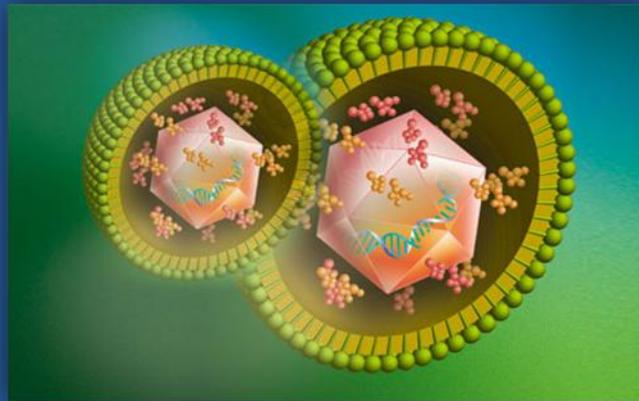


**INMUNIDAD CELULAR ESPECÍFICA DE  
CITOMEGALOVIRUS EN RECEPTORES DE  
TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO DE BAJO  
RIESGO DE ENFERMEDAD POR  
CITOMEGALOVIRUS**



**TESIS DOCTORAL**

**Juan Damián Mena Romo**

**Sevilla, Marzo 2016**

**Departamento de Medicina,  
Universidad de Sevilla**





**TESIS DOCTORAL**

**INMUNIDAD CELULAR ESPECÍFICA DE  
CITOMEGALOVIRUS EN RECEPTORES DE  
TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO DE  
BAJO RIESGO DE ENFERMEDAD POR  
CITOMEGALOVIRUS**

Juan Damián Mena Romo



Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla

Sevilla, Marzo de 2016



La Dra. Doña Elisa Cordero Matía, Facultativo Especialista de Área de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, la Dra. Doña Pilar Pérez Romero, Investigadora del programa Nicolás Monardes adscrita a la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, y el Prof. Don Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla,

#### CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación que lleva por título “Inmunidad celular específica de citomegalovirus en receptores de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por citomegalovirus” ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Don Juan Damián Mena Romo, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a Marzo de 2016.

M<sup>a</sup> Elisa Cordero Matía

Co-Directora

M<sup>a</sup> Pilar Pérez Romero

Co-Directora

Jerónimo Pachón Díaz

Tutor

## **FINANCIACIÓN DE LA TESIS**

Subprograma de proyectos de Investigación en Salud, correspondiente a la convocatoria 2011 de concesión de ayudas de la acción estratégica de salud (número de expediente PI11/02800), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS

### **Artículos:**

Cytomegalovirus specific T cellular immunity as a risk factor of the infection in low risk solid organ transplant recipients. Mena-Romo D, Perez-Romero P, Martín-Gandul C, Lage E, Gentil MA, Gómez MA, Cordero E.

Manuscrito en preparación, se remitirá a la revista *American Journal of Transplantation*.

DNA cut-off value in plasma for pre-emptive treatment of CMV infection is different for kidney and liver transplant recipients at lower risk of CMV infection. Martín-Gandul C, Mena-Romo D, Lage E, Gentil MA, Gómez MA, Perez-Romero, Cordero E.

Manuscrito en preparación, se remitirá a la revista *Transplantation*.

Characterization of the CMV-specific T-Cell Immune Response Kinetics in Renal Transplantation receiving Thymoglobulin Induction Therapy: a pilot study. Mena-Romo D, Martín-Gandul C, Gentil MA, Perez-Romero P, Cordero E.

Manuscrito en preparación, se remitirá a la revista *American Journal of Transplantation*.

Quantiferon vs. flow cytometry for evaluation of CMV specific immune response in solid organ transplant recipients. Mena-Romo D, Martín-Gandul C, Gentil MA, Gómez MA, Lage E, Perez-Romero MP, Cordero E.

Manuscrito en elaboración, se remitirá a la revista *Transplantation International*.

### **Capítulos de libro:**

El tratamiento anticipado de la infección por CMV el receptor de trasplante hepático. “1000 trasplantes hepáticos” (pp. 205-211). Pilar Blanco-Lobo\*, Cecilia Martín-Gandul\*, Damián Mena-Romo\*, Cisneros JM, Cordero E, Perez-Romero MP. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla, 2014.

### **Presentaciones en congresos:**

“Cytomegalovirus specific T cellular immunity as a risk factor of the infection in low risk solid organ transplant recipients”.

24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 2014. Presentación oral.

Travel Grant Award: 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

“Inmunidad celular específica frente a citomegalovirus como factor de riesgo de la infección en receptores de trasplante de bajo riesgo”.

XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Valencia, 2014. Presentación oral.

Por fin llegó el ansiado momento...

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Jerónimo Pachón, a la Dra. Pilar Pérez y a la Dra. Elisa Cordero la oportunidad de realizar este proyecto y poder cumplir uno de mis sueños, el de formarme como Doctor.

A todas las personas que han contribuido a ello, en lo profesional y especialmente en lo personal, porque la convivencia es un aprendizaje continuo y de todo se puede obtener un mensaje positivo. Gracias a Meri Joe de citometría, Nacho del 202, Juanma de estadística, Cecilia, a las niñas del 213, especialmente a Mery y Marina, a Juan, Bea, Tere, Carrasco, Fran, Viviana, Pablo, Josan, Pili, Ángel y al resto del equipo.

A mis amigos por estar cuando lo he necesitado y cuando no también, Parras, Javi, Manu, Álvaro, Alberto, a los neurocríticos, los erasmus y a los “sevillanos” Eloy, Carlos y Calero.

A Ana Cristina, porque lo hemos compartido prácticamente todo, y lo que nos queda.

Y, por supuesto, a mi familia, gracias a ellos por todo lo que soy: a mis padres, Carmen y Juan, a mi hermano Luis, mi abuela, mis tíos, mis primos y a todos los que ya no están. Os quiero.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Características del citomegalovirus (CMV).....	2
1.1. Familia <i>Herpesviridae</i> .....	2
1.2. Estructura del CMV.....	2
1.3. Ciclo de vida de CMV.....	4
2. Infección causada por CMV.....	6
2.1. Epidemiología.....	6
2.2. Patogénesis y patología del CMV.....	7
3. Infección por CMV en pacientes receptores de órgano sólido (TOS).....	10
3.1. Factores de riesgo de la infección por CMV en receptores de TOS.....	12
3.1.1. Seroestatus.....	13
3.1.2. Tipo de órgano.....	13
3.1.3. Tiempo postrasplante.....	14
3.1.4. Agentes inmunosupresores.....	14
3.1.5. Otros factores.....	14
3.2. Diagnóstico de la infección por CMV.....	15
3.2.1. Histopatología.....	15
3.2.2. Cultivo de virus.....	16
3.2.3. Serología.....	16
3.2.4. Antigenemia.....	16
3.2.5. Pruebas cuantitativas de ácidos nucleicos.....	17
3.3. Manejo clínico de la infección por CMV.....	17
3.3.1. Antivirales específicos contra CMV.....	18
3.3.2. Resistencias a antivirales.....	21
3.3.3. Estrategias de prevención.....	22
3.3.3.1. Profilaxis universal.....	23
3.3.3.2. Tratamiento anticipado.....	24
4. Respuesta inmune frente a CMV en pacientes TOS.....	25
4.1. Inmunidad innata.....	25
4.2. Inmunidad adaptativa.....	26
4.2.1. Inmunidad humoral.....	26

4.2.2. Inmunidad celular.....	27
4.2.2.1. Papel de las células T CD8 <sup>+</sup> .....	28
4.2.2.2. Papel de las células T CD4 <sup>+</sup> .....	28
5. Monitorización inmunológica de receptores de TOS.....	29
5.1. Métodos de monitorización inmune no específicas frente a CMV.....	30
5.2. Métodos de monitorización inmune específicas frente a CMV.....	30
<b>II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....</b>	<b>35</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>39</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
1. Definiciones.....	46
2. Diseño del estudio e inclusión de pacientes.....	47
3. Monitorización y seguimiento de los pacientes.....	47
4. Determinación de la serología frente a CMV.....	48
5. Determinación de la carga viral de CMV.....	48
6. Determinación de la inmunidad celular específica frente a CMV.....	49
7. Análisis estadístico.....	50
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
1. Características generales de la muestra incluida en el estudio.....	54
1.1. Inclusión de pacientes.....	54
1.2. Características demográficas y basales de los pacientes evaluables.....	57
1.3. Incidencia de infección y enfermedad por CMV de los pacientes evaluables.....	59
1.4. Evolución de los pacientes evaluables.....	68
1.4.1. Evolución de los pacientes al fin del año de seguimiento inmunoviroológico y seguimiento clínico.....	68

1.4.2. Características de los pacientes con rechazo y relación con la replicación por CMV.....	69
1.4.3. Relación del cambio de tratamiento basal por inhibidores de mTOR con la replicación por CMV.....	71
2. Cronología de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV evaluables.....	73
2.1. Cronología de la respuesta inmune específica frente a CMV de células T CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> y del recuento de poblaciones linfocitarias CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	73
2.1.1. Cronología de las células T CD8 <sup>+</sup> que expresan IFN $\gamma$ tras la estimulación.....	73
2.1.2. Cronología de las células T CD4 <sup>+</sup> que expresan IFN $\gamma$ tras la estimulación.....	74
2.1.3. Cronología de las células T CD8 <sup>+</sup> que expresan IL2 tras la estimulación.....	75
2.1.4. Cronología de las células T CD4 <sup>+</sup> que expresan IL2 tras la estimulación.....	76
2.1.5. Cronología de la subpoblación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	77
2.1.6. Cronología de la subpoblación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	79
2.2. Cronología de la respuesta inmune celular específica considerando como inmunidad positiva el porcentaje de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> específicas de CMV $\geq 0,25$ .....	82
2.3. Cronología de la respuesta inmune celular específica considerando como inmunidad positiva el porcentaje de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> específicas de CMV $\geq 0,15$ .....	90
2.4. Punto de corte de 0,15 en la semana 2 como predictor del punto de corte de 0,25 en la semana 4 postrasplante.....	100
3. Relación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV con el desarrollo de infección por CMV en los receptores de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por CMV.....	100
3.1. Relación de la respuesta de células T frente a CMV con el nivel de replicación e indicación de tratamiento anticipado.....	100
3.2. Valoración de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV como factor de riesgo de enfermedad por CMV en los pacientes evaluables de bajo riesgo.....	104

3.3. Definición de un umbral de respuesta inmune específica de células T frente a CMV con efecto terapéutico a partir del cual el paciente de bajo riesgo por enfermedad puede controlar espontáneamente la viremia por CMV.....	104
3.3.1. Determinación del umbral mediante curvas ROC.....	104
3.3.2. Relación entre la respuesta inmune de células T específica (utilizando el punto de corte de $\geq 0,25\%$ ) y la infección por CMV.....	107
3.3.2.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,25%.....	107
3.3.2.1.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%.....	108
3.3.2.1.2. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%.....	110
3.3.2.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,25%.....	111
3.3.2.2.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%.....	114
3.3.2.2.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%.....	115
3.3.2.3. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,25%.....	116
3.3.2.3.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%.....	120
3.3.2.3.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%.....	121
3.3.3. Relación entre la respuesta inmune celular específica (utilizando el punto de corte de $\geq 0,15\%$ ) y la infección por CMV.....	122

3.3.3.1.	Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,15%.....	123
3.3.3.1.1.	Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%.....	124
3.3.3.1.2.	Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%.....	125
3.3.3.2.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	127
3.3.3.2.1.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%.....	130
3.3.3.2.2.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%.....	131
3.3.3.3.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	132
3.3.3.3.1.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%.....	135
3.3.3.3.2.	Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%.....	136
3.4.	Definición de un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en función de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en pacientes de bajo riesgo.....	139

## **VII. DISCUSIÓN.....147**

1.	Incidencia de infección y enfermedad por CMV en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV.....	149
1.1.	Replicación por CMV.....	149
1.2.	Administración de tratamiento anticipado.....	150

1.3. Infección sintomática.....	150
1.4. Serología del donante.....	150
1.5. Inhibidores del mTOR e infección por CMV.....	151
2. Cronología de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV.....	152
2.1. Respuesta de células T CD8 <sup>+</sup> específicas de CMV productoras de IFN $\gamma$ .....	152
2.2. Respuesta de células T CD4 <sup>+</sup> específicas de CMV productoras de IFN $\gamma$ .....	155
2.3. Respuesta de células T CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> específicas de CMV productoras de IL2.....	156
2.4. Respuesta de células T CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> .....	156
3. Relación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV con la infección en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV.....	157
3.1. Definición de un umbral de respuesta inmune de células T con efecto terapéutico.....	158
3.2. Valoración de la respuesta inmune específica de células T como factor de riesgo de enfermedad por CMV.....	163
3.3. Definición de un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en función de la respuesta inmune celular específica en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV.....	164
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>167</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>171</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

## I. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Síntomas clínicos de la infección por CMV según el tipo de pacientes.....	9
<b>Tabla 2.</b> Principales fármacos específicos contra CMV.....	19
<b>Tabla 3.</b> Ventajas y desventajas de la profilaxis universal y el tratamiento anticipado.....	23
<b>Tabla 4.</b> Principales métodos para la monitorización de la respuesta inmune de células T específica frente a CMV.....	31

## VI. RESULTADOS

<b>Tabla 5.</b> Motivos de no inclusión de los 134 pacientes trasplantados durante el período de inclusión.....	55
<b>Tabla 6.</b> Características demográficas y basales de los pacientes evaluables y no evaluables o no incluidos de bajo riesgo por enfermedad por CMV y con indicación de tratamiento anticipado.....	56
<b>Tabla 7.</b> Características demográficas basales previas al desarrollo de infección por CMV de los 106 pacientes evaluables.....	58
<b>Tabla 8.</b> Características demográficas y basales de los pacientes evaluables que desarrollan o no infección por CMV durante el seguimiento.....	61
<b>Tabla 9.</b> Características demográficas basales de los pacientes evaluables que desarrollan o no infecciones con cargas virales pico $\geq 2000$ UI/ml por CMV durante el seguimiento.....	63
<b>Tabla 10.</b> Características demográficas y basales de los 106 pacientes evaluables en función de la indicación de tratamiento anticipado durante el seguimiento.....	64
<b>Tabla 11.</b> Características de la infección por CMV de los 54 pacientes evaluables con uno o más episodios de replicación en función de la indicación de tratamiento anticipado durante el seguimiento.....	65
<b>Tabla 12.</b> Características demográficas y basales de la enfermedad por CMV de los pacientes con infección sintomática por CMV.....	67

<b>Tabla 13.</b> Características demográficas y basales de los pacientes evaluables que tuvieron o no algún episodio de rechazo durante el seguimiento.....	70
<b>Tabla 14.</b> Características de la infección por CMV de los pacientes evaluables que tuvieron o no algún episodio de rechazo durante el seguimiento.....	71
<b>Tabla 15.</b> Evolución de los 106 paciente evaluables del estudio.....	72
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de células T CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> , así como subpoblaciones linfocitarias de CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> expresados en células/ $\mu$ l, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante de los pacientes que desarrollan o no infección por CMV durante el seguimiento.....	102
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de células T CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> , así como subpoblaciones linfocitarias de CD8 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> expresados en células/ $\mu$ l, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante de los pacientes en función de la indicación de tratamiento durante el seguimiento.....	103
<b>Tabla 18.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular pretrasplante específica frente a CMV, considerando como punto de corte 0,25%.....	108
<b>Tabla 19.</b> Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular CMV específica pretrasplante con un punto de corte de 0,25%.....	109
<b>Tabla 20.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante hepático con y sin respuesta inmune celular pretrasplante específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,25%.....	111
<b>Tabla 21.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,25%.....	112
<b>Tabla 22.</b> Análisis multivariante de las variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV >2000 UI/ml.....	113
<b>Tabla 23.</b> Análisis multivariante de las variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.....	114
<b>Tabla 24.</b> Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25%.....	115

<b>Tabla 25.</b> Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25% .....	116
<b>Tabla 26.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin inmunidad celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando el punto de corte de 0,25% .....	117
<b>Tabla 27.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV >2000 UI/ml .....	118
<b>Tabla 28.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado .....	119
<b>Tabla 29.</b> Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,25% .....	120
<b>Tabla 30.</b> Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 4 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25% .....	121
<b>Tabla 31.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV pretrasplante utilizando un punto de corte de 0,15% .....	123
<b>Tabla 32.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante renal con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV en el pretrasplante utilizando un punto de corte de 0,15% .....	124
<b>Tabla 33.</b> Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica pretrasplante con un punto de corte de 0,15% .....	125
<b>Tabla 34.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,15% .....	127
<b>Tabla 35.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV >2000 UI/ml .....	128

<b>Tabla 36.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.....	129
<b>Tabla 37.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante renal con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	130
<b>Tabla 38.</b> Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	131
<b>Tabla 39.</b> Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,15%.....	132
<b>Tabla 40.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV $>2000$ UI/ml.....	133
<b>Tabla 41.</b> Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.....	134
<b>Tabla 42.</b> Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	135
<b>Tabla 43.</b> Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.....	136
<b>Tabla 44.</b> Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad pretrasplante (porcentaje de células T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25\%$ ).....	140
<b>Tabla 45.</b> Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante (porcentaje de células T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25\%$ ).....	141
<b>Tabla 46.</b> Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante (porcentaje de células T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15\%$ ).....	143

# ÍNDICE DE FIGURAS

## I. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Estructura básica del CMV.....	4
<b>Figura 2.</b> Modelo de entrada del CMV en la célula hospedadora.....	5
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida del CMV en una célula humana.....	6
<b>Figura 4.</b> Cuerpo de inclusión de CMV en célula hepática.....	8

## VI. RESULTADOS

<b>Figura 5.</b> Diagrama de la inclusión de los pacientes trasplantados de órgano sólido.....	54
<b>Figura 6.</b> Incidencia de infección por CMV y aplicación de tratamiento antiviral en los pacientes incluidos y evaluables del estudio.....	60
<b>Figura 7.</b> Pacientes asintomáticos y sintomáticos a los que se indicó la administración de tratamiento anticipado.....	66
<b>Figura 8.</b> Gráfico comparativo de la evolución clínica de los 106 pacientes evaluables al final del seguimiento inmunoviroológico (Mayo de 2014) y al final del seguimiento clínico (Mayo de 2015).....	69
<b>Figura 9.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ a lo largo del seguimiento.....	74
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ a lo largo del seguimiento.....	75
<b>Figura 11.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IL2 a lo largo del seguimiento.....	76
<b>Figura 12.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IL2 a lo largo del seguimiento.....	77
<b>Figura 13.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD8 <sup>+</sup> expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.....	78
<b>Figura 14.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD8 <sup>+</sup> expresado como porcentaje del total de linfocitos a lo largo del seguimiento.....	78

<b>Figura 15.</b> Comparación entre la mediana del porcentaje de células CD8 <sup>+</sup> específicas de CMV y el número total de células CD8 <sup>+</sup> expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.....	79
<b>Figura 16.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD4 <sup>+</sup> expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.....	80
<b>Figura 17.</b> Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD4 <sup>+</sup> expresado como porcentaje del total de linfocitos a lo largo del seguimiento.....	81
<b>Figura 18.</b> Comparación entre la mediana del porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> específicas de CMV y el número total de células CD4 <sup>+</sup> expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.....	82
<b>Figura 19.</b> Evolución de la adquisición de la inmunidad celular específica de CMV en receptores de trasplante a partir de la segunda semana postrasplante con un punto de corte de %CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25.....	83
<b>Figura 20.</b> Porcentaje mediano de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular (%CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25) a las 2 semanas postrasplante.....	84
<b>Figura 21.</b> Porcentaje mediano de células CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular (%CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25) a las 2 semanas postrasplante.....	85
<b>Figura 22.</b> Evolución de la adquisición de la inmunidad celular específica postrasplante frente a CMV (%CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25) en función de los datos de inmunidad celular específica pretrasplante.....	87
<b>Figura 23.</b> Porcentaje mediano de células CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular (%CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25) pretrasplante.....	88
<b>Figura 24.</b> Porcentaje mediano de células CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> que secretan IFN $\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular (%CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> $\geq$ 0,25) pretrasplante.....	89

<b>Figura 25.</b> Evolución de la adquisición de inmunidad celular específica de CMV en receptores de trasplante a partir de la segunda semana postrasplante con un punto de corte de $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ .....	90
<b>Figura 26.</b> Porcentaje mediano de células $CD8^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) a las 2 semanas postrasplante.....	92
<b>Figura 27.</b> Porcentaje mediano de células $CD4^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) a las 2 semanas postrasplante.....	93
<b>Figura 28.</b> Evolución de la adquisición de inmunidad celular específica postrasplante frente a CMV ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) en función de los datos de inmunidad celular específica pretrasplante.....	95
<b>Figura 29.</b> Porcentaje mediano de células $CD8^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) pretrasplante.....	96
<b>Figura 30.</b> Porcentaje mediano de células $CD4^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) pretrasplante.....	97
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de células $CD8^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados.....	98
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de células $CD4^+CD69^+$ que secretan $IFN\gamma$ en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados.....	99
<b>Figura 33.</b> Curvas ROC de la respuesta inmune celular específica frente a CMV (porcentaje de células T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ ).....	106
<b>Figura 34.</b> Curvas ROC analizando el desarrollo de viremia como predictor de desarrollo de enfermedad por CMV en pacientes con un porcentaje de células T $CD8^+CD68^+IFN\gamma^+$ menor a: A) 0,25 antes del trasplante, B) 0,25 a las 4 semanas postrasplante y C) 0,15 a las 2 semanas postrasplante.....	139





# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Características del citomegalovirus (CMV)

### 1.1. Familia *Herpesviridae*

La familia *Herpesviridae* presenta una serie de características comunes en cuanto a su estructura y genoma. En concreto, dichos virus presentan un genoma de ADN de doble cadena en el interior de una nucleocápsida icosaédrica, rodeada a su vez por un tegumento formado por distintas proteínas y englobado todo por una doble membrana lipídica que proviene de la célula a la que infecta y que, por tanto, posee tanto proteínas virales como del hospedador. Todos los herpesvirus presentan dos fases de replicación: una lítica, en la cual la replicación viral da lugar a la lisis de la célula hospedadora, y otra fase latente, durante la cual son capaces de establecer infecciones de por vida gracias a la inserción del genoma viral en la célula infectada y a múltiples formas de evasión del sistema inmune (1).

La familia *Herpesviridae* se divide en 3 subfamilias, la *Alphaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* y *Gammaherpesviridae*. El citomegalovirus humano (HCMV o HHV-5) pertenece a la subfamilia *Betaherpesviridae*, cuyos miembros se caracterizan por tener un ciclo reproductivo más lento y establecer latencia en los leucocitos o glóbulos blancos (2).

### 1.2. Estructura del CMV

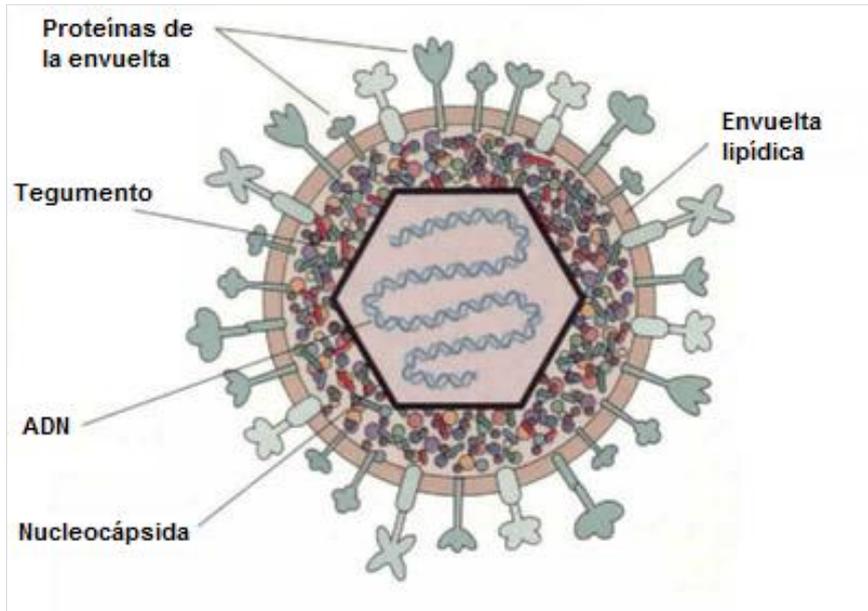
El CMV es el virus de mayor tamaño de la familia *Herpesviridae*, siendo también el de mayor tamaño capaz de infectar al ser humano. Es un virus envuelto con una bicapa lipídica que rodea una nucleocápsida icosaédrica, donde se encuentra un genoma de ADN lineal de doble cadena que consta de 230 kilobases aproximadamente, el cual codifica unos 165 genes y presenta un único origen de replicación. Su genoma se encuentra dividido en secuencias internas repetidas (IRS) y secuencias únicas clasificadas en función de su tamaño: secuencias largas (UL) y cortas (US), además de dos secuencias terminales repetidas (TRS). Los genes se clasifican en función de su expresión: genes de expresión precoz (IE ó  $\alpha$ ), temprana (E ó  $\beta$ ) y tardía (L ó  $\gamma$ ), que se dividen a su vez en dos categorías: “leaky-late genes” o  $\gamma_1$  (genes poco tardíos), que son independientes de la síntesis de ADN, y los “true-late genes” o  $\gamma_2$  (genes verdaderamente tardíos), dependientes de la síntesis del ADN viral (3).

