

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Problematika cytomegalovirové infekce u
transplantovaných pacientů**

(Cytomegalovirus infection in transplant patients)

Jan Dvořák

Školitel: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

2009/2010

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ	8
3	STAVBA VIRIONU	9
3.1	Kapsida	9
3.2	Tegument	10
3.3	Obal	10
3.4	Virový genom	11
4	ŽIVOTNÍ CYKLUS	11
4.1	Lytický životní cyklus	11
4.2	Latentní životní cyklus	12
5	IMUNITNÍ OBRANA PROTI HCMV	13
5.1	Vrozená imunita	13
5.1.1	NK buňky	14
5.2	Adaptivní Imunita	14
5.2.1	Protilátky	14
5.2.2	Buněčná imunita	15
5.2.2.1	CD8+ T lymfocyty	15
5.2.2.2	CD4+ T lymfocyty	15
5.3	Mechanismy úniku HCMV před imunitním systémem	16
6	EPIDEMIOLOGIE	17
7	INFEKCE HCMV A S NÍ SPOJENÁ ONEMOCNĚNÍ	17
7.1	Vrozená infekce	17

7.2	Infekce u zdravých lidí	18
7.3	Infekce u pacientů s infekcí HIV	18
8	INFEKCE HCMV U TRANSPLANTOVANÝCH PACIENTŮ	18
8.1	Pacienti po orgánové transplantaci (SOT)	19
8.2	Pacienti po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT)	19
8.2.1	Allogenní HSCT	19
8.2.2	Autologní HSCT	20
9	DETEKCE HCMV	21
9.1	Nepřímý průkaz	21
9.1.1	Sérologie	21
9.2	Přímý průkaz	21
9.2.1	Tkáňové kultury	21
9.2.2	Detekce virových antigenů	22
9.2.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	22
9.2.4	Další metody	23
10	MONITOROVÁNÍ HCMV	23
10.1	Monitorování antigenemie	24
10.2	Monitorování hladiny virové DNA	24
10.3	Monitorování imunity	24
11	MOŽNOSTI PREVENCE A LÉČBY NEMOCNĚNÍ SPOJENÝCH S HCMV	25
11.1	Antivirotika používaná k profylaktické a preemptivní léčbě	25
11.2	Možnosti profylaktické vakcinace	26
12	ZÁVĚR	26
13	PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY	28

Abstrakt

Cytomegalovirus (HCMV) je běžný lidský β -herpesvirus, který vykazuje vysokou prevalenci v populaci. K přenosu dochází těsným kontaktem mezi osobami, u kterých způsobuje převážně asymptomatickou primární infekci, která poté přechází v latentní infekci. Problémy tento virus způsobuje během těhotenství, kde může způsobit potraty, defekty plodu a vrozené defekty novorozenců. Mnohem větším nebezpečím je infekce tímto virem u imunokompromitovaných pacientů převážně u pacientů s infekcí HIV a u transplantovaných pacientů.

Tato práce je komplexním pojednáním o biologii HCMV se zaměřením především na rizika, která HCMV způsobuje u pacientů po orgánové transplantaci a transplantaci hematopoetických kmenových buněk, včetně přehledu metod používaných pro diagnostiku a monitorování HCMV infekce a možností prevence vzniku HCMV asociovaných onemocnění.

Klíčová slova: Cytomegalovirus, transplantace hematopoetických kmenových buněk, orgánová transplantace, detekce, monitorování, polymerázová řetězová reakce, buněčná imunita, protilátková imunita

Abstract

Cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous human β -herpesvirus highly prevalent in the population. HCMV is transmitted by close contact between individuals. In infected person this virus causes mainly asymptomatic primary infection, after which the latency is established. In pregnant women HCMV infection can lead to abortions, defects of the fetus and congenital abnormalities of newborn babies. Even more serious complications are caused by this virus in the immunocompromised patients, especially those infected by HIV and in patients who undergo solid organ transplantation and hematopoietic stem cell transplantation.

This work is a complex report about HCMV biology with emphasis on complications which HCMV causes in patients after solid organ transplantation and hematopoietic stem cell transplantation. This article also contains summary of the methods used for diagnostic of HCMV infection and monitoring and prevention of HCMV associated diseases.

Keywords: Cytomegalovirus, hematopoietic stem cell transplantation, solid organ transplantation, detection, monitoring, polymerase chain reaction, cellular immunity, humoral immunity

Seznam zkratk

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome	syndrom získaného selhání imunity
cAMP	Cyclic adenosinmonophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
crs	Cis acting repression signal	v cis působící represní signál
CFC	Cytokine flow cytometry	měření množství cytokinů průtokovou cytometrií
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
DE	Delayed – early genes	opožděně časně geny
EBV	Epstein-Barr virus	virus Epteina a Barrové
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	imunoanalýza spojená s enzymatickou reakcí
ELISPOT	Enzym linked immunospot	imunospot spojený s enzymatickou reakcí
FRET	Flourescence resonance energy transfer	přenos energie flourescenční rezonancí
GvHD	Graft versus host disease	reakce štěpu proti hostiteli
HCMV	Human cytomegalovirus	lidský cytomegalovirus
HHV-5	Human herpesvirus 5	lidský herpesvirus 5
HHV-6	Human herpesvirus 6	lidský herpesvirus 6
HHV-8	Human herpesvirus 8	lidský herpesvirus 8
HIV	Human immunodeficiency virus	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	Human leukocyte antigen	antigeny na povrchu leukocytů
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation	transplantace hematopoetických kmenových buněk
HSV-1	Herpes simplex virus 1	virus herpes simplex 1

HSV-2	Herpes simplex virus 2	virus herpes simplex 2
IE	Immediate – early genes	bezprostředně časné geny
INF-γ	Interferon gamma	Interferon gamma
IR	Internal repeat	vnitřní repetice
IRL	Long internal repeat	dlouhá vnitřní repetice
IRS	Short internal repeat	krátká vnitřní repetice
L	Late genes	pozdní geny
MCMV	Mouse cytomegalovirus	myší cytomegalovirus
MCP	Major capsid protein	hlavní kapsidový protein
MHC I	Major histocompatibility complex I. class	hlavní histokompatibilní komplex I. třídy
MHC II	Major histocompatibility complex II. class	hlavní histokompatibilní komplex II. třídy
MIEP	Major immediate early promotor	hlavní promotor bezprostředně časných genů
mRNA	messenger RNA	mesengerová RNA
NASBA	nucleic acid sequence based amplification	
NF-κB	Nuclear factor κ B	transkripční jaderný faktor κ B
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámeček
PCR	Polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PBL	Periferal blood leukocyte	leukocyty periferní krve
PBMC	Periferal blood mononuclear cells	jednojaderné buňky periferní krve
RT-PCR	Real - time PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SCP	Smallest capsid protein	nejmenší kapsidový protein
SOT	Solid organ transplantation	orgánová transplantace

SSB	Single strand binding	protein vazající se na jednořetězcovou nukleovou kyselinu
TLRs	Toll - like receptors	receptory podobné Toll
TR	Terminal repeat	terminální repetice
TRL	Long terminal repeat	dlouhá terminální repetice
TRS	Short terminal repeat	krátká terminální repetice
TNF-α	Tumor necrosis factor α	tumor nekrotizující faktor α
UL	Unique long	unikátní dlouhá oblast
US	Unique short	unikátní krátká oblast
VZV	Varicella-Zoster virus	virus Varicella-Zoster

1 Úvod

Lidský cytomegalovirus (HCMV, HHV-5) je běžný lidský herpesvirus, který vykazuje vysokou prevalenci v populaci. Tento virus je největším z lidských herpetických virů. U zdravých lidí tento virus způsobuje převážně asymptomatickou infekci, ve vyjímečných případech však může infekce probíhat symptomaticky s příznaky podobnými mononukleóze. Velmi nebezpečným se virus stává během těhotenství, kde může v malém procentu případů způsobit potrat, závažné defekty plodu nebo vrozené defekty nově narozených dětí. Velmi závažné problémy způsobuje tento virus u pacientů s defektem imunity - u pacientů infikovaných HIV a transplantovaných pacientů.

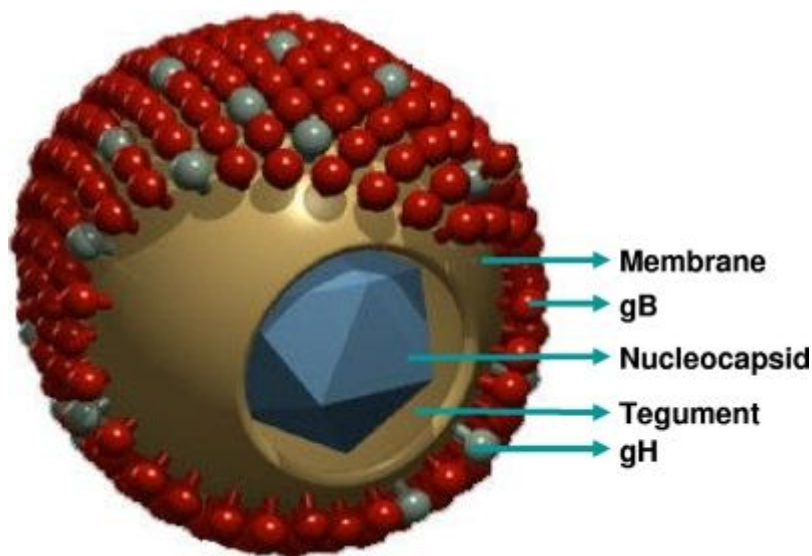
Cílem této práce je shrnutí poznatků o důsledcích infekce HCMV především u pacientů, kteří podstupují transplantace a o možnostech prevence, diagnostiky, monitorování a léčby onemocnění spojených s HCMV u těchto pacientů.

