durante 2010-2017). En este grupo de pacientes que recibieron un TPH y presentaron síntomas gastrointestinales, se realizó un estudio endoscópico con toma de biopsia múltiple de tejido gastrointestinal. Las muestras de tejido gastrointestinal obtenidas en el mismo procedimiento

endoscópico se enviaron a anatomía patológica, en fresco, para análisis histológico e IHQ (formol como medio de transporte) y al departamento de microbiología para realización de PCR-RT (suero fisiológico como medio de transporte).

De las 113 muestras analizadas en el *estudio retrospectivo* (donde la PCR-RT se realizó en muestras en parafina), se diagnosticaron 17 episodios de enfermedad *probada* y 3 episodios de *probable* enfermedad. De los 17 casos de enfermedad *probada*, la PCR-RT fue positiva en 16 (94% de los casos) y de los 3 casos de *probable* enfermedad la PCR-RT fue negativa en todos ellos (falsos negativos). Merece la pena destacar que hubo 1 caso donde la IHQ fue negativa y la PCR-RT fue positiva en la biopsia intestinal (se diagnosticó de “no enfermedad”) y que, por persistencia de los síntomas gastrointestinales, la biopsia endoscópica se repitió a los 10 días y entonces se diagnosticó de enfermedad *probada* (IHQ positiva).

En las muestras en parafina la IHQ mostró una sensibilidad: 95%, especificidad: 97%, valor predictivo positivo: 86% y valor predictivo negativo: 99%. En cambio la PCR-RT en muestras en parafina mostró una sensibilidad: 80%, especificidad: 97%, valor predictivo positivo: 84% y valor predictivo negativo: 98%.

De las 73 muestras analizadas en el *estudio prospectivo*, hubo 12 episodios de enfermedad *probada* y 1 caso de enfermedad *probable* (todas ellas correspondientes al tracto digestivo bajo). La PCR-RT fue positiva en todos los casos de *probada* y *probable* (100%). Por lo que la parafina y la PCR-RT mostraron los mismos valores de sensibilidad (100%), especificidad (98%), valor predictivo positivo (93%) y valor predictivo negativo (100%). Hubo 8 episodios de *posible* enfermedad gastrointestinal, en 3 de estos episodios, ante la persistencia de la sintomatología gastrointestinal, se repitió la biopsia endoscópica a los 7 días, y el diagnóstico fue de enfermedad *probada* (IHQ positiva), por lo que la PCR-RT fue capaz de realizar un diagnóstico precoz.

Para poder definir un punto de corte válido para el diagnóstico, se evaluó la carga viral en las muestras. La mediana de carga viral en los casos de enfermedad *probada* y *probable* fue 184.627 c/μg (rango 1.250-5.483.875 c/μg) y en los casos de *posible* fue 100.242 c/μg (rango 1.940-483.261 c/μg). En los casos de enfermedad *probada* y *probable* no hubo diferencias en la carga viral entre aquellos que presentaron EICR y los que no (503.841 c/μg vs. 1.847.126 c/μg, p= 0,314). Tampoco en los casos de enfermedad *posible* hubo diferencias en la carga viral con o sin EICR (100.242 c/μg vs. 113.565 c/μg, p=1).

El 70% de los casos de enfermedad *probada/probable* tenían una carga viral > 10.000 c/μg y el 75% de los casos de enfermedad *posible* tenían un carga viral > 10.000 c/μg. Por lo que podría ser un posible punto de corte para definir enfermedad por CMV gastrointestinal.

La evidencia de una carga viral más alta en los casos de enfermedad *probada/probable*, en comparación con los casos de enfermedad *posible*, sugiere que el diagnóstico de *posible* enfermedad podría corresponderse con un diagnóstico precoz de enfermedad, lo que explicaría que hubiera 3 casos de enfermedad *posible* que al repetir el estudio endoscópico más tarde, el diagnóstico evolucionara a enfermedad *probada*. Esta habilidad de la PCR-RT para realizar un “diagnóstico precoz” de enfermedad GI por CMV nos permitiría iniciar tratamiento antiviral antes, con cargas virales más bajas y aumentaría la eficacia del tratamiento antiviral.

7.3 Trabajo número 3 (preliminar)

Título: *Impacto del uso de ciclofosfamida-post como profilaxis de la enfermedad del injerto contra el receptor en la infección por Citomegalovirus*. Manuscrito en preparación

En los últimos 10 años, se han incorporado modalidades nuevas de TPH para pacientes que no disponen de una donante compatible, sea emparentado o no, como el trasplante haploidéntico, en el que donante y receptor comparten sólo la mitad de la compatibilidad HLA. Esta disparidad en el HLA obliga a una profilaxis de la EICR más agresiva y sobre todo más inmunosupresora. En este contexto, el fármaco más utilizado como pilar de la inmunosupresión es la ciclofosfamida administrada después de la infusión de los progenitores hematopoyéticos, a los 3 y 4 días post-TPH. Con ello se consigue un efecto inmunosupresor selectivo sobre los linfocitos Alo-reactivos exclusivamente y no tanto sobre los linfocitos citotóxicos. La preservación de los linfocitos citotóxicos, responsables de la respuesta inmune frente a CMV, debería traducirse en menos complicaciones infecciosas. Sin embargo, la escasa bibliografía al respecto describe una incidencia similar de infección por CMV pero de aparición más precoz y necesidad de prolongar la duración del tratamiento antiviral para eliminar el virus. Debido a los buenos resultados de la administración de la CyPT en cuanto a disminución de la incidencia de EICR y la baja toxicidad asociada, esta estrategia se ha extendido a otras modalidades de TPH de donante no emparentado con disparidad en el HLA (HLA 7/8) y también en el que no hay disparidad (HLA 10/10). Dado que la infección por CMV es una complicación frecuente (60%) en los pacientes que reciben un TPH es necesario conocer el efecto de la Ciclofosfamida post-TPH sobre la epidemiología de la infección por CMV.

Hasta el momento se han analizado 165 pacientes sometidos a TPH en nuestra institución (2013-2016) que recibieron profilaxis de EICR estándar (inhibidor de calcineurina en combinación con MMF o MTX, n=81 pacientes) y aquellos que recibieron profilaxis de EICR con ciclofosfamida post-TPH (CyPT) (n= 84 pacientes). La incidencia de infección por CMV es similar (65%) aunque ésta ocurre de manera más precoz en el grupo CyPT (+38 días vs 49 días). Un mayor número de pacientes en el grupo Cy-PT que requirieron alargar la duración del tratamiento antiviral (más de 14 días) para negativizar la DNAemia (48% vs 25%, p=0,02), que entraría dentro de la definición de infección refractaria probable. El porcentaje de pacientes que presentó mielotoxicidad fue similar (CyPT 60% vs 50%, estándar) así como la necesidad de administrar G-CSF para mantener las cifras hemoperiféricas. Existe una tendencia a presentar mayor incidencia de enfermedad por CMV y de que ésta ocurra de manera precoz, coincidiendo con la primera reactivación por CMV en el grupo de la CyPT en comparación con los que reciben profilaxis estándar.

Así mismo, dado que la infección por CMV ocurre antes, ésta tiene lugar en un momento del TPH en el que las cifras hemoperiféricas aún no han alcanzado niveles normales lo que obliga a administrar el foscarnet en primera línea de tratamiento de manera más frecuente en el grupo CyPT, lo que repercute en mayor nefrotoxicidad (25% grupo CyPT vs. 7% grupo profilaxis estándar). En aquellos pacientes que presentaron infección refractaria y llevaban 4 semanas de tratamiento antiviral, se solicitó estudio de resistencias. Se detectó infección por CMV

resistente a antivirales en el 1,5% de los pacientes que presentaron infección por CMV. Todos ellos pertenecían al grupo de la CyPT, se diagnosticó resistencia a foscarnet y a ganciclovir. En el grupo de profilaxis estándar ningún paciente presentó criterios para realizar estudio de resistencias.

DISCUSIÓN

El CMV es un virus de la familia de los herpesvirus, en concreto el VHH-5, que, al igual que los otros virus de esta familia, tras la primoinfección tiene la capacidad de permanecer en estado de latencia en las células que infecta. El estado latente, o de infección no activa, está regulado por diferentes mecanismos ligados al propio virus y a la regulación que ejerce el sistema inmune mediante la inmunidad específica frente al virus.

Los mecanismos por los que el virus se reactiva se desconocen pero sí se ha demostrado que diferentes situaciones o circunstancias que se presentan en el receptor de un TPH (paciente) favorecen la reactivación del virus, que pasa de su estado latente a una infección productiva. Dichos estados o circunstancias favorecedores de la reactivación pueden ser el estrés, la inmunosupresión, la inflamación o la infección por otros gérmenes.

La respuesta inmune frente al CMV recae fundamentalmente sobre los linfocitos T CD8+ citotóxicos o efectores, que son los encargados de eliminar el virus del organismo. Para que esto ocurra es necesaria la cooperación de los diferentes integrantes del sistema inmune, empezando por las células que reconocen el antígeno viral y actúan como células presentadoras de antígeno (CPA). Para que los linfocitos T CD8+ puedan actuar contra el CMV necesitan de los linfocitos T CD4+ "*helper*", de moléculas co-estimuladoras y de la presencia de determinadas citocinas (moléculas solubles) en el ambiente que median la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos. Una vez activados reconocen el virus a través de los antígenos virales (pp65, IE-1) en las células infectadas y las destruyen, liberando IFN γ . El virus al no tener la célula que salvaguarda su supervivencia, se desintegra y desaparece. Los linfocitos B, a través de las inmunoglobulinas que producen, son los encargados de crear la memoria inmunológica frente al virus, favoreciendo la maduración de linfocitos T CD8+ memoria específicos contra el CMV, que promoverán una respuesta inmune más eficaz y rápida cuando se produzca una nueva reactivación. Las inmunoglobulinas producidas durante la infección activa por el CMV nos permiten identificar el "momento infeccioso" en el que se encuentra el paciente (primoinfección vs. infección pasada). De esta manera, podemos identificar los pacientes que tendrán riesgo de infección por CMV (aquellos con IgG anti-CMV positiva, porque tiene el virus latente) y estratificar el riesgo de cada paciente, antes del TPH, de acuerdo a las serologías de donante y receptor.