La nucleocápsida de CMV la componen 162 capsómeros y está formada íntegramente por proteínas virales: pUL86, pUL85, pUL46 y pUL48-49, que conforman casi el 30% del total de proteínas que componen el virión (Fig. 1).

La nucleocápsida se encuentra rodeada por una matriz amorfa de naturaleza proteica conocida como tegumento (Fig. 1), compuesta por 14 proteínas diferentes. Sus funciones son muy variadas, participando en la entrada del virus en la célula hospedadora, en la expresión de los genes víricos, en la evasión del sistema inmune, en el ensamblaje y la salida de la nueva progenie vírica. La proteína más destacada del tegumento es la fosfoproteína 65 (pp65 o pUL83), que es liberada en el núcleo de la célula infectada durante la infección al inicio de la fase lítica. También es la más abundante y altamente antigénica, de ahí que sea utilizada como diana para la detección diagnóstica de CMV. La proteína pp65 es la principal diana tanto de la respuesta humoral como de los linfocitos T citotóxicos. Además, interacciona con numerosas cascadas de señalización de la activación de la respuesta inmune, actuando fundamentalmente en aquellas implicadas en la evasión de la respuesta inmune (4, 5). Otras proteínas importantes del tegumento son la pp71 o pUL82, que participa en la activación del virión, la pp150 o pUL48, que participa en la maduración del virión, la pp28 o pUL99 y la pUL48.

Por último, el virus presenta una envuelta formada por una doble membrana lipídica, la cual procede de la célula previamente infectada (Fig. 1). Dicha envuelta presenta al menos 20 glicoproteínas virales que ejercen funciones fundamentales en la penetración del virus en la célula diana, la transmisión del virus célula a célula y la maduración de los viriones. Incluye las glicoproteínas B (gB), la gH, gL, gM, gN y la gO (4).

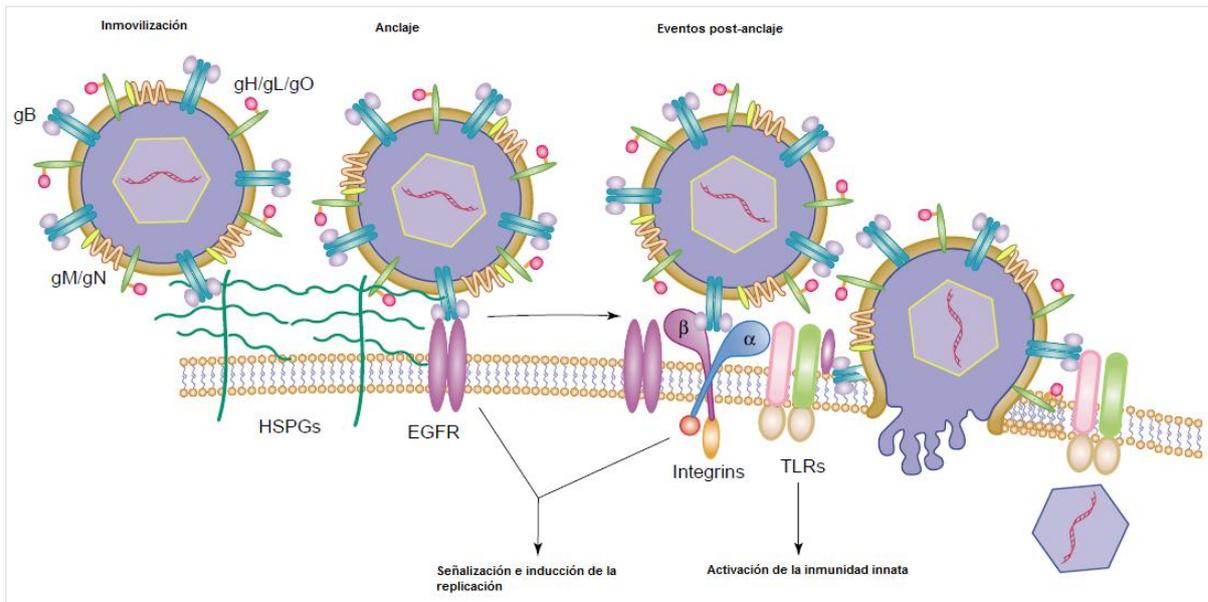
**Figura 1.** Estructura básica del CMV (adaptado de *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed.)



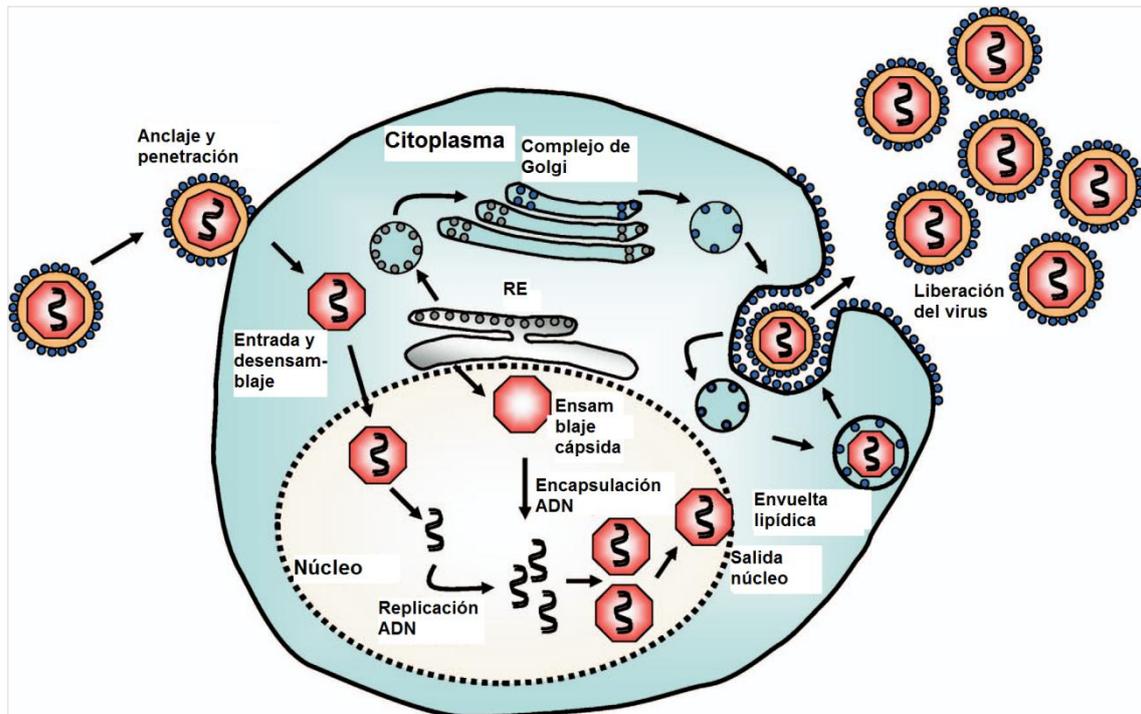
### 1.3. Ciclo de vida de CMV

El CMV infecta principalmente a células endoteliales y epiteliales, aunque también es capaz de infectar otros tipos celulares, como células del músculo liso, células mesenquimales, hepatocitos, granulocitos, macrófagos, neutrófilos, neuronas y células del estroma. En su fase de latencia se puede encontrar en los progenitores de la línea mieloide y las células CD34<sup>+</sup> (6).

La entrada del CMV en la célula hospedadora se produce tras el reconocimiento inicial de las glicoproteínas de la envuelta viral gM y gB y de los proteoglicanos heparán-sulfato (HSPGs) de la membrana plasmática (Fig. 2). A continuación, la unión del virus con la superficie celular se hace más estable al interaccionar la glicoproteína gB con uno o más receptores celulares, como hetero-dímeros de integrina específicos o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Durante la fase final de la entrada del virus, se produce la fusión de las envueltas celulares y virales, en las que juegan un papel fundamental las glicoproteínas víricas gB y gH/gL, tras la cual se liberan la nucleocápsida y las proteínas del tegumento en el citoplasma de la célula infectada (7).

**Figura 2.** Modelo de entrada del CMV en la célula hospedadora (Compton T., 2004)

Una vez en el citoplasma, la nucleocápsida es transportada al núcleo por un mecanismo aún desconocido, pero en el que están implicadas proteínas virales y los microtúbulos del citoesqueleto celular. El ADN viral es traslocado al núcleo, donde la proteína del virión pp71 activa la expresión de los genes IE1-p72 y IE2-p86. Ambos se encargan de reclutar ARN polimerasa II de la célula hospedadora con el fin de transcribir los genes E en lugares especiales del núcleo. Las proteínas de los genes E llevan a cabo tanto la síntesis del ADN viral (que comienza a las 24 horas de la infección y cuyo pico se produce a las 48 horas), como la expresión de los genes L. Los genes tardíos se encargan de la síntesis de las proteínas estructurales del virión que, tras su ensamblaje (empieza a las 48 horas y su máximo es a las 72-96 horas), permiten la salida de la célula para continuar la infección (Fig. 3).

**Figura 3.** Ciclo de vida del CMV en una célula humana (Crough T., 2009)

Cuando las proteínas IE son reprimidas el virus entra en fase de latencia, mientras que la expresión de los genes IE está asociada con su reactivación (8). La reactivación del virus desde el estado de latencia es un paso clave en la patogénesis de la infección. La reactivación se produce por diversos estímulos como la inmunosupresión, inflamación, infección o estrés (9). Se sabe que las citoquinas pro-inflamatorias  $TNF-\alpha$  y GM-CSF inducen la diferenciación de los monocitos a macrófagos o células dendríticas, dando lugar así a la transcripción de los genes IE del CMV latente (10). Debido a que las proteínas IE son las primeras que se expresan tras la reactivación, son la diana principal de los linfocitos T (11).

## 2. Infección causada por CMV

### 2.1. Epidemiología

La infección por CMV está ampliamente distribuida en la población mundial, presentando una gran variabilidad tanto geográfica como demográfica. En cuanto a la distribución geográfica, la seroprevalencia de CMV medida por los anticuerpos IgG

(que indica una infección pasada) se encuentra alrededor del 60% en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo y subdesarrollados este porcentaje llega a alcanzar el 100%. La infección puede ser adquirida por individuos de cualquier edad y desarrollo. En general, los datos geográficos están relacionados con el nivel socioeconómico, ya que las personas con menores posibilidades presentan mayores tasas de seroprevalencia de CMV (12). En España, la seroprevalencia se encuentra en torno al 62,8% variando levemente en función del sexo (58,4% en hombres y 66,7% en mujeres) y de la edad (43,7% en niños de 6 a 10 años y de 79,1% en adultos de 31 a 40 años) (13).

El citomegalovirus puede transmitirse por vía vertical u horizontal. La transmisión vertical, con una incidencia de hasta el 56%, es la que se produce entre la madre y el feto, pudiendo ocurrir como una infección intrauterina (infección congénita). La mayoría de los bebés infectados de manera congénita son asintomáticos, aproximadamente sólo 1 de cada 10 bebés con infección congénita presenta síntomas (14). La segunda ruta de transmisión vertical sería a través de la leche materna y secreciones vaginales. En la leche, la carga viral es menor que en las secreciones vaginales, donde pueden darse altas concentraciones del virus, aunque la transmisión a través de la leche materna se produce de forma continuada (15).

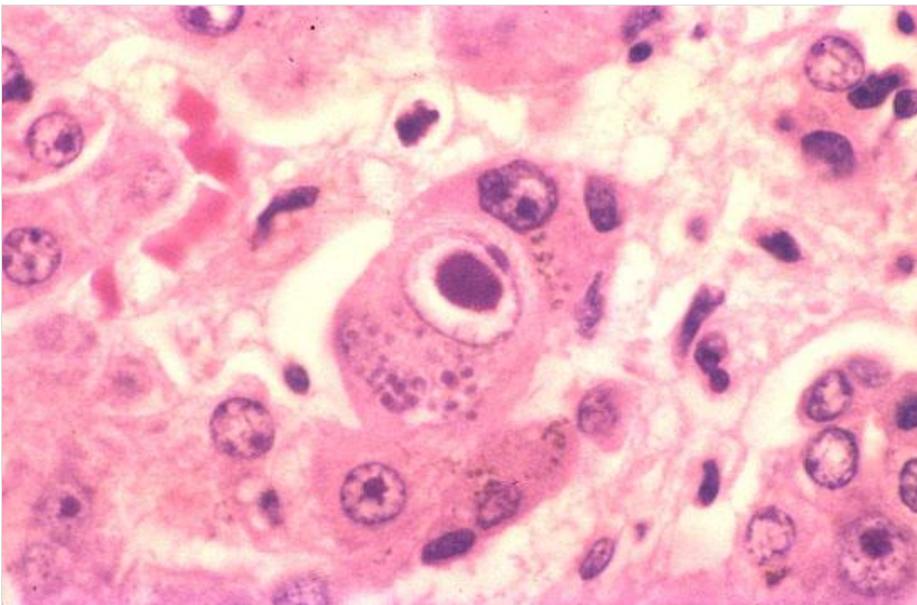
La transmisión horizontal se produce por varias vías. En primer lugar, a través de las secreciones respiratorias, más frecuente durante la infancia. En segundo lugar, por transmisión sexual. En tercer lugar, a través de transfusiones de hemoderivados, aunque actualmente, gracias al mantenimiento de los concentrados de hematíes a 4°C antes de la transfusión, la incidencia ha pasado de un 30-60% a principios de la década de los 90 (16), a un 1%. En el caso de que los productos sanguíneos sean desleucocitados por filtración, el riesgo de transmisión se reduce prácticamente a cero (17). Otra vía de transmisión horizontal, aunque resulta muy improbable, tiene lugar en el trasplante de progenitores hematopoyéticos (18). Sin embargo, la incidencia de transmisión horizontal es más importante en los receptores de trasplante de órgano sólido, en los que los donantes seropositivos para CMV transmiten frecuentemente el virus (aproximadamente un 78% de los casos) a los receptores seronegativos (19).

### **2.2. Patogénesis y patología del CMV**

La enfermedad por CMV se produce por la actividad lítica de los viriones, que provoca síntomas en el huésped, como inflamación y otras reacciones fisiopatológicas. La infección puede ocurrir *de novo*, denominada infección primaria, a través de la reactivación de una infección latente o como una re-infección. El virus inicialmente penetra por el epitelio del tracto digestivo, respiratorio o genito-urinario. Los leucocitos y las células epiteliales de los vasos sanguíneos favorecen la transmisión del CMV. Durante la fase aguda de la infección, se han encontrado antígenos virales en neutrófilos y monocitos, de ahí que la eliminación de los leucocitos sea determinante para evitar la transmisión sanguínea del CMV. Se ha comprobado que los macrófagos capaces de infiltrarse en los tejidos son también reservorios de replicación viral. Por otra parte, se ha descrito que el CMV codifica determinadas citoquinas que actúan como aglutinadoras de neutrófilos y monocitos, facilitando así su diseminación a través de estos tipos celulares (20).

La diseminación sanguínea del CMV es seguida de la infección de las células epiteliales. La infección por CMV se detecta por la estructura morfológica de ‘ojo de búho’ característica que adquieren las células infectadas (Fig. 4), formadas por inclusiones intranucleares (acumulación de nucleocápsidas en formación) que desplazan la cromatina (21).

**Figura 4.** Cuerpo de inclusión de CMV en célula hepática (adaptada de [www.telmeds.org](http://www.telmeds.org))



El citomegalovirus causa pocas complicaciones en el individuo inmunocompetente. Sin embargo, en el feto, en el neonato y en pacientes inmunocomprometidos, la infección por CMV puede llegar a causar síntomas clínicos severos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Síntomas clínicos de la infección por CMV según el tipo de pacientes.

<b>Tipo de paciente</b>	<b>Síntomas clínicos</b>
<b>Individuo sano</b>	Normalmente asintomático, menos frecuente síndrome mononucleósico con fiebre, mialgias, adenopatías, hepatomegalia
<b>Feto/Neonato con infección congénita</b>	Ictericia, hepatoesplenomegalia, petequias, microcefalia, hipotonía, convulsiones, letargo
<b>Receptores de trasplante de órgano sólido</b>	Síndrome febril con leucopenia, enfermedad invasiva de tejido en forma de neumonitis, enterocolitis, esofagitis, gastritis, hepatitis, retinitis, nefritis, cistitis, miocarditis o pancreatitis.
<b>Receptores de progenitores hematopoyéticos</b>	Síndrome viral, neumonitis, enterocolitis, esofagitis, gastritis, hepatitis, retinitis o encefalitis
<b>Pacientes infectados con VIH</b>	Retinitis, enterocolitis, esofagitis, gastritis

*VIH: Virus de la Inmunodeficiencia humana*

La infección primaria en el individuo inmunocompetente es normalmente asintomática y no suele causar enfermedad. En ciertos casos, puede resultar en un síndrome mononucleótico clínicamente indistinguible de una infección primaria del virus Epstein-Barr (VEB), con fiebre, mialgias, linfadenopatías y hepatomegalia (22). Otro grupo de pacientes que exhiben evidencias indirectas de la infección por CMV son aquellos individuos inmunocompetentes que requieren su ingreso repentino en la unidad de cuidados intensivos (UCI) por infarto de miocardio, shock séptico o quemaduras (23).

La infección congénita es el principal motivo de sordera en los neonatos y una causa importante de desarrollo de anomalías neurológicas (24). Otra serie de síntomas relacionados con esta población se encuentran resumidos en la tabla 1.

Citomegalovirus es una causa importante de morbilidad entre los individuos inmunocomprometidos tales como los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y los pacientes receptores de alotrasplantes. La manifestación más común de enfermedad por CMV en pacientes infectados con VIH es la retinitis, caracterizada por una necrosis hemorrágica de la retina (25). Antes de la introducción de la terapia antirretroviral de alta actividad o combinada (TARGA), hasta un 40% de los pacientes infectados con VIH desarrollaban retinitis por CMV (26). Desde entonces, la incidencia del CMV en esta población ha disminuido significativamente, ya que cada vez menos pacientes tienen un recuento de células T CD4<sup>+</sup> por debajo de las 100 células/ $\mu$ l, umbral relacionado con un mayor riesgo de sufrir enfermedad por CMV en individuos infectados con VIH (27).

Debido a la inmunodeficiencia provocada tras el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, este grupo de trasplantados tienen un riesgo de desarrollar una infección primaria por CMV de hasta un 30% en pacientes seronegativos. Sin embargo, la forma más frecuente de infección por CMV, con tasas de hasta un 80%, ocurre en pacientes seropositivos por reactivación del virus (28). Las manifestaciones clínicas más comunes de la enfermedad temprana por CMV (100 primeros días postrasplante) son neumonitis y enterocolitis (29). A pesar de que los nuevos tratamientos y estrategias han reducido la incidencia de enfermedad temprana, también han contribuido a un incremento en las tasas de hematotoxicidad y a un empeoramiento de la reconstitución de la respuesta inmune. Por tanto, están emergiendo como un nuevo problema las infecciones fúngicas invasoras y la enfermedad tardía por CMV (que ocurre después de los 100 primeros días postrasplante; 30, 31).

El grupo de receptores de trasplante de órgano sólido lo trataremos en el siguiente apartado.

Finalmente, se ha demostrado que la infección por CMV causa los cambios que llevan a los individuos de avanzada edad a tener un ‘fenotipo de alto riesgo inmune’, aunque aún no está clara su relación con la mayor mortalidad observada en esta población (32).

### **3. Infección por CMV en pacientes receptores de órgano sólido (TOS)**

En receptores de TOS, la infección o replicación por CMV es definida como la detección del virus, ya sean proteínas o ácidos nucleicos virales, en cualquier fluido corporal o muestra de tejido. La enfermedad por CMV se define como el desarrollo de síntomas o signos asociados a la aparición del virus, y puede categorizarse de dos formas, como síndrome viral o como enfermedad invasiva de tejido. El síndrome viral se define por la presencia de fiebre ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 2 días en un periodo de 4 días, asociada a leucopenia, trombocitopenia o elevación de transaminasas, junto con la detección de infección por CMV en sangre. La enfermedad de órgano se manifiesta por síntomas y signos en el órgano afectado, requiriendo para el diagnóstico definitivo la presencia de un cuadro clínico-analítico compatible junto con la presencia de cuerpos de inclusión o antígenos virales detectados mediante inmunohistoquímica en una biopsia (33). La forma de enfermedad de órgano más frecuente es la enfermedad digestiva, aunque puede afectar a otros órganos como en el caso de neumonía, hepatitis, encefalitis, retinitis, nefritis, cistitis, miocarditis y pancreatitis (Tabla 1).

Antes de la amplia difusión de la profilaxis entre los receptores de TOS, la enfermedad por CMV ocurría típicamente en los tres primeros meses después del trasplante. Sin embargo, la cronología de la enfermedad está cambiando, ya que en la mayoría de casos ésta se produce tras el fin de la profilaxis antiviral, es decir, después de los tres meses postrasplante, por lo que se habla de ‘enfermedad tardía por CMV’. La enfermedad tardía se ha asociado a un mayor riesgo de pérdida del injerto y a mayor mortalidad (34).

Los síntomas tanto del síndrome viral como de la enfermedad invasiva de tejido están relacionados con los efectos directos de la replicación del virus en la fase aguda de la infección. Sin embargo, CMV produce también una serie de efectos indirectos asociados a largos períodos de replicación viral de bajo nivel (35), como son la aparición de infecciones fúngicas (*Pneumocystis jiroveci*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp.) (36), incremento del riesgo de bacteriemias (37), así como la reactivación de otros herpesvirus como el *Herpes Simplex* o el *Epstein-Barr*, que puede causar a su vez el síndrome linfoproliferativo postrasplante (38). También se asocia con el rechazo agudo y crónico del injerto trasplantado (39), así como con la pérdida del injerto (40). Algunos de los efectos indirectos específicos para cada tipo de trasplante que se asocian con CMV serían la estenosis de arteria renal en los trasplantados renales (41), vasculopatía

de las arterias coronarias en trasplantados cardíacos (42), la obliteración bronquiolítica en los de pulmón (43) y el síndrome de desaparición de los conductos biliares en los trasplantados hepáticos (44). Además, también se ha asociado la infección por CMV con la aparición de diabetes mellitus después del trasplante (45). En cualquier caso, no existe consenso aún en si los efectos indirectos asociados con el CMV son causados por la replicación del virus o, por el contrario, la replicación de CMV es provocada por la acción de dichos efectos indirectos (33).

Muchos de estos efectos indirectos asociados con la infección por CMV parecen estar relacionados con la capacidad del virus de utilizar diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune, como por ejemplo la disminución de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MHC-I y MHC-II) (46), la disminución de la expresión de células presentadoras de antígenos (APCs) y la producción de un homólogo del MHC-I que interfiere en la presentación de antígenos de la célula infectada para bloquear así el reconocimiento y destrucción por parte de las células *natural killer* (NK) y células T citotóxicas (47). Otras consecuencias de la inmunosupresión ejercida por el CMV son la inhibición de la proliferación de linfocitos T, promoviendo su apoptosis a través de la expresión del receptor de muerte celular PD-1 (48) y reduciendo su capacidad de secretar interleuquina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (49). También es capaz de modular la respuesta humoral mediante la producción de un receptor viral homólogo al fragmento cristalizante o constante de los anticuerpos (Fc) (50), que permite evadir tanto a las inmunoglobulinas G (IgG) específicas frente al virus como al sistema del complemento (51). Citomegalovirus es también capaz de reducir la migración de macrófagos al área de infección del virus mediante la disrupción de su citoesqueleto y la expresión de diversos homólogos de citoquinas que reducen su quimioatracción (52). Todos estos efectos inmunosupresores, combinados con la inmunosupresión farmacológica típica de estos pacientes, parecen estar directamente relacionados con las mayores tasas de infecciones fúngicas, bacterianas y víricas observadas en los pacientes con replicación o enfermedad por CMV.

### **3.1. Factores de riesgo de la infección por CMV en receptores de TOS**

A pesar de los grandes avances en los tratamientos antivirales, la infección por CMV continúa teniendo un gran impacto en la morbilidad y supervivencia del injerto en

el paciente trasplantando de órgano sólido a través de una diversidad de efectos directos e indirectos. Más del 50% de los receptores de TOS muestran evidencias de infección por CMV, con una tasa de enfermedad sintomática que se sitúa entre un 10 y un 50%, dependiendo del seroestatus del receptor (R) y el donante (D) (53).

El riesgo de desarrollar enfermedad por CMV en los receptores de TOS depende de una serie de factores entre los que se encuentran el seroestatus del donante y receptor del trasplante, el tipo de órgano trasplantado y el estado global de inmunosupresión del paciente, entre otros.

### **3.1.1. Seroestatus**

El riesgo de desarrollar infección por CMV está relacionado con el seroestatus del donante y del receptor del trasplante. Los pacientes con mayor riesgo son los receptores seronegativos que reciben un injerto procedente de un donante seropositivo (D+/R-). El virus latente en el injerto puede reactivarse causando una infección primaria que en general es más grave debido a la ausencia de respuesta inmune específica contra el virus. Tienen un riesgo 20 veces mayor de desarrollar enfermedad por CMV que los receptores seropositivos (54), y la mayoría de casos de enfermedad tardía se produce también en este tipo de pacientes. Los pacientes de bajo riesgo de desarrollar enfermedad por CMV son los receptores seropositivos que reciben un órgano seronegativo (D-/R+) o seropositivo (D+/R+). En estos pacientes, la infección se puede producir por una reactivación del virus latente en el receptor o a través de una reinfección del virus latente en el donante. Ambas formas de infección suelen provocar una sintomatología menor que en el caso de los trasplantados de alto riesgo; sin embargo, a pesar de tener una supuesta respuesta inmune específica contra CMV, siguen existiendo datos de infección e incluso de enfermedad (55, 56, 57). Los receptores seronegativos que reciben un injerto seronegativo (D-/R-) son los que tienen menor riesgo de desarrollar infección por CMV (57), a menos que reciban transfusiones sanguíneas de receptores seropositivos (56) o exhiban una infección primaria.