2 Taxonomické zařazení

HCMV patří do čeledi Herpesviridae která je dělena na tři základní podčeledi α , β a γ – herpesvirinae. Pro podčeleď α je charakteristický relativně krátký reprodukční cyklus, variabilní hostitelský okruh, destrukce produktivně infikovaných buněk a ustavení latence v gangliích. Z této podčeledi využívají savčí hostitele rody Simplexvirus a Varicellovirus. Do rodu Simplexvirus patří lidské patogeny herpes simplex virus 1 a 2 (HSV-1 a HSV-2) a do rodu Varicellovirus varicella-zoster virus (VZV). Viry z podčeledi γ využívají savčí hostitele, napadají hlavně T a B lymfocyty a latentně infikují lymfoidní tkáň. Do této podčeledi patří dva lidské patogeny Epstein-Barr virus (EBV) patřící do rodu Lymphocryptovirus a lidský herpesvirus 8 (HHV-8) patřící do rodu Rhadinovirus. Pro podčeleď β je charakteristický dlouhý životní cyklus, úzký hostitelský okruh, nápadně zvětšené infikované buňky (cytomegalia) a ustavení latence v sekrečních žlázách. V podčeledi β rozlišujeme několik rodů: Roseolovirus, do kterého patří lidský herpesvirus 6 (HHV-6), Cytomegalovirus kam patří HCMV a Muromegalovirus kam řadíme myší cytomegalovirus (MCMV) (pro přehled Pellett a Roizman, 2007).

3 Stavba virionu

Virion sestává z kapsidy, která obaluje lineární dvojřetězcovou DNA o velikosti 235 kbp. Okolo kapsidy se nachází amorfnní hmota zvaná tegument ohraničená obalem tvořeným lipidovou dvojvrstvou obsahující glykoproteiny kódované virem. Velikost maturovaného virionu se pohybuje okolo 200 -300 nm v závislosti na tloušťce tegumentu (viz Obr. 1.).



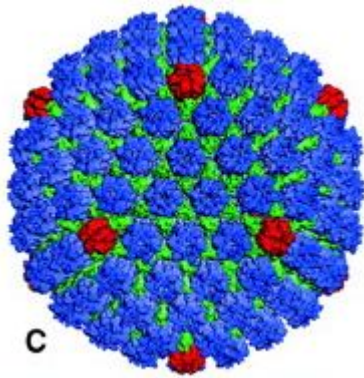
Obr. 1: Struktura virionu. Převzato z Crough a Khanna 2009.

3.1 Kapsida

Kapsida HCMV o velikosti 135 nm je ikosahedrální symetrie s triangulačním číslem $T=16$ obsahující 162 kapsomer, z toho 150 hexamerů tvořící triangulární plochu a 12 pentamerů tvořící vrcholy ikosahedronu (viz Obr. 2).

Kapsidu je tvořena pěti typy strukturálních proteinů, majoritním (MCP, produkt genu UL86), minoritním (TRI1, UL46), minoritním vazebným (TRI2, UL85), nejmenším (SCP, UL48A) a portálním (PORT, UL104).

MCP proteiny tvoří hlavní strukturu kapsidy, jejich 150 hexonů tvořených 6 kopiemi MCP a 11 ze 12 pentonů tvořených 5 kopiemi MCP, mezi nimiž jsou umístěné triplexy tvořené TRI1 a TRI2, SCP proteiny tvoří vnitřní povrch kapsidy a jsou lokalizované na vrcholech hexonů a PORT proteiny (12 kopií) vytváří modifikovaný dvanáctý penton důležitý pro enkapsidaci virové DNA (pro přehled Mocarsky, Shenk a Pass, 2007).



Obr. 2: Struktura HCMV kapsidy. Modře označené jsou hexony, červeně pentony a zeleně proteiny tvořící triplexy. Převzato z www.iayork.com.

3.2 Tegument

Tegument se nachází mezi kapsidou a obalem a má převážně amorfní charakter. Tegument je tvořen virem kódovanými proteiny, může obsahovat buněčné proteiny, buněčnou a virovou RNA. Tegumentové virem kódované proteiny jsou z velké části fosfoproteiny, z nichž nejvíce zastoupené jsou pp65 (UL83), pp71(UL82), pp150(UL32), pUL47 a pUL48.

Protein pp71 slouží jako transaktivátor iniciující lytickou replikaci, pp65 inaktivuje obranu na úrovni buňky a organismu a je hlavním cílem buněčné a humorální imunity. Protein pp150 je důležitý ke směrování kapsid na místa další maturace a proteiny pUL47 a pUL48 jsou asociované s kapsidou a hrají roli v rozbalení a vstupu virové DNA do jádra (pro přehled Kalejta 2008).

3.3 Obal

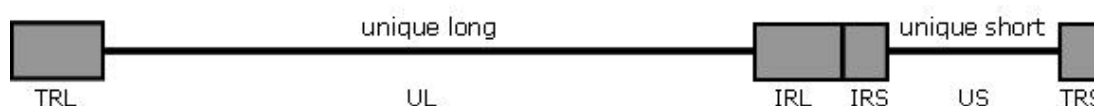
Obal je tvořený lipidovou dvojvrstvou obsahující virem kódované glycoproteiny gB (UL55), gM (UL100), gN (UL73), gH (UL75), gL (UL115), gO (UL74). Tyto glykoproteiny hrají důležitou roli při vazbě viru na buněčný povrch a při jeho vstupu do buňky. Glykoprotein gB (UL55) se váže na heparansulfát na buněčném povrchu a napomáhá vstupu viru do buňky. Zároveň také spouští buněčné signální dráhy, které připravují prostředí pro zahájení replikačního cyklu viru a je též hlavním cílem neutralizačních protilátek. Glykoproteiny gM a gN vytváří komplexy a napomáhají vazbě na buněčný povrch. Další glykoproteiny gH, gL a gO vytváří také komplexy a hrají důležitou roli při fúzi obalu viru s buněčnou membránou (pro přehled Mocarski, Shenk a Pass 2007).

3.4 Virový genom

Genom HCMV tvoří dvojřetězcová lineární DNA, která je na obou koncích ohraničená terminálními repeticemi (TR), na levém konci dlouhou TR (TRL = long terminal repeat) obsahující mnohokrát opakovanou **a** sekvenci a za ní následující dlouhou sekvenci **b**, na pravém konci krátkou TR (TRS = short terminal repeat) obsahující krátkou **c** sekvenci následovanou sekvencí **a**. Uvnitř genomu se nacházejí vnitřní invertované repetice (IR = internal repeat), dlouhá IR (IRL = long internal repeat) obsahující invertovanou sekvenci **b** a krátká IR (IRS = short internal repeat) obsahující invertovanou sekvenci **c**. Mezi TRL a IRL se nachází unikátní dlouhá oblast (UL = unique long) a mezi IRS a IRL se nachází unikátní krátká oblast (US = unique short) (viz. Obr. 2). Inverzí oblastí genomu US a UL, ke kterým dochází rekombinací během replikace, mohou vzniknout čtyři ekvimolární izomery.

Genom lze rozdělit na tři velké skupiny genů - bezprostředně časné (α , IE = immediate - early), opožděně časné (β , DE = delayed - early) a pozdní (γ , L = late). Produkty IE genů slouží k regulaci dalších kroků životního cyklu, proteiny kódované DE geny regulují replikaci virové DNA a produkty L genů jsou virovými strukturálními proteiny. Počet genů v genomu HCMV je přibližně 165.

Genom HCMV obsahuje několik cis elementů. Elementy pac-1 a pac-2 se nacházejí v terminálních repeticích a slouží k zabalení virové DNA (enkapsidaci), oriLyt se vyskytuje přibližně ve středu UL oblasti a je replikačním počátkem virové DNA. Mezi cis elementy, které se podílejí na regulaci transkripce IE genů patří zesilovač (enhancer) hlavního promotoru bezprostředně časných genů (MIEP = major immediate early promotor) umístěný -580 až -300 párů bazí od startu transkripce a crs (cis-acting repression signal) umístěný v MIEP mezi TATA boxem a startem transkripce (pro přehled Mocarski, Shenk a Pass, 2007).



Obr. 3: Schéma HCMV genomu. Převzato z www.nist.gov.

4 Životní cyklus

4.1 Lytický životní cyklus

Replikace HCMV probíhá v primárních nebo sekundárních fibroblastech, případně v myeloidních buňkách. Replikační cyklus je pomalý. Bezprostředně po vstupu virové DNA

do jádra dochází k transkripci IE genů ze čtyř odlišných regionů UL36 a 37, IE-1 a IE-2, TRS-1 a IRS-1, a US-3. Transkripce IE-1 a IE-2 probíhá z MIEP a je regulována MIEP zesilovačem a tegumentovými virovými transaktivátory (např. pp71). Hlavní funkce produktů IE-1 a IE-2 genů je aktivace transkripce DE a L genů, ale zároveň mají tyto proteiny i další funkce, IE1-p72 inhibují STAT buněčnou signalizační dráhu zajišťující tvorbu interferonů a IE2 (IE2-p86) indukuje zastavení buněčného cyklu a působí negativní zpětnou vazbou na expresi z MIEP vazbou na crs. V pozdějších fázích infekce produkty DE a L genů regulují zase expresi IE genů.

V další fázi replikačního cyklu viru dochází k transkripci DE genů. Tyto DE genové produkty následně iniciují replikaci virové DNA. Mimo to, připravují vnitřní prostředí buňky pro replikaci a účastní se maturace kapsidy. Nejdůležitější jsou produkty genů UL112 - UL113, které produkují alternativním sestřihem čtyři proteiny důležité pro iniciaci replikace DNA a UL54 kódující katalytickou podjednotku DNA polymerasy.

Replikace DNA HCMV začíná v oblasti oriLyt transkripční aktivací, které se účastní IE transaktivátory. Dochází k aktivní transkripci genů produkujících šest proteinů přítomných v replikační vidličce: UL54, UL44 podjednotky zodpovědné za procesivitu polymerázy, UL57 (SSB = single strand binding protein) a třech proteinů tvořících primázu. Na začátku replikace dochází k cirkularizaci virové DNA, tato cirkularizace nasměrovává transaktivátory do místa počátku replikace, kde dochází k vazbě UL 84 proteinu asociovaného s IE2-p86 a produkty UL112 - UL113. Následně tyto faktory iniciují replikaci. Replikace probíhá zpočátku theta mechanismem, po určité době však dojde k přepnutí na replikaci mechanismem valivé kružnice.