El TPH provoca un estado de inmunosupresión severa y prolongada debido a dos aspectos fundamentales. El primero es inherente al procedimiento del TPH, donde eliminamos la hemopoyesis del paciente y, tras la administración de los progenitores hematopoyéticos del donante, la reconstitución del nuevo sistema inmune parte desde cero y ocurre de manera escalonada y ordenada. Primero la inmunidad innata (células NK, neutrófilos, monocitos) para continuar con la inmunidad adaptativa (linfocitos T CD8 y CD4, linfocitos B). La reconstitución de los linfocitos T, implicados en la respuesta frente al CMV, se inicia a partir del tercer mes post-TPH pero se prolonga hasta los 12 y 24 meses post-TPH. Esta inmunosupresión inherente al procedimiento es la causa de que los diferentes subtipos de linfocitos T CD8, CD4 y B, células con capacidad para la especialización, así como la capacidad para que estas células puedan especializarse, se encuentre afectada. Por ello, la funcionalidad de las células efectoras y las co-estimuladoras es deficitaria durante los 12-24 meses posteriores al TPH, que es el tiempo que necesitan los linfocitos T y B para desarrollar todo su potencial y madurar de manera completa y poder ofrecer una funcionalidad adecuada. El segundo, las complicaciones propias

del TPH como la enfermedad de injerto contra receptor (EICR) y su tratamiento, contribuye de manera directa a esta deficiencia cualitativa o funcional del sistema inmune, agravando la inmunosupresión y provocando un enlentecimiento en el proceso de reconstitución inmune.

La consecuencia principal de este déficit del sistema inmunitario, cuantitativo en la fase precoz, y funcional, en la fase inmediata y tardía, son las complicaciones infecciosas de cualquier etiología: bacteriana, fúngica y viral. Estas complicaciones infecciosas contribuyen a la mortalidad relacionada con el procedimiento.

Sin embargo, no todos los pacientes están al mismo riesgo de presentar infección por CMV. Conocer los diferentes factores de riesgo, tanto los que vienen impuestos y no modificables, como son las serologías pre-TPH de donante y receptor y el tipo de trasplante, que viene determinado por la disponibilidad del donante, por la enfermedad hematológica que indica el trasplante y su estadio, y por la comorbilidad del paciente; así como aquellos factores de riesgo que se van adquiriendo durante el trasplante, debido a las complicaciones que desarrollan, por ejemplo, la enfermedad injerto contra receptor, el tratamiento con corticoides y las complicaciones infecciosas, permiten individualizar las estrategias de prevención, y tratamiento, tanto de la infección como de la enfermedad por CMV. En definitiva, conocer los factores de riesgo asociados a cada paciente y a cada procedimiento, tiene como objetivo adaptar las estrategias de profilaxis y tratamiento para disminuir la mortalidad directamente relacionada con el virus así como la morbilidad que, de manera indirecta, impacta en la supervivencia.

Los avances en el diagnóstico de la infección/enfermedad por CMV en los últimos años, mediante técnicas microbiológicas, han permitido realizar el denominado tratamiento anticipado, es decir, tratar la infección antes del desarrollo de enfermedad. Con lo que se ha conseguido mejorar la supervivencia de los pacientes.

En cuanto a las estrategias de prevención, el primer paso consiste en identificar los factores de riesgo que predisponen al paciente a desarrollar infección por CMV. En el primer trabajo se confirma que la serología para CMV pre-TPH de donante y receptor son el principal factor de riesgo y la incidencia de infección es significativamente diferente entre las diferentes combinaciones: la incidencia de infección por CMV en los pacientes de alto riesgo (Donante -/Receptor +) es del 88%, en los de riesgo intermedio (Donante +/Receptor +) es del 62% y en los de bajo riesgo (Donante -/Receptor -) es del 0% ($p=0,023$). El tratamiento con corticoides a altas dosis es otro factor de riesgo conocido que afecta a la infección por CMV y que está relacionado con la presencia de EICR y su tratamiento, los corticoides. El principal hallazgo descrito en el primer trabajo es que los corticoides no modifican la incidencia de infección por CMV en los pacientes de alto riesgo (D-/R+) pero, sí en los pacientes de riesgo intermedio (D+/R+).

De hecho, cualquier factor de riesgo que añada inmunosupresión, como es la enfermedad Injerto contra receptor (EICR) y su tratamiento, los corticoides, la presencia de linfopenia o la depleción linfoide T, representan factores de riesgo adicionales para desarrollar infección/reactivación por CMV. El primer trabajo confirma que el tratamiento con corticoides a altas dosis ($> 1 \text{ mg/kg/día}$) aumenta la incidencia de infección y de infección recurrente por CMV. Este efecto tiene impacto sobre todo en los pacientes con serología de riesgo

intermedio, donde aquellos que recibieron corticoides presentaron una incidencia de infección por CMV superior a los que no recibieron corticoides (80% vs 40% $p=0,01$) y también de infección recurrente por CMV (55% vs 18%, $p=0,02$). Mientras que en los de alto riesgo la incidencia de infección e infección recurrente no se vió influenciada por los corticoides, pero sí la duración del tratamiento antiviral para conseguir la negativización de la carga viral. Además, los pacientes de riesgo intermedio que reciben corticoides presentan una incidencia de infección por CMV similar al paciente de alto riesgo (80% riesgo intermedio y corticoides vs. 88% alto riesgo), lo que sitúa al tratamiento con corticoides como el principal factor de riesgo post-TPH para presentar infección/reactivación por CMV.

El análisis de la inmunidad CMV específica y global mostró que no se detecta inmunidad CMV específica los primeros dos meses del TPH en ningún paciente, lo que es debido a que la reconstitución de los linfocitos T CD8 y CD4 se inicia a partir del segundo mes del TPH. Los corticoides afectan a la reconstitución inmune a través de complejos mecanismos. En el trabajo 1, se muestra que los pacientes que recibieron corticoides presentaron niveles más bajos de linfocitos T CD8+/IFN γ + y CD4+/IFN γ + en comparación con aquellos que no recibieron corticoides. Sin embargo, la cifra de linfocitos T CD8/CD4 globales fueron similares en ambos grupos y dentro de los valores normales, lo que sugiere que los corticoides tienen un efecto directo sobre la inmunidad CMV-específica y provoca una deficiencia en la misma, por su capacidad linfocítica y por la inhibición de la producción de citocinas por los linfocitos T CD8/CD4.

Estos hallazgos pueden tener implicaciones terapéuticas, como por ejemplo, que los pacientes de riesgo intermedio que realizan tratamiento con corticoides realicen la misma estrategia de profilaxis que aquellos pacientes de alto riesgo, al tener una incidencia de infección por CMV similar. Para disminuir la tasa de infección recurrente por CMV, una opción interesante sería realizar tratamiento de mantenimiento tras finalizar las dos semanas de tratamiento de la infección en aquellos pacientes que estén realizando tratamiento con corticoides y hasta su suspensión. Por otro lado, la medición de la inmunidad CMV específica puede ayudar a adaptar la duración del tratamiento antiviral, y suspenderlo de manera precoz en el momento en que se detecte inmunidad CMV específica, siempre que la carga viral sea negativa; o bien, realizar tratamiento de mantenimiento en aquellos pacientes en los que no se detecte inmunidad CMV específica tras finalizar el tratamiento antiviral de la reactivación.

Las mejoras en las técnicas diagnósticas han dado lugar a uno de los grandes cambios en el manejo de la infección por CMV, la introducción y estandarización del tratamiento anticipado. Ello ha supuesto un antes y un después para la supervivencia de los pacientes que reciben un TPH. Los avances en la interpretación de la PCR-RT en tejido pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por CMV. El trabajo número 2, se centra en la utilidad de la PCR-RT como técnica diagnóstica para la manifestación más frecuente de enfermedad por CMV, la enfermedad gastrointestinal (en la mayoría de los casos afecta al intestino y menos frecuentemente al tracto digestivo alto, esófago o estómago). Para el diagnóstico de la misma es necesaria la presencia de síntomas gastrointestinales. Sin embargo, los síntomas gastrointestinales derivados del daño causado por el CMV son indistinguibles de los síntomas presentes en la EICR gastrointestinal. Por lo que la realización de una biopsia endoscópica múltiple es imprescindible para el diagnóstico. El aspecto macroscópico de la

mucosa intestinal puede orientar el diagnóstico, pero no confirmarlo. La presencia de úlceras se asocia con más frecuencia a la afección por CMV. En el segundo trabajo, se describe que el 70% de los casos de enfermedad gastrointestinal por CMV presentaban úlceras. Sin embargo, otros diagnósticos como la EICR, infección por adenovirus o por clostridium también presentaban úlceras. Por tanto, para confirmar el diagnóstico, se debe detectar el CMV en el tejido intestinal, donde la tinción inmunohistoquímica (IHQ) se considera el “*gold estándar*”. Todas las técnicas diagnósticas tienen sus limitaciones. La calidad de la muestra es importante para que el método diagnóstico sea fiable. La PCR-RT es una técnica molecular en la que se extrae el DNA viral de la muestra para posteriormente realizar la amplificación y cuantificación del mismo. La automatización de ambos procedimientos (extracción y amplificación de DNA) hace que la técnica sea objetiva y reproducible. La inmunohistoquímica (IHQ) requiere de la interpretación por parte del patólogo y de que la tinción se realice correctamente, y los resultados pueden variar dependiendo del grosor del corte.