### **3.1.2. Tipo de órgano**

Los trasplantados de pulmón, intestino y páncreas tienen un riesgo mayor de sufrir infección por CMV y que ésta sea más grave que los trasplantados de riñón, hígado y corazón. Los principales motivos podrían ser la mayor intensidad de la

inmunosupresión y la mayor cantidad de tejido linfoide que conllevan dichos trasplantes, por lo que la probabilidad de adquirir monocitos y otras células linfoideas infectadas por CMV latente o en replicación es mayor (58).

### **3.1.3. Tiempo postrasplante**

El período de riesgo máximo de infección por CMV se sitúa entre el primer y el sexto mes postrasplante, produciéndose el pico de incidencia entre el segundo y tercer mes. Sin embargo, ciertos factores pueden adelantar o atrasar dicha cronología, tales como el uso de inmunosupresores como las inmunoglobulinas antitímocíticas (ATG) o el uso de profilaxis universal, respectivamente (59).

### **3.1.4. Agentes inmunosupresores**

Los tratamientos inmunosupresores son imprescindibles para prevenir el rechazo del injerto y evitar las respuestas específicas humorales y celulares contra el mismo. Esto favorece la replicación incontrolada del CMV latente y el aumento del riesgo de enfermedad. En concreto, producen dichos efectos la metilprednisolona (60) y el micofenolato mofetilo (61) a dosis elevadas, y los agentes depletores de linfocitos como las globulinas antilinfocitarias (ALG), antitímocíticas (ATG) (62) y los anticuerpos monoclonales OKT3 (anti-CD3) (63) y alemtuzumab (anti-CD25) (64), especialmente tras su uso como tratamiento para el rechazo agudo. Otros inmunosupresores frecuentemente usados en la práctica clínica como la ciclosporina, tacrolimus y prednisolona, usados a las dosis convencionales, no suelen reactivar al CMV latente, aunque sí aumentan su virulencia cuando se encuentra en fase replicativa (33). Los anticuerpos monoclonales anti-CD25 basiliximab y daclizumab tampoco están relacionados con un aumento del riesgo de infección o enfermedad por CMV (65). Por otra parte, existen agentes inmunosupresores que se asocian con un riesgo menor de infección y enfermedad por CMV. Son los inhibidores de mTOR como el everolimus o sirolimus (66).

### **3.1.5. Otros factores**

El estado global o neto de inmunosupresión en el receptor de TOS está determinado por variables como la dosis, duración y tipo de agentes inmunosupresores, comorbilidades subyacentes, la edad o deficiencias en el sistema inmune del individuo (59).

Los agentes inmunosupresores han sido tratados en el anterior apartado. Respecto a las comorbilidades adyacentes, se ha comprobado un mayor riesgo de enfermedad por CMV con la reactivación y replicación de otros herpes virus como los herpes virus humanos tipos 6 y 7 (67). Si los eventos de rechazo son causa o consecuencia de la infección por CMV es una cuestión aún por resolver, aunque parece que el rechazo provoca un ambiente pro-inflamatorio que facilita la reactivación del virus (68). La edad del donante por encima de los 60 años, el trasplante de riñón cadáver o la edad avanzada de los receptores también han sido asociados con una mayor incidencia de infección por CMV (69). Por último, las alteraciones genéticas en el sistema inmune innato y adaptativo, como polimorfismos en ciertos receptores ‘Toll-like’ (70) y lectinas de unión a manosa (71), defectos de citoquinas como la interleucina 10 (IL-10) (72) y deficiencias en las células específicas T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> (73) y en la expresión de los genes implicados en la evasión del virus (74), se han relacionado también con una mayor incidencia de infección y enfermedad por CMV.

### **3.2. Diagnóstico de la infección por CMV**

Las pruebas de laboratorio disponibles para la exploración y diagnóstico de la infección por CMV son la histopatología, cultivo viral, serología, antigenemia de la proteína pp65 y las pruebas cuantitativas de ácido nucleicos virales.

#### **3.2.1. Histopatología**

Se trata de una técnica en la que se obtiene una muestra del tejido que se sospecha infectado mediante biopsia para su posterior análisis por histología. El diagnóstico se basa en la presencia de cuerpos de inclusión, típicas inclusiones basófilas intranucleares, aunque también se pueden ver inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas. Los estudios inmunohistoquímicos utilizan sondas de ADN complementario (ADNc) específicos contra CMV para la hibridación *in situ*.

Debido a la existencia de otras pruebas menos invasivas, la histopatología se usa para confirmar el diagnóstico de enfermedad de órgano (excepto para la retinitis y la enfermedad del sistema nervioso central), cuando existen sospechas de rechazo (ya que mientras que el rechazo requiere un aumento de la inmunosupresión, el tratamiento por CMV requiere un reducción del mismo) y cuando existen sospechas de co-infección por

otros patógenos (especialmente cuando los pacientes no responden al tratamiento anti-CMV). Las limitaciones más importantes de esta prueba son la imposibilidad de su práctica en ciertas situaciones clínicas y la discordancia existente entre los resultados histopatológicos y la determinación de la carga viral en muestras sanguíneas en algunos casos, sobre todo en la enfermedad gastrointestinal por CMV (58).

### **3.2.2. Cultivo de virus**

El cultivo viral en fibroblastos humanos se trata de una prueba muy específica en el diagnóstico de la infección por CMV. Sin embargo, su reducida sensibilidad y lentitud (puede llevar semanas hasta que el virus sea detectado) lo convierten en una técnica poco usada actualmente.

Su principal utilidad radica en el aislamiento del virus en tejidos donde las técnicas cuantitativas de ácido nucleicos no están optimizadas y en la detección fenotípica de resistencia a antivíricos, aunque actualmente los ensayos genotípicos son la prueba de referencia.

### **3.2.3. Serología**

Consiste en la detección de anticuerpos específicos frente a CMV (IgG e IgM). Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), inmunofluorescencia, fijación del complemento y aglutinación pasiva en látex son las más usadas para su detección.

La IgM específica de CMV se detecta en las primeras dos semanas después de la aparición de signos y síntomas y puede persistir hasta 4 ó 6 meses después. Indican, por tanto, infección reciente, reactivación de una infección primaria o un falso positivo. La IgG específica no suele ser detectables hasta 2 ó 3 semanas después de la aparición de signos y síntomas y persisten toda la vida. Por tanto, indican infección pasada en algún momento de la vida, no pudiéndose determinar cuándo.

Los estudios serológicos son de poca utilidad para el diagnóstico de la infección y enfermedad por CMV, limitándose su uso a la estratificación del riesgo de los pacientes TOS antes del trasplante, en función de la discordancia existente entre el receptor (R) y el donante (D) del injerto.

### **3.2.4. Antigenemia**

Las pruebas de antigenemia detectan el antígeno viral, la proteína pp65 de CMV, en los leucocitos de sangre periférica infectados mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se ha usado ampliamente por su rapidez y mayor sensibilidad que los cultivos celulares. Sin embargo, la ausencia de estandarización de la técnica, el largo procesado que requiere la muestra y su limitación en pacientes leucopénicos han provocado que sean reemplazadas por las técnicas cuantitativas de detección de ácidos nucleicos (75).

### **3.2.5. Pruebas cuantitativas de ácidos nucleicos**

Consisten en la detección del ADN o ARN viral mediante PCR cuantitativa en tiempo real, lo cual permite cuantificar la muestra en copias de genoma/ml de fluido. Se pueden practicar en muestras de orina, sangre completa y plasma. Además, gracias a su elevada especificidad y sensibilidad, se han convertido en la prueba diagnóstica de referencia en los receptores de TOS. Las mayores desventajas de estos métodos han estado asociadas a la gran variabilidad de soluciones y agentes comerciales usados, tipos de muestra utilizada, métodos de extracción del ácido nucleico, etc., lo que ha contribuido a diferencias significativas entre los resultados obtenidos en distintos laboratorios y la falta de aplicabilidad de resultados (76). Por dicho motivo, existen muy pocos umbrales de replicación viral normalizados recomendados para el inicio del tratamiento antiviral en pacientes con tratamiento anticipado. Para paliar esta falta de estandarización, la Organización Mundial de la Salud (OMS), comercializó en 2010 el primer estándar internacional para la normalización de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de CMV, transformando los resultados de copias/ml a Unidades Internacionales/ml (UI/ml).

### **3.3. Manejo clínico de la infección por CMV**

A finales de la década de los 80 y principios de los 90, CMV era la infección viral más frecuente en receptores de TOS, causando una elevada morbi-mortalidad. La significativa reducción de los niveles de infección, enfermedad y mortalidad por CMV se ha debido a los avances en su diagnóstico, prevención y tratamiento. Resultan fundamentales tanto el tratamiento agresivo como prevenir y diagnosticar la infección cuanto antes. Para conseguirlo, se siguen principalmente dos estrategias terapéuticas: la

profilaxis universal y el tratamiento anticipado. El denominador común en ambos casos es el uso de antivirales específicos frente al virus, los cuales han conseguido reducir de forma significativa los efectos directos e indirectos de la infección.

### **3.3.1. Antivirales específicos contra CMV**

El desarrollo de nuevos antivirales ha disminuido significativamente la incidencia de morbi-mortalidad por CMV, así como la incidencia de efectos indirectos.

Los principales fármacos empleados frente a la infección por CMV son el ganciclovir y su reformulación, valganciclovir. Como segunda y tercera línea de tratamiento, está recomendada la administración de foscarnet y cidofovir, respectivamente. Por último, otra serie de compuestos que están en fase experimental, entre los que se encuentran el maribavir, letermovir y brincidofovir como más prometedores (Tabla 2; 77).

**Tabla 2.** Principales fármacos específicos contra CMV.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Administración y usos</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>Disponibilidad</b>
<b>Ganciclovir</b>	Terminador de la cadena de ADN durante la replicación viral después de la fosforilación por pUL97	Vía intravenosa. Tratamiento de la infección	Hematoxicidad, posología incómoda	Disponible en clínica
<b>Valganciclovir</b>	Derivado estérico del ganciclovir	Vía oral. Tratamiento de la infección, profilaxis universal y tratamiento anticipado	Hematoxicidad, riesgo de resistencia.	Disponible en clínica
<b>Foscarnet</b>	Inhibición directa de la ADN polimerasa viral	Vía intravenosa. Tratamiento de la infección por CMV resistente	Elevada nefrotoxicidad	Disponible en clínica
<b>Cidofovir</b>	Inhibición directa de la ADN polimerasa viral	Vía intravenosa. Tratamiento de la infección por CMV resistente	Elevada nefrotoxicidad	Disponible en clínica
<b>Maribavir</b>	Inhibidor de la quinasa pUL97	Vía oral. Profilaxis, tratamiento de la infección	Poco efectivo	Ensayos clínicos en fase III
<b>Letermovir</b>	Efectos en la subunidad pUL56 de la terminasa viral	Vía oral. Profilaxis, tratamiento de la infección.	No se encuentran de momento	Ensayos clínicos en fase III
<b>Brincidofovir</b>	Derivado lipídico del cidofovir	Vía oral. Profilaxis, tratamiento de la infección.	Dolor abdominal, estomatitis aftosa	Ensayos clínicos en fase III

El ganciclovir es un análogo del nucleósido 2' desoxiguanosina. Inhibe la replicación del virus a través del siguiente mecanismo de acción: primero, ganciclovir es fosforilado por la proteína quinasa viral que codifica el gen UL97, convirtiéndose en ganciclovir-mono-fosfato. Continúa su fosforilación por quinasas celulares hasta transformarse en ganciclovir-tri-fosfato. Esta forma activa interactúa con la polimerasa del virus (codificada por el gen UL54) compitiendo por el nucleósido desoxi-guanosina-tri-fosfato (dGTP) y provocando así la terminación de la replicación del ADN viral (78). Se administra vía intravenosa y se suele indicar para el tratamiento de enfermedad por CMV, cuando las cargas virales alcanzadas en un proceso infeccioso son muy elevadas o en casos en los que la absorción gastrointestinal es deficiente (58). Su principal efecto secundario es la toxicidad hematológica (79). Esta toxicidad depende de la dosis administrada y se suele manifestar como episodios de neutropenia y trombocitopenia más o menos grave, llegando a necesitar en ocasiones la administración de factor estimulante de colonias y/o la reducción de los niveles de inmunosupresión. Otros efectos secundarios menos frecuentes son anemia, síntomas del sistema nervioso central, valores anormales de la función hepática, fiebre o erupciones cutáneas (80).

El valganciclovir es el éster del ganciclovir con el aminoácido L-valina. Una vez hidrolizado, su mecanismo de acción es igual que el del ganciclovir. Se administra por vía oral, consiguiendo niveles plasmáticos mucho más elevados que los del ganciclovir oral. En los últimos años, gracias a la seguridad y eficacia demostrada del valganciclovir (81), y a que disminuye la estancia hospitalaria y el riesgo de la terapia parenteral, se ha convertido en el fármaco de elección para el tratamiento de la infección por CMV, excepto en los casos enumerados para la indicación de ganciclovir intravenoso. Los efectos secundarios generados son los mismos que en el caso del ganciclovir, si bien se ha observado en algunos casos una incidencia más elevada de neutropenia, sobre todo en aquellos pacientes con tratamientos de larga duración (82).

El foscarnet es un análogo del pirofosfato inorgánico. Inhibe selectivamente la ADN polimerasa viral interaccionando con el sitio de unión de los pirofosfatos y bloquea el anclaje de dichos grupos procedentes de los nucleósidos tri-fosfato que se adicionan a la cadena de ADN en formación. Está considerado un tratamiento de segunda línea, usado cuando el ganciclovir no ha funcionado, ya sea por resistencia de

la estirpe viral o por neutropenia grave del paciente (78). El principal efecto secundario es su elevada toxicidad renal, de ahí su aplicación secundaria (83).

Cidofovir es un análogo del monofosfato de desoxicitidina (dCMP). Presenta un mecanismo de acción similar al del foscarnet, actuando como terminador de la replicación viral al unirse a la ADN polimerasa de CMV. Se administra por vía intravenosa, aunque presenta una baja biodisponibilidad. Debido a su elevada nefrotoxicidad está considerado un tratamiento de tercera línea, por detrás de ganciclovir y foscarnet (78).

La industria farmacéutica sigue investigando nuevos compuestos anti-CMV que reduzcan los efectos secundarios de los fármacos disponibles actualmente. Los que más avanzados se encuentran, en fase III de ensayo clínico o incluso habiéndose utilizado en casos aislados con éxito (84) son el maribavir, un inhibidor de la quinasa pUL97 de CMV (77), letermovir, con efectos en la subunidad pUL56 de la terminasa viral (85), y el brincidofovir, un derivado lipídico del cidofovir con menor nefrotoxicidad (86) (Tabla 2).

### **3.3.2. Resistencias a antivirales**

El origen de las resistencias a los tratamientos antivirales, se produce por la existencia de mutaciones en el ADN del virus. Las principales mutaciones descritas hasta el momento afectan a los genes UL97, que codifica la proteína quinasa, y UL54, que codifica la ADN polimerasa. En el caso de UL97, se han establecido siete mutaciones diferentes que se dan en la mayoría de casos de resistencia, las cuales provocan un aumento de hasta 15 veces la cantidad de ganciclovir y valganciclovir necesaria para ejercer su función antiviral (87). Las mutaciones del gen UL97 que afectan al maribavir, el otro fármaco que actúa sobre la quinasa, son diferentes que en el caso del ganciclovir (88). Respecto al gen UL54, existe un amplio abanico de mutaciones que se repiten en ciertos dominios funcionales y que confieren resistencia a prácticamente todos los antivirales inhibidores de una forma u otra de la replicación viral, como el ganciclovir, valganciclovir, foscarnet, cidofovir y su derivado el brincidofovir (88). El único antiviral no afectado por las mutaciones de los genes UL97 y UL54 es el letermovir, ya que se trata de un inhibidor del complejo de la terminasa del CMV. Sin embargo, existen estudios *in vitro* que muestran una fuerte resistencia de

mutaciones seleccionadas específicamente contra dicho fármaco, aunque sus efectos en la clínica están aún por encontrarse (89).

Existe sospecha de resistencia al tratamiento antiviral cuando los receptores de TOS con infección o enfermedad por CMV, después de varias semanas de tratamiento frente al mismo, siguen mostrando síntomas y/o la carga viral no disminuye o incluso aumenta.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de resistencia antiviral por CMV son la exposición prolongada al tratamiento en presencia de una infección activa, la ausencia de inmunidad previa al virus (grupo de alto riesgo, D+/R-), la inmunosupresión muy intensa y la inadecuada liberación del antiviral, ya sea por su administración a concentraciones subóptimas, por su absorción incorrecta o por la variación en su aclaramiento (87).

El diagnóstico de una cepa de CMV resistente al tratamiento antiviral puede realizarse por métodos fenotípicos o genotípicos. Los primeros están desaconsejados debido a sus desventajas (tiempo requerido, ausencia de cepas clínicas con mutaciones puras, variabilidad de resultados). Los genotípicos consisten en la detección de mutaciones a través de la amplificación y secuenciación *Sanger* de los genes que contienen las mutaciones más frecuentes. Esto implica que las bases de datos de los genes que contienen dichas mutaciones se encuentren en continua actualización (87).

Las consecuencias clínicas de la aparición de cepas resistentes al tratamiento antiviral oscilan entre la infección asintomática y las enfermedades invasivas de órgano muy graves o incluso mortales (90). Las guías de práctica clínica recomiendan instaurar tratamiento con ganciclovir intravenoso a altas dosis y reducir el nivel de inmunosupresión. En caso de un elevado nivel de resistencia se recomienda añadir o sustituir el antiviral por foscarnet y como tercera opción cidofovir. Sin embargo, debido a su elevada toxicidad y a la espera de la introducción de los nuevos fármacos en fase experimental, nuevas estrategias terapéuticas siguen surgiendo, como el uso de inhibidores del mTOR, del artesunato o de la leflunomida (91).

### **3.3.3. Estrategias de prevención**

Existen dos estrategias terapéuticas principales usadas para la prevención de la enfermedad por CMV: la profilaxis universal y el tratamiento anticipado. Ambas tienen

ventajas y desventajas (Tabla 3), y existen variaciones en su aplicación clínica entre los diferentes centros sanitarios. Sin embargo, las dos han demostrado ser eficaces para prevenir la infección y enfermedad por CMV (33, 91). En algunos centros se practica también una estrategia híbrida, en la que durante el período de mayor riesgo se utiliza profilaxis, y luego se sucede a tratamiento anticipado en la etapa de riesgo intermedio. Sin embargo, la eficacia de esta aproximación no se ha demostrado aún (92).

**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de la profilaxis universal y el tratamiento anticipado

<b>Parámetro</b>	<b>Profilaxis universal</b>	<b>Tratamiento anticipado</b>
<b>Prevención de la enfermedad por CMV</b>	Sí	Sí, aunque no previene la infección
<b>Prevención de la enfermedad tardía por CMV</b>	No, sobre todo en pacientes de alto riesgo (R-/D+)	Sí
<b>Prevención de infecciones oportunistas</b>	Podría prevenir	No existen suficientes datos
<b>Prevención del rechazo</b>	Podría prevenir	No existen suficientes datos
<b>Supervivencia del injerto</b>	Sí	Sí
<b>Resistencia a antivirales</b>	Poco común	Poco común
<b>Toxicidad farmacológica</b>	Mayor	Menor
<b>Dificultad de la implementación</b>	Relativamente fácil	Más dificultoso
<b>Coste</b>	Elevado en fármacos	Elevado en pruebas diagnósticas
<b>Desarrollo de inmunidad específica contra CMV</b>	No	Sí

### 3.3.3.1. Profilaxis universal

La profilaxis universal consiste en la administración temprana y continuada del tratamiento antiviral durante el período de mayor incidencia de enfermedad por CMV, que corresponde a los primeros 90-100 días postrasplante, y comenzando durante los 10 primeros días.

Es la estrategia recomendada en pacientes de alto riesgo para CMV (D+/R-), sobre todo en los receptores de órganos de mayor riesgo (pulmón, intestino y páncreas) y en caso de que no se pueda asegurar una monitorización virológica rigurosa (33).

La eficacia de la profilaxis universal sobre la reducción de la incidencia de enfermedad por CMV ha sido demostrada en numerosos estudios, además de poder estar implicada en la reducción de los efectos indirectos asociados a la infección, como infecciones oportunistas, rechazo y supervivencia del injerto (93).

El principal fármaco usado en la administración de la profilaxis universal es el valganciclovir, siendo menos comunes el ganciclovir oral y el valaciclovir (sólo en el caso de receptores renales).

Las mayores desventajas de esta estrategia son la emergencia de cepas de CMV resistentes y la toxicidad asociada a los antivirales y la alta incidencia de enfermedad tardía tras la interrupción del período de profilaxis, que ocurre hasta en un 12-30% de los pacientes y puede asociarse a un riesgo más elevado de mortalidad (94). Las soluciones propuestas para solucionar este problema han sido varias (58), entre las que se encuentran la extensión de la duración de la profilaxis hasta los 200 días después del trasplante (82) o incluso hasta completar el año postrasplante (95), la administración de la estrategia híbrida antes explicada (92) o el uso durante la profilaxis de inmunoglobulinas específicas contra CMV en trasplantados de alto riesgo de pulmón y corazón (96).

### **3.3.3.2. Tratamiento anticipado**

El tratamiento anticipado consiste en la administración del tratamiento antiviral cuando los pacientes presenten replicación viral por encima de un umbral durante un período de 2 a 3 semanas o hasta que la carga viral sea indetectable. Para ello es necesario realizar una monitorización periódica de la replicación viral con el objetivo de detectar infecciones asintomáticas e indicar el inicio de tratamiento antiviral. Es decir, una vez la replicación alcanza un determinado valor umbral, se iniciaría dicho tratamiento para evitar la progresión hacia una enfermedad sintomática. La técnica de monitorización más usada actualmente para el diagnóstico de la viremia es la PCR a tiempo real, seguida de la antigenemia pp65. Los intervalos para la monitorización son

variables, oscilando entre 1 y 3 semanas por prueba diagnóstica, y se realizan durante un tiempo definido también variable entre 3 y 12 meses (91).

Al igual que la profilaxis universal, el tratamiento anticipado ha demostrado ser efectivo reduciendo de forma similar el riesgo global de enfermedad por CMV (97). Además, se disminuyen los costes por el uso de antivirales, el riesgo de toxicidad por el tratamiento y el de aparición de enfermedad tardía.

Es la estrategia recomendada en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV (R+), principalmente en receptores de hígado, riñón y corazón (33, 91). Su uso entre los pacientes de alto riesgo (D+/R-) está en debate, ya que se sugiere que de esta manera se produce una exposición controlada con el virus que permitiría el desarrollo de una respuesta inmune celular específica frente al virus (98). En todo caso, la monitorización que se establecería para estos pacientes sería más estrecha, con umbrales de replicación mucho más bajos que en el caso de los pacientes de menor riesgo.

Como desventajas, el tratamiento anticipado parece no proteger de los efectos indirectos de la replicación del virus de manera tan efectiva como la profilaxis universal (99). Además, debido a la falta de homogeneidad en las técnicas diagnósticas no existe un valor umbral o punto de corte universalmente aceptado para el inicio del tratamiento anticipado, por lo que las guías clínicas recomiendan que cada centro desarrolle su propio protocolo de acuerdo a la técnica disponible en el laboratorio y al riesgo del paciente (33, 91). Recientemente, se ha definido y posteriormente validado una carga viral de 3983 UI/ml como el umbral óptimo en el que comenzar el tratamiento en receptores TOS de bajo riesgo de enfermedad por CMV (100).

Por tanto, siguen siendo necesarios más estudios que analicen otros factores de riesgo para el desarrollo de infección y enfermedad por CMV que influyan el establecimiento de un valor umbral óptimo para la aplicación del tratamiento anticipado.

#### **4. Respuesta inmune frente a CMV en pacientes TOS**

En las últimas décadas, se ha demostrado la importancia de la respuesta inmune en el control del desarrollo y gravedad de la infección y enfermedad por CMV (11,

101). El control inmunológico de este virus es un proceso complejo y no entendido por completo, en el que participan las respuestas inmunes innatas y adaptativas (22).

### 4.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata representa la primera barrera frente a CMV en el proceso infeccioso. Sin embargo, su importancia en el proceso de control del virus no se conoce aún completamente.

Como otros patógenos, CMV es diana de los receptores *Toll-like* (TLR). La estimulación de dichos receptores provoca la secreción de citoquinas que reclutan otras células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos, células *Natural Killer* (NK), así como componentes para la producción de la respuesta inflamatoria y para la activación de la respuesta adaptativa. De esta forma, se han asociado ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single-nucleotide polymorphisms*) con un mayor riesgo de sufrir enfermedad por CMV, como, por ejemplo, una SNP en los receptores *Toll-like* tipo 2 y 4, en las lectinas de unión a manosas o en la ficolina-2 se han relacionado con un incremento de la replicación y gravedad de la infección por CMV en los pacientes que la presentaban (70, 102, 71, 103).