Transkripce L genů je rozdělena na transkripci γ_1 a γ_2 podle doby zahájení jejich transkripce. Transkripce genů γ_1 vyžaduje transkripci inhibitorů replikace, zatímco pro zahájení transkripce genů γ_2 je nezbytná inhibice replikace. Produkty L genů spolu s produkty DE genů se podílejí na sestavení kapsidy, enkapsidaci DNA a maturaci a uvolnění virionu z buňky (pro přehled Mocarski, Shenk a Pass, 2007).

4.2 Latentní životní cyklus

Latentní infekce bývá nejčastěji ustanovena v myeloidních kmenových buňkách CD34+ nacházejících se v kostní dřeni (Mendelson et al. 1996). Zároveň také bylo zjištěno, že HCMV ustanovuje latentní infekci v monocitech CD14+ (Taylor-Wiedeman et al., 1991), dendrických buňkách (Senechal et al., 2004) a megakaryocytech (Crapnell et al., 2000) nacházejících se u zdravých jedinců v periferní krvi.

Mechanismus ustavení latentní infekce není dosud jasný, byly však identifikované virové transkripty z oblasti hlavního IE promotoru přítomné pouze v buňkách latentně infikovaných virem a u seropozitivních zdravých jedinců. Jejich funkce však nebyla jednoznačně objasněna. Dalším produktem přítomným v latentně infikovaných buňkách je varianta virového interleukinu-10 přepsaného z oblasti UL111.5A (Jenkins et al., 2004). Poměrně recentně byl v latentně infikovaných buňkách identifikován antisense UL81 – UL82 transkript. Ten by vazbou na produkt UL82 genu produkujícího pp71 mohl interferovat s jeho funkcí transaktivátoru lytické replikace (Bego et al., 2005). Řada dalších virových transkriptů spojených s latentní infekcí byla identifikovaná, ale dosud pouze u otevřeného čtecího rámce (ORF) UL138 bylo prokázáno, že funkce této oblasti je pro latentní infekci HCMV nepostradatelná (Goodrum et al., 2007).

V latentně infikovaných buňkách může dojít k reaktivaci a přepnutí na lytickou fázi infekce. Spouštěcím stimulem může být imunosuprese, zánět nebo stres. Přesný mechanismus není objasněný, ale předpokládá se, že důležitou úlohu hraje tumor nekrotizující faktor (TNF- α), který vazbou na TNF receptor latentně infikovaných buněk stimuluje replikaci IE genů přes proteinkinázu C a NF- κ B (Stein et al., 1993) podobně jako látky produkované při stresu např.: adrenalin, noradrenalin (Prosch et al., 2000), či při zánětu (Kline et al., 1998) stimuluje transkripci přes dráhu cyklického adenosimonofosfátu (cAMP).

Studie na in vitro modelech naznačují, že reaktivace latentní HCMV infekce je závislá na aktivaci specifické dráhy pro diferenciaci monocytů a replikaci HCMV. Výsledky též ukazují, že reaktivace latentní HCMV infekce v makrofágách vyžaduje imunologickou aktivaci T buněk a produkci INF- γ (Soderberg-Naucler et al., 2001).

5 Imunitní obrana proti HCMV

Mechanismy imunitní obrany HCMV jsou podobné mechanismům proti jiným virům. Mezi tyto mechanismy patří vrozená imunita zprostředkovaná NK buňkami a adaptivní imunita zprostředkovaná protilátkami a T lymfocyty zejména CD4+ a CD8+. Hlavní roli u pacientů po HSCT a SOT v potlačení rozvoje onemocnění vyvolaných HCMV hrají hlavně CD4+ a CD8+ T lymfocyty, ale nezbytnost ostatních složek byla také prokázána, stejně jako řada dalších virů, HCMV má však spoustu strategií jak uniknou imunitní obraně hostitele.

5.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita hraje roli při obraně proti HCMV a zároveň také aktivuje mechanismy adaptivní imunity. V přítomnosti HCMV i jiných patogenů dochází ke stimulaci receptorů podobných Toll (TLRs). Stimulací TLRs dochází ke spuštění signální dráhy indukující tvorbu

zánětlivých cytokinů, které ovlivňují buňky vrozené imunity. Tyto cytokiny také zvyšují počet kostimulačních molekul důležitých pro aktivaci adaptivní imunity (Boehme a Compton, 2004).

5.1.1 NK buňky

O funkci NK buněk u lidí při obraně proti HCMV je známo velmi málo. Na to, že NK buňky hrají svou úlohu, ukazuje zvýšení jejich počtu při primoinfekci i reaktivaci latentní HCMV infekce u pacientů po transplantaci ledvin (Venema et al., 1994). Na účast NK buněk v obraně proti infekci cytomegalovirem ukazují i studie sledování pacientů, kteří podstoupili transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT), přičemž jim chyběly NK buňky zcela nebo jejich počet byl velmi nízký. U těchto pacientů došlo k rozvoji HCMV infekce, která vedla v některých případech až k úmrtí pacienta. U pacientů, u nichž došlo k regresi onemocnění, byla zjištěna souvislost mezi zvýšením počtu nespecifických NK buněk a zotavením se z infekce (Quinnan et al. 1982).

Také na modelu infekce MCMV v myších bylo zjištěno, že při odstranění NK buněk novorozeným myším dochází k rozvoji letální cytomegalovirové infekce (Brown et al., 2001), a naopak adoptivní přenos NK buněk zabraňuje infekci MCMV (Bukowski et al., 1985). Z těchto poznatků vyplývá, že NK buňky mají svou roli v potlačení HCMV infekce. Jsou však potřeba studie, které upřesní jejich funkci.

5.2 Adaptivní Imunita

5.2.1 Protilátky

Hlavní funkcí humorální imunity namířené proti HCMV je zabránění rozšíření infekce a snížení závažnosti onemocnění. Hlavním cílem pro neutralizační protilátky proti HCMV je obalový glykoprotein gB. Neutralizační protilátky jsou též produkovány proti glykoproteinu gH. Při studiích na myších a morčatech bylo zjištěno, že imunizace anti-gB sérem a rekombinativním gB glykoproteinem indukuje protilátkovou odpověď a tyto protilátky chrání zvířata proti přenosu infekce na nenarozená mláďata a vzniku onemocnění (Schleiss et al., 2004). Podobně u těhotných žen bylo zjištěno, že vysoká hladina gB specifických protilátek u matek chrání proti transplacentárnímu přenosu infekce na plod a rozvoji onemocnění (Nigro et al., 2005). Také u pacientů po orgánové transplantaci (SOT) a HSCT byla zjištěna důležitost neutralizačních protilátek proti HCMV. U SOT pacientů bylo zjištěno, že imunizace atenuovaným virem, či pasivní imunizace anti- HCMV imunoglobulinem, snižuje závažnost onemocnění (Plotkin et al., 1994). U HSCT pacientů vysoké titry gB specifických protilátek, které se tvořily jako odpověď na replikaci viru, byly spojovány s lepším přežíváním pacientů (Schoppel et al., 1998).

5.2.2 Buněčná imunita

Její hlavní úlohou je kontrola a omezení virové replikace a zároveň zamezení reaktivace latentní infekce, ale eliminovat virus nedokáže (Crough a Khanna, 2009).

Důležitost buněčné imunity proti HCMV je patrná u pacientů po HSCT. U seropozitivních příjemců allogenní i autologní HSCT dochází k reaktivaci latentní HCMV infekce zhruba se stejnou frekvencí, ale frekvence a závažnost onemocnění vyvolaná HCMV se liší. Pacienti po allogenní HSCT, kteří mají nedostačující počet HCMV specifických CD4+ a CD8+ T lymfocytů mají toto riziko daleko vyšší (Li et al., 1994). Podobné riziko hrozí i pacientům po autologní HSCT, kdy je autotransplantát předem zbaven T buněk (Holmberg et al., 1999; Frere et al., 2006).

5.2.2.1 CD8+ T lymfocyty

CD8+ T lymfocyty se podílejí na ničení infikovaných buněk a ochraně dosud neinfikovaných buněk (Sester et al., 2002). U pacientů s AIDS bylo zjištěno, že produkce HCMV specifických CD8+ T lymfocytů brání rozvoji retinitidy (Jacobson et al., 2004) Důležitost byla také dokumentována u HSCT pacientů, kde byla pozorována shoda mezi nárůstem počtu HCMV specifických CD8+ T lymfocytů, ochranou (Li et al., 1994; Reuser et al., 1991) a zotavením z onemocnění (Quinnan et al. 1982). U HSCT pacientů přenosem HCMV specifických CD8+ T lymfocytů z dárce dochází k obnovení HCMV specifické buněčné imunity a toto obnovení má za následek ochranu před rozvojem symptomů onemocnění (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Jejich specifická reaktivita je namířena hlavně proti antigenů pp65, pp50 a IE-1. Bylo však zjištěno, že reaktivita není omezena jen na tyto antigeny a může být namířena i proti jiným antigenům např. gB a IE-2 (Elkington et al., 2003). Proti pp65 a IE-1 je namířeno zhruba 40% CD8+ T buněk, zatímco 60% je specifických pro další antigeny. T buněčné epitopy specifické pro CD8+ T lymfocyty jsou prezentované na omezeném spektru HLA I alel např. HLA 1, HLA A2HLA A23/A24, HLA B7. Z těchto výsledků je patrné, že T buněčná odpověď proti HCMV je namířena proti širokému spektru antigenů (Gandhi a Khanna, 2004).