En el segundo trabajo se reporta que el resultado de la PCR-RT tiene mayor rendimiento cuando se realiza sobre muestras en fresco que sobre muestras en parafina. El formol, medio utilizado para el transporte de la muestra antes de realizar la inclusión en parafina, no es un medio adecuado para el transporte de muestras destinadas a análisis microbiológicos ni tampoco para el análisis de DNA viral. A su vez, en las muestras de parafina es más difícil realizar la extracción de DNA viral y la reacción de la PCR-RT puede inhibirse por la parafina. Otra limitación de la PCR-RT es decidir un punto de corte en la carga viral para definir el diagnóstico. En este sentido existen diferentes factores que influyen en la cuantificación del DNA viral, a saber, la presencia de EICR y de infecciones por otros gérmenes, especialmente otros virus. Al comparar los resultados obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y con la PCR-RT, se demuestra que la PCR-RT tiene la misma sensibilidad (94%), especificidad (100%), valor predictivo positivo (97%) y valor predictivo negativo (100%) que la IHQ para el diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV *probada* y *probable*, de acuerdo a las nuevas definiciones. Por lo que la PCR-RT es igual de útil y fiable que la IHQ y además es más rápida y objetiva. Merece la pena destacar que la carga viral en los casos de *probada* y *probable* enfermedad gastrointestinal por CMV fue más alta en comparación con los casos de *posible* enfermedad (las diferencias no son significativas). De modo interesante, en un 37% de los casos de *posible* enfermedad por CMV (PCR-RT en tejido fue positiva pero la IHQ fue negativa), ante la persistencia de los síntomas se realizó un nuevo estudio endoscópico a los 7 días del primero y en esta segunda biopsia intestinal tanto la IHQ como la PCR-RT fueron positivas (enfermedad *probada*). Ello sugiere que el valor de la PCR-RT en el diagnóstico de *posible* enfermedad por CMV presupone un “diagnóstico precoz” de enfermedad por CMV. Este hecho es relevante porque permitiría iniciar el tratamiento antiviral de manera precoz y con carga viral más baja por lo que la posibilidad de respuesta al tratamiento sería elevada. La PCR-RT es válida para el diagnóstico y es posible definir un punto de corte para realizar el diagnóstico de modo fiable y objetivo, en nuestro caso 10.000 copias/ μg . Además la cuantificación del DNA viral en tejido gastrointestinal podría ser útil para evaluar la respuesta al tratamiento antiviral así como para definir la duración del mismo.

En nuestro trabajo demostramos que la carga viral en la mayoría de los casos de enfermedad gastrointestinal por CMV fue muy elevada y no encontramos diferencias significativas en la carga viral de las muestras con y sin EICR concomitante. Por lo que a partir

de estos datos definimos un punto de corte para el diagnóstico de *posible* enfermedad por CMV. Teniendo en cuenta que en el 75% de los casos la carga viral en tejido fue superior a 10.000 copias/ μ g, en base a este punto de corte definimos una propuesta de manejo de estos pacientes según las situaciones que se presentan:

- Si la carga viral en tejido es > 10.000 copias/ μ g es diagnóstica de enfermedad por CMV y se debe iniciar tratamiento antiviral de enfermedad por CMV
- Si la carga viral en tejido es < 10.000 copias/ μ g y se detecta DNA viral en sangre, debe considerarse el diagnóstico de infección por CMV e iniciar tratamiento anticipado. En caso de que los síntomas gastrointestinales persistan tras 7 días de tratamiento, se ha de valorar repetir el estudio endoscópico.
- Si la carga viral en tejido es < 10.000 copias/ μ g y no se detecta DNA viral en sangre, no tenemos evidencia para considerar el diagnóstico de *posible* enfermedad por CMV. Por lo que se recomienda realizar una actitud expectante y en caso de que los síntomas gastrointestinales persistan tras 7 días, se ha de valorar repetir el estudio endoscópico.

En el trabajo número 3 se describe el cambio epidemiológico en la infección por CMV que se observa con la administración de ciclofosfamida post-TPH (CyPT) como estrategia de profilaxis de EICR. Esta modalidad de profilaxis se introdujo en el trasplante haploidentico. Posteriormente, se ha adoptado en el trasplante de donante no emparentado, idéntico y con diferencias HLA. En el post-TPH los linfocitos T se generan a través de diferentes vías en el timo y a nivel periférico. En los adultos la función del timo está ausente por lo que la reconstitución inmune post-TPH recae sobre la expansión de los linfocitos T maduros del injerto, sobre los que actúa la CyPT. De modo general la bibliografía que existe al respecto describe una incidencia de infección CMV similar (parece algo más elevada en el haplo-TPH), aunque la primera infección por CMV ocurre antes (mediana 30 días vs 45 días), la infección refractaria es mayor y la incidencia de enfermedad por CMV tiende a ser ligeramente mayor. El hecho de que la primera infección ocurra antes puede comprometer el implante hemopoyético y condicionar la elección del fármaco antiviral. La incidencia más elevada de infección refractaria supone la exposición prolongada a fármacos antivirales y, por lo tanto, a sus toxicidades, así como mayor riesgo de desarrollar resistencias a los fármacos antivirales y mayor riesgo de enfermedad intestinal por CMV. En este grupo de pacientes, mejorar la profilaxis con un fármaco que presente un bajo perfil de toxicidades, como el letermovir, podría suponer un gran cambio.

El efecto que ejerce la ciclofosfamida post-TPH sobre la reconstitución inmune post-TPH, sobretudo descrito en el contexto del haplo-TPH, explicaría el cambio en la epidemiología de la infección por CMV. La linfopenia profunda de CD8 y CD4 que ocurre en el primer mes explicaría la mediana de reactivación más precoz. Por otro lado, el retraso en la reconstitución de los linfocitos T CD4, que se iniciaría a partir de los 6 meses y se prolongaría hasta los 12-24 meses post-TPH, podría explicar la mayor incidencia de infección pero sobre todo de enfermedad orgánica por CMV (asociada a linfopenia CD4) y de la infección refractaria al tratamiento antiviral. Así mismo, la mayor incidencia de infección refractaria, aumenta el riesgo de enfermedad orgánica por CMV, dado que supone una "DNAemia mantenida"

durante un periodo de tiempo. Dichos efectos se han descrito sobre todo en el trasplante haploidéntico aunque probablemente es inherente al mecanismo de acción de la ciclofosfamida post-TPH. Aunque faltan más estudios, se ha descrito que la inmunidad CMV específica y los niveles de linfocitos T CD8+ en los TPH que reciben ciclofosfamida post-TPH son similares a los del haplo-TPH pero la incidencia de infección/enfermedad por CMV es inferior en los TPH no haploidénticos. Este hecho se podría explicar por la necesidad de menos fármacos inmunosupresores (en los TPH no Haplo) y la menor incidencia de EICR que se consigue con la CyPT.

La profilaxis y el tratamiento anticipado reducen el impacto y la incidencia de infección por CMV. Para que las estrategias de profilaxis y tratamiento anticipado sean eficaces es necesario conocer los factores de riesgo que presenta cada paciente, tal y como se demuestra en el primer y tercer trabajo, al describir el efecto de los corticoides y de la CyPT sobre la incidencia de infección por CMV así como sobre la reconstitución inmune CMV específica. De esta manera se podrán diseñar estrategias individualizadas adaptadas al riesgo de cada paciente y procedimiento. A modo de ejemplo, a un paciente de alto riesgo (R +) que realiza un TPH, con CyPT, se podrá adoptar una estrategia profiláctica con letermovir (cuando esté disponible), fármaco prometedor por su perfil de toxicidad favorable. En cuanto al inicio de la profilaxis, no se conoce en este momento, aunque dado que la mediana de reactivación es a los 30 días, y dado que el CMV se encuentra latente en los monocitos, se podría iniciar letermovir al iniciar la recuperación hemoperiférica, para inhibir la replicación viral desde el momento en el virus pueda hacerlo.

Respecto a la infección/reactivación por CMV detectada en sangre, iniciar el tratamiento antiviral con carga viral baja aumenta la eficacia del mismo y por contra, una carga viral elevada es un factor de riesgo para infección refractaria y fracaso del tratamiento antiviral. En la mayoría de los centros hospitalarios se utiliza la PCR-RT en plasma para el diagnóstico de infección/reactivación de CMV. Aunque no existe una recomendación específica sobre a partir de qué carga viral se debe iniciar el tratamiento antiviral, sí que se acepta el valor de > 1.000 UI/ml en plasma para iniciar el tratamiento anticipado. Algunos autores han descrito el beneficio de iniciar tratamiento anticipado con cargas virales < 1.000 UI/ml en situaciones en las que se detecta una carga viral en aumento en 2 o más determinaciones consecutivas. Dado que el plasma es un medio estéril, el hecho de que se detecta carga viral, por pequeña que sea ha de ser tomada en cuenta. Ello reviste especial importancia si el paciente se encuentra en los primeros 100 días post-TPH y/o presenta algún factor de riesgo como son la administración de corticoides o la administración de CyPT. Otros autores han defendido el beneficio de la exposición al virus, mediante la replicación viral con baja carga sobre la que no se realizaría tratamiento antiviral, para que el sistema inmune genere poblaciones de linfocitos CD8 y favorecer así la reconstitución de la inmunidad CMV-específica de manera natural. Esta estrategia puede tener sentido cuando se tiene evidencia de algún indicio de reconstitución inmune post-TPH o bien cuando el paciente se encuentra en el post-TPH tardío. Lógicamente, si no hay reconstitución de linfocitos es muy poco probable que éstos sean capaces de generar respuesta inmune, ni eficaz ni duradera.

La toxicidad relacionada con los fármacos y la emergencia de infección refractaria y resistente obliga a prolongar la exposición a los diferentes antivirales utilizados en el

tratamiento, lo que se traduce en mayor toxicidad y mayor riesgo de enfermedad por CMV. En el caso de enfermedad orgánica, especialmente la gastrointestinal al ser la más frecuente, el disponer de una técnica diagnóstica rápida, objetiva y fiable, como la PCR cuantitativa en tejido, nos permitiría realizar un diagnóstico precoz (*posible* enfermedad por CMV) e iniciar tratamiento antiviral dirigido cuando la carga viral en tejido GI es más baja y mejorar la eficacia del tratamiento antiviral.