Las células NK son esenciales como parte de la respuesta inmune innata y también por su colaboración en la respuesta inmune adaptativa. En las primeras fases de la infección, las células NK actúan especialmente frente al virus a través de mecanismos de citotoxicidad o la secreción de IFN $\gamma$  (104), de ahí que cuando estas células no actúan correctamente, el individuo se hace vulnerable sobre todo a infecciones virales, como es el caso del CMV. De esta manera, la expresión de un tipo de receptores de estas células del sistema inmune innato, los receptores tipo inmunoglobulinas activadores de células *killer* (KIR), se han relacionado inversamente con la replicación de CMV en pacientes TOS (105). Nuevas investigaciones *in vitro* tanto con CMV humano (106) como con CMV murino (107) siguen poniendo de manifiesto la importancia de las células NK en el control y transmisión del virus durante su proceso infeccioso.

## **4.2. Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa constituye la última línea de defensa frente a CMV, y se caracteriza por su especificidad, memoria, clonalidad y autorregulación. Tiene dos tipos de respuesta que se complementan e interactúan: la humoral, mediada por los linfocitos B, y la celular, mediada por los linfocitos T. El papel de ambas respuestas ha demostrado ser vital para el control de la replicación del virus en el organismo.

### **4.2.1. Inmunidad humoral**

La infección primaria por CMV induce una respuesta transitoria mediada por IgM específicos, detectables a partir de la semana 2 pos-infección. Al mismo tiempo, se genera la respuesta persistente mediada por IgG específicos, detectables a partir de la semana 2-4, y entre los que se encuentran los anticuerpos neutralizantes. La contribución de la respuesta humoral en la protección y control de la infección por CMV ha sido debatida. Sin embargo, existen estudios que han demostrado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra las glicoproteínas B, H, L y pUL128-131 del virus son fundamentales para restringir su diseminación y la gravedad de la enfermedad, especialmente tras la recurrencia de episodios de infección o re-infección (108, 109). En receptores de TOS de pulmón y corazón, la hipogammaglobulinemia ha resultado ser un factor de riesgo para el desarrollo de infección por CMV, aunque en receptores de riñón e hígado no se ha podido comprobar lo mismo (110, 111). En cualquier caso, como se explicó anteriormente, los estudios serológicos son de poca utilidad actualmente para el diagnóstico de la infección y enfermedad por CMV, limitándose su uso a la estratificación del riesgo de los pacientes TOS antes del trasplante.

### **4.2.2. Inmunidad celular**

En el caso de una infección primaria, la respuesta de las células se activa gracias a numerosos antígenos como pp65, pp50, IE1, glicoproteína B, IE-2, etc. Estos antígenos son procesados por las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas o los macrófagos, que activan a las células T CD4<sup>+</sup> mediante la secreción de IL-12, IL-18 e IL-23, las cuales secretan a su vez IL-2, IFN $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ). Las células T CD4<sup>+</sup> activan, entre otras, a la población de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV, secretoras principalmente de IFN $\gamma$  y encargadas de

la eliminación de las células infectadas. Son capaces de expandirse localmente en aquellos tejidos en los que se desarrolla una infección primaria por CMV (9).

La respuesta inmune específica frente a CMV mediada por células T representa el mecanismo de defensa más importante frente a la infección, gracias a la contribución de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> al control de la replicación del CMV y a la destrucción de las células infectadas por el virus (112). La presencia de células T específicas frente a CMV fue comprobada por primera vez en un estudio de trasplante de progenitores hematopoyéticos, en el que se observó que la mayoría de pacientes sin inmunidad celular específica desarrollaron enfermedad por CMV (113). Una prueba de que la respuesta inmune celular T específica es la más importante frente a CMV lo constituye el hecho de que hasta el 10% de todas las células T circulantes en individuos sanos son específicas contra el virus, llegando al 40% en personas mayores (114).

En los últimos años también se ha puesto de manifiesto el papel de otros subgrupos de células T, como las células T  $\gamma\delta$  y las células T reguladoras (Tregs). La deficiencia en la expansión de las células T  $\gamma\delta$  durante la infección por CMV parece estar relacionada con una mayor duración de la misma (9). De igual modo, niveles bajos de células Tregs se han relacionado con un mejor control de la infección (115).

#### **4.2.2.1. Papel de las células T CD8<sup>+</sup>**

Numerosos estudios en pacientes TOS han demostrado que la presencia de un número reducido de células T CD8<sup>+</sup> secretoras de citoquinas está relacionada con un mayor riesgo de replicación por CMV (11, 101, 116). En concreto, la falta de control inmunológico se ha correlacionado con la reducción de la producción de IFN $\gamma$  y no con el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (117, 118). Por tanto, las variaciones en la secreción de IFN $\gamma$  por las CD8<sup>+</sup> han sido sugeridas como el principal factor predictivo para cargas virales de CMV elevadas, demostrándose que en aquellos pacientes que no desarrollan infección por CMV existía una secreción continua y elevada de IFN $\gamma$  (118). Las respuestas más antigénicas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos se producen ante las proteínas de CMV pp65, IE-1, pp50, glicoproteína B y IE-2, aunque la mayoría de estudios se han centrado en las dos primeras (22).

#### **4.2.2.2. Papel de las células T CD4<sup>+</sup>**

Al igual que las células T CD8<sup>+</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> específicas de CMV son fundamentales en el proceso de control de la infección por CMV, siendo las responsables de mantener la inmunidad a largo plazo (119). Han sido los estudios de inmunoterapia adoptiva de células T específicas contra CMV las que han puesto de manifiesto que sólo con la presencia de las células T CD4<sup>+</sup> específicas se puede conservar las respuestas inmunes celulares frente al virus (120), siendo pieza clave para la estimulación y producción de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (121). Tradicionalmente, el papel de las CD4<sup>+</sup> durante la infección latente se ha asociado al mantenimiento de células CD8<sup>+</sup> específicas de memoria y a su expansión frente al virus (122). Sin embargo, también podrían estar implicadas en la destrucción directa de las células infectadas, a través de células T CD4<sup>+</sup> citotóxicas específicas frente a CMV (123).

### **5. Monitorización inmunológica de receptores de TOS**

A pesar del gran avance en diagnósticos, tratamientos y estrategias de prevención contra la infección por CMV, los algoritmos de predicción y lucha contra el mismo no son óptimos. La enfermedad activa por CMV no siempre se correlaciona con la detección de carga viral, mientras que en otros casos los receptores de TOS muestran altas cargas virales sin desarrollar síntomas de enfermedad, siendo tratados innecesariamente con antivirales con las consecuencias que ello conlleva. Esta casuística es especialmente acusada en los pacientes de bajo riesgo (R+), por este motivo se hace relevante conocer otros marcadores asociados a su control. Las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas contra CMV son componentes esenciales de la respuesta inmune contra el virus, por lo que su monitorización pre y postrasplante podría predecir con más eficacia aquellos individuos con un riesgo mayor de desarrollar enfermedad e infección por CMV, sirviendo de referencia para guiar las terapias profilácticas y de tratamiento anticipado. Además, con esta aproximación se podría solucionar otro de los problemas emergentes en la actualidad, esto es, la aparición de enfermedad tardía tras la interrupción de la profilaxis universal, sobre todo en pacientes de alto riesgo (D+/R-), así como la aparición de los efectos secundarios comentados anteriormente como consecuencia de la administración continuada de los antivirales frente a CMV, ya que se piensa que la profilaxis limita la exposición del virus al sistema inmune del individuo, resultando en una respuesta inmune deficiente. Por el contrario, el tratamiento

anticipado permitiría un nivel mínimo de replicación del virus suficiente para permitir el desarrollo de la respuesta inmune celular específica. Este efecto terapéutico de la adquisición de inmunidad celular específica frente a CMV se demostró en receptores de TOS de alto riesgo de enfermedad (D+/R-) (124).

Actualmente, existen dos tipos de aproximaciones para la monitorización inmunológica de los receptores de TOS que se diferencian según la diana sea específica o no frente a CMV (125).

### **5.1. Métodos de monitorización inmune no específicas frente a CMV**

Dentro de esta categoría entrarían aquellas estrategias que evalúan una rama de la respuesta inmune, como el nivel de inmunoglobulinas (inmunidad humoral) o el nivel de factores del complemento (inmunidad innata) en el suero del paciente, ante un evento de infección general, que no tiene por qué estar relacionado con un evento de replicación por CMV. Los principales métodos utilizados actualmente son simplemente cuantitativos (nivel de inmunoglobulinas en suero, nivel de factores del complemento - C3, C4 o MBL- en suero, nivel de subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica) o también pueden ofrecer información funcional acerca del número de células T funcionales (es el caso de las técnicas del CD30<sup>+</sup> soluble o la liberación de adenosín trifosfato (ATP) en células T CD4<sup>+</sup>, comercializado como ImmuKnow; Cylex Inc., Columbia, MD, USA) (125).

### **5.2. Métodos de monitorización inmune específicas frente a CMV**

Los métodos de monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV ofrecen un nuevo panorama de cara a la individualización de las estrategias de prevención de la enfermedad e infección frente al virus, siendo incluso recomendado su uso en las guías de práctica clínica (33, 91). Como se ha comentado antes, aunque las respuestas innatas y humorales tienen una gran importancia en el control de la replicación de CMV y su gravedad, es la respuesta inmune celular la que parece esencial para el control definitivo de la infección. Por este motivo, los principales métodos para la monitorización de la respuesta inmune se han centrado en la

cuantificación y análisis *ex vivo* de las células T CMV-específicas. En la tabla 4 se pueden comparar las principales pruebas que se utilizan actualmente.

**Tabla 4.** Principales métodos para la monitorización de la respuesta inmune de células T específica frente a CMV

<b>Características</b>	<b>Multímeros HLA</b>	<b>ELISpot</b>	<b>QuantiFERON</b>	<b>Tinción intracelular de citoquinas (ICS)</b>
<b>Análisis funcional</b>	No (sólo si se combina con ICS)	Sí	Sí	Sí
<b>Caracterización fenotípica</b>	Sí	No	No	Sí
<b>Diferenciación entre CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup></b>	Sí	No	No (sólo detecta CD8 <sup>+</sup> )	Sí
<b>Conocimiento previo de HLA Antígeno</b>	Sí	No	No	No
	Péptidos individuales (pp65, IE-1, pp50)	Péptidos individuales/ Librería de péptidos/ Lisado viral/Células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Combinación de 22 péptidos	Péptidos individuales/ Librería de péptidos/Lisado viral/Células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814
<b>Duración</b>	1 – 2 h	24 – 48 h	24 – 48 h	8 – 10 h
<b>Tipo y volumen de muestra</b>	PBMCs (0,5 ml-1ml)	PBMCs (10ml)	Sangre entera (3-5ml)	PBMCs o sangre entera (1-2ml)
<b>Requerimiento de citómetro</b>	Sí	No	No	Sí
<b>Estandarización</b>	No	Sí	Sí	No
<b>Dificultad</b>	Cierta laboriosidad	Fácil manejo	Fácil manejo	Cierta laboriosidad

*PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (“peripheral blood mononuclear cells”)*

La mayoría de ensayos se basan en la detección de IFN $\gamma$  después de la estimulación con antígenos específicos del virus o lisados virales, aunque es común el uso de otras citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-2. En términos de utilidad clínica, el método ideal debería evaluar tanto de forma cuantitativa como funcional las respuestas de células CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Además, debería ser sencillo, rápido, relativamente barato y reproducible (119).

Los métodos que emplean multímeros HLA ó MHC-péptido se basan en la conjugación de tetrámeros o pentámeros de péptidos específicos de las células T usando moléculas MHC de clase I unidas a un fluorocromo o a moléculas de biotina o avidina (126). Mediante citometría de flujo es capaz de identificar el número de células T que reconocen un determinado epítipo viral, siendo un ensayo rápido y que requiere poco volumen de sangre. Sin embargo, no informa de la funcionalidad de los linfocitos reconocidos, además de requerir el conocimiento previo del HLA del paciente.

Los ensayos basados en ELISA, el ELISpot y el QuantiFERON<sup>®</sup> (Cellestis Ltd), evalúan la detección de citoquinas producidas por las células T tras la estimulación antigénica. En el caso del ELISpot, no discrimina la respuesta de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, sólo es capaz de evaluar un único marcador funcional (IFN $\gamma$  o TNF- $\alpha$  usualmente), y requiere un volumen relativamente alto de sangre. El QuantiFERON<sup>®</sup>, por el contrario, requiere poco volumen de sangre y presenta un relativamente amplio espectro de especificidades de HLA, aunque sólo evalúa las respuestas de IFN $\gamma$  producidas por las células CD8<sup>+</sup>, además de mostrar una escasa sensibilidad en el caso de pacientes linfopénicos.

La tinción de citoquinas intracelulares y análisis por citometría de flujo se basa en la expresión de moléculas de superficie de las células T y detección de las citoquinas secretadas tras la estimulación antigénica. Se trata de un método que no demanda el conocimiento del HLA del paciente, requiere poco volumen de sangre, además de ofrecer un análisis funcional y cuantitativo de la respuesta inmune celular específica. Sus mayores inconvenientes son su elevado coste y la falta de estandarización de la técnica entre laboratorios (9, 119, 125, 127).

Debido al estado neto de inmunosupresión del paciente después del trasplante, que, como se vio en el apartado 3.1, está determinado por variables como la dosis, duración y tipo de agentes inmunosupresores, comorbilidades subyacentes, la edad o

deficiencias en el sistema inmune del individuo, así como a las complicaciones que puedan surgir durante el tiempo postrasplante, la monitorización de la respuesta inmune específica de células T puede ofrecer resultados variables y que no se ajustan a la realidad fisiológica del paciente en ese momento. Por esta razón, en los últimos años se está proponiendo que la monitorización pretrasplante de la respuesta inmune podría predecir futuros eventos de replicación por CMV, sobre todo en los individuos seropositivos (R+), en los que a pesar de presentar anticuerpos IgG frente al virus, existe un porcentaje variable de pacientes en los que la respuesta inmune celular por células T estaría ausente o disminuida (128, 129).



## **II. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

Citomegalovirus es un virus que generalmente causa infecciones asintomáticas en los individuos sanos, si bien en pacientes inmunocomprometidos puede desencadenar importantes problemas de salud. Las mejoras experimentadas en diagnósticos, tratamientos y estrategias de prevención han permitido una reducción drástica en las tasas de enfermedad, a pesar de lo cual la infección por CMV sigue siendo una de las principales causas de morbilidad en los receptores de TOS.

Aunque los pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar infección y enfermedad por CMV son receptores seronegativos que reciben un órgano de un donante seropositivo (D+/R-), existe un número importante de receptores seropositivos (R+) considerados de bajo riesgo que siguen desarrollando episodios de infección y enfermedad por CMV después del trasplante. En estos pacientes, la enfermedad activa por CMV no siempre se correlaciona con la detección de carga viral, mientras que en otros casos muestran altas cargas virales sin desarrollar síntomas de enfermedad, siendo tratados innecesariamente con antivirales con los efectos adversos que su uso conlleva. Además, el porcentaje de receptores seropositivos representan la mayoría de pacientes trasplantados, por lo que en números globales suponen un porcentaje igual o mayor respecto a las tasas de enfermedad por CMV.

La recomendación terapéutica en los receptores seropositivos de riñón, hígado y corazón (órganos considerados de bajo riesgo) es la terapia anticipada. Dicha estrategia requiere la monitorización virológica de cada paciente. El método más utilizado en la actualidad se trata de la PCR a tiempo real. Debido a la falta de estandarización, cada centro debe establecer y validar su propio protocolo. En nuestro grupo, se ha definido y posteriormente validado una carga viral de 3983 UI/ml como el umbral óptimo en el que comenzar el tratamiento en receptores TOS de bajo riesgo de enfermedad por CMV.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la replicación viral estaría relacionada con la respuesta inmune específica, en concreto con la producción de IFN $\gamma$  y otras citoquinas por las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas contra CMV, pudiendo predecir ésta a aquellos individuos con mayor riesgo de enfermedad. En esta línea, nuestro grupo ha estudiado durante los últimos 6 años en pacientes de alto riesgo la relación entre la replicación del CMV y la reconstitución inmune específica de CMV y la posible influencia de ésta en la progresión clínica, manifestada como enfermedad tardía. En un estudio piloto, se estudiaron un grupo de pacientes de alto riesgo que

recibió tratamiento anticipado cuando la carga viral era superior a 1000 copias/ml en plasma. Los resultados mostraron que todos los pacientes desarrollaron *de novo* una respuesta específica de células T frente a CMV temprana tras el trasplante, con una mediana de 12 semanas, después de uno o dos episodios de replicación por CMV. Una vez adquirida la respuesta inmune específica frente a CMV, ésta tuvo un efecto terapéutico frente a la infección por CMV, ya que los pacientes controlaron los posteriores episodios de replicación por CMV sin necesidad de tratamiento antiviral, no desarrollando en ningún caso enfermedad por CMV. En conjunto, estos resultados corroboran la importancia del desarrollo de una respuesta de células T específicas frente a CMV después del trasplante y se describe el efecto terapéutico de la adquisición de la respuesta inmune específica frente a CMV por encima de un umbral.

Aunque se observa una asociación entre el desarrollo de la respuesta inmune específica frente a CMV y la protección frente a la enfermedad, no existe un consenso sobre si podría usarse la monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV durante el seguimiento clínico postrasplante, y se desconoce si estos hallazgos son aplicables a la población trasplantada de bajo riesgo. Asimismo, hay pocos datos disponibles que muestren la influencia de la inmunidad celular en este grupo de enfermos. Avances en estos aspectos permitirían identificar la capacidad de los pacientes para controlar la viremia por CMV, pudiendo establecer puntos de corte concretos según la situación inmune específica del paciente en relación con el riesgo de desarrollo de infección o de necesidad de tratamiento. Esto podría evitar la enfermedad de órgano en pacientes con viremias bajas. El tratamiento anticipado guiado por la carga viral medida por RT-PCR CMV y la respuesta inmune específica podría ser la mejor opción de cara a la individualización del tratamiento propuesta por el Consenso Internacional de Manejo de la Infección por Citomegalovirus en el Trasplante de Órgano Sólido.



### **III. HIPÓTESIS**

A pesar de que todos los receptores de órgano sólido de bajo riesgo de desarrollar enfermedad por CMV tienen anticuerpos detectables frente a CMV en suero, la respuesta inmune celular específica varía entre pacientes y se modifica a lo largo del tiempo tras el trasplante. El grado de respuesta inmune específica frente a CMV se relaciona con el control espontáneo de la viremia en receptores de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por CMV, pudiendo establecer puntos de corte de carga viral para iniciar el tratamiento en función de la situación inmune específica del paciente

El tratamiento anticipado guiado por la carga viral y la respuesta inmune específica podría ser la mejor opción de cara a la individualización del tratamiento propuesta por los consensos internacionales en el manejo y tratamiento del CMV en trasplantados de órgano sólido.



## **IV. OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis doctoral es comprobar si la respuesta inmune celular específica frente a CMV constituye un buen predictor del control espontáneo de la infección por CMV y puede utilizarse para la toma de decisiones para la indicación de tratamiento anticipado en el receptor de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por CMV.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Conocer la incidencia de infección y enfermedad por CMV en los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV de la cohorte estudiada.
2. Conocer la cronología de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV de la cohorte estudiada.
3. Conocer la relación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV con la infección por CMV en los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV. Y dentro del mismo:
  - 3.1. Definir si existe un umbral de respuesta inmune con efecto terapéutico a partir del cual el paciente puede controlar espontáneamente la viremia por CMV.
  - 3.2. Valorar la respuesta inmune específica como factor de riesgo de enfermedad por CMV.
  - 3.3. Definir un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en función de la respuesta inmune celular específica en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Definiciones

El receptor de bajo riesgo de enfermedad por CMV se define como el paciente que recibe un trasplante de órgano sólido con serología pretrasplante positiva frente a CMV y que no ha recibido inducción o tratamiento con timoglobulina.

Se definieron la infección y enfermedad por CMV siguiendo las recomendaciones GESITRA-SEIMC/REIPI para el manejo de la infección por CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido, basadas en las definiciones publicadas por Ljungman *et al.* y “*The International Consensus Guidelines*” (130, 91).

- Infección o replicación por CMV: detección del virus, ya sea a través de la detección de la proteína viral pp65 (antigenemia), ADN (DNAemia) o ARNm (RNAemia) en cualquier fluido o tejido corporal.

- Infección primaria por CMV: detección de CMV que se produce en un individuo que no ha desarrollado una infección previa y por tanto tenía serología negativa antes de la infección.

- Enfermedad por CMV: se considera que existe enfermedad por CMV cuando el paciente infectado presenta síntomas o signos de infección. Los síntomas pueden presentarse como síndrome viral o enfermedad de órgano. El síndrome viral se define por la presencia de fiebre ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 2 días en un periodo de 4 días, asociada a leucopenia, trombocitopenia o elevación de transaminasas, y por la detección de infección por CMV en sangre. La enfermedad de órgano se manifiesta por síntomas y signos en el órgano afectado, requiriendo para el diagnóstico definitivo la presencia de un cuadro clínico-analítico compatible y la presencia de lesiones histológicas en una biopsia y cultivo positivo para CMV. Las formas de enfermedad más recurrentes son la neumonía, enfermedad digestiva, hepatitis, encefalitis, retinitis, nefritis, cistitis, miocarditis y pancreatitis.

- Enfermedad tardía por CMV: la enfermedad por CMV que sucede después de los primeros 90-100 días postrasplante, que constituye el período de mayor riesgo de infección.

- Profilaxis universal: consiste en la administración de tratamiento antiviral durante el período de mayor riesgo de infección (primeros 90-100 días postrasplante) con dosis

profilácticas de 900 mg / 24 h, para prevenir la aparición de infección por CMV y/o la enfermedad por CMV.

· Tratamiento anticipado: consiste en la administración de tratamiento antiviral a dosis terapéuticas (900 mg / 12 h) cuando se detecta, durante la monitorización periódica del paciente, la infección por CMV por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente y en ausencia de síntomas clínicos.

## **2. Diseño del estudio e inclusión de pacientes**

Se diseñó un estudio prospectivo de una cohorte consecutiva de pacientes trasplantados de órgano sólido (hepático, renal y cardíaco) de bajo riesgo de enfermedad por CMV. El estudio se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, comenzando la inclusión de pacientes en enero de 2012 y finalizando en mayo de 2013. Se incluyeron pacientes mayores de 16 años, con serología pretrasplante positiva para CMV y que tuvieran una supervivencia superior a 14 días postrasplante. Se excluyeron los pacientes que no proporcionaron su consentimiento por escrito para participar en el estudio y aquellos que recibieron tratamiento de inducción con timoglobulina.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

## **3. Monitorización y seguimiento de los pacientes**

Los pacientes siguieron una monitorización inmunoviológica y clínica.

Para el seguimiento inmunoviológico, en cada visita se recogieron dos muestras de sangre: un tubo EDTA, para la determinación de la carga viral de CMV, y un tubo de heparina de litio, usado para la determinación de la respuesta inmune de células T específica frente a CMV. La monitorización se realizó cada dos semanas durante los 100 primeros días postrasplante, y una vez al mes hasta completar un año de seguimiento. Además, desde noviembre de 2012 se recogieron muestras pretrasplante, que se extraían inmediatamente antes de la cirugía, con las que se determinaba el estado de la respuesta inmune celular específica de células T frente a CMV de los pacientes

justo antes del trasplante. El seguimiento inmunoviroológico de los pacientes se desarrolló hasta completar, al menos, un año desde la fecha de la inclusión.

Además, se realizó un seguimiento clínico de los pacientes donde se recogieron las siguientes variables: variables relacionadas con las características demográficas de los pacientes incluidos, factores descriptivos tales como tipo y etiología del trasplante, factores de riesgo, tipo de inmunosupresión basal, cambios en los regímenes de inmunosupresión a lo largo del seguimiento, episodios de rechazo y serología del donante para CMV. También se recogieron datos relacionados con la infección por CMV postrasplante tales como la duración de la viremia, la administración de tratamiento con ganciclovir y/o valganciclovir, el diagnóstico de enfermedad por CMV y su evolución. Y por último, también fueron anotadas variables pronósticas tales como la supervivencia del injerto y supervivencia del paciente.

#### **4. Determinación de la serología frente a CMV**

La serología frente a CMV previa al trasplante del donante y del receptor de trasplante de órgano sólido se realizó en el Servicio de Microbiología del hospital mediante la detección de las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) por inmunoquimioluminiscencia utilizando el ensayo *Elecsys 2010 (Roche)*.

#### **5. Determinación de la carga viral de CMV**

La determinación de la carga viral de CMV se realizó en plasma usando los métodos *Quant CMV LightCycler® 2.0 PCR Kit (Roche Diagnostics)* entre enero y abril de 2012, con un límite de detección de 180 UI/ml, y *COBAS Ampliprep/COBAS Taqman CMV test (Roche Diagnostics)* entre abril de 2012 y mayo de 2014, con un límite de detección de 137 UI/ml, en el Servicio de Microbiología del hospital. Los resultados fueron expresados en unidades internacionales por mililitro (UI/ml). Se determinó la carga viral de CMV, además de en las visitas de monitorización programadas, cuando hubo sospecha clínica de replicación viral.