5.2.2.2 CD4+ T lymfocyty

CD4+ T lymfocyty reagují proliferací téměř u všech pacientů na pp65, ale u některých jedinců také na gB a gH a další antigeny (Beninga et al., 1995). Nezbytnost CD4+ T lymfocytů byla dokumentována u pacientů po transplantaci ledvin. Z této studie vyplývá, že rozvoj symptomů onemocnění a nárůst virové nálože souvisí s velkým poklesem CD4+ T lymfocytů (Sester et al., 2001). Nezbytnost CD4+ T lymfocytů byla také dokumentována u zdravých dětí infikovaných HCMV, kde dlouhotrvající nedostatek CD4+ T lymfocytů vedl k prodlouženému uvolňování viru v moči a slinách (Tu et al., 2004). Důležitost je také

doložena studií u HSCT pacientů, kde přenosem HCMV specifických CD4+ T lymfocytů došlo k dramatickému snížení virové nálože a byla také zjištěna shoda v nárůstu počtu HCMV specifických CD8+ T lymfocytů (Einsele et al., 2002). Během latentní infekce CD4+ T lymfocyty plní nepřímou roli v obraně proti HCMV, která spočívá v T buněčné pomoci při udržování tvorby HCMV specifických protilátek B lymfocyty (Davignon et al., 1996) a nárůstu počtu HCMV specifických CD8+ T lymfocytů (Einsele et al., 2002).

Některá data však naznačují, že CD4+ lymfocyty mohou hrát i přímou roli zabíjení virem infikovaných buněk které mají na povrchu molekuly hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC II). Cytotoxické CD4+ lymfocyty izolované z asymptomatických séropozitivních jedinců a těhotných žen byly specifické především pro glykoprotein gB (Hopkins et al., 1996).

5.3 Mechanismy úniku HCMV před imunitním systémem

Mechanismy úniku HCMV před imunitním dohledem jsou odobné jako u ostatních herpetických virů. Mezi tyto mechanismy patří snížení počtu molekul MHC I a II, tvorba virem kódovaných homologů MHC I, tvorba produktů pro únik před NK buňkami (homology signálních peptidů nezbytných pro funkci HLA E, proteiny blokující vystavení ligandů pro aktivaci NK receptorů), tvorba virem kódovaného homologu imunosupresivního cytokinu interleukinu 10, tvorba vlastních chemokinových receptorů a tvorba antiapoptotických produktů a vlastních chemokinů (Crough a Khanna, 2009).

Snížení počtu molekul MHC I se účastní produkty kódované geny US2, US3, US6, US10 a US11, tyto produkty brání tvorbě a transportu komplexů MHC I s peptidy na buněčný povrch (Crough a Khanna, 2009). Snížení počtu molekul MHC II zajišťuje produkt oblasti US2, který nasměrovává MHC II k degradaci v proteasomu (Tomazin et al., 1999). Na tomto snížení se kromě produktu US2 podílí také produkty IE a DE genů, které zasahují do exprese molekul MHC II zprostředkované $INF-\gamma$ (Miller et al., 1998). HCMV produkuje homolog lidského MHC I (UL18), který napodobuje funkce hostitelských proteinů a zamezuje tak rozpoznání virem infikovaných buněk. Bylo zjištěno, že UL18 stejně jako MHC I váže β 2-microglobulin a peptidy (Chapman et al., 1999). Rozdíl mezi nimi je však v tom, že UL18 se váže pouze na leukocytový receptor 1 podobný imunoglobulinovému receptoru na povrchu monocytů a B lymfocytů a tato vazba je podobná vazbě hostitelského MHC I (Cosman et al., 1999). Virus uniká před ničením NK buňkami například tvorbou homologů signálních peptidů UL40, které jsou nezbytné pro funkci HLA E. HLA E s navázaným signálním peptidem brání rozpoznání infikovaných buněk NK buňkami vazbou na jejich inhibiční receptor CD94/NKG2A (Tomasec et al., 2000). Další možností úniku před NK buňkami může být tvorba produktu UL141, který blokuje vystavení CD155 ligandů, nutných pro aktivaci NK

receptorů (Tomasec et al., 2005). Virem kódovaný homolog imunosupresivního interleukinu 10 - UL111 inhibuje expresi MHC I a II a proliferaci lymfocytů (Kotenko et al., 2000). Chemokinové receptory kódují oblasti genomu UL33 (Marguiles et al., 1996) UL78, US27 a US28 (Chee et al., 1990).

6 Epidemiologie

HCMV je ve vnějším prostředí nestabilní a proto je k účinnému přenosu třeba těsný kontakt s osobou produkující virus. K přenosu HCMV dochází transplacentárním přenosem, při porodu, kojením, slinami, sexuálním kontaktem, krevní transfuzí a v dnešní době, se vzrůstajícím počtem transplantací, se zvyšuje frekvence přenosu při orgánové transplantaci a transplantaci HSCT. K primární infekci dochází v raném věku. Přenos viru mezi dětmi a dětmi a dospělými je velmi efektivní. K časté infekci též dochází v zařízeních, kde je velká kumulace předškolních dětí a přenos je usnadněný těsnými kontakty mezi nimi. V těchto zařízeních byla zjištěna přítomnost HCMV na povrchu hraček, různých plochách a na rukou (Hutto et al., 1986). V populacích žijících mimo velká města dochází často k infekci v období dospívání. Důležitým rizikovým faktorem přenosu u adolescentů je sexuální aktivita (Sohn et al., 1991). V rozvinutých zemích je přítomnost protilátek proti HCMV prokazována u 30 – 70% obyvatel (Pass, 1985). Vyšší prevalence, až 90%, byla zjištěna u žen, u skupin obyvatel z nižších socioekonomických vrstev, u těhotných žen a imigrantů z rozvojových zemí (Gambarotto et al., 1997).

7 Infekce HCMV a s ní spojená onemocnění

7.1 Vrozená infekce

Největší riziko kongenitální infekce HCMV je u plodů žen, které prodělají primární infekci v prvním trimestru těhotenství. Ohrožených primoinfekcí je zhruba 45% těhotných žen (HCMV séronegativních) a k primoinfekci dochází u 1-4% z nich. K transplacentárnímu přenosu při primoinfekci dochází zhruba ve 40%. Až u 90% dětí s kongenitálně získanou HCMV infekcí je průběh asymptomatický a pouze 5-15% dětí s asymptomatickou prenatálně získanou infekcí dochází k patologickým projevům. U 10-15% však proběhne symptomatická infekce a k poškození dochází až u 90% těchto dětí (Stagno a Whitley, 1985). Kongenitální infekce může být příčinou potratu, způsobit komplikace při vývoji plodu, a vyvolat vrozené defekty. Nejčastějším poškozením jsou závažné neurologické defekty (mikrocefalie, psychomotorické retardace a encefalitidy). Kongenitální infekce HCMV je nejčastější infekční příčinou ztráty sluchu. Některé další symptomy, například žloutenka, hepatosplenomegalie, hepatitida a trombocytopenie, u většiny případů po několika týdnech i

bez léčby vymizí. Na základě závažných poškození životně důležitých orgánů v důsledku vrozené symptomatické infekce dochází k úmrtí asi v 15% případů (Boppana et al., 1992).

7.2 Infekce u zdravých lidí

Primární infekce u zdravých lidí probíhá většinou asymptomaticky, ale ve výjimečných případech se může objevit HCMV mononukleóza. Mohou se však objevit i méně časté komplikace, jako například kolitida, hepatitida, meningitida a myokarditida. Symptomy HCMV mononukleózy jsou velmi podobné symptomům mononukleózy vyvolané EBV zahrnující zvýšenou teplotu, cervikální adenopatii a myalgie. Rozdíl mezi EBV a HCMV mononukleózou je v tom, že u HCMV mononukleózy je menší frekvence výskytu lymfadenopatie, tonsilitidy, pharyngitidy a splenomegalie než u EBV mononukleózy (Sissons a Carmichael, 2002).

7.3 Infekce u pacientů s infekcí HIV

U pacientů s AIDS bývá nejčastějším onemocněním HCMV retinitida, která se vyskytovala až u čtvrtiny pacientů s AIDS před tím, než se začala používat vysoce účinná antiretrovirová terapie pro léčbu pacientů s HIV (Jacobson 1997). U pacientů s retinitidou, kteří reagovali na vysoce účinnou antiretrovirovou terapii zvýšením počtu CD4+ T-lymfocytů byl pozorován rozvoj symptomatické vitritidy až v 63 % případů. Vitritida nebyla pozorována u pacientů nereagujících na antiretrovirovou terapii a u pacientů, kteří neměli retinitidu (Karavellas et al. 1999). Mezi další onemocnění spojená s infekcí HCMV u pacientů s AIDS, patří encefalopatie, gastroenteritida, hepatitida, esofagitida a vzácně se objevuje i pneumonitida. Z některých studií vyplývá, že se HCMV může nepřímo podílet na urychlení nástupu AIDS a smrti (Spector et al. 1998), jiné studie však tuto souvislost neprokázali (Shepp et al. 1996). Mezi možné mechanismy, kterými se může HCMV podílet na urychlení HIV infekce a nástupu AIDS patří například transaktivace promotoru v HIV LTR (Barry et al. 1990) nebo indukce exprese Fc receptorů, které usnadní vstup HIV do buněk a šíření mezi nimi (McKeating et al. 1990).

8 Infekce HCMV u transplantovaných pacientů

Infekce HCMV způsobená přenosem orgánovou transplantací nebo transplantací hematopoetických kmenových buněk je dnes předmětem rozsáhlých klinických studií v mnoha zemích na celém světě. Výzkum se zaměřuje především na zlepšení detekčních metod a metod pro monitorování přítomnosti HCMV v krevní plazmě a dále na možnosti snížení rizika přenosu a propuknutí onemocnění spojených s HCMV u transplantovaných pacientů.

8.1 Pacienti po orgánové transplantaci (SOT)

Při orgánové transplantaci se na reaktivaci HCMV, sérokonverzi a rozvoji onemocnění spojených s HCMV podílí z největší části imunosupresivní léčba, která snižuje riziko rejekce transplantátu. V jejím důsledku dochází k reaktivaci latentní HCMV infekce. Dalšími neméně významnými faktory podílejícími se na rozvoji onemocnění jsou sérostatus dárce a příjemce transplantátu a stres během chirurgického zákroku zahrnující i transplantační zákrok (Cook et al., 1998). Infekci HCMV lze detekovat až u 50% pacientů po SOT, z nichž 10-50% vyvine symptomatické onemocnění (Rubin, 2007).