La adaptación a las nuevas realidades que se presentan, fruto de los cambios en los tratamientos y en el procedimiento del TPH, conduce, por un lado, a profundizar en el conocimiento de la reconstitución inmune post-TPH cuando se utiliza CyP. Por otro lado, buscar soluciones adecuadas para mejorar la supervivencia de los pacientes. Las estrategias de tratamiento antiviral han de adaptarse no sólo a cada paciente sino también al momento del trasplante en el que ocurre la infección por CMV. La infección por CMV, al igual que el trasplante, evoluciona de manera dinámica. Si queremos evitar la infección, controlarla y evitar tanto el fracaso al tratamiento antiviral como la recaída de la infección, para prevenir la enfermedad orgánica, se deben adaptar las estrategias de profilaxis y tratamiento anticipado a las circunstancias de cada momento del TPH. En un momento dado será necesario priorizar la profilaxis, en otro disminuir toxicidad farmacológica y en otro prevenir recaída y evitar resistencias. Igualmente un mismo paciente puede presentar un riesgo diferente dependiendo de cómo evolucione el trasplante. Por ejemplo, un paciente de riesgo intermedio puede evolucionar a alto riesgo si desarrolla una EICR e inicia tratamiento con corticoides. Por tanto, se ha de estratificar el riesgo de infección de CMV del paciente no sólo en base al estado serológico pre-TPH, sino también a la toma de corticoides a dosis altas, o el uso de la CyPT como profilaxis de EICR. Otro factor importante es el valor de las técnicas diagnósticas y, en base a una correcta interpretación del resultado, iniciar tratamiento antiviral precozmente, para aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad del mismo. Hacer uso de las nuevas estrategias disponibles, farmacológicas y no farmacológicas, de manera individualizada permitirá optimizar los recursos. La monitorización inmunológica, mediante la cuantificación de la inmunidad CMV-específica, permite definir estrategias de tratamiento, definir la duración de la profilaxis y del tratamiento anticipado así como valorar iniciar tratamiento de mantenimiento o profilaxis secundaria en pacientes de alto riesgo para la infección recurrente. El tratamiento de mantenimiento se recomienda en pacientes que han presentado enfermedad orgánica por CMV, en cualquiera de sus manifestaciones. La duración del mismo no está definido ni existe consenso al respecto, por lo que la cuantificación de la inmunidad CMV específica permitiría tomar la decisión de suspender el mantenimiento o realizar una profilaxis secundaria en caso de detectar inmunidad CMV específica, tras haber recibido, al menos, 4 semanas de tratamiento. La presencia de infección por CMV refractaria es un problema cada vez más frecuente especialmente en el contexto de la CyPT. Aquellos pacientes que reciben CyPT y que existe la sospecha clínica de infección refractaria a antivirales (carga viral persistente a pesar de correcto tratamiento antiviral), se puede valorar la posibilidad de realizar doble tratamiento antiviral, por ejemplo con foscarnet y ganciclovir y evitar, en lo posible, las toxicidades de los fármacos. La administración linfocitos CD8+ CMV específicos (inmunoterapia CMV específica) puede ser una opción de tratamiento adyuvante al tratamiento antiviral en pacientes con carga viral persistente en los que no se detecta inmunidad CMV específica, en aquellos pacientes que han desarrollado resistencias al tratamiento antiviral o que presentan toxicidad farmacológica limitante para el uso de

antivirales. Sin embargo, la administración de corticoides contraindica la inmunoterapia CMV específica por anular la eficacia de la misma, por lo que la recomendación es no administrar corticoides o suspenderlos en caso de optar por esta estrategia.

En definitiva, conocer los factores de riesgo permite diseñar estrategias individualizadas adaptadas al riesgo que presenta el paciente en cada momento del TPH, que sean más eficaces en controlar la infección por CMV y por lo tanto, la enfermedad por CMV. Disponer de técnicas para realizar un diagnóstico rápido y fiable así como para evaluar la inmunidad CMV-específica permite iniciar el tratamiento antiviral de manera precoz, evaluar la respuesta al mismo y definir la duración del tratamiento de una manera más objetiva y atendiendo a la realidad de cada paciente. Este manejo individualizado evitará la exposición prolongada e innecesaria al fármaco antiviral, disminuirá la toxicidad y, en otros casos, orientará a alargar la duración del tratamiento antiviral para evitar la reinfección o para controlar mejor la DNAemia y así disminuir el riesgo de enfermedad orgánica por CMV y reducir el potencial desarrollo de resistencias a los antivirales. Todo ello, encaminado a reducir la toxicidad sin perder eficacia y, en definitiva, mejorar la supervivencia de los pacientes.

CONCLUSIONES

1.- El Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos produce una inmunosupresión severa y prolongada debido a aspectos inherentes al procedimiento tales como el tratamiento inmunosupresor y la propia reconstitución inmune post-TPH, así como a aspectos adquiridos, como la presencia de EICR y el tratamiento con corticoides.

2.- En los pacientes seropositivos, la infección por CMV en el post-TPH es frecuente (60%) y la morbilidad asociada a la misma es elevada contribuyendo a una menor supervivencia global.

3.- El tratamiento con corticoides a altas dosis aumenta la incidencia de infección e infección recurrente por CMV y tiene un efecto deletéreo dependiendo del riesgo serológico pre-TPH.

4.- En los pacientes de alto riesgo (D-/R+) la incidencia de infección por CMV no se ve modificada por el tratamiento con corticoides, pero sí la respuesta y la duración del tratamiento antiviral.

5.- En los pacientes de riesgo intermedio (D+/R+) el tratamiento con corticoides aumenta la incidencia de infección y de infección recurrente por CMV con tasas similares a los de alto riesgo.

6.- El tratamiento con corticoides produce un efecto negativo sobre la reconstitución inmune CMV-específica.

7.- Las mejoras en las técnicas diagnósticas de la infección por CMV han contribuido a implementar la estrategia más eficaz contra el CMV en el TPH, el tratamiento anticipado, gracias a la monitorización de la carga viral mediante PCR-RT.

8.- La PCR-RT en tejido GI tiene la misma sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo que la IHQ, por lo que es una técnica fiable en el diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV.

9.- La PCR-RT en tejido gastrointestinal permite realizar un diagnóstico precoz de enfermedad por CMV ("posible" enfermedad por CMV) e iniciar el tratamiento antiviral de manera precoz, con carga viral más baja, lo que puede aumentar la eficacia del tratamiento.

10.- Es posible definir un punto de corte fiable para el diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV (>10.000 copias/ μ g), lo cual permitiría realizar tratamiento de forma más precoz y sería útil para la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral.

11.- La ciclofosfamida post-TPH modifica la epidemiología de la infección por CMV presentando una mediana de aparición más precoz (30 días), mayor incidencia de infección refractaria y tendencia a mayor incidencia de enfermedad por CMV. Debido a estos cambios epidemiológicos el tiempo de exposición a antivirales es superior, lo que aumenta el riesgo de desarrollar resistencias a los fármacos y de aumentar la toxicidad secundaria a los mismos.

12.- Identificar los factores de riesgo que presenta cada paciente para desarrollar infección por CMV así como el uso de las nuevas herramientas disponibles, permite diseñar estrategias individualizadas de profilaxis y tratamiento que sean eficaces en la prevención de la infección y enfermedad por CMV y a la vez minimizar la toxicidad, disminuir la morbilidad asociada y mejorar la supervivencia global de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009;154(1):171-7.
- 2.- Sijmons S, Thys K, Ngwese MM et al. High-Throughput Analysis of Human Cytomegalovirus Genome Diversity Highlights the Widespread Occurrence of Gene-Disrupting Mutations and Pervasive Recombination. *Journal of Virology* 2015 89(15):7673–769
- 3.- Yu X, Jih J, Jiang J, and Zhou ZH. Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science* . 2017 June 30; 356(6345)
- 4.- Crough T and Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2009, p. 76–98
- 5.- Sanbonmatsu S, Pérez Ruiz M, Navarro JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Supl 1:15-22
- 6.- Mocarski E S Jr, Shank T and Pass RF. 2007. Cytomegaloviruses, p. 2701–2772. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- 7.- Stinski MF. 1978. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* 26:686–701.
- 8.- Goodrum F, Reeves M, Sinclair J, High K, and Shenk T. 2007. Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* 110:937–945.
- 9.- Cheung AK, Abendroth A, Cunningham AL, Slobedman B. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3691-9. Epub 2006 Aug 24.
- 10.- Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 1993;67:3166–3175.
- 11.- Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol.* 2008 Mar;41(3):180-5.
- 12.- Noriega VM, Haye KK, Kraus TA et al. Human Cytomegalovirus Modulates Monocyte-Mediated Innate Immune Responses during Short-Term Experimental Latency In Vitro. *Journal of Virology* 2014, 88 (16): 9391–9405.
- 13.- Sissons JG, Bain M, Wills MR. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Infect.* 2002;44:73–77.
- 14.- Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 2006;87:1763–1779.
- 15.- Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 1991;72:2059–2064.

- 16.- Stein J, Volk HD, Liebenthal C, Kruger DH, Prosch S. Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J. Gen. Virol.* 1993;74:2333–2338.
- 17.- Landini MP, Lazzarotto T, Xu J, Geballe AP, and Mocarski ES. 2000. Humoral immune response to proteins of human cytomegalovirus latency-associated transcripts. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 6:100–108.
- 18.- Almanan M, Raynor J, Sholl A. Tissue-specific control of latent CMV reactivation by regulatory T cells. *PLoS Pathog.* 2017 Aug 10;13(8):e1006507.
- 19.- Seckert CK, Griessl M, Büttner JK et al. Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med Microbiol Immunol.* 2012 Nov;201(4):551–66
- 20.- La Rosa C and Diamond DJ. The immune response to human CMV *Future Virol.* 2012 March 1; 7(3): 279–293.
- 21.- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, and Greenberg PD. 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78:1373–1380.
- 22.- Dunn HS, Haney DJ, Ghanekar SA, Stepick-Biek P, Lewis DB, and Maecker HT. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J. Infect. Dis.* 2002; 186:15–22.
- 23.- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol,* 2003 77:4588–4596.
- 24.- Wynn KK, Fulton Z, Cooper L, S. L. et al. Impact of clonal competition for peptide-MHC complexes on the CD8_T-cell repertoire selection in a persistent viral infection. *Blood* 2008; 111:4283–4292.
- 25.- Marshall EE, Geballe AP. Multifaceted Evasion Of The Interferon Response By Cytomegalovirus. *Journal Of Interferon & Cytokine Research* Volume 29, Number 9, 2009
Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch
Mechanisms PA of MHC class I-restricted antigen processing and crosspresentation. *Immunological Reviews* 2005 Vol. 207: 145–157
- 26.- Lilleri D, Fornara C, Revello MG, and Gerna G. 2008. Human cytomegalovirus-specific memory CD8⁺ and CD4⁺ T cell differentiation after primary infection. *J. Infect. Dis.* 198:536–543.
- 27.- Moss P and Khan N. CD8⁺ T-cell immunity to cytomegalovirus. *Human Immunology* (2004) 65; 456–464.
- 28.- Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res.* 2016 Nov 15;76(22):6445–6451.
- 29.- Jacobson LO, Marks ER, Robson MJ, Gaston EO, Zirkle RE. The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949;34:1538–43.