Se consideró episodio de replicación a partir de la detección de una carga viral mayor al límite de detección lineal de la técnica, hasta la obtención de una carga viral menor o igual al límite de detección en dos determinaciones consecutivas.

Se indicó tratamiento siempre que la infección por CMV fuera sintomática, y cuando se alcanzaban cargas virales por encima del punto de corte de 3983 UI/ml determinado con anterioridad por nuestro grupo (100) y, en general, a juicio del clínico que atendía al paciente.

## **6. Determinación de la inmunidad celular específica frente a CMV**

La determinación de la inmunidad de células T específica frente a CMV se llevó a cabo *in vitro* en células de sangre periférica por tinción extracelular de receptores de membrana y por tinción intracelular de citoquinas en respuesta a un estímulo antigénico, para medir simultáneamente el fenotipo, función, historia replicativa y el número de células T antígeno-específicas mediante citometría de flujo en citómetro *LSRFortessa* (*Beckton Dickinson*). El análisis de los resultados de citometría se llevó a cabo mediante el software de análisis *BD FACSDiva v6.2*.

El procedimiento de determinación de la inmunidad de células T frente a CMV se llevó a cabo en distintos pasos que se describen a continuación:

### **· Estimulación de las células de memoria de sangre periférica:**

Se partió de una muestra de sangre periférica extraída en heparina de litio que fue estimulada con 1 µg/ml de la mezcla de péptidos *PepMix HCMV pp65* y *PepMix HCMV IE-1* (*JPT Peptides Technologies GmbH, Berlin, Germany*). Como control negativo se incluyó un tubo de sangre sin estimular, y como control positivo un tubo de sangre estimulada con 1,5 µg/ml ionomicina de *Streptomyces globatus* y 25 ng/ml *PMA (4-alpha-phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)*. Todas las muestras fueron coestimuladas con 1 µg/ml de *CD28<sup>+</sup>/CD49d<sup>+</sup>* (*Beckton Dickinson, San Jose, CA*) y, para evitar la secreción de las citoquinas al entorno extracelular, se añadió 10 µg/ml de brefeldina A (*Beckton Dickinson*). A continuación, las muestras fueron incubadas 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual, se añadió 5 ml de la solución lisante *FACS Lysis* (*Beckton Dickinson*), para lisar los eritrocitos, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos fueron

centrifugados a 500g durante 5 minutos a 4°C y el pellet celular se lavó añadiendo 7 ml de solución salina 1x (*Phosphate Buffered Saline pH 7.2, Gibco Thermo Fisher Scientific*).

· Tinción extra e intracelular:

Para el marcaje de los receptores de membrana se añadieron a cada tubo los siguientes anticuerpos monoclonales: 0,04 µg/µl *PE anti-human CD69<sup>+</sup>*, 0,1 µg/µl *PerCP/Cy5.5 anti-human CD4<sup>+</sup>*, 0,1 µg/µl *APC/Cy7 anti-human CD8<sup>+</sup>*, 0,5 µg/µl *Alexa Fluor® 700 anti-human CD3<sup>+</sup>* (*Biolegend*) y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para fijar las células se añadió a cada tubo 50 µl de *IntraPrep reagent 1* (*Beckman Coulter, Fullerton, CA*) y se incubaron durante 15 minutos, tras lo cual se lavaron con PBS 1x. A continuación, se llevó a cabo la permeabilización celular añadiendo 50 µl de *IntraPrep reagent 2* e incubando 1 minuto. Seguidamente, se llevó a cabo el marcaje intracelular de citoquinas, añadiendo los siguientes anticuerpos monoclonales: 0,025 µg/µl *APC anti-human IL-2* y 0,05 µg/µl *FITC anti-human IFN $\gamma$*  (*Biolegend*). Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se procedió a lavar el exceso de anticuerpos con PBS 1x y se resuspendió el pellet en 250 µl de PBS 1x.

· Cuantificación del marcaje por citometría de flujo:

Las muestras se analizaron entonces en el citómetro, bien mediante el sistema manual, o de forma automática en placas de 96 pocillos gracias al adaptador *HTS (High Throughput Sampler)*. Para ello, se cuantificaron entre treinta y cuarenta mil eventos de células marcadas con *anti-human CD3<sup>+</sup>* (antígeno específico para linfocitos T) del total de linfocitos, de las cuales se separaron las poblaciones *CD4<sup>+</sup>* y *CD8<sup>+</sup>*, marcadas con sus respectivos anticuerpos. Los resultados fueron normalizados respecto al control negativo.

Se consideró como muestra positiva aquellas con un porcentaje de células *CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>* productoras de *IFN $\gamma$*   $\geq 0,25$ . Este punto de corte fue establecido en base a estudios previos (124, 131 - 134) en los que los pacientes que alcanzaban dicho dintel, mantenían ese porcentaje de células *CD8<sup>+</sup>* CMV específicas productoras de *IFN $\gamma$*   $\geq 0,25$ .

## **7. Análisis estadístico**

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables descritas previamente. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes de pacientes. Las variables continuas se expresaron como medias y desviaciones típicas (DE), o como medianas y rangos intercuartílicos (RIQ) en caso de que la muestra no cumpliera criterios de normalidad. Las variables categóricas se analizaron mediante el test de chi-cuadrado o el test de Fisher, cuando la frecuencia esperada era menor de 5. Para las variables continuas se utilizó la T de Student o el test U de Mann-Whitney en caso de que la muestra no cumpliera criterios de normalidad. La asociación entre variables se expresó como riesgo relativos (RR) ó odds ratios (OR)  $\pm$  intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para valores de p menores a 0,05 de dos colas. El análisis multivariante se realizó mediante regresión logística para determinar factores confusores del desarrollo de viremias con cargas virales superiores a 2000 UI/ml o de la indicación de tratamiento anticipado. Para la correlación entre variables se utilizó el test no paramétrico de la rho de Spearman. Para la determinación del punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en pacientes sin inmunidad se utilizaron curvas ROC.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico *SPSS v15.0* (SPSS, Chicago, IL). La sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo se obtuvieron con el paquete estadístico *G-Stat v2.0*. Para las gráficas de las curvas de supervivencia y la evolución de la respuesta inmune se usó el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad, La Jolla, CA).



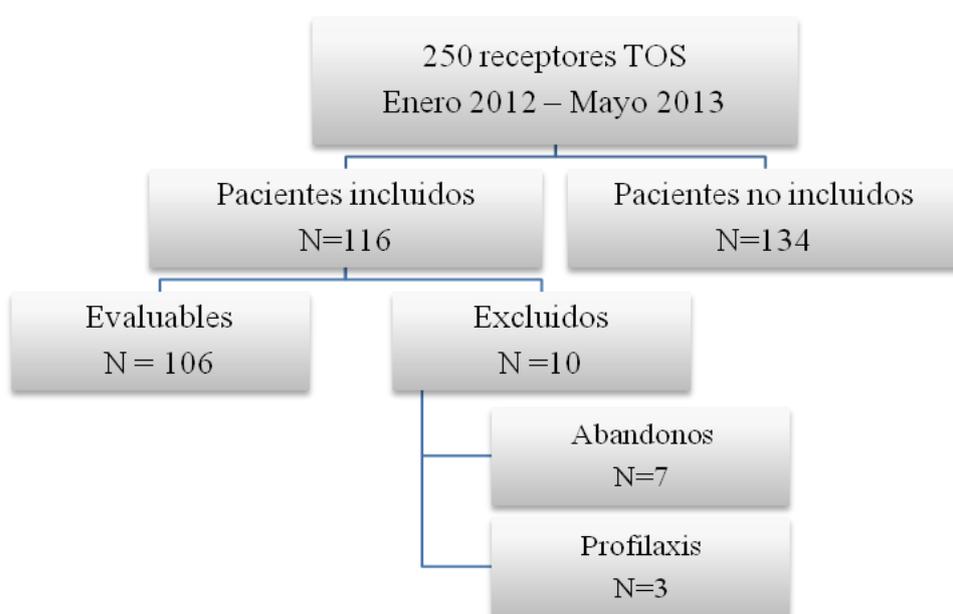
## **VI. RESULTADOS**

## 1. Características generales de la muestra incluida en el estudio

### 1.1. Inclusión de pacientes

Entre los 250 pacientes que se trasplantaron de órgano sólido durante el período de inclusión, un total de 116 fueron finalmente incluidos siguiendo los criterios citados anteriormente en materiales y métodos (Fig. 5).

**Figura 5.** Diagrama de la inclusión de los pacientes trasplantados de órgano sólido.



De los 134 pacientes no incluidos, 28 (20,9%) no lo hicieron por tratarse de pacientes con serología pretrasplante negativa para CMV, 43 (32,1%) recibieron timoglobulina como tratamiento de inducción y, por tanto, se les indicó profilaxis universal, 27 (20,1%) no dieron su consentimiento por escrito, 22 (16,4%) no pudieron incluirse porque se les dio el alta médica antes de poder proponerles el estudio, 8 (6,0%) sufrieron una disfunción del injerto en los 14 días posteriores al trasplante, 3 (2,2%) no sobrevivieron a la cirugía dentro de los primeros 14 días postrasplante, 2 (1,5%) eran pacientes menores de 16 años y 1 paciente (0,7%) no fue incluido porque padecía una afectación neurológica (Tabla 5).

**Tabla 5.** Motivos de no inclusión de los 134 pacientes trasplantados durante el período de inclusión.

<b>Motivo de la no inclusión</b>	<b>Pacientes no incluidos, N=134</b>
<i>Serología pretrasplante negativa para CMV</i>	28 (20,9%)
<i>Inducción con timoglobulina</i>	43 (32,1%)
<i>Falta de consentimiento informado</i>	27 (20,1%)
<i>Alta médica anticipada</i>	22 (16,4%)
<i>Disfunción del injerto trasplantado</i>	8 (6,0%)
<i>No supervivencia a los 14 días del trasplante</i>	3 (2,2%)
<i>Pacientes pediátricos</i>	2 (1,5%)
<i>Afectación neurológica</i>	1 (0,7%)

Aunque se incluyeron un total de 116 pacientes, para el análisis sólo fueron evaluables un total de 106 pacientes, ya que 7 de estos pacientes abandonaron el estudio voluntariamente dentro de las 11 primeras semanas postrasplante y los 3 restantes se excluyeron por la administración temprana de profilaxis con valganciclovir (Figura 5).

Se compararon las características demográficas y basales de los receptores de bajo riesgo incluidos (N=106) y analizables respecto a los no incluidos y no analizables (N=73) (Tabla 6). El porcentaje de receptores de riñón fue mayor entre los pacientes incluidos y evaluables (50,9% vs. 30,1%, RR 1,69 IC95% 1,14 – 2,51, p = 0,006), mientras que el porcentaje de receptores de corazón resultó menor entre los pacientes incluidos y evaluables (3,8% vs. 16,4%, RR 0,23 IC95% 0,08 – 0,68, p = 0,004).

Los datos demográficos y basales de ambos grupos se encuentran recogidos en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características demográficas y basales de los pacientes evaluables y no evaluables o no incluidos de bajo riesgo por enfermedad por CMV y con indicación de tratamiento anticipado.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes evaluables, N=106</b>	<b>Pacientes no incluidos y no evaluables, N= 73</b>	<b>P</b>
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	84 (79,2%)	62 (84,9%)	0,335
<i>Edad, años, media ± DE</i>	54,1 ± 10,9	52,2 ± 11,4	0,242
<b>Tipo de trasplante,</b>			
<i>Riñón, n (%)</i>	54 (50,9%)	22 (30,1%)	0,006
<i>Hígado, n (%)</i>	46 (43,4%)	38 (52,1%)	0,254
<i>Corazón, n (%)</i>	4 (3,8%)	12 (16,4%)	0,004
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	2 (1,9%)	1 (1,4%)	1,000
<b>Inmunosupresión basal,</b>			
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	90 (84,9%)	59 (83,1%)	0,747
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	16 (15,1%)	12 (16,9%)	0,747
<i>Micofenolato, n (%)</i>	105 (99,1%)	70 (98,6%)	1,000
<i>Prednisona, n (%)</i>	104 (98,1%)	69 (97,2%)	1,000
<b>Terapia de inducción, n (%)</b>			
<i>Basiliximab, n (%)</i>	27 (25,5%)	23 (32,9%)	0,288
<i>Daclizumab, n (%)</i>	9 (8,5%)	1 (1,4%)	0,053
<b>Serología del donante para CMV,</b>			
<i>D+, n (%)</i>	69 (87,3%)	31 (75,6%)	0,102
<i>D-, n (%)</i>	10 (12,7%)	10 (24,4%)	0,102
<i>Desconocida, n (%)</i>	27 (25,5%)	32 (43,8%)	0,010
<i>Rechazo previo a la infección CMV, n (%)</i>	26 (24,5%)	23 (31,5%)	0,303
<i>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</i>	22 (20,8%)	22 (30,1%)	0,152

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado y t-Student.*

## 1.2. Características demográficas y basales de los pacientes evaluables

De los 106 receptores TOS de bajo riesgo de enfermedad por CMV analizados, 54 (50,9%) eran receptores de riñón, 46 (43,4%) de hígado, 4 (3,8%) de corazón y 2 (1,9%) de hígado-riñón, la mayoría varones (79,2%), con una media de edad de  $54,1 \pm 10,9$  años. La mediana de seguimiento fue de 51,6 semanas (RIQ de 48,5 – 53,6 semanas).

Respecto a la etiología previa al trasplante de los receptores renales, 18 pacientes (33,3%) tuvieron glomerulonefritis, 7 (13,0%) poliquistosis, 6 (11,1%) glomeruloesclerosis diabética, 5 (9,3%) nefropatía tubulointerstitial crónica, 3 (5,6%) vasculitis, 1 (1,9%) crioglobulinemia por el virus de la hepatitis C, 1 (1,9%) uropatía obstructiva crónica, 1 (1,9%) hipertensión arterial maligna, 1 (1,9%) disfunción renal desarrollada en el contexto de una sepsis connatal y en 11 (20,4%) la etiología era desconocida.

Respecto a las causas del trasplante hepático, en 19 pacientes (39,1%) el origen fue una cirrosis alcohólica (3 de los cuales con hepatocarcinoma), 12 (26,1%) cirrosis por el virus de la hepatitis C (7 de los cuales con hepatocarcinoma), 5 (18,9%) cirrosis por el virus de la hepatitis B (1 de los cuales con hepatocarcinoma), 3 (6,5%) cirrosis biliar primaria, 2 (4,3%) cirrosis criptogénica (1 de los cuales con hepatocarcinoma), y en un caso (2,15%), respectivamente, esteatohepatitis no alcohólica junto con hepatocarcinoma, enfermedad de Wilson, poliquistosis hepatorrenal, colangitis esclerosante secundaria y enfermedad amiloidótica familiar de tipo I. En un caso la etiología no fue conocida.

En los receptores cardíacos la etiología fue en dos casos (50%) cardiopatía isquémicas y en otros dos (50%) miocardiopatía dilatada.

En el caso del trasplante hepatorrenal, en un caso fue debido a una poliquistosis hepatorrenal y en otro a una cirrosis alcohólica junto con glomerulonefritis diabética.

Como tratamiento inmunosupresor basal, el 84% de los pacientes recibió triple terapia con prednisona, micofenolato y tacrolimus, mientras que el 14,2% recibió triple terapia de prednisona, micofenolato y ciclosporina. El 1,8% restante tuvo un régimen basal doble con micofenolato y ciclosporina y prednisona y tacrolimus. El 34% de los

pacientes recibió tratamiento de inducción con basiliximab (25,5%) o daclizumab (8,5%).

La serología del donante para CMV se conocía en 79 (74,5%) pacientes, de los cuales 69 (87,3%) fueron positivos.

De los 28 pacientes que presentaron uno o más episodios de rechazo a lo largo del seguimiento postrasplante, en 26 (92,9%) ocurrió previo a la infección por CMV, requiriendo tratamiento con bolos de metilprednisona 22 (78,6%) de ellos.

Las características demográficas basales se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Características demográficas basales previas al desarrollo de infección por CMV de los 106 pacientes evaluables.

<b>Variable</b>	<b>Total pacientes evaluables, N=106</b>
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	84 (79,2%)
<i>Edad, años, media ± DE</i>	54,1 ± 10,9
<b>Tipo de trasplante,</b>	
<i>Riñón, n (%)</i>	54 (50,9%)
<i>Hígado, n (%)</i>	46 (43,4%)
<i>Corazón, n (%)</i>	4 (3,8%)
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	2 (1,9%)
<b>Etiología del trasplante,</b>	
<b>Riñón (N = 54)</b>	
<i>Glomerulonefritis, n (%)</i>	18 (33,3%)
<i>Poliquistosis, n (%)</i>	7 (13,0%)
<i>Glomerulonefritis diabética, n (%)</i>	6 (11,1%)
<i>Nefropatía tubulointersticial crónica, n (%)</i>	5 (9,3%)
<i>Vasculitis, n (%)</i>	3 (5,6%)
<i>Crioglobulinemia por virus C</i>	1 (1,9%)
<i>Uropatía obstructiva crónica</i>	1 (1,9%)
<i>Hipertensión arterial maligna</i>	1 (1,9%)
<i>Sepsis connatal</i>	1 (1,9%)
<i>Desconocida</i>	11 (20,4%)
<b>Hígado (N = 46)</b>	
<i>Cirrosis alcohólica, n (%)</i>	19 (41,3%)
<i>Cirrosis por virus hepatitis C, n (%)</i>	12 (26,1%)
<i>Cirrosis por virus hepatitis B, n (%)</i>	5 (18,9%)

<b>Variable</b>	<b>Total pacientes evaluables, N=106</b>
<i>Hepatocarcinoma, n (%)</i>	13 (28,3%)
<i>Cirrosis biliar primaria, n (%)</i>	3 (6,5%)
<i>Cirrosis criptogénica, n (%)</i>	2 (4,3%)
<i>Esteatohepatitis no alcohólica, n (%)</i>	1 (2,2%)
<i>Enfermedad de Wilson, n (%)</i>	1 (2,2%)
<i>Poliquistosis hepatorrenal, n (%)</i>	1 (2,2%)
<i>Enfermedad amiloidótica familiar tipo I, n (%)</i>	1 (2,2%)
<i>Colangitis esclerosante, n (%)</i>	1 (2,2%)
<i>Desconocida, n (%)</i>	1 (2,2%)
<b>Corazón (N = 4)</b>	
<i>Cardiopatía isquémica, n (%)</i>	2 (50,0%)
<i>Miocardopatía dilatada, n (%)</i>	2 (50,0%)
<b>Hígado-Riñón (N = 2)</b>	
<i>Poliquistosis hepatorrenal, n (%)</i>	1 (50,0%)
<i>Cirrosis alcohólica y Glomerulonefritis diabética, n (%)</i>	1 (50,0%)
<b>Inmunosupresión basal,</b>	
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	90 (84,9%)
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	16 (15,1%)
<i>Micofenolato, n (%)</i>	105 (99,1%)
<i>Prednisona, n (%)</i>	104 (98,1%)
<b>Terapia de inducción, n (%)</b>	36 (34,0%)
<i>Basiliximab, n (%)</i>	27 (25,5%)
<i>Daclizumab, n (%)</i>	9 (8,5%)
<b>Serología del donante para CMV,</b>	
<i>D+, n (%)</i>	69 (87,3%)
<i>D-, n (%)</i>	10 (12,7%)
<i>Desconocida, n (%)</i>	27 (25,5%)
<b>Rechazo previo a la infección CMV, n (%)</b>	26 (24,5%)
<b>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</b>	22 (20,8%)

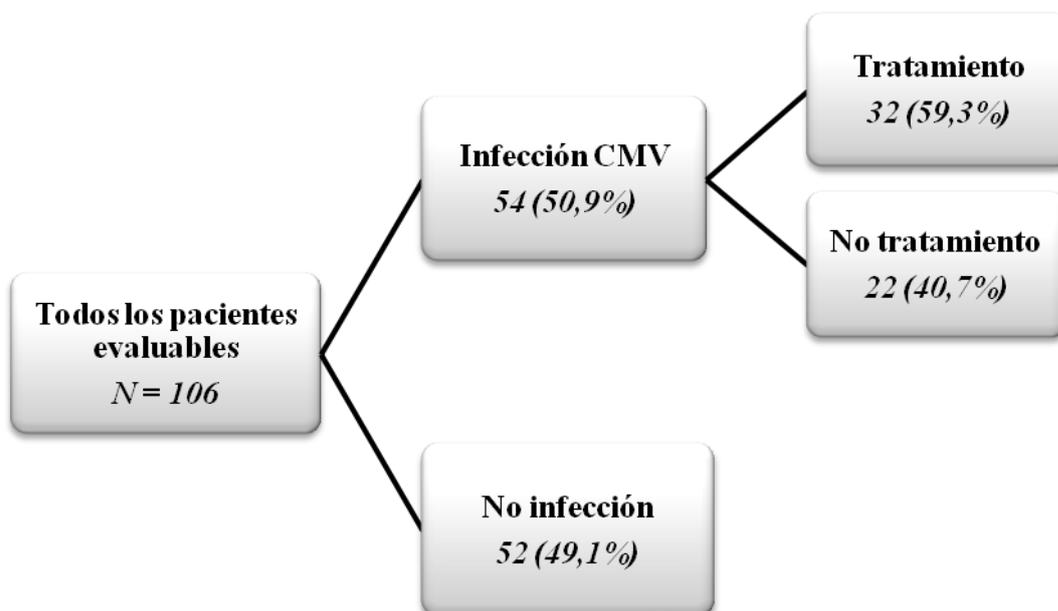
### 1.3. Incidencia de infección y enfermedad por CMV de los pacientes evaluables

De los 106 receptores TOS de bajo riesgo de infección por CMV, 54 (50,9%) desarrollaron uno o más episodios de replicación de CMV a lo largo del seguimiento (Fig. 6), que se iniciaron con una mediana de 5,7 semanas (RIQ 4 – 7,5) después del trasplante y que tuvieron una duración media de  $29,4 \pm 19,0$  días. La mediana de episodios de replicación por paciente fue de 1 (rango 1 – 3), con una mediana de la

carga viral pico por paciente de 1732,5 UI/ml (RIQ 613 – 3933,3). De los 54 pacientes con episodios de replicación, en 32 (59,3%) se indicó tratamiento anticipado. La mediana de carga viral a partir de la cual se inició el primer tratamiento anticipado por paciente fue de 2861,5 UI/ml (RIQ 1683,3 – 3868,5). Un total de 27 (50,0%) pacientes tuvieron una carga viral pico mayor a 2000 UI/ml.

Veintiún pacientes tuvieron 2 ó más episodios de replicación, de los cuales en 6 se les administró tratamiento anticipado. La mediana de carga viral a partir de la cual se inició este segundo tratamiento fue de 2857,3 UI/ml (RIQ 1399,3 – 6515,8). Dos pacientes desarrollaron 3 episodios de replicación, y ambos casos recibieron tratamiento anticipado, siendo la mediana de carga viral para el inicio del mismo de 2743,5 UI/ml (RIQ 2566 – 2921).

**Figura 6.** Incidencia de infección por CMV y aplicación de tratamiento antiviral en los pacientes incluidos y evaluables del estudio.



Se estudiaron las características demográficas basales de los pacientes en función de desarrollar o no episodios de replicación por CMV a lo largo del seguimiento, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características demográficas y basales de los pacientes evaluables que desarrollan o no infección por CMV durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con episodios de replicación, N=54</b>	<b>Pacientes sin episodios de replicación, N=52</b>	<b>P</b>
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	43 (79,6%)	41 (78,8%)	0,921
<i>Edad, años, media ± DE</i>	55,3 ± 10,7	52,9 ± 11,1	0,254
<b>Tipo de trasplante,</b>			
<i>Riñón, n (%)</i>	32 (59,3%)	22 (42,3%)	0,081
<i>Hígado, n (%)</i>	19 (35,2%)	27 (51,9%)	0,082
<i>Corazón, n (%)</i>	2 (3,7%)	2 (3,8%)	1,000
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	1 (1,9%)	1 (1,9%)	1,000
<b>Inmunosupresión basal,</b>			
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	48 (88,9%)	42 (80,8%)	0,243
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	6 (11,1%)	10 (19,2%)	0,243
<i>Micofenolato, n (%)</i>	54 (100%)	51 (98,1%)	0,491
<i>Prednisona, n (%)</i>	53 (98,1%)	51 (98,1%)	1,000
<b>Terapia de inducción, n (%)</b>			
<i>Basiliximab, n (%)</i>	14 (25,9%)	13 (25,0%)	0,913
<i>Daclizumab, n (%)</i>	7 (13,0%)	2 (3,8%)	0,161
<b>Serología del donante para CMV,</b>			
<i>D+, n (%)</i>	38 (90,5%)	31 (83,8%)	0,502
<i>D-, n (%)</i>	4 (9,5%)	6 (16,2%)	0,502
<i>Desconocida, n (%)</i>	12 (22,2%)	15 (28,8%)	0,434
<i>Rechazo previo a la infección CMV, n (%)</i>	15 (27,8%)	11 (21,2%)	0,428
<i>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</i>	15 (27,8%)	7 (13,5%)	0,069

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado y T-student.*

También se analizaron las características basales de los pacientes en función del desarrollo de viremias elevadas (por encima de 2000 UI/ml). Las cargas virales fueron mayores a 2000 UI/ml en 27 (25,5%) pacientes. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variables demográficas basales analizadas, excepto por la administración de daclizumab como tratamiento de

inducción, que fue significativamente mayor en los pacientes con cargas virales pico mayores a 2000 UI/ml que en los pacientes sin infección o con infección con cargas virales pico por debajo de 2000 UI/ml (18,5% vs. 5,1%, RR 3,66 IC95% 1,06 – 12,64, p = 0,045; Tabla 9).