Nejrizikovější kombinací pro rozvoj onemocnění je séronegativní příjemce (R-) a séropozitivní dárce (D+), protože R- nemá vyvinutou specifickou imunitu proti HCMV. Bylo ukázáno, že virová nálož po SOT je nejvyšší právě u příjemců s R-/D+ kombinací (Sia et al., 2000). Snížení rizika rozvoje onemocnění lze dosáhnout kombinací séronegativní příjemce (R-) a séronegativní dárce (D-), ale tento přístup by značně omezoval dostupnost orgánů pro transplantaci.

K rozvoji onemocnění spojeného s HCMV u R- pacientů, tedy po primární infekci, dochází nejprve v transplantovaném orgánu, kde v důsledku infekce dochází k zánětlivým projevům. Záněty v transplantovaných orgánech mohou způsobit jejich nefunkčnost a následnou rejekci. Mezi komplikace způsobené systémovým šířením viru patří pneumonitida, hepatitida a enteritida, z nichž nejtěžší komplikací je pneumonitida (Ljungman et al., 2002), která vykazuje vysokou úmrtnost (Peterson et al., 1980). Frekvence rozvoje pneumonitidy je závislá na typu transplantovaného orgánu. Největší frekvence byla zjištěna u transplantací srdce a plic (32%) a nejnižší u ledvin (2%) (Ho, 2008). U pacientů po transplantaci plic, u kterých došlo k rozvoji onemocnění vyvolaný HCMV, byl navíc zjištěn, až v 60%, výskyt oportunních bakteriálních infekcí a mykóz komplikujících dále stav pacientů (Kim et al., 2000).

8.2 Pacienti po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT)

8.2.1 Allogenní HSCT

U HSCT pacientů díky imunosupresi a zbavení štěpu T- buněk dochází k prodloužení doby nutné pro znovuoživení vrozené a specifické HCMV imunity, hlavně CD 4+ a CD8+ T-lymfocytů. Nízký počet CD 4+ a CD8+ T lymfocytů má za následek zvýšení rizika rozvoje onemocnění, neboť nedokáže zabránit reaktivaci latentní infekce (Ozdemir et al. 2002, Boeckh et al. 2003).

Na rozdíl od pacientů po SOT, u pacientů po HSCT dochází nejčastěji k projevům infekce HCMV v důsledku reaktivace infekce u původně seropozitivního příjemce transplantátu (až u 80% jedinců). Primární infekce HCMV je dokumentována u 30% seronegativních pacientů (Ljungman, 2007). Mezi HCMV seropozitivními dárci a seronegativními příjemci byl pozorován vyšší výskyt pneumonitidy (Ljungman et al., 2002) a také vyšší výskyt oportunních bakteriálních infekcí a mykóz a vyšší úmrtnost pacientů ve srovnání se skupinou seronegativních dárců a příjemců (Nichols et al., 2002). Vliv HCMV sérostatutu dárce na prognózu vývoje HCMV onemocnění u HCMV séropozitivního příjemce není zcela jasný. Lepší přežívání bylo dokumentované u HCMV séropozitivních příjemců při transplantaci buněk od HCMV seropozitivního dárce ve srovnání s dárce seronegativním, snad v důsledku přenosu imunitních buněk dárce (Ljungman et al., 2003). Jiné studie však tento rozdíl nezjistily (Boeckh a Nichols, 2004).

Nejčastěji se u pacientů v období do 100 dnů po HSCT vyskytuje pneumonitida a enterocolitida. Problémy mohou nastat i v období po 100 dnech po HSCT, kdy může dojít k pozdnímu rozvoji onemocnění. V tomto období byl zjištěn výskyt onemocnění asi u 18 % pacientů se 46 % úmrtností. Mezi komplikace, které se vyskytují u těchto pacientů, patří pneumonitida, enterocolitida, někdy se může vyskytnout i encefalitida a retinitida. Jako hlavní rizikové faktory, které se podílejí na pozdním nástupu onemocnění v období po 100 dnech po HSCT patří detekované virové antigeny před 100 dnem po HSCT, výskyt reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), hladina CD4+ T lymfocytů nižší než 50 buněk na ml, celková hladina všech lymfocytů nižší než 100 buněk na ml a nefunkční specifická imunita zprostředkovaná T lymfocyty (Boeckh et al. 2003).

V souvislosti s rozvojem nových metod HSCT bylo zjištěno, že použití HSCT bez myeloablace zvyšuje riziko rozvoje HCMV asociovaných onemocnění v období do 100 dnů po výkonu, ale v delším období (100 dnů až rok) po transplantaci je toto riziko srovnatelné s rizikem po myeloablativní HSCT (Junghanss et al., 2002a). U HSCT bez myeloablace byl ale pozorován vyšší výskyt bakteriálních infekcí a mykóz, zvláště aspergillózy (Junghanss et al., 2002b).

8.2.2 Autologní HSCT

Hlavní komplikací po autologní HSCT je pneumonitida, která se však vyskytuje u pacientů v méně než 1 % (Ljungman et al. 1994). Větší riziko rozvoje onemocnění hrozí u pacientů po autologní HSCT, kterým jsou transplantovány pouze CD 34+ buňky, ve srovnání s pacienty, kteří podstoupili transplantaci nefrakcionovaných periferních krevních kmenových buněk (Holmberg et al., 1999; Frere et al., 2006).

9 Detekce HCMV

Díky vysoké promořenosti populace HCMV a asymptomatickému průběhu infekce u zdravých jedinců byla detekce prováděna především u těhotných žen z důvodu rizika kongenitální infekce. S objevením se HIV viru a též rozvojem léčebných metod, v jejichž důsledku dochází k imunosupresi pacientů, nabyla detekce a monitorování HCMV infekce na nové důležitosti.

9.1 Nepřímý průkaz

9.1.1 Sérologie

Sérologické testy mohou být použity k identifikaci séronegativních dárců krve a krevních produktů. Měření protilátek CMV IgG je používáno pro zjištění sérologického statutu jedince a jako indikátor pro akutní či prodělanou infekci, nejsou však vhodné k monitorování reaktivace latentní infekce u transplantovaných pacientů. První krok při diagnostice akutní nákazy HCMV je nejčastěji prováděn detekcí anti-CMV-specifických IgG a IgM protilátek. Jako antigen se využívá pp150 rekombinantní protein. Vzorky reaktivní na IgM protilátky indikují akutní, nedávnou nebo reaktivovanou infekci. Sérokonverze na CMV IgM a IgG rovněž potvrzuje diagnózu nedávné HCMV nákazy. Přítomnost IgM protilátek u novorozenců prokazuje prenatální infekci. Titr IgM protilátek stoupá po 2-6 týdnech po infekci a přetrvává zhruba 2 roky. Pozitivita IgG přetrvává celoživotně, ale s věkem může klesat (Mocarski, Shenk a Pass, 2007).

Pro další analýzu primární CMV infekce je jako pomůcka používáno měření CMV IgG avidity. Pozitivní výsledek IgM v kombinaci s nízkou aviditou na IgG je silným indikátorem primární CMV infekce v posledních 4 měsících a díky tomu je tato metoda vhodná pro identifikaci těhotných žen, u kterých hrozí riziko přenosu infekce na dítě v prvním trimestru (Bodeus et al. 2002).

9.2 Přímý průkaz

9.2.1 Tkáňové kultury

Detekce přítomnosti viru se provádí na tkáňových kulturách lidských fibroblastů, přičemž se sleduje tvorba cytopatického efektu HCMV. Doba sledování však musí být minimálně 21 dní, což je značným omezením těchto testů. V diagnostice se více využívá metoda zrychlené izolace „Shell vials“, která spočívá v centrifugaci klinického materiálu na tkáňovou kulturu fibroblastů na podložním skle. I když nedojde k vytvoření cytopatického efektu je možné virové antigeny detekovat imunofluorescenčně či imunoperoxidázovými

technikami s použitím monoklonálních protilátek proti IE-1 již po 24-36 hodinách (Gleaves et al., 1984).

9.2.2 Detekce virových antigenů

Pro detekci virových antigenů (antigenemie) a jejich kvantifikaci se nejčastěji používá metoda založená na detekci tegumentového proteinu pp65 (UL83) v leukocytech v periferní krvi (PBL). Nejdříve se cytocentrifugací vyizolují z krve leukocyty a v těchto buňkách je poté provedena nepřímá imunofluorescence detekující pp65 (The et al. 1990). Metoda se užívá hlavně pro monitorování účinnosti antivirové terapie (Hebart a Einsele, 2004).

9.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K detekci virové DNA se užívají jak kvalitativní, tak kvantitativní amplifikační metody. Kvalitativní PCR slouží hlavně ke zjištění přítomnosti virové DNA v krvi, krevní plazmě a také v leukocytech. V diagnostice aktivní HCMV infekce a cytomegalovirového onemocnění se užívá kvantitativní PCR. Detekce pomocí PCR může být prováděna u transplantovaných pacientů v plazmě, krvi, leukocytech periferní krve (PBL), jednojaderných buňkách periferní krve (PBMC) (Razonable et al., 2002). Detekci PCR lze také provádět v moči u novorozenců a dětí (Schalasta et al., 2000).

Primery pro detekci HCMV jsou cílené hlavně do konzervované oblasti genomu a existuje jich celá řada např. cílené do genů UL 55, MIE, UL54, UL 83 atd. Srovnáním primerů pro detekci HCMV v klinických vzorcích bylo zjištěno, že nejvyšší citlivost PCR vykazují primery cílené do genů UL55 a U54 a proto je jejich využití v diagnostice HCMV nejvýhodnější (Habbal et al., 2009).