- 30.- Storb R, Epstein RB, Rudolph RH, Thomas ED. Allogeneic canine bone marrow transplantation following cyclophosphamide. *Transplantation* 1969;7:378–86.
- 31.- Storb R, Epstein RB, Graham TC, Thomas ED. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation* 1970;9:240–6.
- 32.- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 1986;314(12):729–735
- 33.- Müller-Ruchholtz W. MHC allograft immunogenicity--its role in bone marrow transplantation and its constant downregulation. *Immunol Invest.* 1991 Apr;20(2):199-206.
- 34.- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491–6.
- 35.- Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* 1970 Jun;9(6):571-87
- 36.- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511–33.
- 37.- Giralt S, Estey E, Albitar M, van BK, Rondon G, Anderlini P et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; 89: 4531–4536.
- 38.- Slavin S, Ackerstein A, Naparstek E, Or R, Weiss L. The graft-versus-leukemia (GVL) phenomenon: is GVL separable from GVHD? *Bone Marrow Transplant.* 1990 Sep;6(3):155-61.
- 39.- Martin PJ. CIK: a path to GVL without GVHD? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Nov;17(11):1571-2.
- 40.- Giralt S, Hester J, Huh Y et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4337-43.
- 41.- Butturini A, Gale RP. The role of T-cells in preventing relapse in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1987 Dec;2(4):351-4.
- 42.- Powles RL, Clink HM, Spence D et al. Cyclosporin A to prevent graft-versus-host disease in man after allogeneic bone- marrow transplantation. *Lancet.* 1980; 1:327–9.
- 43.- Gratwohl A. Cyclosporin-A in allogeneic bone marrow transplantation for leukemia: Basle experience 1979 to 1984. *Tokai J Exp Clin Med.* 1985 Jun;10(2-3):127-32
- 44.- Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE et al. Allogeneic transplantation of **blood**-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1989 Nov;4(6):643-6

- 45.- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26;321(17):1174-8
- 46.- Raju TN. The Nobel chronicles. 1980: George Davis Snell (1903-96); Jean Baptiste Dausset (b 1916); Baruj Benacerraf (b 1920). *Lancet*. 1999 Nov 13;354(9191):1738.
- 47.- Snell GD. The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the nobel prize for physiology or medicine, 1980: studies in histocompatibility. *Scand J Immunol* 1992;36:513–26.
- 48.- Thomas DE and Storb R. The development of scientific foundation of hematopoietic stem cell transplantation based on animal and human studies. Thomas ED, Blume KG and Forman SJ. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 1998. BlackwellPublishing. Pags 1-8.
49. Besse K, Maiers M, Confer D, Albrecht M. On Modeling Human Leukocyte Antigen-Identical Sibling Match Probability for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Estimating the Need for an Unrelated Donor Source. *Biol Blood Marrow Transplant* 22 (2016) 410-417
- 50.- Klein J, Sato A. The HLA System. *N Engl J Med* 2000; 343:702-709
- 51.- Coo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications *Yonsei Med J*. 2007 Feb 28;48(1):11-23
- 52.- Mussetti A, Greco R, Peccatori J, Corradini P. Post-transplant cyclophosphamide, a promising anti-graft versus host disease prophylaxis: where do we stand? *Expert Rev Hematol*. 2017 May;10(5):479-492.
- 53.- Lee SJ, Klein J, Haagenson M et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007;110:4576-4583
- 54.- Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome *Blood*, 1 October 2004, Volume 104, Number 7
- 55.- Rubio MT, Savani BN, Labopin M et al. The impact of HLA-matching on reduced intensity conditioning regimen unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in patients above 50 years—a report from the EBMT acute leukemia working party. *Journal of Hematology & Oncology* (2016) 9:65
- 56.- Shaw BE, Arguello R, Garcia-Sepulveda CA and Madrigal JA. The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology*, 150, 251–258.
- 57.- Lorentino F, Labopin M, Fleischhauer K et al. The impact of HLA matching on outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT is modulated by GVHD prophylaxis. *Blood Adv*. 2017 Apr 21;1(11):669-680
- 58.- Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, et al. Optimizing outcome after unrelated marrow

transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998;92:3515–20.

59.- Ruggeri A, Labopin M, Bacigalupo A et al. Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *Journal of Hematology & Oncology* (2018) 11:40

60.- Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med* 2012;367:1487

61.- Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001;344:175e81.

62.- Eapen M, Logan BR, Horowitz MM, et al. Transplantation of peripheral blood progenitor cells as compared to bone marrow from unrelated related donors for hematologic cancers using fludarabine-alkylating agent based reduced intensity conditioning regimens (ASH Annual Meeting) *Blood* 2013;122. abstr 550.

63.- Eapen M. Unrelated donor transplantation: Peripheral blood or bone marrow e Does it matter? *Best Practice & Research Clinical Haematology* 27 (2014) 278e282

64.- Eapen M, Logan BR, Appelbaum FR, Antin JH, Anasetti C, Couriel DR, Chen J, Maziarz RT, McCarthy PL, Nakamura R, Ratanatharathorn V, Vij R, Champlin RE. Long-term survival after transplantation of unrelated donor peripheral blood or bone marrow hematopoietic cells for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):55-9.

65.- Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2276-2285.

66.- Passweg JR, Baldomero H, Bader P et al. Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplantation* (2018) 53:1139–1148

67.- <http://www.fcarreras.org> (Registro Español Donantes de Médula ósea, REDMO).

68.- <http://www.ont.es> (organización nacional de trasplantes)

69.- Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Non-myeloablative transplants for malignant disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:375-91.

70.- Savani BN, Labopin M, Kröger N et al. Expanding transplant options to patients over 50 years. Improved outcome after reduced intensity conditioning mismatched-unrelated donor transplantation for patients with acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica* 2016-780 Volume 101(6):773

71.- Kharfan-Dabaja MA, Labopin M, Bazarbachi A, et al. Comparing i.v. BU dose intensity between two regimens (FB2 vs FB4) for allogeneic HCT for AML in CR1: a report from the Acute

Leukemia Working Party of EBMT. Bone Marrow Transplantation volume 49, pages1170–1175 (2014)

72.- Le Bourgeois A, Labopin M, Blaise D et al. Reduced-intensity versus reduced-toxicity myeloablative fludarabine/busulfan-based conditioning regimens for allografted non-Hodgkin lymphoma adult patients: a retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Ann Oncol.* 2017 Sep 1;28(9):2191-2198.

73.- Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Martin J, Ferrá C, Nieto JB, Sampol A, Bernal MT, Piñana JL, Vazquez L, Ribera JM, Besalduch J, Moraleda JM, Carrera D, Brunet MS, Perez-Simón JA, Sierra J. Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: chronic graft-versus-host disease is the strongest factor improving survival. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 1;26(4):577-84

74.- Liu H, Zhai X, Song Z, et al. Busulfan plus fludarabine as a myeloablative conditioning regimen compared with busulfan plus cyclophosphamide for acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective and multicenter study. *Journal of Hematology & Oncology*, 2013 6(1), 1– 1.

75.- Lee JH, Joo YD, Kim H, et al. Randomized Trial of Myeloablative Conditioning Regimens: Busulfan Plus Cyclophosphamide Versus Busulfan Plus Fludarabine. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 701– 9.

76.- Bartelink IH, van Reij EM, Gerhardt CE et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Mar;20(3):345-53.

77.- Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec;15(12):1628-33.

78.- Piemontese S, Ciceri F, Labopin M et al. On behalf of the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). A comparison between allogeneic stem cell transplantation from unmanipulated haploidentical and unrelated donors in acute leukemia *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:24

79.- Ruggeri A, Battipaglia G, Labopin M et al. Unrelated donor versus matched sibling donor in adults with acute myeloid leukemia in first relapse: an ALWP-EBMT study. *Journal of Hematology & Oncology* (2016) 9:89

80.- Cantilena CR, Ito S, Battiwalla M et al. Distinct Biomarker Profiles in Ex-vivo T cell depletion Graft Manipulation Strategies: CD34+ Selection vs CD3+/19+ Depletion in Matched Sibling Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018 March ; 24(3): 460–466.

81.- Busca A, Aversa F. In-vivo or ex-vivo T cell depletion or both to prevent graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Nov;17(11):1401-1415

- 82.- Erbey F, Akçay A, Atay D, Ovalı E, Öztürk G. Comparison of outcomes after HLA- matched unrelated and $\alpha\beta$ T- cell- depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for children with high- risk acute leukemia. *Pediatric Transplantation*. 2018;22:e13192.
- 83.- Choi ES, Joon Im H, Kim H et al. Depletion of ab1 T cells for a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children. *J Clin Apher*.2018;1–8.
- 84.- Malard F, Labopin M, Cho C et al. Ex vivo and in vivo T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission resulted in similar overall survival: on behalf of the ALWP of the EBMT and the MSKCC. *Journal of Hematology & Oncology* (2018) 11:127
- 85.- Barbarino JM, Staatze CE, Venkataramananc R, Kleina TE and Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 October; 23(10): 563–585
- 86.- Liu J, Farmer J, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807–15.
- 87.- Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988;241:1655–8.
- 88.- Allison AC and Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000 May;47(2-3):85-118.
- 89.- Nash RA, Antin JH, Karanes C et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2000; 96:2062–8.
- 90.- Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003 May;35(3 Suppl):7S-14S.
- 91.- Antin JH, et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood*. 2003; 102:1601–5.
- 92.- Mohty M. (2007). Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*, 21(7), 1387–1394.
- 93.- Luo Yi, Xiao H, Lai X, Shi J, Tan Y, He J, Xie W, Zheng W, Zhu Y, Ye X, Yu X, Cai Z, Lin M and Huang H.T-cell-replete haploidentical HSCT with low-dose anti-T- globulin compared with matched sibling HSCT and unrelated HSCT Lymphocyte Blood 2014 124: 2735-2743
- 94.- Kanda J, Lopez RD and Rizzieri DA. Alemtuzumab for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Int J Hematol* (2011) 93:586–593
- 95.- Guilcher GMT, Shah R, Shenoy S. Principles of alemtuzumab immunoablation in hematopoietic cell transplantation for non- malignant diseases in children: A review. *Pediatric Transplantation*. 2018;22:e13142.