**Tabla 9.** Características demográficas basales de los pacientes evaluables que desarrollan o no infecciones con cargas virales pico  $\geq 2000$  UI/ml por CMV durante el seguimiento.

Variable	Pacientes con carga viral $\geq 2000$ UI/ml, N=27	Pacientes sin infección o con carga viral $< 2000$ UI/ml, N=79	P
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	22 (81,5%)	62 (78,5%)	0,740
<i>Edad, años, media <math>\pm</math> DE</i>	54,7 $\pm$ 10,2	53,9 $\pm$ 11,2	0,743
<i>Tipo de trasplante,</i>			
<i>Riñón, n (%)</i>	17 (63,0%)	37 (46,8%)	0,148
<i>Hígado, n (%)</i>	9 (33,3%)	37 (46,8%)	0,222
<i>Corazón, n (%)</i>	1 (3,7%)	3 (3,8%)	1,000
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	0 (0%)	2 (2,5%)	1,000
<i>Inmunosupresión basal,</i>			
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	24 (88,9%)	66 (83,5%)	0,756
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	3 (11,1%)	13 (16,5%)	0,756
<i>Micofenolato, n (%)</i>	27 (100%)	78 (98,7%)	1,000
<i>Prednisona, n (%)</i>	26 (96,3%)	78 (98,7%)	0,446
<i>Terapia de inducción, n (%)</i>			
<i>Basiliximab, n (%)</i>	6 (22,2%)	21 (26,6%)	0,654
<i>Daclizumab, n (%)</i>	5 (18,5%)	4 (5,1%)	0,045
<i>Serología del donante para CMV,</i>			
<i>D+, n (%)</i>	20 (90,9%)	49 (86,0%)	0,717
<i>D-, n (%)</i>	2 (9,1%)	8 (14,0%)	0,717
<i>Desconocida, n (%)</i>	5 (18,5%)	22 (27,8%)	0,337
<i>Rechazo previo a la infección CMV, n (%)</i>	6 (22,2%)	20 (25,3%)	0,747
<i>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</i>	6 (22,2%)	16 (20,3%)	0,828

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado y t-Student.*

Un total de 32 (30,2%) pacientes recibió tratamiento anticipado para el control de la infección por CMV. Respecto a las características demográficas basales, no se

observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados y no tratados, bien porque controlaron espontáneamente la infección o bien porque no desarrollaron ningún episodio de replicación (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características demográficas y basales de los 106 pacientes evaluables en función de la indicación de tratamiento anticipado durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con tratamiento, N=32</b>	<b>Pacientes sin tratamiento, N=74</b>	<b>P</b>
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	25 (78,1%)	59 (79,7%)	0,852
<i>Edad, años, media ± DE</i>	54,9 ± 10,3	53,8 ± 11,2	0,662
<b>Tipo de trasplante,</b>			
<i>Riñón, n (%)</i>	19 (59,4%)	35 (47,3%)	0,253
<i>Hígado, n (%)</i>	12 (37,5%)	34 (45,9%)	0,421
<i>Corazón, n (%)</i>	1 (3,1%)	3 (4,1%)	1,000
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	0 (0%)	2 (2,7%)	1,000
<b>Inmunosupresión basal,</b>			
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	28 (87,5%)	62 (83,8%)	0,772
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	4 (12,5%)	12 (16,2%)	0,772
<i>Micofenolato, n (%)</i>	32 (100%)	73 (98,6%)	1,000
<i>Prednisona, n (%)</i>	31 (96,9%)	73 (98,6%)	0,515
<b>Terapia de inducción, n (%)</b>			
<i>Basiliximab, n (%)</i>	8 (61,5%)	19 (82,6%)	0,235
<i>Daclizumab, n (%)</i>	5 (38,5%)	4 (17,4%)	0,235
<b>Serología del donante para CMV,</b>			
<i>D+, n (%)</i>	24 (92,3%)	45 (84,9%)	0,484
<i>D-, n (%)</i>	2 (7,7%)	8 (15,1%)	0,484
<i>Desconocida, n (%)</i>	6 (18,8%)	21 (28,4%)	0,296
<i>Rechazo previo a la infección CMV, n (%)</i>	8 (25,0%)	18 (24,3%)	0,941
<i>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</i>	8 (25,0%)	14 (18,9%)	0,478

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, t-Student y U de Mann-Whitney.*

De los 54 pacientes con episodios de replicación a lo largo del año de seguimiento, 22 (40,7%) controlaron espontáneamente los episodios de replicación, mientras que a los 32 restantes (59,3%) se les administró tratamiento anticipado (RR 3,36 IC95% 2,37 – 4,78,  $p < 0,001$ ). La carga viral pico fue mayor en los pacientes tratados (3589,5 (RIQ 2673,3 – 6788,3) vs. 601 (RIQ 345,3 – 818,5),  $p < 0,001$ ), así como el porcentaje de pacientes con cargas virales pico  $\geq 2000$  UI/ml (84,4% vs. 0%,  $p < 0,001$ ). Todas las características analizadas se encuentran detalladas en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Características de la infección por CMV de los 54 pacientes evaluables con uno o más episodios de replicación en función de la indicación de tratamiento anticipado durante el seguimiento.

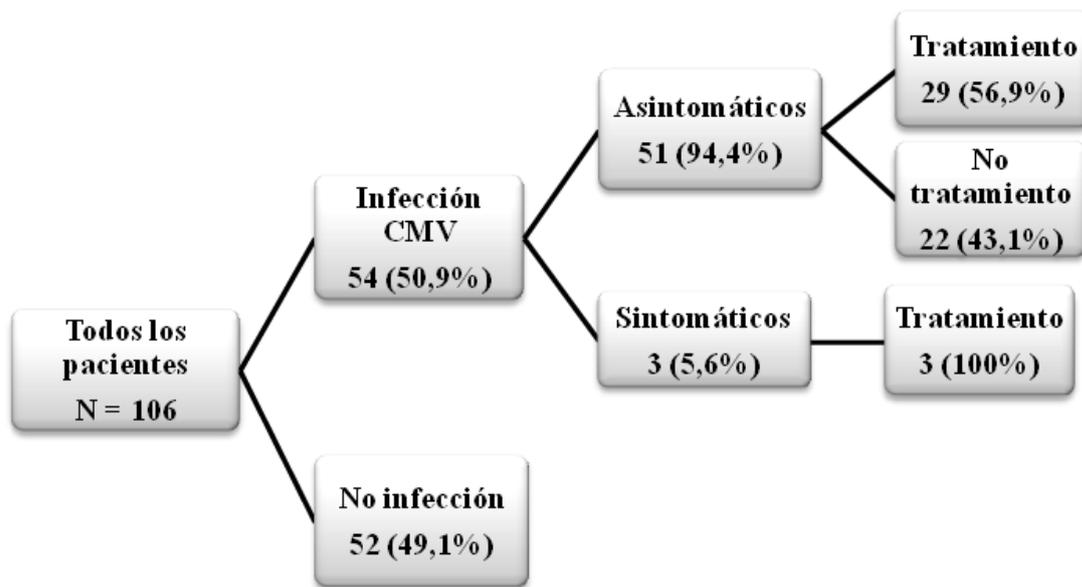
<b>Variable</b>	<b>Pacientes con tratamiento, N=32</b>	<b>Pacientes sin tratamiento, N=22</b>	<b>P</b>
<i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i>	1,5 (1 – 3)	1 (1 – 3)	0,051
<i>Duración total viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i>	40,4 $\pm$ 20,6	36,6 $\pm$ 26,5	0,346
<i>Primera replicación CMV postrasplante (semanas), mediana (RIQ)</i>	5,35 (3,9- 7,3)	6,3 (4,2 – 8,7)	0,355
<i>Última replicación postrasplante (semanas ), mediana (RIQ)</i>	12,9 (4,6 – 18,1)	7,3 (5,3 – 11,2)	0,184
<i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i>	3589,5 (2673,3 – 6788,3)	601 (345,3 – 818,5)	$< 0,001$
<i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i>	27 (84,4%)	0 (0%)	$< 0,001$

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

Sólo 3 pacientes (2,8%), todos ellos receptores de trasplante hepático, desarrollaron enfermedad por CMV durante el seguimiento (Fig. 7). Dos pacientes tuvieron gastritis y un paciente hepatitis. Dos de ellos habían recibido tratamiento con bolos de corticoides por rechazo previo a la enfermedad. La carga viral al diagnóstico de la enfermedad fue de 3749, 6024 y 26299 UI /ml, respectivamente. Todos los episodios se resolvieron sin secuelas.

Uno de los tres pacientes, que estaba en lista de espera para trasplante por disfunción crónica del injerto, fue trasplantado a las tres semanas del inicio del tratamiento. Las características de estos tres pacientes se encuentran detalladas en la Tabla 12.

**Figura 7.** Pacientes asintomáticos y sintomáticos a los que se indicó la administración de tratamiento anticipado.



**Tabla 12.** Características demográficas y basales de la enfermedad por CMV de los pacientes con infección sintomática por CMV.

<i>Nº Paciente</i>	<b>79</b>	<b>84</b>	<b>85</b>
<i>Edad (años)</i>	37	59	54
<i>Sexo</i>	Varón	Varón	Varón
<i>Etiología trasplante</i>	Enfermedad de Wilson	Cirrosis alcohólica	Desconocida
<i>Serología CMV donante</i>	Desconocida	D+	D-
<i>Ciclosporina</i>	Sí	No	No
<i>Tacrolimus</i>	No	Sí	Sí
<i>Tto inducción</i>	No	No	No
<i>Rechazo previo (Semana)</i>	Sí (2,9)	Sí (23,6)	No
<i>Tratamiento con bolos de esteroides (Semana)</i>	Sí (2,9)	Sí (23,6)	No
<i>Semana infección sintomática</i>	6,3	26,9	5,9
<i>Tipo infección sintomática</i>	Hepatitis	Gastritis	Gastritis
<i>Replicación previa al episodio de enfermedad (Semana)</i>	No	Sí (5,7)	No
<i>Carga viral inicio tratamiento (UI/ml)</i>	2066	2439	6024
<i>Carga viral pico (UI/ml)</i>	26299	3749	6024
<i>Evolución enfermedad</i>	Resuelto	Pérdida de injerto no relacionada con CMV	Resuelto

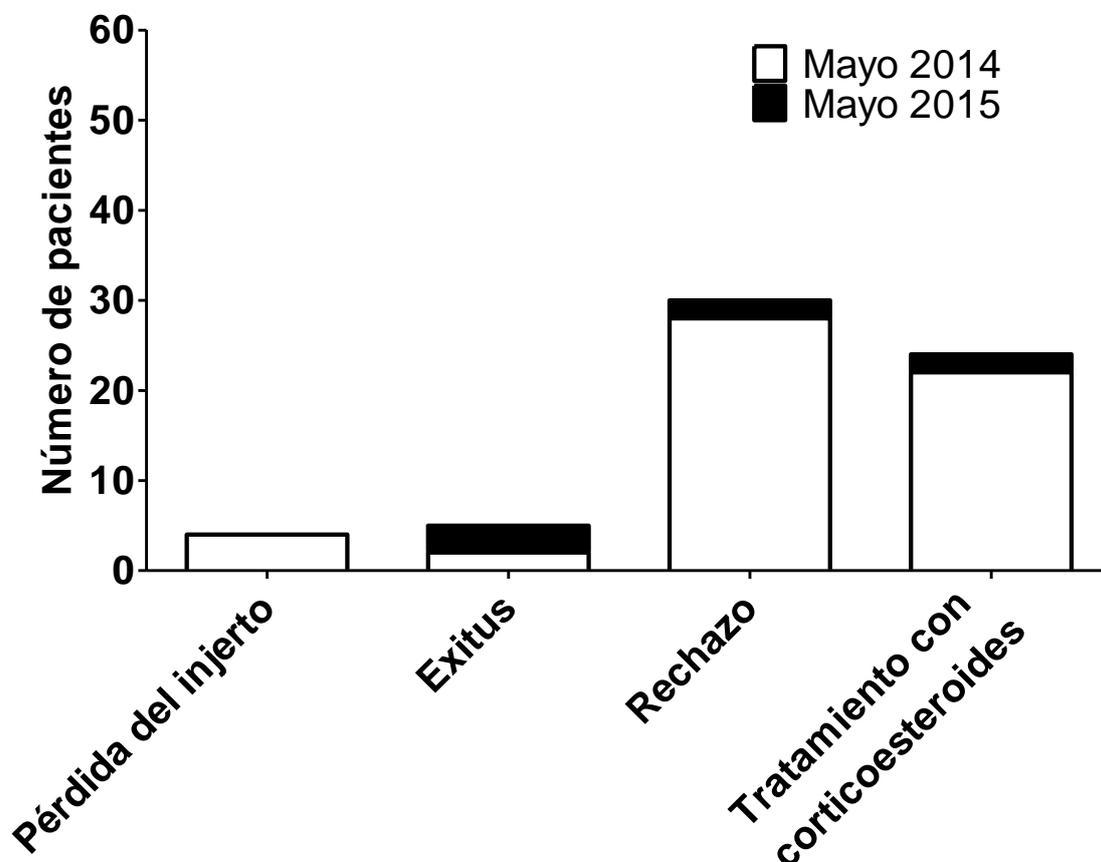
## 1.4. Evolución de los pacientes evaluables

### 1.4.1. Evolución de los pacientes al fin del año de seguimiento inmunoviroológico y seguimiento clínico

El seguimiento inmunoviroológico de un año se completó en Mayo de 2014, mientras que el seguimiento clínico se continuó hasta Mayo de 2015. La mediana de seguimiento inmunoviroológico de los 106 pacientes evaluables fue de 51,6 semanas (RIQ 48,5 – 53,6). De los mismos, 100 pacientes (94,3%) completaron el año de monitorización inmunoviroológica establecido en los objetivos del estudio. Cuatro pacientes (3,8%) finalizaron el seguimiento antes del fin del estudio debido a pérdidas del injerto, que ocurrieron a una mediana de 25,6 semanas (RIQ 15,1 – 32,6), mientras que 2 pacientes (1,9%) fallecieron antes de completar el año de seguimiento, con una mediana de 39,9 semanas (RIQ 32,9 – 47,0). Ni las pérdidas de injerto ni los casos de exitus estuvieron relacionados con episodios de infección por CMV. Un total de 28 pacientes (26,4%) sufrieron algún episodio de rechazo del injerto, que ocurrieron con una mediana de 2,6 semanas (RIQ 0,7 – 51,3). Veintidós pacientes (20,8%) requirieron tratamiento con bolos de corticoesteroides.

El seguimiento clínico de los 100 pacientes que acabaron el seguimiento inmunoviroológico se continuó hasta mayo de 2015 (mes mediano 31,1 postrasplante, RIQ 26,6 - 37,8). Tres pacientes fallecieron por motivos no relacionados con la infección por CMV, el resto de pacientes conservó el injerto. Cinco pacientes tuvieron algún episodio de rechazo (mediana 20,7 meses, RIQ 12,7 – 26,9), de los cuales, 2 requirieron tratamiento con bolos de esteroides. Por tanto, al final del seguimiento clínico en mayo de 2015, de los 106 pacientes evaluables, 97 sobrevivieron al trasplante, 4 perdieron el injerto por causas no relacionadas con la infección por CMV, 5 fallecieron por causas no relacionadas con la infección por CMV y 30 pacientes sufrieron episodios de rechazo, de los cuales 24 necesitaron tratamiento con bolos de corticoesteroides (Fig. 8).

**Figura 8.** Gráfico comparativo de la evolución clínica de los 106 pacientes evaluables al final del seguimiento inmunoviroológico (Mayo de 2014) y al final del seguimiento clínico (Mayo de 2015).



#### 1.4.2. Características de los pacientes con rechazo y relación con la replicación por CMV

Cuando se compararon las características demográficas basales de los pacientes que sufrieron o no episodios de rechazo, se observó que entre aquellos pacientes con rechazo eran más frecuentes los receptores hepáticos, mientras que los renales eran más frecuentes en el grupo sin rechazo. También era más frecuente entre los pacientes con rechazo el uso de ciclosporina (28,6% vs. 10,3%, RR 2,25, IC95% 1,21 – 4,20,  $p = 0,03$ ) y menor el uso de tacrolimus (71,5% vs. 89,7%, RR 0,79, IC95% 0,62 – 1,02,  $p =$

0,03), No se encontraron otras diferencias significativas para el resto de variables demográficas basales analizadas (Tabla 13).

**Tabla 13.** Características demográficas y basales de los pacientes evaluables que tuvieron o no algún episodio de rechazo durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con rechazo, N=28</b>	<b>Pacientes sin rechazo, N=78</b>	<b>P</b>
<i>Sexo, varón, n (%)</i>	24 (85,7%)	60 (76,9%)	0,325
<i>Edad, años, media ± DE</i>	52,7 ± 11,8	54,7 ± 10,6	0,412
<i>Tipo de trasplante,</i>			
<i>Riñón, n (%)</i>	8 (28,6%)	46 (59,0%)	0,006
<i>Hígado, n (%)</i>	18 (64,3%)	28 (35,9%)	0,009
<i>Corazón, n (%)</i>	2 (7,1%)	2 (2,6%)	0,284
<i>Hígado-Riñón, n (%)</i>	0 (0%)	2 (2,6%)	1,000
<i>Inmunosupresión basal,</i>			
<i>Tacrolimus, n (%)</i>	20 (71,4%)	70 (89,7%)	0,030
<i>Ciclosporina, n (%)</i>	8 (28,6%)	8 (10,3%)	0,030
<i>Micofenolato, n (%)</i>	28 (100%)	77 (98,7%)	1,000
<i>Prednisona, n (%)</i>	26 (92,9%)	78 (100%)	0,068
<i>Terapia de inducción, n (%)</i>	6 (21,4%)	30 (38,5%)	0,103
<i>Basiliximab, n (%)</i>	6 (21,4%)	21 (26,9%)	0,567
<i>Daclizumab, n (%)</i>	0 (0%)	9 (11,5%)	0,108
<i>Serología del donante para CMV,</i>			
<i>D+, n (%)</i>	19 (86,4%)	50 (87,7%)	1,000
<i>D-, n (%)</i>	3 (13,6%)	7 (12,3%)	1,000
<i>Desconocida, n (%)</i>	6 (21,4%)	21 (26,9%)	0,567

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

En relación a la infección por CMV, no se observaron tampoco diferencias significativas en función de que el paciente presentara o no rechazo (Tabla 14).

**Tabla 14.** Características de la infección por CMV de los pacientes evaluables que tuvieron o no algún episodio de rechazo durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con rechazo, N=28</b>	<b>Pacientes sin rechazo, N=78</b>	<b>P</b>
<i>Infección por CMV previa al rechazo, n (%)</i>	15 (53,6%)	37 (47,4%)	0,577
<i>Infección por CMV en cualquier momento del seguimiento, n (%)</i>	17 (60,7%)	37 (47,4%)	0,228
<i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i>	1 (0 – 3)	0 (0 – 3)	0,323
<i>Duración viremia (días), media ± DE</i>	44,4±24,4	36,3±22,3	0,233
<i>Primera replicación CMV postrasplante (semanas), mediana (RIQ)</i>	5,1 (4,2 – 8,4)	5,9 (3,9 – 7,4)	0,661
<i>Última replicación postrasplante (semanas), mediana (RIQ)</i>	10,1 (4,4 – 16,9)	8,1 (5,5 – 15,9)	0,867
<i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i>	1274 (825,5 – 4541)	2191 (601 – 3824,5)	0,583
<i>Pacientes con infección con cargas virales ≥2000 UI/ml, n (%)</i>	8 (28,6%)	19 (24,4%)	0,661
<i>Pacientes con tratamiento anticipado, n (%)</i>	10 (35,7%)	22 (28,2%)	0,458
<i>Pacientes con enfermedad por CMV, n (%)</i>	2 (7,1%)	1 (1,3%)	0,170

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

### **1.4.3. Relación del cambio de tratamiento basal por inhibidores de mTOR con la replicación por CMV**

Un total de 42 pacientes (39,6%) sufrieron alguna modificación del tratamiento inmunosupresor basal durante el año de seguimiento. Debido a la importancia de los inhibidores del mTOR tanto en la evolución de la respuesta inmune celular como en la infección por CMV, se llevó a cabo un análisis de los pacientes que recibieron everolimus o sirolimus en algún momento del seguimiento. Un total de 12 pacientes (11,3%) cambiaron su tratamiento basal por inhibidores de mTOR con una mediana de

20,7 semanas tras el trasplante (RIQ 13,3 – 34,3). De los 12 pacientes, 6 (50%) tuvieron algún episodio de replicación por CMV durante el seguimiento, que ocurrió en todos los casos antes del cambio de tratamiento (mediana del inicio de la replicación: semana 3,3 (RIQ 2,8 – 4,4) vs. mediana del cambio a everolimus/sirolimus: semana 16,7 (RIQ 10,2 – 44,5). En ninguno de los casos se detectó replicación por CMV en el momento de la conversión a inhibidores de mTOR. Sólo un paciente tuvo un episodio de replicación posterior al cambio de tratamiento.

En la tabla 15 se encuentran resumidas las características más destacadas de la evolución de los 106 pacientes evaluables.

**Tabla 15.** Evolución de los 106 paciente evaluables del estudio.

<i>Variable</i>	<b>Todos los pacientes, N=106</b>
<i>Pérdida del injerto, n (%)</i>	4 (3,8%)
<i>Mortalidad, n (%)</i>	2 (1,9%)
<i>Pérdida de injerto o exitus relacionado con CMV, n (%)</i>	0 (0%)
<i>Rechazo previo a la infección por CMV, n (%)</i>	26 (24,5%)
<i>Tratamiento con bolos de esteroides previo a la infección por CMV, n (%)</i>	15 (14,2%)
<i>Rechazo posterior a la infección por CMV, n (%)</i>	2 (1,9%)
<i>Tratamiento con bolos de esteroides posterior a la infección por CMV, n (%)</i>	2 (1,9%)
<i>Cambio de tratamiento basal, n (%)</i>	42 (39,6%)
<i>Cambio a inhibidores de mTOR, n (%)</i>	12 (11,3%)

## **2. Cronología de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV evaluables**

### **2.1. Cronología de la respuesta inmune específica frente a CMV de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> y del recuento de poblaciones linfocitarias CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

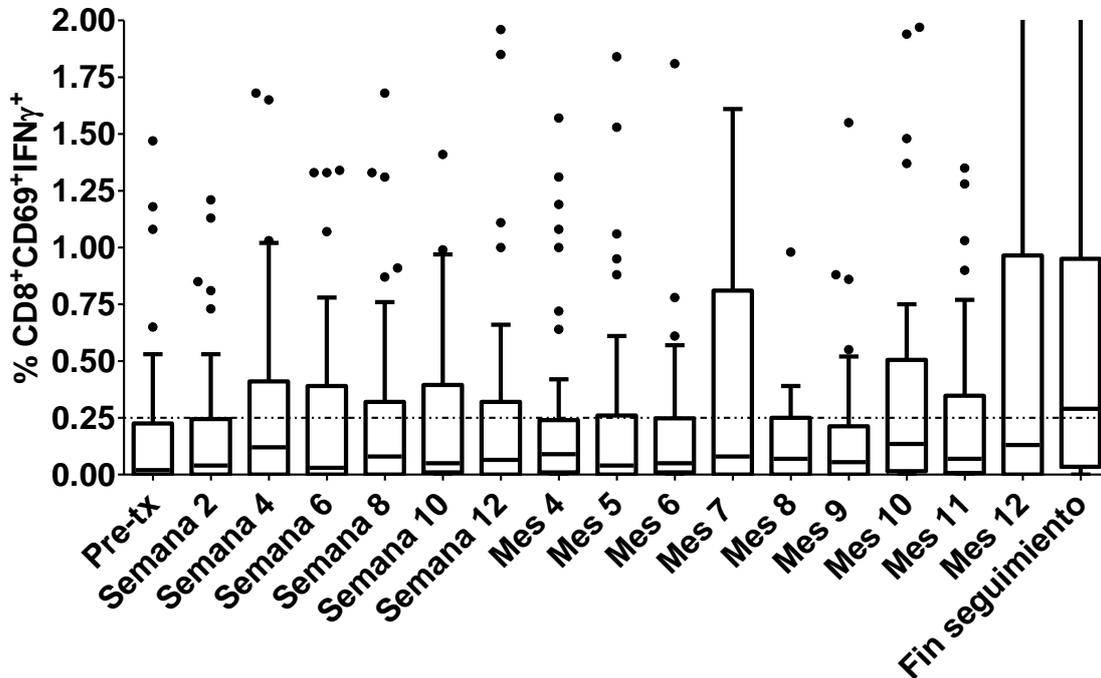
Como se explica en la Sección de Materiales y Métodos, se tomaron muestras para determinar la respuesta inmune específica de células T frente a CMV cada dos semanas durante los tres primeros meses después del trasplante y una vez al mes hasta completar un año de seguimiento. Por lo que se tienen datos de la respuesta inmune de células T de cada uno de los pacientes hasta que se detectó un porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas de CMV  $\geq 0,25\%$  en al menos dos visitas consecutivas. Tras la inclusión de los primeros 50 pacientes del estudio y dado que los resultados de inmunidad celular específica frente a CMV no fueron positivos en 29 pacientes como se hubiera esperado en la primera muestra postrasplante analizada (día 15 postrasplante), se decidió incluir una muestra pretrasplante en todos los pacientes incluidos a partir de ese momento.