Pro kvalitativní analýzu se používá nested PCR, která je schopna také částečné kvantifikace HCMV DNA (Schafer et al., 1993). Pro kvantitativní analýzu se využívají metody real-time PCR (RT-PCR) založené na TaqMan analýze, kde je HCMV DNA kvantifikováno již během PCR reakce na principu přenosu energie fluorescenční rezonancí (FRET), například komerční LightCycler PCR vyvinutý firmou Roche. Ke kvantifikaci je možné také využít metodu PCR, kde během PCR reakce dochází k inkorporaci značených nukleotidů, ale takto značené produkty jsou kvantifikovány až po PCR reakci imunoanalýzou spojenou s enzymatickou reakcí (ELISA), do této skupiny můžeme zařadit komerční test Cobas Amplicor CMV Monitor vyvinutý firmou Roche. Obě tyto metody využívají primery cílené do oblasti v genu UL83, který kóduje tegumentový pp65 protein.

Z mnoha studií porovnávající rozdíl mezi LightCycler PCR a Cobas Amplicor CMV Monitor vyplývá, že detekce pomocí LightCycler PCR vykazuje větší přesnost, citlivost, schopnost zpracovat více vzorků na reakci a nižší časové nároky než Cobas Amplicor CMV

Monitor (Pang et al., 2003; Pumannova et al., 2006; Razonable et al., 2001). Díky těmto výhodám se zdá, že LightCycler PCR je vhodnější pro diagnostiku a monitorování HCMV infekce než Cobas Amplicor CMV Monitor. Srovnáním detekce HCMV DNA v plazmě, krvi, PBL a PBMC pomocí Cobas Amplicor CMV Monitor testu bylo zjištěno, že všechny tyto složky je možné využít pro diagnostiku a monitorování HCMV infekce u transplantovaných pacientů, z nichž největší citlivost vykazuje detekce HCMV DNA z krve (Razonable et al., 2002).

Při užití metody PCR je třeba mít na paměti, že klinické vzorky obsahují inhibitory, IgG v plazmě, hemoglobin a lactoferrin v krevních buňkách. V malé míře mohou také PCR ovlivnit antikoagulanty přidávané při odběru vzorků. Díky těmto inhibitorům se vzorky mohou jevit jako falešně negativní (Al-Soud a Radstrom, 2001). Velmi důležité je tedy volit vhodné postupy izolace nukleových kyselin pro amplifikační metody.

9.2.4 Další metody

Pro detekci a kvantifikaci HCMV DNA je možné také využít Hybrid capture test vyvinutý firmou Digene, který spočívá v hybridizaci specifické RNA se specifickou oblastí HCMV DNA a následnou kvantifikací hybridů RNA:DNA. Výhodou této metody je její jednoduchost, nižší riziko kontaminace než u PCR a relativně menší časová náročnost (Boeckh a Boivin, 1998). Ve srovnání s detekcí hladiny pp65 vykazuje Hybrid capture vyšší citlivost (Veal et al., 1996). Ovšem z dalších studií srovnávající citlivost Hybrid capture, detekci pp65 a PCR vyplývá, že Hybrid capture může vykazovat menší citlivost ve srovnání s detekcí pp65 nebo kvalitativní PCR z PBMC (Mazzulli et al., 1996; Lazzarotto et al., 1996). U nové verze Hybrid capture bylo pozorováno zlepšení citlivosti oproti staré verzi (Mazzulli et al., 1999).

V diagnostice HCMV je možné využít detekci virové IE mRNA nebo pozdní pp67 mRNA amplifikační metodou nucleic acid sequence based amplification (NASBA). Tato metoda se ukazuje jako specifická a citlivá při prenatální diagnostice rizika rozvoje vrozené infekce z plodové vody i u novorozenců (Revello et al., 2003). Dobré výsledky této metody byly zjištěny i u AIDS pacientů (Blank et al., 2002), HSCT (Gerna et al., 2003a) a SOT pacientů (Gerna et al., 2003b), ale je třeba tuto metodu ještě dále optimalizovat.

10 Monitorování HCMV

K virologickému monitorování se užívají nejčastěji metody pro stanovení pp65 antigenemie a počtu kopií HCMV DNA pomocí RT-PCR. V poslední době se jako velmi důležité ukazuje monitorování HCMV specifické imunity. Virologické a imunologické

monitorování umožňuje sledovat průběh infekce po transplantaci, přesněji identifikovat pacienty s rizikem rozvoje onemocnění a tak lépe optimalizovat léčbu.

10.1 Monitorování antigenemie

U transplantovaných pacientů znalost pp65 antigenemie určuje hranici pro zahájení preventivní léčby: u pacientů po SOT na vyšší než 100 pp65 - pozitivních leukocytů v periferní krvi (PBL = periferal blood leukocyte) na 200000 PBL, u pacientů po HSCT a pacientů po SOT s R-/D+ kombinací na vyšší než 2 pp65 - pozitivní PBL na 200000 PBL (Balandati et al 2008). Bylo však zjištěno, že hodnoty antigenemie nesouhlasí se zvýšením hladiny HCMV DNA, která se zdá, že lépe předpovídá nástup klinických symptomů onemocnění. Mimo to byl po léčbě ganciclovirem paradoxně pozorován nárůst hladiny pp65 - pozitivních PBL, zatímco hladina HCMV DNA klesala (Gerna et al. 1998a, 1998b). Proto v současnosti je pp65 antigenemie doplňována při monitorování transplantovaných pacientů kvantitativní detekcí virové DNA (Gerna et al. 2005).

10.2 Monitorování hladiny virové DNA

Podobně jako pro antigenemii byla stanovena i hladina virové DNA, která indikuje nutnost zahájení preventivní léčby, u pacientů po SOT na < 300 000 kopií HCMV DNA a u pacientů po HSCT < 10 000 kopií HCMV DNA na ml krve (Lilleri et al. 2004). Studie srovnáním antigenemie a hladiny virové DNA, jako metody určující nutnost zahájení preventivní léčby naznačuje, že monitorování hladiny virové DNA detekuje infekci u menšího počtu pacientů a zároveň i indikuje menší počet pacientů k zahájení preemptivní terapie, aniž by zvyšovala riziko rozvoje onemocnění u pacientů neindikovaných k léčbě (Gerna et al., 2007; Lilleri et al., 2007).

10.3 Monitorování imunity

Virologické monitorování je nyní velmi důležitou metodou pro zjištění rizika rozvoje onemocnění. Nově se však pozornost zaměřuje na monitorování HCMV specifické imunity. Bylo totiž zjištěno, že rozvoj onemocnění je spojen s nepřítomností HCMV specifické imunity (Boeckh et al. 2003). Metody pro monitorování specifické imunity dokáží zjistit fenotyp imunitních buněk a také jejich funkci na základě jimi produkovaných cytokinů např. INF- γ . V případě HCMV je třeba monitorovat specifickou imunitu zprostředkovanou CD4+ a CD8+ T lymfocyty. Pro monitorování byla vyvinuta řada metod, z nichž je nejvíce využíván tetramerový test (Altman et al. 1996). Tato metoda však analyzuje počet specifických T buněk, ale ne jejich funkci. Mimo to je, vzhledem ke své komplexitě (specifický HLA i epitop, vyžaduje velký počet tetramerů k testování) poměrně náročná na velikost klinického vzorku,

který bývá u pacientů monitorovaných po transplantacích limitujícím faktorem. Vzhledem k tomu, že recentní studie naznačují, že spíše než počet specifických cytotoxických T lymfocytů je to jejich funkce, kterou je třeba monitorovat, pozornost se soustřeďuje nyní na použití funkčních testů jako je např. immunospot spojený s enzymatickou reakcí (ELISPOT) (Crough a Khanna, 2009) a detekce cytokinů metodou průtokové cytometrie (CFC) (Waldrop et al., 1997).

Studie tedy prokázaly a prokazují, že kvantitativní měření funkce T specifických buněk by mohlo být vhodnou metodou pro klinické účely monitoringu vzniku HCMV asociovaných onemocnění u transplantovaných pacientů. Další výzkum však bude třeba na objasnění klinické relevance využití různých testů a jejich kombinací, detekce různých fenotypů T buněk, stejně tak jako na optimalizaci detekčních metod (např. druh antigenu použitý pro antigenní stimulaci ovlivňuje efektivitu a citlivost testu).

11 Možnosti prevence a léčby onemocnění spojených s HCMV

V prevenci rozvoje onemocnění spojených s HCMV u transplantovaných pacientů se uplatňuje několik přístupů, z nichž nejpoužívanější je profylaktická a preemptivní léčba. Preemptivní léčba bývá zahajována po transplantaci při prvních pozitivních testech na přítomnost viru v krvi nebo moči, antigenemii a pozitivní DNAemii. Profylaktická léčba je aplikována u všech pacientů, u kterých byla zjištěna seropozitivita před transplantací bez ohledu na potransplantační přítomnost viru v krvi nebo moči, antigenemii nebo pozitivní DNAemii. Z antivirotik se pro profylaktickou i preemptivní terapii využívá hlavně ganciclovir a v menší míře foscarnet (Boeckh, 1999).

11.1 Antivirotika používaná k profylaktické a preemptivní léčbě

Ganciclovir je analog deoxyguanosinu, který po inkorporaci do HCMV DNA inhibuje její replikaci (Gilbert a Boivin 2005). Používáním gancikloviru v profylaxi u HSCT pacientů dochází ke snížení počtu pacientů se symptomatickým onemocněním, ale ne úmrtnosti. Při preemptivní podávání gancikloviru u HSCT pacientů se snižuje počet jedinců s příznaky onemocnění, ale nedochází i ke snížení úmrtnosti a zlepšení přežití (Goodrich et al. 1991). Nevýhodou podávání gancicloviru je, že dochází ke zhoršení a prodloužení neutropenie a tato neutropenie se pak podílí na zvýšení rizika propuknutí bakteriálních infekcí a mykóz. Dalšími nevýhodami použití gancikloviru jsou jeho toxicita vůči kostní dřeni a zhoršení znovuoživení specifické HCMV imunity (Goodrich et al. 1993). Bylo také zjištěno, že při dlouhodobém podávání gancikloviru se zvyšuje počet jeho vedlejších toxických projevů

(Salzberger et al. 1997), zvyšuje se riziko propuknutí onemocnění po 100 dnu po HSCT (Nguyen et al. 1999) a též riziko vzniku rezistence HCMV (Gilbert a Boivin 2005).