- 96.- Chakraverty R, Orti G, Roughton M et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010; 116:3080–8.
- 97.- Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-650.
- 98.- Luznik L and Fuchs EJ. High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res*. 2010 July ; 47(1-3): 65–77
- 99.- Moiseev IS, Pirogova OV, Alyanski AL et al. Graft vs Host Disease Prophylaxis in unrelated peripheral blood stem cell transplantation with post-transplantation cyclophosphamide, tacrolimus and mycophenolate mofetil. *BBMT 22* (2016): 1037-1042
- 100.- Slade M, DiPersio JF, Westervelt P, Vij R, Schroeder MA, Romee R. Haploidentical Hematopoietic Cell Transplant with PostTransplant Cyclophosphamide and Peripheral Blood Stem Cell Grafts in Older Adults with Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant 23* (2017) 1736–1743
- 101.- Bashey A and Solomon SR. T-cell replete haploidentical donor transplantation using post-transplant CY: an emerging standard-of-care option for patients who lack an HLA-identical sibling donor. *Bone Marrow Transplantation* (2014) 49, 999–1008
- 102.- Slade M, Fakhri B, Savani BN and Romee R. Halfway there: the past, present and future of haploidentical transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2017) 52, 1–6
- 103.- Immunobiology, the immune system in health and disease, 5th edition. Janeway, Travers, Walport and Shlomchik, Garland Science Publishing, 2001
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/?term=Immunology>
- 104.- Swain SL, McKinstry KK & Strutt TM. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses; *Nature Reviews Immunology* 2012, 12, 136-148
- 105.- Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*. 2015 Aug; 74(2): 318–326.
- 106.- Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*. 2008 Feb;15(2):226-33.
- 107.- Biron CA, and Brossay L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol* 13:458–464.
- 108.- Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227-42
- 109.- Obar JJ and Lefrançois L. Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. *International immunology* (2010) 1 of 7.

- 110.- Kim TK, St. John LS, Wieder ED, Khalili J, Qing Ma and Komanduri KV. Human late memory CD8+ T cells have a distinct cytokine signature characterized by CC Chemokine production without IL-2 production. *The Journal of Immunology* (2009); 183; 6167-6174.
- 111.- Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJG and Carmichael AJ. Identification of naïve or antigen-experienced human CD8+ T Cells bby expression of costimulation and chemokine receptors: Analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8+ T cell response. *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 5455-5464.
- 112.- Malek TR. T helper cells, IL-2 and the generation of cytotoxic T-cell responses. *Trends in Immunology* Vol. 23 No. 10 October 2002: 465-467.
- 113.- Basta S, Bennink JR. A Survival Game of Hide and Seek: Cytomegaloviruses and MHC Class I Antigen Presentation Pathways. *Viral Immunology* Volume 16, Number 3, 2003: 231-246
- 114.- Rocha B and Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Current opinion in Immunology*, 2004, 16:259-263.
- 115.- Northrop JK, Shen H. CD8+ T-cell memory: only the good ones last. *Current Opinion in Immunology* 2004, 16:451–455
- 116.- Cresswell, P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, and Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and crosspresentation. *Immunol. Rev.* 2005;207:145–157
- 117.- Zanetti M. T for two: When helpers need help. *Autoimmunity Reviews* 4 (2005) 571– 578
- 118.- Griekspoor A, Groothuis T, Neijssen J, Herberts C, Neefjes J. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunological Reviews*, vol. 207: 60–76 (2005).
- 119.- Roberto A, Castagna L, Zanon V et al. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. *Blood*. 2015;125(18):2855-2864)
- 120.- Sprent, J, and Tough DF. 2001. T cell death and memory. *Science* 293:245–248.
- 121.- <http://www.ehu.eus/immunologia/wiki>
- 122.- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 344:1058-66. Review
- 123.- Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001 344: 1140-4. Review
- 124.- Murphy K, Travers P, Walport M. The complement system and innate immunity. 2008. In *Janeway's Immunobiology*. Seven edition. Garland Science. New York and London. Pag 61-81. Review.
- 125.- Ochsenbein, AF, and Zinkernagel RM. 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol. Today* 21:624–630

- 126.- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 1143-1238 (2009). American Society for Blood and Marrow Transplantation.
- 127.- Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* (2005) 35(Suppl 1):S53–7.
- 128.- Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol* (2011) 23(5):679–84.
- 129.- Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* (2008) 21(3):579–96.
- 130.- Mackall C, Fry T, Gress R, Peggs K, Storek J, Toubert A. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant* (2009) 44(8):457–62.
- 131.- Petersen SL, Ryder LP, Bjork P, Madsen HO, Heilmann C, Jacobsen N, et al. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant* (2003) 32(1):65–72.
- 132.- Storek J, Witherspoon RP, Maloney DG, Chauncey TR, Storb R. Improved reconstitution of CD4 T cells and B cells but worsened reconstitution of serum IgG levels after allogeneic transplantation of blood stem cells instead of marrow. *Blood* (1997) 89(10):3891–3.
- 133.- Marr KA. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenger. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012 ; 2012: 265–270.
- 134.- Elfeky R, Lazareva A, Qasim W, Veys P. Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation using different stem cell sources. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Jul;15(7):735-751
- 135.- Styczynski J. Who Is the Patient at Risk of CMV Recurrence: A Review of the Current Scientific Evidence with a Focus on Hematopoietic Cell Transplantation. *Infect Dis Ther* (2018) 7:1–16.
- 136.- Ogonek J, Juric MK, Ghimire S, et al. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation *Frontiers in Immunology*.
- 137.- Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP and Gerna G. Human Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and immune control of viral infection. *Haematologica* (2008) Feb; 93 (2): 248-256.
- 138.- Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C et al. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Infectious Diseases* (2008); 198:818 -26.

- 139.- Corre E, Carmagnat M, Busson M et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: Bcell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* (2010) ;95:1025-1029.
- 140.- Luo XH, Chang YJ and Huang XJ. Improving Cytomegalovirus-Specific T Cell Reconstitution after Haploidentical Stem Cell Transplantation. *Journal of Immunology Research* Volume 2014, Article ID 631951.
- 141.- Pei XY, Zhao XY, Xu LP et al. Immune reconstitution in patients with acquired severe aplastic anemia after haploidentical stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2017) 52, 1556–1562.
- 142.- Retière C, Willem C, Guillaume T et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of highdose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 14):1451-11464.
- 143.- Noviello M, Forcina A, Veronica V et al. Early recovery of CMV immunity after HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation as a surrogate biomarker for a reduced risk of severe infections overall. *Bone Marrow Transplantation* (2015) 50, 1262–1264.
- 144.- Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (2014) 440e449.
- 145.- Crocchiolo R, Bramanti S, Vai A et al. Infections after T-replete haploidentical transplantation and high-dose cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. *Transpl Infect Dis* 2015; 17: 242–249.
- 146.- Kato R, Tamaki H, Ikegame K et al. Early detection of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes against cytomegalovirus antigenemia in human leukocyte antigen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* (2015) 94:1707–1715
- 147.- Rimondo A, Crocchiolo R, El-Cheikh J et al. The calcineurin inhibitor and the intensity of the conditioning regimen may affect the occurrence of polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplantation* (2017) 52, 135–137.
- 148.-Ljungman P, Hakki M and Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* . 2011 February ; 25(1): 151–169
- 149.- 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 Transplantation* (2009); 1-7.
- 150.- Muñoz-Cobo B, Giménez E, Solano C, et al. An evaluation of the role of NKG2C+ natural killer cells in protection from cytomegalovirus DNAemia early following allogeneic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2014 May;86(5):806-11

- 151.- Eid AJ, Brown RA, Hogan WJ et al. Kinetics of interferon-gamma producing cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and the risk of subsequent CMV viremia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease* (2009) 11: 519-528.
- 152.- Tormo N, Solano C, Benet I et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active infection. *Journal of medical virology* (2010) 82: 1208-1215.
- 153.- Pourghesari B, Piper KP, McLarnon A et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow transplantation* (2009) 43, 853-861.
- 154.- Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 9:543-558 (2003)
- 155.- Ljungman P, de la Camara R, Robin C et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019 Aug;19(8):e260-e272.
- 156.- Boeckh M and Ljungman P. How we treat CMV in hematopoietic cell transplant recipients? *Blood* 2009;113:5711-5719.
- 157.- Ashley P, Ng, Worth L, Chen L et al. Cytomegalovirus DNAemia and disease: incidence, natural history and management in settings other than allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90:1672-1679.
- 158.- Zaia JA. Cytomegalovirus Infection. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, 4th edition. 2009 Blackwell Publishing, ISBN: 9781405153485.
- 159.- Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, and Riddell SR. 1994. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83:1971–1979.
- 160.- Sellar RS, Vargas FA, Henry JY et al. CMV promotes recipient T-cell immunity following reduced-intensity T-cell-depleted HSCT, significantly modulating chimerism status. *Blood* 2015;125:731–9.
- 161.- Duarte RF and Lyon S. Novel approaches to CMV after HCT: report from the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Future Science*. OA (2018)4(5), FSO296
- 162.- Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C and Boeckh M. Neutropenia in Allogeneic Marrow Transplant Recipients Receiving Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease: Risk Factors and Outcome. *Blood*, 1997, 90 (6): 2502-2508.