En los siguientes apartados se muestra la cronología del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que expresaron las citoquinas (IFN $\gamma$  e IL-2) en respuesta a la estimulación *in vitro* con una mezcla de péptidos de las proteínas IE-1 y pp65, así como el recuento total de dichas subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.

#### **2.1.1. Cronología de las células T CD8<sup>+</sup> que expresan IFN $\gamma$ tras la estimulación**

En la figura 9 se muestran las determinaciones realizadas en los distintos puntos de tiempo de seguimiento del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> detectadas tras la estimulación *in vitro*. Se aprecia una alta heterogeneidad de los resultados obtenidos por semana de seguimiento que está en función de la heterogeneidad de la respuesta inmune en cada paciente analizado. Sin embargo, se puede observar un aumento hasta la semana 4, de un 0,068% (RIQ 0,05 – 0,08) de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, porcentaje que se mantiene prácticamente constante hasta el mes 12 de seguimiento, donde la mediana es de 0,13% (RIQ 0,0 – 0,97).

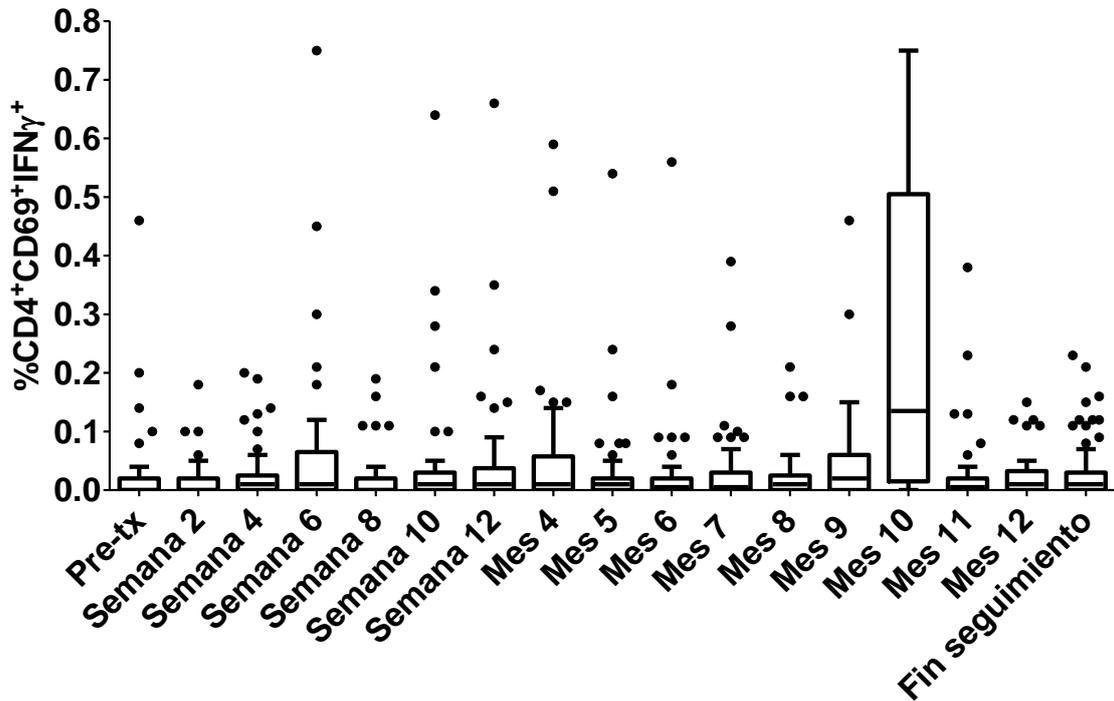
**Figura 9.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  a lo largo del seguimiento. La línea discontinua indica un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,25\%$ , a partir del cual se considera la respuesta inmune como positiva.



### 2.1.2. Cronología de las células T $CD4^+$ que expresan $IFN\gamma$ tras la estimulación

En la figura 10 se muestran las determinaciones realizadas en los distintos puntos de tiempo de seguimiento del porcentaje de células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  detectadas tras la estimulación in vitro. Al igual que ocurre con la población de  $CD8^+$ , existe una alta heterogeneidad al analizarlo por semanas. Sin embargo, se observa que hasta el mes 9 el porcentaje de células  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  se mantiene prácticamente constante en torno a 0,01% (RIQ 0,005 – 0,01). El valor máximo se alcanza en el mes 10 postrasplante (0,13% RIQ 0,02 – 0,60), y posteriormente disminuye hasta una mediana de 0,01% (RIQ 0,0 – 0,03) en el mes 12 de seguimiento.

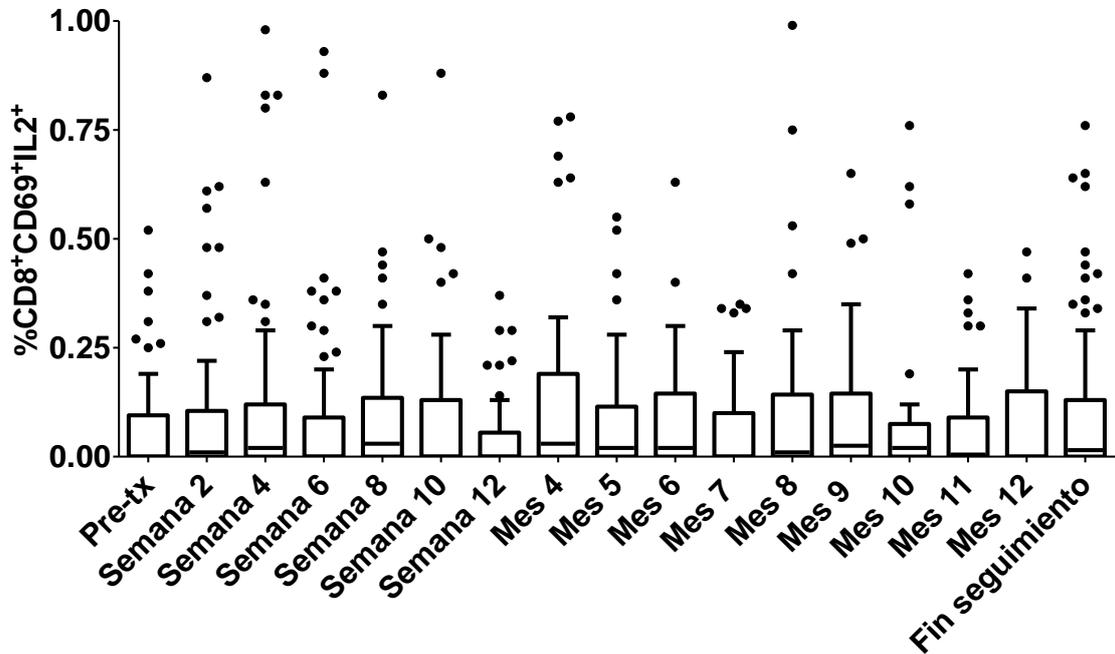
**Figura 10.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  a lo largo del seguimiento.



### 2.1.3. Cronología de las células T $CD8^+$ que expresan IL2 tras la estimulación

En la figura 11 se muestran las determinaciones realizadas en los distintos puntos de tiempo de seguimiento del porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IL2^+$  detectadas tras la estimulación in vitro. Se puede observar que existe una alta heterogeneidad al analizar por semanas, con valores que oscilan entre 0 y 0,03%.

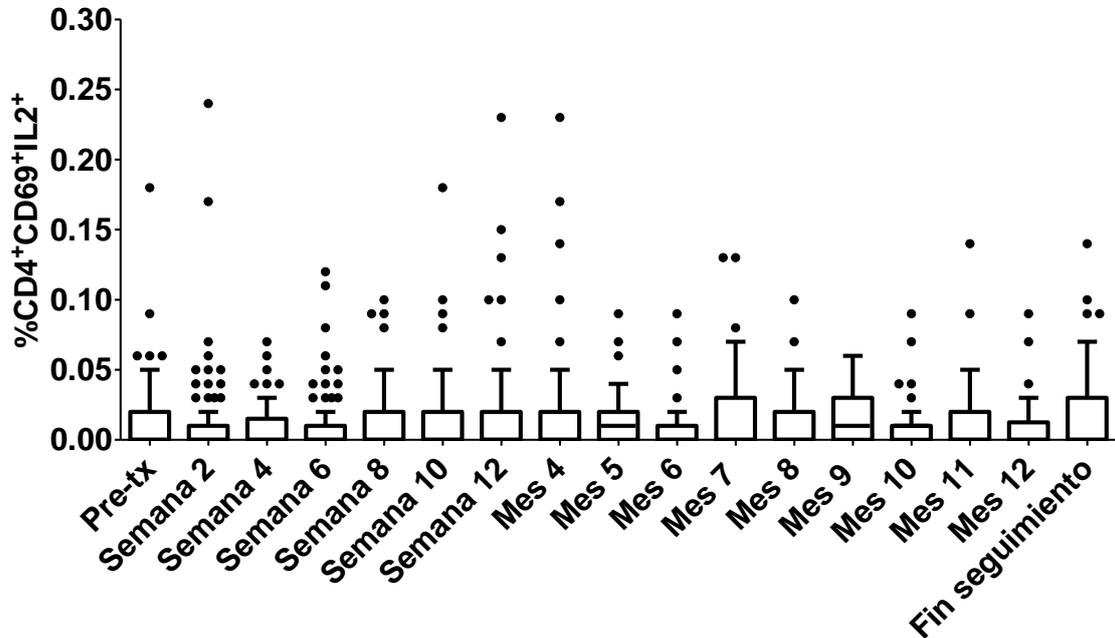
**Figura 11.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células  $CD8^+ CD69^+$  que secretan IL2 a lo largo del seguimiento.



#### 2.1.4. Cronología de las células T $CD4^+$ que expresan IL2 tras la estimulación

En la figura 12 se muestran las determinaciones realizadas en los distintos puntos de tiempo de seguimiento del porcentaje de células T  $CD4^+CD69^+IL2^+$  detectadas tras la estimulación in vitro. Se puede observar que existe una alta heterogeneidad al analizar por semanas, con valores que oscilan entre 0 y 0,03%.

**Figura 12.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> que secretan IL2 a lo largo del seguimiento.

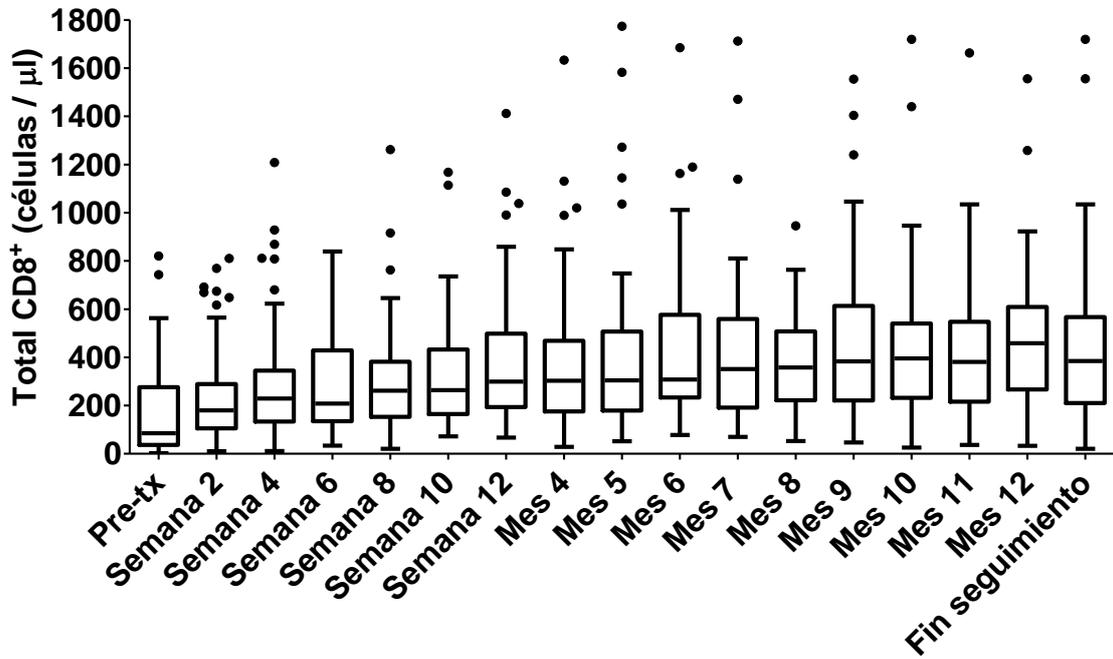


### 2.1.5. Cronología de la subpoblación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

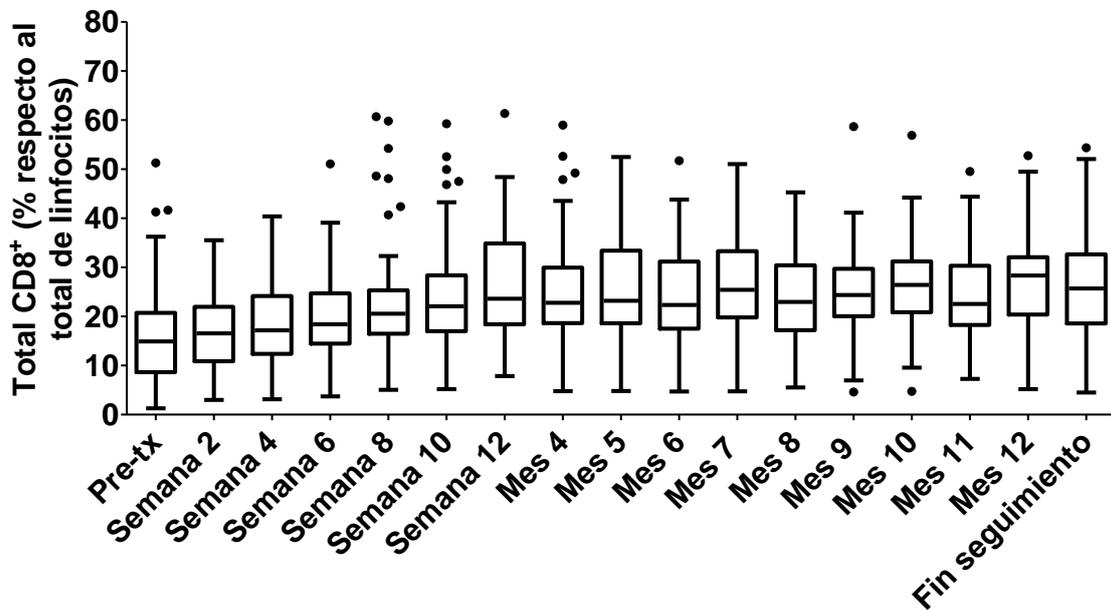
Se calculó la mediana de la subpoblación linfocitaria de células T CD8<sup>+</sup> expresado en células/ $\mu$ l (Fig. 13) y el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> respecto al total de linfocitos (Fig. 14) en las muestras disponibles en cada uno de los tiempos de seguimiento.

Se observa una tendencia en la evolución del total de células T CD8<sup>+</sup>, con un aumento durante los 3 primeros meses postrasplante, que se mantiene alrededor de un valor constante (357,9 células/ $\mu$ l RIQ 307,7 – 383,1 expresado como total de células CD8<sup>+</sup>/ $\mu$ l y 23,2%, RIQ 22,8 – 25,42 expresado como porcentaje de células CD8<sup>+</sup> sobre el total de linfocitos) hasta llegar a los 12 meses de seguimiento.

**Figura 13.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD8<sup>+</sup> expresado como células/μl a lo largo del seguimiento.

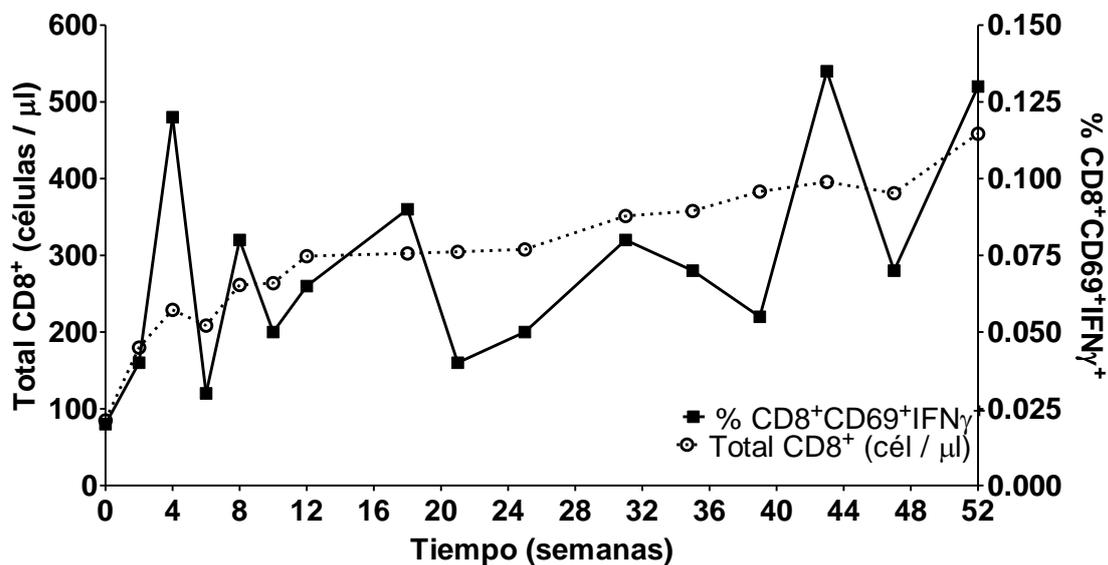


**Figura 14.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD8<sup>+</sup> expresado como porcentaje del total de linfocitos a lo largo del seguimiento.



Se estudió si existe una relación entre la subpoblación de  $CD8^+$  y el porcentaje de las células  $CD8^+$  específica de CMV ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ ) a lo largo del seguimiento, con el objeto de plantear su valor como marcador subrogado que pueda utilizarse en centros donde la citometría de flujo no esté disponible. El coeficiente de correlación  $\rho$  entre la subpoblación  $CD8^+$  (células/ $\mu$ l) y el porcentaje de células  $CD8^+$  específicas de CMV fue de 0,103% ( $p = 0,006$ ). Aunque existe una relación significativa positiva entre la subpoblación de células  $CD8^+$  y el porcentaje de células  $CD8^+$  específicas de CMV, el coeficiente de correlación es bajo, por lo que la relación entre ambas variables es débil y poco relevante como marcador subrogado (Fig. 15).

**Figura 15.** Comparación entre la mediana del porcentaje de células  $CD8^+$  específicas de CMV y el número total de células  $CD8^+$  expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.

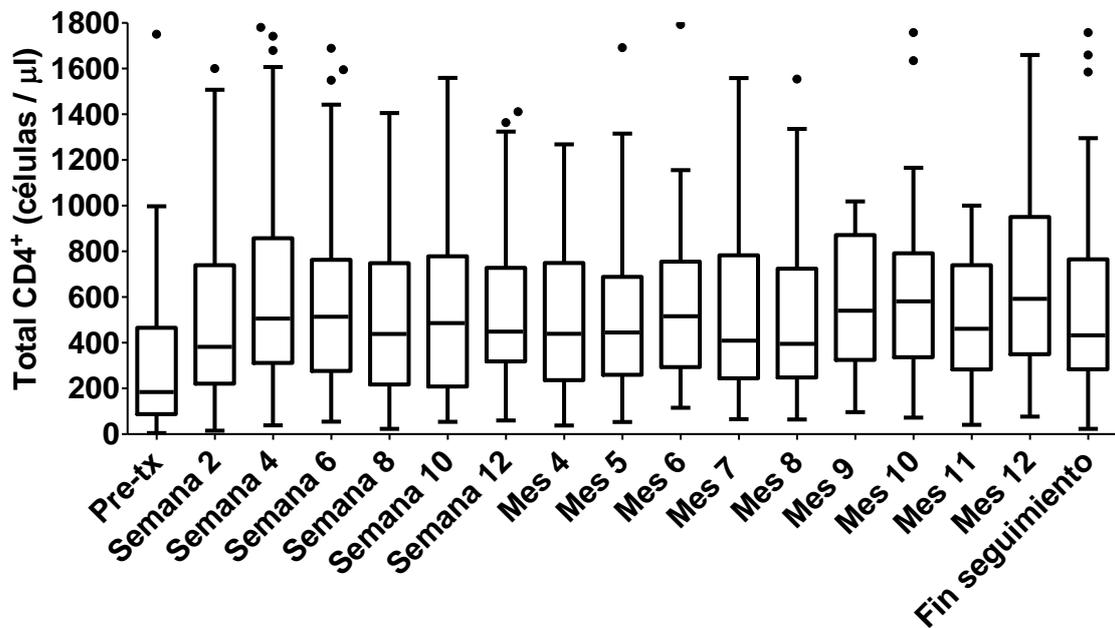


### 2.1.6. Cronología de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+$

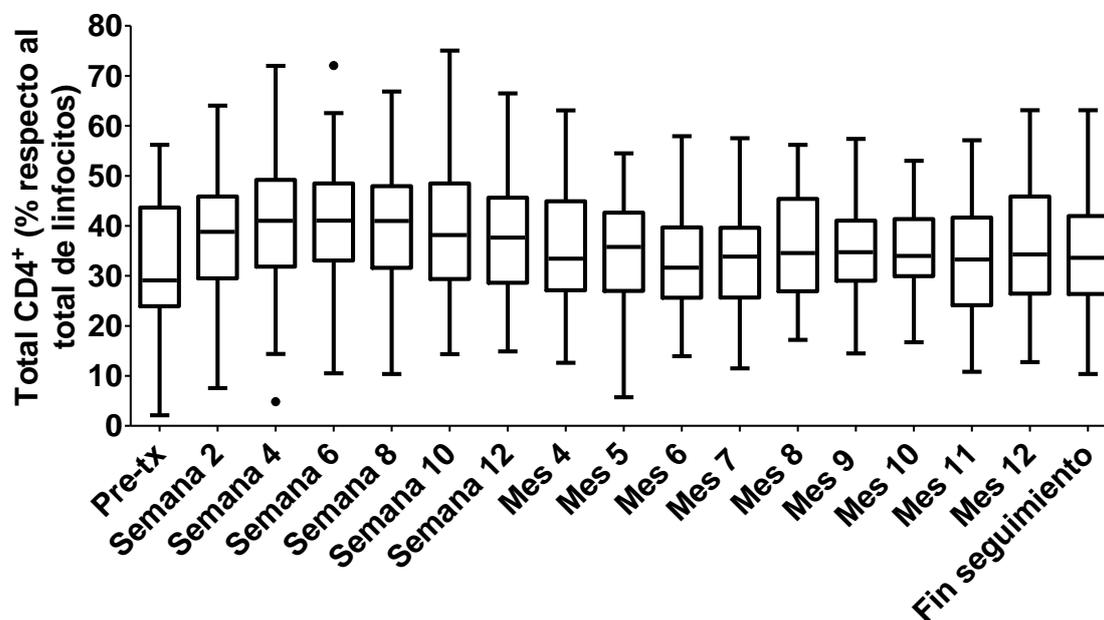
Se calculó también la mediana de células T  $CD4^+$  expresado en células/ $\mu$ l (Fig. 16) y el porcentaje de linfocitos  $CD4^+$  del total de linfocitos (Fig. 17) en aquellos pacientes en los que había muestra disponible en cada uno de los tiempos de seguimiento. Se observa una cierta tendencia, aunque no tan clara como en el caso de la

evolución del total de células T CD8<sup>+</sup>. En el caso de las células T CD4<sup>+</sup>, el aumento se produce de forma más acusada durante el primer mes, y los valores oscilan dentro de un rango constante durante el resto del seguimiento (461,2 células/ $\mu$ l RIQ 439,5 – 515,8 expresado como total de células CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l y 34,6%, RIQ 33,8 – 37,7 expresado como porcentaje de células CD4<sup>+</sup> sobre el total de linfocitos).

**Figura 16.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD4<sup>+</sup> expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.

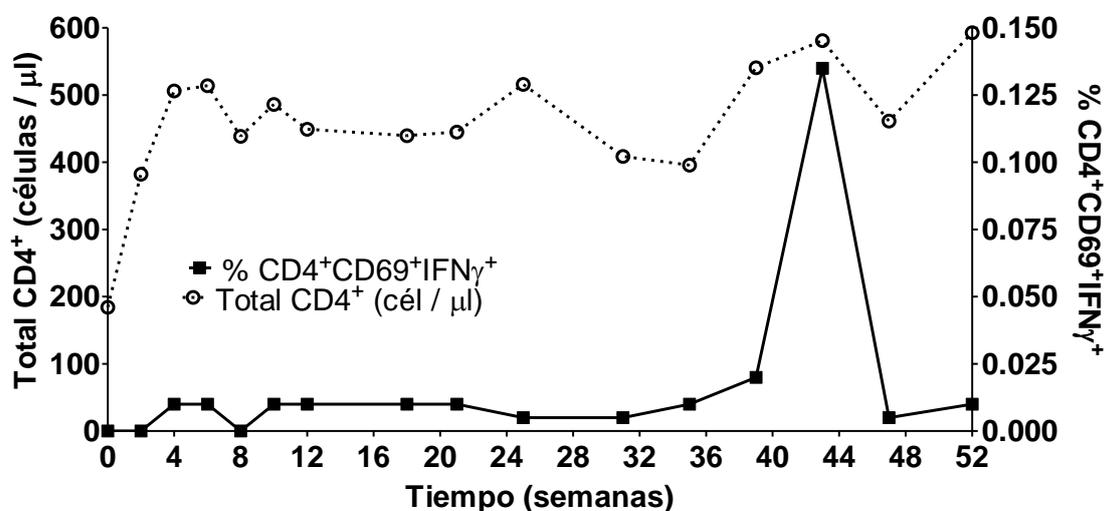


**Figura 17.** Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra la evolución del total de células T CD4<sup>+</sup> expresado como porcentaje del total de linfocitos a lo largo del seguimiento.