V případech, kdy není možné použít ganciklovir, například z důvodu neutropenie, nasazuje se foscarnet. Foscarnet také působí inhibičně na replikaci HCMV DNA (Gilbert a Boivin 2005) a vykazuje srovnatelnou účinnost s ganciklovirem (Moretti et al. 1998). Foscarnet sice není toxický vůči kostní dřeni, ale vykazuje nefrotoxicitu a způsobuje elektrolytickou nerovnováhu. Díky těmto nevýhodám je proto používán pouze jako alternativa při kontraindikaci podávání gancikloviru (Reusser et al. 1992, Bacigalupo et al. 1994).

Mimo antivirotik lze pro profylaktickou léčbu použít podávání imunoglobulinu a monoklonálních protilátek (Boeckh, 1999). Optimální léčebná strategie je stále předmětem výzkumu podobně jako volba optimální monitorovací metody.

11.2 Možnosti profylaktické vakcinace

Vzhledem k vysoké promořenosti populace a komplikacím, které HCMV způsobuje u nenarozených dětí a u pacientů po HSCT nebo SOT, je velká snaha nalézt vakcínu pro primární prevenci infekce HCMV, především pro prevenci kongenitální infekce, ale i vakcínu která by bránila rozvoji infekce a onemocnění především u transplantovaných séronegativních pacientů.

První testovaná vakcína byla vytvořena atenuací Towne kmene izolovaného z dětí s vrozenou infekcí. Testy této vakcíny byly prováděny u pacientů s transplantací ledvin. Výsledkem těchto testů bylo zjištění, že tato vakcína stimuluje imunitní systém a vakcinace seronegativních pacientů před transplantací zabránila rozvoji onemocnění, ne však vlastní infekci. Mnoho dalších vakcín bylo a je vyvíjeno a testováno - atenuovaná vakcína kombinující Towne a Toledo kmen, podjednotková gB vakcína, rekombinantní gB nebo pp65 v Canarypox virovém vektoru nebo DNA vakcíny s oblastmi HCMV genomu kódující gB nebo pp65 protein. Většina těchto vakcín prokázala imunogenitu a protektivitu a řada z nich prošla či prochází klinickými zkouškami různého stupně u lidí. Dosud však žádná není používána v klinické praxi (Gandhi a Khanna 2004).

12 Závěr

Od doby izolace HCMV v roce 1957 byl zaznamenán velký pokrok v metodách detekce, monitorování a léčby. Díky novým postupům se u pacientů po transplantaci SOT nebo HSCT zlepšilo jejich přežití a snížila úmrtnost v důsledku infekce a onemocnění vyvolaných virem HCMV. Problematika HCMV infekce u transplantovaných je v dnešní době studována mnoha skupinami po celém světě. Cílem je srovnat metody monitorování a

detekce a zjistit, která z nich (tzn. monitorování hladiny antigenu pp65, hladiny virové DNA nebo specifické imunity) je nejefektivnější pro sledování průběhu infekce u transplantovaných pacientů. Dále je nutné zjistit, která z metod monitorování je nejúčinnější pro rozhodnutí o zahájení léčby a sledování účinnosti této léčby. Výzkum se také zaměřuje na vývoj účinné vakcíny.

V této práci jsou hlavně shrnuty poznatky o důsledcích infekce HCMV u pacientů, kteří podstupují transplantace. Dále jsou shrnuty možnosti diagnostiky, prevence, monitorování a léčby onemocnění spojených s HCMV.

13 Přehled citované literatury

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 274(5284), 94-96.

Al-Soud WA and Radstrom P. (2001). Purification and characterisation of PCR inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39, 485– 493.

Bacigalupo A, Tedone E, Van Lint MT, Trespi G, Lonngren M, Sanna MA, Moro F, Frassoni F, Occhini D, Gualandi F, et al. (1994). CMV prophylaxis with foscarnet in allogeneic bone marrow transplant recipients at high risk of developing CMV infections. *Bone Marrow Transplant.* 13. 783–788.

Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. (2008). Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J. Clin. Virol.* 41(3), 237-241

Barry PA, Pratt-Lowe E, Peterlin BM, Luciw PA. (1990). Cytomegalovirus activates transcription directed by the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64(6), 2932-2940.

Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St Jeor S. (2005). Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 79(17), 11022-11034.

Beninga J, Kropff B, Mach M. (1995). Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* 76, 153–160.

Blank BS, Meenhorst PL, Pauw W, Mulder JW, van Dijk WC, Smits PH, Roeles F, Middeldorp JM, Lange JM. (2002). Detection of late pp67-mRNA by NASBA in peripheral blood for the diagnosis of human cytomegalovirus disease in AIDS patients. *J. Clin. Virol.* 25, 29–38.

Bodeus M, Van Ranst M, Bernard P, Hubinont C, Goubau P. (2002). Anticytomegalovirus IgG avidity in pregnancy: a 2-year prospective study. *Fetal. Diagn. Ther.* 17, 362–366

Boeckh M. (1999). Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy. *Transpl. Infect. Dis.* 1(3), 165-178

Boeckh M and Boivin G. (1998). Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(3), 533-554

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood.* 101(2), 407-414

Boeckh M and Nichols WG. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood.* 103(6), 2003-2008.

- Boehme KW and Compton T. (2004).** Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol.* 78(15), 7867-7873.
- Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. (1992).** Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11, 93–99.
- Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, Smith HR, Beckman DL, Blattenberger EA, Dubbelde CE, Stone LR, Scalzo AA, Yokoyama WM. (2001).** Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science.* 292(5518), 934-937.
- Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. (1985).** Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 161(1), 40-52.
- Cook CH, Yenchar JK, Kraner TO, Davies EA, Ferguson RM. (1998).** Occult herpes family viruses may increase mortality in critically ill surgical patients. *Am. J. Surg.* 176, 357–360.
- Cosman D, Fanger N, Borges L. (1999).** Human cytomegalovirus, MHC class I and inhibitory signalling receptors: more questions than answers. *Immunol. Rev.* 168, 177-185.
- Crapnell K, Zanjani ED, Chaudhuri A, Ascensao JL, St Jeor S, Maciejewski JP. (2000).** In vitro infection of megakaryocytes and their precursors by human cytomegalovirus. *Blood* 95, 487–493.
- Crough T and Khanna R. (2009).** Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(1), 76-98.
- Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. (1999).** The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity.* 11(5), 603-613.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. (1990).** Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature.* 344(6268), 774-777.
- Davignon JL, Castanié P, Yorke JA, Gautier N, Clément D, Davrinche C. (1996).** Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4+ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J Virol.* 70(4), 2162-2169.
- Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, Grigoleit U, Moris A, Rammensee HG, Kanz L, Kleihauer A, Frank F, Jahn G, Hebart H. (2002).** Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 99(11), 3916-3922.
- Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, Khanna R. (2003).** Ex vivo profiling of CD8+ T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* 77(9), 5226-5240.
- Frere P, Pereira M, Fillet G, Beguin Y. (2006).** Infections after CD34-selected or unmanipulated autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Eur. J. Haematol.* 76(2), 102-108.

Gambarotto K, Ranger-Rogez S, Aubard Y, Piver P, Duffetelle B, Delpeyroux C, Roussanne MC, Nicot T, Denis F. (1997). Primary cytomegalovirus infection and pregnant women: epidemiological study on 1100 women at Limoges. *Pathol. Biol. (Paris)*. 45(6), 453-461.

Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Torsellini M, Castiglioni B, Vitulo P, Pellegrini C, Viganò M, Grossi P, Revello MG. (2003a). Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation*. 75(7),1012-1019.

Gerna G, Baldanti F, Torsellini M, Minoli L, Viganò M, Oggionis T, Rampino T, Castiglioni B, Goglio A, Colledan M, Mammana C, Nozza F, Daniele L; Bergamo Transplant Group. (2007). Evaluation of cytomegalovirus DNAemia versus pp65-antigenaemia cutoff for guiding preemptive therapy in transplant recipients: a randomized study. *Antivir. Ther.* 12(1), 63-72.

Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, Torsellini M, Giorgiani G, Zecca M, De Stefano P, Middeldorp J, Locatelli F, Revello MG. (2003b). Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. *Blood*. 101, 5053–5060.

Gerna G, Lilleri D, Zecca M, Alessandrino EP, Baldanti F, Revello MG, Locatelli F. (2005). Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 90(4), 526-533.

Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Chezzi L, Grossi P, Revello MG. (1998a). Human cytomegalovirus (HCMV) leukoDNAemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection. *Transplantation* 65, 1378–1385.

Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Grossi P, Torsellini M, Revello MG. (1998b). Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection. *J Clin Microbiol*. 36(4), 1113-1116.

Ghandi MK and Khanna R. (2004). Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infect Dis* 4(12), 725-738

Gilbert C and Boivin G. (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs.

Antimicrob. Agents Chemother. 49(3), 873-883

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. (1984). Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. Clin. Microbiol.* 19(6), 917-919.

Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. (1993). Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann. Intern. Med.* 118(3), 173-178.

- Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, Buhles WC, DeArmond B, Meyers JD. (1991).** Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 325(23), 1601-1607.
- Goodrum F, Reeves M, Sinclair J, High K, Shenk T. (2007).** Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood.* 110, 937–945.
- Habbal W, Monem F, Gärtner BC. (2009).** Comparative evaluation of published cytomegalovirus primers for rapid real-time PCR: which are the most sensitive? *J. Med. Microbiol.* 58(Pt 7), 878-883.
- Hebart H and Einsele H. (2004).** Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* 65(5), 558-564
- Ho M. (2008).** The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 197(2), 65-73.
- Holmberg LA, Boeckh M, Hooper H, Leisenring W, Rowley S, Heimfeld S, Press O, Maloney DG, McSweeney P, Corey L, Maziarz RT, Appelbaum FR, Bensinger W. (1999).** Increased incidence of cytomegalovirus disease after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 94(12), 4029-4035.
- Hopkins JI, Fiander AN, Evans AS, Delchambre M, Gheysen D, Borysiewicz LK. (1996).** Cytotoxic T cell immunity to human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Med. Virol.* 49(2), 124-131.
- Hutto C, Little EA, Ricks R, Lee JD, Pass RF. (1986).** Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *J Infect. Dis.* 154(3), 527-530.
- Jacobson MA. (1997).** Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 337, 105–114.
- Jacobson MA, Maecker HT, Orr PL, D'Amico R, Van Natta M, Li XD, Pollard RB, Brecht BM; Adult AIDS Clinical Trials Group and the Studies of Ocular Complications of AIDS Research Group. (2004).** Results of a cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+/interferon- gamma+ cytokine flow cytometry assay correlate with clinical evidence of protective immunity in patients with AIDS with CMV retinitis. *J. Infect. Dis.* 189(8), 1362-1373.
- Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B. (2004).** A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 78, 1440–1447.
- Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Little MT, Corey L, Storb R. (2002a).** Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood.* 99(6), 1978-1985.
- Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Storb R. (2002b).** Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 8(9), 512-520.

- Kalejta RF. (2008).** Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72(2), 249-265
- Karavellas MP, Plummer DJ, Macdonald JC, Torriani FJ, Shufelt CL, Azen SP, Freeman WR. (1999).** Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 179, 697–700.
- Kim WR, Badley AD, Weisner RH, Porayko MK, Seaberg EC, Keating MR, Evans RW, Dickson ER, Krom RA, Paya CV. (2000).** The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation.* 69(3), 357-361
- Kline JN, Hunninghake GM, He B, Monick MM, Hunninghake GW. (1998).** Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines. *Exp. Lung Res.* 24, 3–14.
- Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. (2000).** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(4), 1695-1700.
- Lazzarotto T, Campisi T, Dal Monte P, Galli S, Spezzacatena P, Guglielmi P, Landini MP. (1996).** A quantitative test (HCMV-hybrid-capture(TM)) to detect human cytomegalovirus DNA in the blood of immunocompromised patients compared with antigenemia and polymerase chain reaction. *New Microbiol.* 19(3), 193-201.
- Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. (1994).** Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood.* 83, 1971–1979.
- Lilleri D, Baldanti F, Gatti M, Rovida F, Dossena L, De Grazia S, Torsellini M, Gerna G. (2004).** Clinically-based determination of safe DNAemia cutoff levels for preemptive therapy or human cytomegalovirus infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Med. Virol.* 73(3), 412-418.
- Lilleri D, Gerna G, Furione M, Bernardo ME, Giorgiani G, Telli S, Baldanti F, Locatelli F. (2007).** Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving hematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65 antigenemia. *Blood.* 110(7), 2757-2760.
- Ljungman P. (2007).** Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 20(2), 209-217.
- Ljungman P, Biron P, Bosi A, Cahn JY, Goldstone AH, Gorin NC, Link H, Messina C, Michallet M, Richard C, et al. (1994).** Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 13(2), 209-212.

Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. (2003). Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*. 102(13), 4255-4260.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipient. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1094-1097.

Margulies BJ, Browne H, Gibson W. (1996). Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology*. 225(1), 111-125.

Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, Jekic-McMullen D, Kohn DJ, Isada C, Moussa G, Chua R, Walmsley S. (1999). Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J. Clin. Microbiol.* 37(4), 958-963.

Mazzulli T, Wood S, Chua R, Walmsley S. (1996). Evaluation of the Digene Hybrid Capture System for detection and quantitation of human cytomegalovirus viremia in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 34(12), 2959-2962.

McKeating JA, Griffiths PD, Weiss RA. (1990). HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature*. 343(6259), 659-661.

Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* 77, 3099-3102.

Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW, Sedmak DD. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* 187(5), 675-683.

Mocarski ES Jr., Shenk T, Pass RF. (2007). Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (eds.). *Fields Virology*, 5th edition, Volume 2. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, USA, 2702-2772.

Moretti S, Zikos P, Van Lint MT, Tedone E, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, Mordini N, Berisso G, Bregante S, Bruno B, Bacigalupo A. (1998). Forscarnet vs ganciclovir for cytomegalovirus (CMV) antigenemia after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation (HSCT): a randomised study. *Bone Marrow Transplant.* 22(2), 175-180.

Nguyen Q, Champlin R, Giral S, Rolston K, Raad I, Jacobson K, Ippoliti C, Hecht D, Tarrand J, Luna M, Whimbey E. (1999). Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 28(3), 618-623.

Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. (2002). High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J. Infect. Dis.* 185(3), 273-282.

- Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM; Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. (2005).** Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353(13), 1350-1362.
- Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, Rowland-Jones S, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV. (2002).** Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood.* 100(10), 3690-3697.
- Pang XL, Chui L, Fenton J, LeBlanc B, Preiksaitis JK. (2003).** Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 41(7), 3167-3174.
- Pass RF (1985).** Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 152, 243–248.
- Pellet PE, Roizman B. (2007).** The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (eds.). *Fields Virology*, 5th edition, Volume 2. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, USA, 2702-2772.
- Peterson PK, Balfour HH, Marker SC, Fryd DS, Howard RJ, Simmons RL. (1980).** Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine.* 59, 283-300.
- Plotkin SA, Higgins R, Kurtz JB, Morris PJ, Campbell DA Jr, Shope TC, Spector SA, Dankner WM. (1994).** Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation.* 58(11), 1176-1178.
- Prosch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Kruger DH, Volk HD, Docke WD. (2000).** A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology.* 272, 357–365.
- Pumannova M, Roubalova K, Vitek A, Sajdova J. (2006).** Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay with LightCycler-based polymerase chain reaction for measuring cytomegalovirus DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54(2),115-120
- Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. (1982).** Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 307(1), 7-13.
- Razonable RR, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Kremers W, Wilson J, Groettum C, Smith TF, Paya CV. (2001).** Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. *J. Clin. Microbiol.* 39(12), 4472-4476.

- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, Smith TF, Paya CV. (2002).** The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation*. 73(6), 968-973.
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. (1991).** Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*. 78, 1373–1380.
- Reusser P, Gambertoglio JG, Lilleby K, Meyers JD. (1992).** Phase I-II trial of foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in autologous and allogeneic marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 166, 473–479
- Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Middeldorp J, Gerna G. (2003).** Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 41(4), 1772-1774.
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. (1992).** Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 257, 238–241.
- Rubin RH. (2007).** The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20(4), 399-407.
- Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. (1997).** Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood*. 90(6), 2502-2508.
- Senechal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW. (2004).** Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood*. 103(11), 4207-4215.
- Sester M, Sester U, Gärtner BC, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. (2002).** Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(10), 2577-2584.
- Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Köhler H. (2001).** Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 71(9), 1287-1294.
- Shepp DH, Moses JE, Kaplan MH. (1996).** Seroepidemiology of cytomegalovirus in patients with advanced HIV disease: influence on disease expression and survival. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 11(5), 460-468.
- Schafer P, Braun RW, Mohring K, Henco K, Kang J, Wendland T, Kuhn JE. (1993).** Quantitative determination of human cytomegalovirus target sequences in peripheral blood leukocytes by nested polymerase chain reaction and temperature gradient gel electrophoresis. *J Gen Virol* 74, 2699– 2707.

- Schalasta G, Eggers M, Schmid M, Enders G. (2000).** Analysis of human cytomegalovirus DNA in urines of newborns and infants by means of a new ultrarapid real-time PCR-system. *J. Clin. Virol.* 19(3),175-185.
- Schleiss MR, Bourne N, Stroup G, Bravo FJ, Jensen NJ, Bernstein DI. (2004).** Protection against congenital cytomegalovirus infection and disease in guinea pigs, conferred by a purified recombinant glycoprotein B vaccine. *J. Infect. Dis.* 189(8), 1374-1381.
- Schoppel K, Schmidt C, Einsele H, Hebart H, Mach M. (1998).** Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 178(5), 1233-1243.
- Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. (2000).** Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J. Infect. Dis.* 181, 717–20.
- Sissons JG and Carmichael AJ. (2002).** Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J. Infect.* 44, 78–83.
- Söderberg-Nauclér C, Streblow DN, Fish KN, Allan-Yorke J, Smith PP, Nelson JA. (2001).** Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J. Virol.* 75(16), 7543-7554.
- Sohn YM, Oh MK, Balcarek KB, Cloud GA, Pass RF. (1991).** Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents. *J. Infect. Dis.* 163, 460–463.
- Spector SA, Wong R, Hsia K, Pilcher M, Stempien MJ. (1998).** Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J. Clin. Invest.* 101(2), 497-502.
- Stagno S and Whitley RJ. (1985).** Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* 313(20), 1270-1274.
- Stein J, Volk HD, Liebenthal C, Kruger DH, Prosch S. (1993).** Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J. Gen. Virol.* 74, 2333–2338.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. (1991).** Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72, 2059–2064.
- The TH, van der Bij W, van den Berg AP, van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG, van Son WJ. (1990).** Cytomegalovirus antigenemia. *Rev. Infect. Dis.* 12 Suppl 7:S734-44.
- Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. (2000).** Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science.* 287(5455), 1031.

Tomasec P, Wang EC, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, McSharry BP, Morris RJ, Llewellyn-Lacey S, Rickards C, Nomoto A, Sinzger C, Wilkinson GW. (2005). Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat. Immunol.* 6, 181–188.

Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* 5(9), 1039-1043.

Tu W, Chen S, Sharp M, Dekker C, Manganello AM, Tongson EC, Maecker HT, Holmes TH, Wang Z, Kemble G, Adler S, Arvin A, Lewis DB. (2004). Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J. Immunol.* 172(5), 3260-3267.

Veal N, Payan C, Fray D, Sarol L, Blanchet O, Kouyoumdjian S, Lunel F. (1996). Novel DNA assay for cytomegalovirus detection: comparison with conventional culture and pp65 antigenemia assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3097-3100

Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* 42(2), 188-192.

Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. (1997). Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* 99(7), 1739-1750.

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333, 1038–1044.