- 163.- Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis.* 2002;185(3):273–282.
- 164.- Einsele H, Reusser P, Bornhäuser M et al. Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2006;107: 3002-3008.
- 165.- Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2010;116(14):2411–2419.
- 166.- Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1309–1314.
- 167.- Chan ST, Logan AC. The clinical impact of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: Why the quest for meaningful prophylaxis still matters. *Blood Reviews* 31 (2017) 173–183
- 168.- Litjens NHR, Van der Wagen L, Kuball J and Kwekkeboom J. Potential beneficial effects of Cytomegalovirus infection after transplantation. *Frontiers in Immunology* 9:389 (2018)
- 169.- Ljungman P. CMV: a warrior against leukemia? *BLOOD*, 15 AUGUST 2013 x VOLUME 122, NUMBER 7: 1101.
- 170.- Thomson KJ, Mackinnon S, Peggs KS. CMV-specific cellular therapy for acute myeloid leukemia? *Blood.* 2012;119(4):1088–1090, author reply 1090-1091.
- 171.- Scheper W, van Dorp S, Kersting S, et al. $\gamma\delta$ T cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT crossrecognize CMV and leukemia. *Leukemia.* 2013;27(6):1328–1338.
- 172.- Green ML, Leisenring WM, Xie H, et al CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(7):1316-1324)
- 173.- Inagaki J, Noguchi M, Kurauchi K, Tanioka S, Fukano R, Okamura J. Effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22: 300–6.
- 174.- Teira P, Battiwalla M, Ramanathan M et al. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood.* 2016 May 19; 127(20): 2427–2438
- 175.- El-Cheikh J, Devillier R, Crocchiolo R et al. “Impact of pretransplant donor and recipient cytomegalovirus serostatus on outcome for multiple myeloma patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation”. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013 Apr 10;5(1):e2013026.

176.- Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMVseropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000;95:2240–5.

177.- Boeckh M and Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004;103:2003-2008

178.- Crocchiolo R, Castagna L, Furst S et al. The patient's CMV serological status affects clinical outcome after T-cell replete haplo-HSCT and post-transplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplantation* (2016) 51, 1134–1136.

179.- Bhutani D, Dyson G, Manasa R, Deol A, Ratanatharathorn V, Ayash L, et al. Incidence, Risk factors, and outcome of cytomegalovirus viremia and gastroenteritis in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:159–64.

180.- Ljungman P, Brand R, Hoek J, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H for the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Donor Cytomegalovirus Status Influences the Outcome of Allogeneic Stem Cell Transplant: A Study by the European Group for Blood and Marrow Transplantation *Clin Infect Dis*. 2014 Aug 15;59(4):473-81.

181.- Schmidt-Hieber M, Labopin M, Beelen D et al. CMV serostatus still has an important prognostic impact in de novo acute leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation: a report from the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood*. 2013;122(19):3359-3364.

182.- Cesaro S, Crocchiolo R, Tridello G et al. Comparable survival using a CMV-matched or a mismatched donor for CMV+ patients undergoing T-replete haplo-HSCT with PT-Cy for acute leukemia: a study of behalf of the infectious diseases and acute leukemia working parties of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation* (2018) 53:422–430

183.- McCurdy SR, Zhang M, St. Martin A et al. Effect of donor characteristics on haploidentical transplantation with posttransplantation cyclophosphamide. *Blood Advances* (Feb) 2018 VOLUME 2, NUMBER 3.

184.- George B, Kerridge IH, Gilroy N et al. A risk score for early cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation identifies low-, intermediate-, and high-risk groups: reactivation risk is increased by graft-versus-host disease only in the intermediate-risk group. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 141–148.

185.- 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 June 18; 113 (25):6465-6476.

186.- Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A et al. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. *Int. J Hematol.* (2010); May 21.

- 187.- Cho BS, Yahng SA, Kim JH et al. Impact of cytomegalovirus gastrointestinal disease on the clinical outcomes in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease in the era of preemptive therapy. *Ann Hematol.* 2013 Apr;92(4):497-504.
- 188.- Krause H, Hebart H, Jahn G, Muller CA, and Einsele H. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant.* . 1997; 19:1111–1116.
- 189.- Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B et al. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65- specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identified patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* (2008) 748: 211-220.
- 190.- Pastore D, Delia M, Mestice A et al. Recovery of CMV –specific CD8+ Tcells and T regs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol. Blood marrow transplant* (2010) May 7.
- 191.- Widmann T, Sester U, Gärtner BC et al. Levels of CMV Specific CD4 T Cells Are Dynamic and Correlate with CMV Viremia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PlosOne* 2008 | Volume 3, Issue 11, e3634
- 192.- Einsele H, Ehninger G, Hebart H et al. Incidence of local CMV infection and acute intestinal GVHD in marrow transplant recipients with severe diarrhoea. *Bone Marrow Transplantation* (1994), 14 (6): 955-963.
- 193.- Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. Review, *Bone Marrow Transplantation* (2008) 42, S70-S72
- 194.- Ljungman P, Griffiths P and Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* (2002) 34: 1094-1097.
- 195.- Einsele H, Mielke S and Grigoleit GU. Diagnosis and treatment of cytomegalovirus 2013. *Curr Opin Hematol.* 2014 Nov;21(6):470-5
- 196.- Hakki M, Riddell SR, Storek J et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation (*Blood.* 2003;102:3060-3067)
- 197.- George B, Pati N, Gilroy N, et al. “Pretransplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy”. *Transpl Infect Dis.* 2010 Aug 1;12(4):322-9.
- 198.- Locatelli F, Bertaina A, Bertaina V and Merli P. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: management of infection. *Expert Review of Hematology: Vol 9, No 1, 2016*
- 199.- Nichols WG, Corey L, Goole T et al. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. *Blood.* 2001;97:867-874

- 200.- Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* (2003);101:407-414.
- 201.- Özdemir E, Saliba RM, Champlin RE et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation* (2007) 40, 125–136
- 202.- Kim DH, Kim JG, Lee NY et al. Risk factors for late cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation using HLA-matched sibling donor: donor lymphocyte infusion and previous history of early CMV infection. *Bone Marrow Transplantation* (2004) 34, 21–27.
- 203.- Boeckh M, Gooley TA, Bowden RA. Effect of high-dose acyclovir on survival in allogeneic marrow transplant recipients who received ganciclovir at engraftment or for cytomegalovirus pp65 antigenemia. *J Infect Dis.* 1998;178:1153-1157.
- 204.- Zaia JA, Gallez-Hawkins GM, Tegtmeier BR, et al. Late cytomegalovirus disease in marrow transplantation is predicted by virus load in plasma. *J Infect Dis.* 1997;176:782-785.
- 205.- Atilla E, Atilla PA, Bozdag SC and Demirer T. A review of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantations. *Infection* (2017) 45:403–411
- 206.- Slade M, Goldsmith S, Romee R et al. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2017;19:e12629
- 207.- Metafuni E, Chiusolo P, Sica S et al. Foscarnet treatment of cytomegalovirus infection in haploidentical or unrelated donor transplants. *Bone Marrow Transplantation* (2018) 53:1560–1567
- 208.- Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH et al, Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. “Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials”. *Clin Infect Dis.* 2017 Jan 1;64(1):87-91.
- 209.- Machado CM, Dulley FL, Boas LS, Castelli JB, Macedo MC, Silva RL, et al. CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment of pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:413–7.
- 210.- Boeckh M, Stevens-Ayers T, Travi G, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA Quantitation in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients With CMV Pneumonia. *J Infect Dis.* 2017 May 15;215(10):1514-1522
- 211.- Eid AJ, Bakri SJ, Kijpittayarit S, Razonable RR. Clinical features and outcomes of cytomegalovirus retinitis after transplantation. *Transpl Infect Dis* 2008;10:13–8.
- 212.- Reddy SM, Winston DJ, Territo MC, Schiller GJ. CMV central nervous system disease in stem-cell transplant recipients: an increasing complication of drug-resistant CMV infection and protracted immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45:979–84.

- 213.- Hebart H, Dagnik S, Stevanovic S et al. 2002. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gammaenzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99:3830–3837.
- 214.- Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Current opinion in infectious diseases* (2007) 20:408-411.
- 215.- Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infectious Diseases* 2007, 7:138
- 216.- Park SY, Lee SO, Choi SH et al. Paradoxical Rising Cytomegalovirus Antigenemia during Preemptive Ganciclovir Therapy in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Incidence, Risk Factors, and Clinical Outcomes. *Journal Of Clinical Microbiology*, 2011, Vol. 49, No. 12: 4179–4184
- 217.- Gimeno C 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. *Journal of clinical microbiology* (2008) 46; 10: 3311-3318.
- 218.- Alice T, Enrietto M, Pittaluga F et al. Quantitation of Cytomegalovirus DNA by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Peripheral Blood Specimens of Patients With Solid Organ Transplants: Comparison With End-Point PCR and pp65 Antigen Test. *Journal of Medical Virology* 78:915–922 (2006)
- 219.- Alice T, Cerutti F, Pittaluga F et al. Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *Journal of Virological Methods* 2008 148(1-2):9-16.
- 220.- Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology* 2008 Mar;41(3):192-7
- 221.- Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(12):1793-7.
- 222.- Gracia-Ahufinger I, Tormo N, Espigado I et al. Differences in cytomegalovirus plasma viral loads measured in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients using two commercial real-time PCR assays. *Journal of Clinical Virology* (2010) 48; 142-146.
- 223.- WHO/BS/10.2138 EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION Geneva, 18 to 22 October 2010 Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays. Jacqueline F. Fryer, Alan B. Heath, Rob Anderson, Philip D. Minor and the Collaborative Study Group
- 224.- Lisboa LF, Asberg A, Kumar D et al. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation*. 2011 Jan 27;91(2):231-6.

- 225.- Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y et al. Are We There Yet? Impact of the First International Standard for Cytomegalovirus DNA on the Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. *Clinical Infectious Diseases* 2016;63(5):583–9
- 226.- Naegele K, Lautenschlager I, Gosert R et al. Cytomegalovirus sequence variability, amplicon length, and DNase-sensitive non-encapsidated genomes are obstacles to standardization and commutability of plasma viral load results. *J Clin Virol.* 2018 Jul;104:39-47.
- 227.- Schlischewsky E, Fuehner T, Warnecke G et al. “Clinical significance of quantitative cytomegalovirus detection in bronchoalveolar lavage fluid in lung transplant recipients”. *Transpl Infect Dis.* 2013 Feb;15(1):60-9.
- 228.- Mills AM, Guo FP, Copland AP, Pai RK and Pinsky BA. “A comparison of CMV detection in gastrointestinal mucosal biopsies using immunohistochemistry and PCR performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue”. *Am J Surg Pathol.* 2013 Jul;37(7):995-1000.
- 229.- McCoy MH, Post K, Sen JD et al. “qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of gastrointestinal biopsies”. *Hum Pathol.* 2014 Jan;45(1):48-53.
- 230.- Arai Y, Kondo T, Kitano T et al. “Usefulness of quantitative PCR in biopsy specimens for early therapeutic intervention in gastro-intestinal cytomegalovirus infections after allogeneic stem cell transplantation”. *Rinsho Ketsueki.* 2014 Dec;55(12):2400-7. Abstract (Article in Japanese)
- 231.- Okahara K, Nagata N, Shimada T et al. “Colonic cytomegalovirus detection by mucosal PCR and antiviral therapy in ulcerative colitis”. *PLoS One.* 2017 Sep 8;12(9):e0183951.
- 232.- Zagórowicz E, Przybysz A, Szlak J, Magdziak A, Wieszczy P, Mróz A. “Detection of cytomegalovirus by immunohistochemistry of colonic biopsies and quantitative blood polymerase chain reaction: evaluation of agreement in ulcerative colitis”. *Scand J Gastroenterol.* 2018 Apr;53(4):435-441.
- 233.- Ganzenmueller T, Henke-Gendo C, Schlué J, Wedemeyer J, Huebner S, Heim A. “Quantification of cytomegalovirus DNA levels in intestinal biopsies as a diagnostic tool for CMV intestinal disease”. *J Clin Virol.* 2009 Nov;46(3):254-8
- 234.- Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T et al. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol.* 2010 Jun 21;16(23):2907-12.
- 235.- Yin YM, Wu T, Ji SQ et al. Cytomegalovirus enteritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011 Aug;32(8):516-20. Abstract (Article in Chinese).
- 236.- Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O and Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV –specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow transplantation* (2007) 40, 865-869

- 237.- Lacey SF, Diamond DJ and Zaia JA. Assessment of cellular immunity to human cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Biology of Blood and Marrow transplantation*, 2004(10):433-447.
- 238.- Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97:1232-1240.
- 239.- Solano C, Benet I, Clari MA et al. 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* 2008. 93:1434-1436.
- 240.- Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R et al. Immune monitoring with iTAG MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study. *Blood* 2010;116(10):1655-1662)
- 241.- Jaskula E, Duplek D, Duda D, Bogunia-Kubik K, Mlynarcewska A and Lange A. Interferon Gamma 13-CA- Repeats Homozygous Genotype and a low proportion of CD4 + Lymphocytes are independent risk factors for Cytomegalovirus reactivation with a high number of copies in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood and Marrow Transplant* 15: 1296- 1305 (2009)
- 242.- Gratama JW, van Esser JWJ, Lamers CHJ et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 2001;98:1358-1364.
- 243.- Borchers S, Luther S, Lips U et al. Tetramer monitoring to assess risk factors for recurrent cytomegalovirus reactivation and reconstitution of antiviral immunity post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2011: 13: 222^236.
- 244.- Fleming T, Dunne J and Crowley B. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD+ T cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish hospital. *Journal of medical virology* (2010) 82: 433-440.
- 245.- Saldan A, Forner G, Mengoli C et al. Comparison of the Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot and CMV QuantiFERON Cell-Mediated Immune Assays in CMV-Seropositive and -Seronegative Pregnant and Nonpregnant Women. *J Clin Microbiol* 54:1352–1356.
- 246.- Abate D, Saldan A, Mengoli C et al. Comparison of CMV ELISPOT and CMV Quantiferon™ interferon releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2013
- 247.- Abate D, Saldan A, Fiscon M et al. Evaluation of Cytomegalovirus (CMV)–Specific T Cell Immune Reconstitution Revealed That Baseline Antiviral Immunity, Prophylaxis, or Preemptive Therapy but not Antithymocyte Globulin Treatment Contribute to CMV-Specific T Cell Reconstitution in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202(4):585–594 (técnica Elispot).

- 248.- Ljungman P, De la Cámara R, Cordonnier C et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with haematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplantation* (2008) 42: 227-240.
- 249.- Ljungman P, Reusser P, de la Camara R et al. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation* (2004) 33, 1075–1081
- 250.- Gagelmann N, Ljungman P, Styczynski J, Kröger N. Comparative Efficacy and Safety of Different Antiviral Agents for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 24(2018):2101 -2109
- 251.- Chen K, Cheng MP, Hammond SP, Einsele H, Marty FM. Antiviral Prophylaxis For Cytomegalovirus Infection In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Blood Advances*.2018016493, 2018 X Volume 2, Number 16
- 252.- Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2017 Dec 21;377(25):2433-2444
- 253.- Meijer E, Boland GJ, Verdonck LF. “Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants”. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Oct;16(4):647-57.
- 254.- Solano C, Giménez E, Piñana JL et al. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplantation* (2016) 51, 718–721
- 255.- Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol*. 2014 Feb;52(2):654-6.
- 256.- Busca A, de Fabritiis P, Ghisetti V et al. Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 102-107
- 257.- McIntosh M, Hauschild B, Miller V. Human cytomegalovirus and transplantation: drug development and regulatory issues. *J. Virus Erad*. 2(3), 143–148 (2016).
- 258.- Griffiths P, Lumley S. Cytomegalovirus. *Curr Opin Infect Dis* 2014, 27:554–559
- 259.- Jorga K, Chavanne C, Frey N et al. Bottom-up meets top-down: Complementary PBPK and PopPK modeling for regulatory approval of a dosing algorithm of valganciclovir in very young children. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Dec;100(6):761-769
- 260.- Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, et al. Maribavir 1263-300 Clinical Study Group. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2011 Apr;11(4):284-92

- 261.- Maertens J, Cordonnier C, Jaksch P et al. Maribavir for Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Reactivation. *N Engl J Med*. 2019 Sep 19;381(12):1136-114
- 262.- Marty FM, Winston DJ, Rowley SD et al. CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2013;369:1227-36.
- 263.- Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S et al. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2014;370:1781-9.
- 264.- Foolad F, Aitken SL, Chemaly RF. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection in adult cytomegalovirus-seropositive hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018 Oct;11(10):931-941.
- 265.- Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol*. 2002 Mar-Apr;12(2):115-27.
- 266.- Chou S. A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res*. 2017 December ; 148: 1–4.
- 267.- Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, Ruebsamen-Schaeff H, Zimmermann H, Lischka P. The Novel Anticytomegalovirus Compound Aic246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication Through A Specific Antiviral Mechanism That Involves The Viral Terminase. *Journal Of Virology*, 2011, Vol 85, No 20, P. 10884–10893
- 268.- Borst EM, Kleine-Albers J, Gabaev I et al. The Human Cytomegalovirus UL51 Protein Is Essential for Viral Genome Cleavage-Packaging and Interacts with the Terminase Subunits pUL56 and pUL89. *Journal of Virology*, 2013, Vol 87 No 3 p. 1720–1732
- 269.- Almyroudis NG, Jakubowski A, Jaffe D et al. Predictors for persistent cytomegalovirus reactivation after T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease* 2007;9:286-94
- 270.- Nakamura R, Battiwalla M, Solomon S, et al. Persisting posttransplantation cytomegalovirus antigenemia correlates with poor lymphocyte proliferation to cytomegalovirus antigen and predicts for increased late relapse and treatment failure. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10(1):49–57.
- 271.- Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Emergence of drugresistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transpl* 2008;22:162–70.
- 272.- Shmueli E, Or R, Shapira MY, Resnick IB, Caplan O, Bdolah-Abram T, et al. High rate of cytomegalovirus drug resistance among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2014;209: 557–61.
- 273.- Kleiboeker S, Nutt J, Schindel B, Dannehl J, Hester J. Cytomegalovirus antiviral resistance: characterization of results from clinical specimens. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 561–567.
- 274.- Lurain NS and Chou S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2010, Vol 23 (4): 689–712

- 275.- Campos AB, Ribeiro J, Boutolleau D, Sousa H. Human cytomegalovirus antiviral drug resistance in hematopoietic stem cell transplantation: current state of the art. *Rev. Med. Virol.* 2016; 26: 161–182.
- 276.- James SH, Prichard MN. The genetic basis of human cytomegalovirus resistance and current trends in antiviral resistance analysis. *Infect Disord Drug Targets.* 2011 Oct;11(5):504-13.
- 277.- Liu J, Kong J, Chang YJ et al. Patients with refractory cytomegalovirus (CMV) infection following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation are at high risk for CMV disease and non-relapse mortality. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(1121):e9-15.
- 278.- Chemaly RF, Chou S, Einsele H et al. Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases* 2019 Apr 8;68(8):1420-1426
- 279.- Herling M, Schroder L, Awerkiew S et al. Persistent CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a CMV-seronegative donor-to-positive recipient constellation: development of multidrug resistance in the absence of anti-viral cellular immunity. *J Clin Virol* 2016; 74:57–60.
- 280.- Komatsu TE, Pikis A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Research* 101 (2014): 12-25
- 281.- Fischer L, Imrich E, Sampaio KL et al. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Research* 131 (2016) 1-8.
- 282.- Papanicolaou GA, Silveira FP, Langston AA et al. Maribavir for Refractory or Resistant Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic-cell or Solid-organ Transplant Recipients: A Randomized, Dose-ranging, Double-blind, Phase 2 Study. *Clinical Infectious Diseases* 2019;68(8):1255–64
- 283.- Einsele H. Immunotherapy for CMV infection. *Cytotherapy.* 2002;4(5):435-6.
- 284.- Einsele H, Roosnek E, Rufer N et al. 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99:3916–3922.
- 285.- Einsele H, Hebart H. CMV-specific immunotherapy. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):558-64.
- 286.-Koehne G, Hasan A, Doubrovina E et al. Immunotherapy with Donor T-cells Sensitized with Overlapping Pentadecapeptides for Treatment of Persistent CMV Infection or Viremia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 September ; 21(9): 1663–1678.
- 287.- Blyth E, Clancy L, Simms R et al. Donor-derived CMV specific T-cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2013;121(18):3745-3758.

288.- Helen E. Heslop. Pharmacotherapy versus T lymphocytes for CMV. *Blood*, 2 May 2013 X
Volume 121, Number 18 3545

289.- Scheinberg P, Melenhorst JJ, Brenchley JM et al. The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood* (2009 December), 114 (24): 5071-5080.

290.- Leen AM, Bollard CM, Mendizabal AM. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013 Jun 27;121(26):5113-23.