Como en el caso de CD8<sup>+</sup>, también se estudió la relación entre la subpoblación linfocitaria total de CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> específica de CMV a lo largo del seguimiento. El coeficiente de correlación  $\rho$  entre la subpoblación de células/ $\mu$ l CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> específicas de CMV fue de 0,021 ( $p = 0,574$ ). En este caso la relación no fue estadísticamente significativa (Fig. 18).

**Figura 18.** Comparación entre la mediana del porcentaje de células  $CD4^+$  específicas de CMV y el número total de células  $CD4^+$  expresado como células/ $\mu$ l a lo largo del seguimiento.

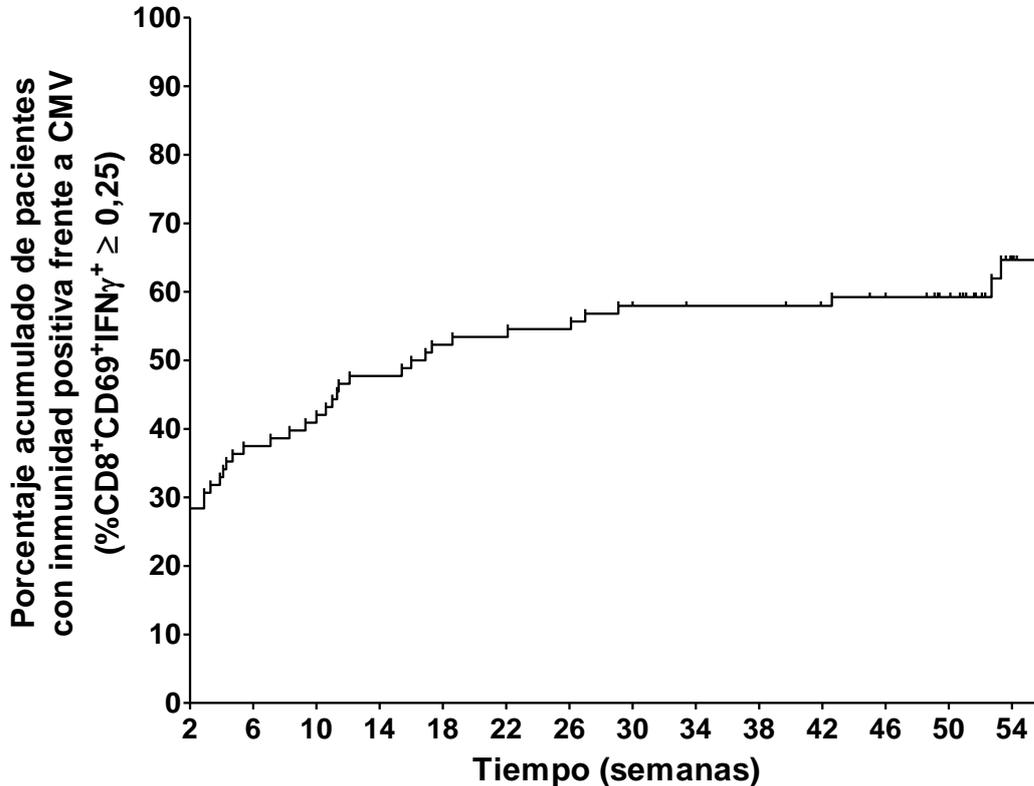


## 2.2. Cronología de la respuesta inmune celular específica considerando como inmunidad positiva el porcentaje de células $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ específicas de CMV $\geq 0,25$

Debido a la heterogeneidad temporal de la adquisición de células T específica frente CMV entre pacientes, se analizaron los datos de inmunidad en función de dos puntos de corte diferentes utilizados en estudios previamente publicados: 0,15% y 0,25%.

En la figura 19 se analiza la evolución del porcentaje acumulado de pacientes que adquieren inmunidad positiva frente a CMV ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) a lo largo del seguimiento. A las 2 semanas del trasplante, 25 pacientes (28,4%) tenían inmunidad positiva con una mediana de 0,485% (RIQ 0,28 – 0,85). Otros 29 pacientes (33%) desarrollaron inmunidad positiva a una mediana de 11,3 semanas desde el trasplante (RIQ 5,1 – 20,4) y con un valor mediano de  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de 0,43% (RIQ 0,31 – 0,61), mientras que 34 pacientes (38,6%) nunca alcanzaron inmunidad celular positiva al final del seguimiento (Fig. 19).

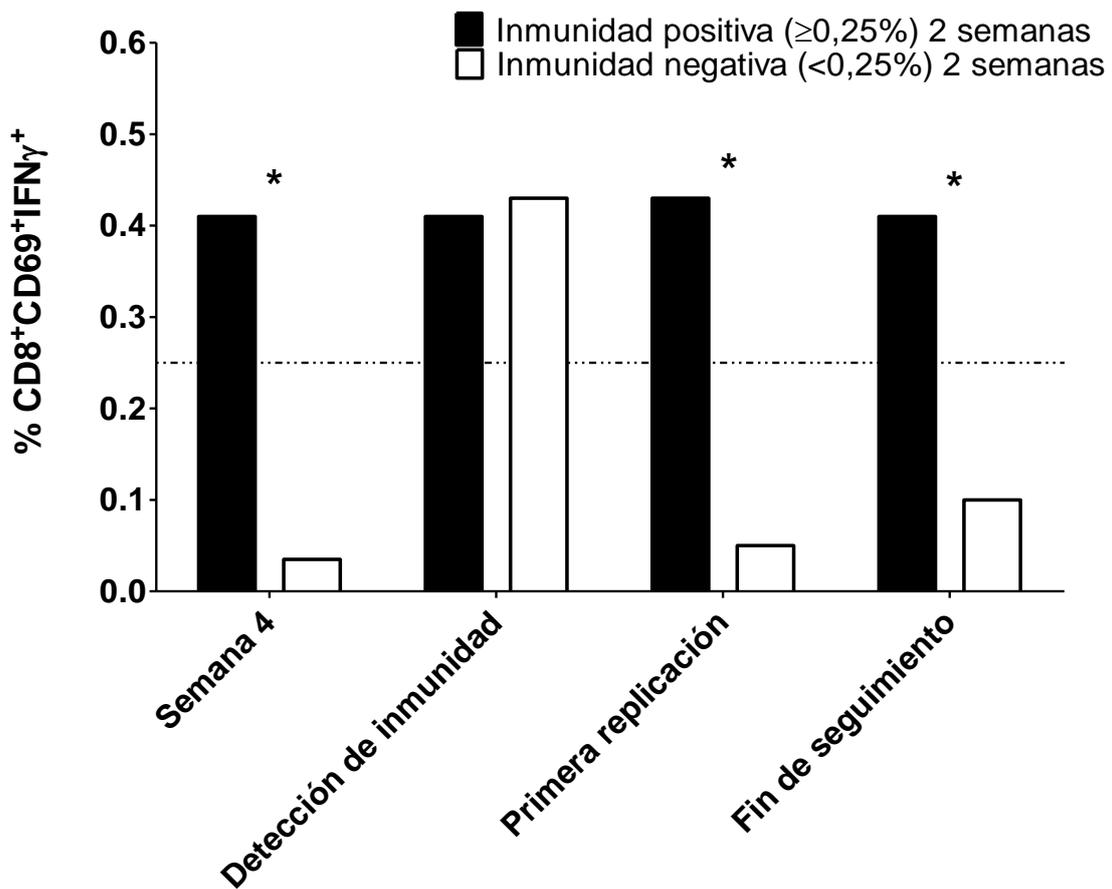
**Figura 19.** Evolución de la adquisición de la inmunidad celular específica de CMV en receptores de trasplante a partir de la segunda semana postrasplante con un punto de corte de  $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ .



*Tipo de análisis estadístico: Kaplan-Meier*

En la figura 20, se comparan los 25 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) en la semana 2 postrasplante frente a los 63 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25$ ) en la semana 2 postrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunoviroológico y respecto del porcentaje de células  $CD8^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . De esta manera, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva y los pacientes sin inmunidad en la semana 4 postrasplante: 0,41% (RIQ 0,32 – 1,02) vs. 0,035% (RIQ 0 – 0,22),  $p < 0,001$ ; antes del primer episodio de replicación: 0,43% (RIQ 0,32 – 0,76) vs. 0,05% (0,005 – 0,15),  $p = 0,006$ , y al final de seguimiento: 0,41% (RIQ 0,34 – 0,85) vs. 0,1% (0 – 0,61),  $p < 0,001$ .

**Figura 20.** Porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) a las 2 semanas postrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad. La línea discontinua indica un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,25\%$ , a partir del cual se considera la respuesta inmune como positiva.

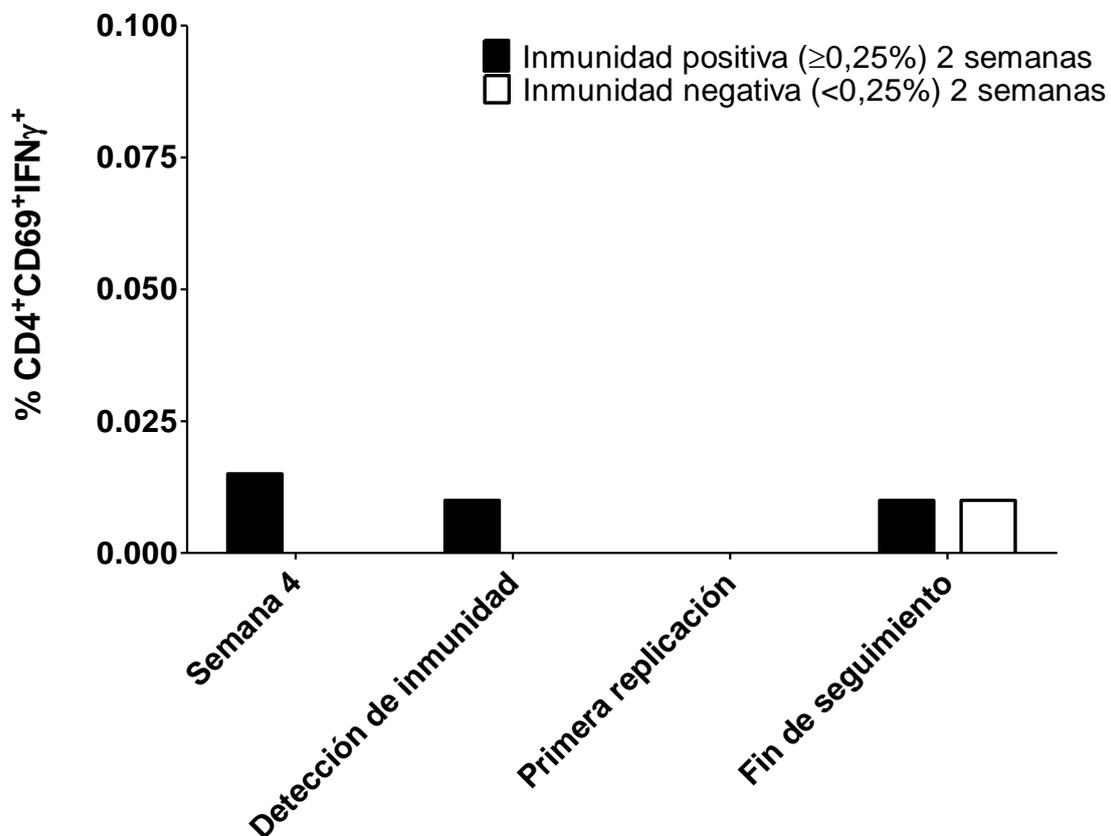


*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

En la figura 21, se comparan los 25 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) en la semana 2 postrasplante frente a los 63 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25$ ) en la semana 2 postrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunoviroológico, pero en esta ocasión respecto al porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva y los pacientes sin inmunidad en ninguno de los momentos del seguimiento analizados. El punto del seguimiento ‘Detección de la inmunidad’ se refiere al momento de detección de un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ , ya que en el caso del porcentaje de células  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  no se pudo determinar un punto de corte estadísticamente significativo debido probablemente a la heterogeneidad de la muestra y a la reducida respuesta encontrada.

**Figura 21.** Porcentaje mediano de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) a las 2 semanas postrasplante.



*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

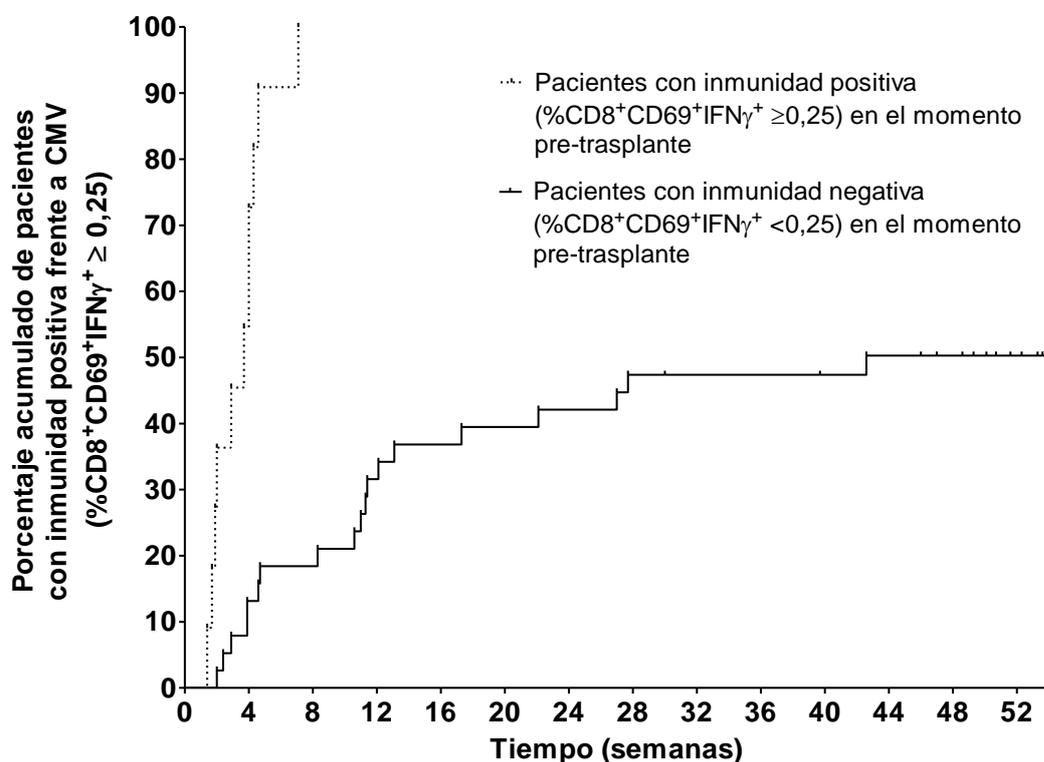
Como se ha mencionado previamente se hizo una modificación del protocolo planteado originalmente y se obtuvieron además muestras pretrasplante en un total de 49 pacientes.

De los 49 pacientes, 11 (22,4%) tuvieron inmunidad específica frente a CMV positiva (considerando el punto de corte  $\geq 0,25\%$ ) en la muestra pretrasplante con una mediana de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de 0,53% (RIQ 0,29 – 1,18). El 57,1% de los pacientes conservó la inmunidad positiva en la determinación realizada postrasplante en la semana 2 postrasplante. El 33,8% de los pacientes recuperó valores de porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  a la cuarta semana y el 9,1% de pacientes restantes en la semana 12.

De los 49 pacientes con muestra pretrasplante analizados, 38 (77,6%) pacientes tuvieron inmunidad específica frente a CMV negativa con un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25\%$ . De ellos, todos fueron negativos en la determinación realizada en la semana 2 postrasplante. El 50% consiguió una respuesta inmune específica positiva con una mediana de 0,38% (RIQ 0,28 – 0,64) en una mediana de tiempo de 11 semanas (RIQ 3,9 – 17,3) postrasplante. El otro 50% de pacientes no llegaron a alcanzar una respuesta inmune específica positiva, con un porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de 0,0% (0,0 – 0,0) a final de seguimiento (Fig. 22).

Los pacientes con inmunidad positiva pretrasplante tuvieron una probabilidad 5,7 veces mayor de tener inmunidad positiva a las 2 semanas postrasplante ( $p = 0,015$ , IC95% 1,64 – 19,96) y una probabilidad 5,8 veces mayor de tener inmunidad positiva a las 4 semanas del trasplante ( $p < 0,001$ , IC95% 2,70 – 12,28) que aquellos que carecían de inmunidad específica pretrasplante.

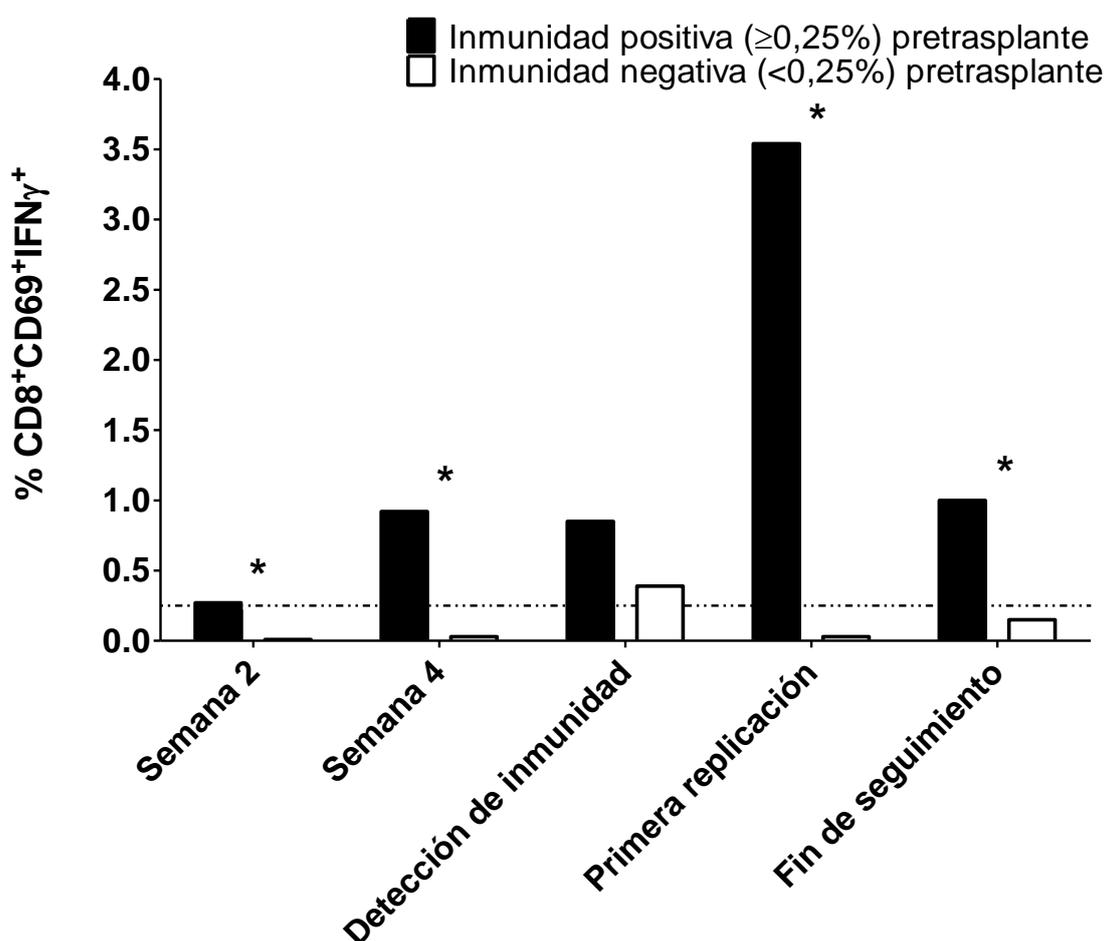
**Figura 22.** Evolución de la adquisición de la inmunidad celular específica postrasplante frente a CMV ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) en función de los datos de inmunidad celular específica pretrasplante.



*Tipo de análisis estadístico: Kaplan-Meier*

En la figura 23 se comparan los 11 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) en el momento pretrasplante frente a los 38 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25$ ) en el momento pretrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunovirológico y respecto al porcentaje de células  $CD8^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . De esta manera, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva pretrasplante y los pacientes sin inmunidad pretrasplante en la semana 2 después del trasplante: 0,27% (RIQ 0,14 – 0,85) vs. 0,01% (RIQ 0 – 0,085),  $p = 0,002$ ; en la semana 4 postrasplante: 0,92% (RIQ 0,38 – 1,29) vs. 0,03% (RIQ 0 – 0,13),  $p < 0,001$ ; antes del primer episodio de replicación: 3,54% (RIQ 0,43 – 6,65) vs. 0,03% (0 – 0,07),  $p = 0,022$ , y al final de seguimiento: 1,0% (RIQ 0,79 – 2,18) vs. 0,15% (0 – 0,76),  $p < 0,001$ .

**Figura 23.** Porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) pretrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad. La línea discontinua indica un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,25\%$ , a partir del cual se considera la respuesta inmune como positiva.

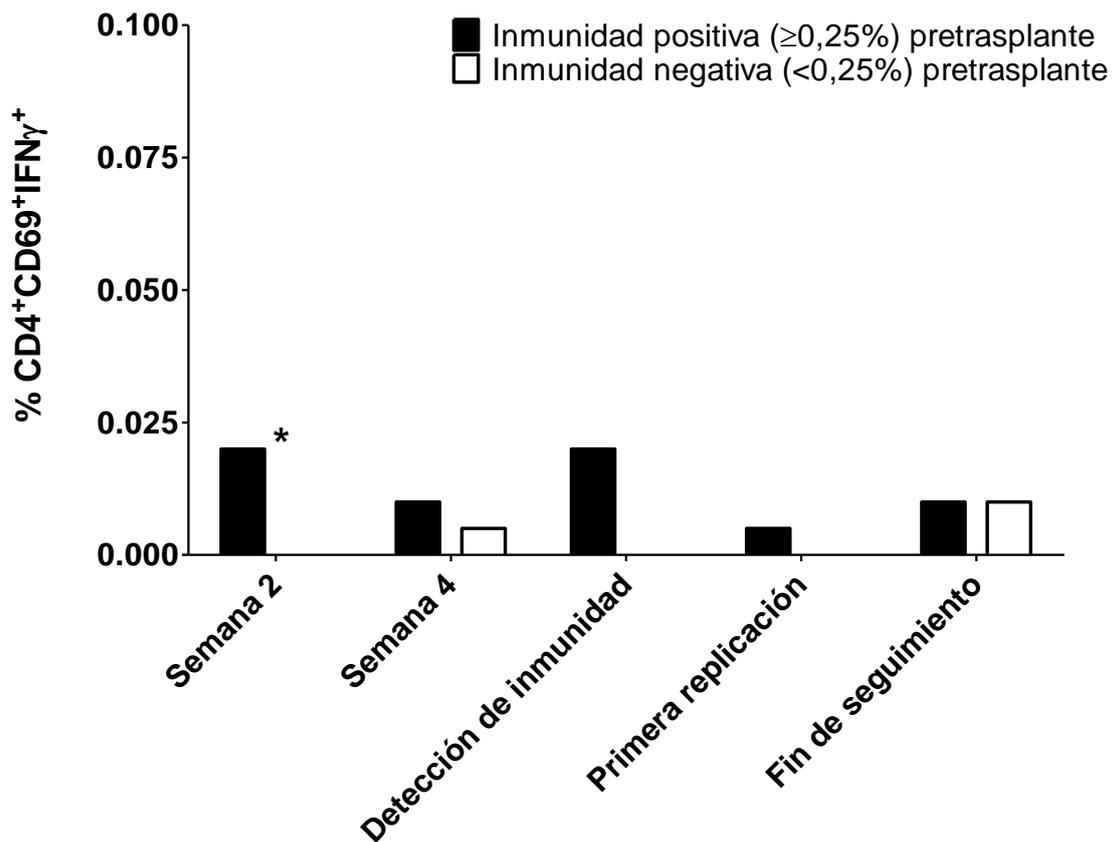


Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney

En la figura 24, se comparan los 11 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) en el momento pretrasplante frente a los 38 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,25$ ) en el momento pretrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunoviroológico, pero en este caso respecto al porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . De esta

manera, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva pretrasplante y los pacientes sin inmunidad pretrasplante en la semana 2 después del trasplante: 0,02% (RIQ 0 – 0,1) vs. 0% (RIQ 0 – 0,01),  $p = 0,015$ . Al igual que antes, el punto del seguimiento ‘Detección de la inmunidad’ se refiere al momento de detección de un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ , ya que en el caso del porcentaje de células  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  no se pudo determinar un punto de corte estadísticamente significativo debido, probablemente, a la heterogeneidad de la muestra y a la reducida respuesta encontrada.

**Figura 24.** Porcentaje mediano de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ ) pretrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad.

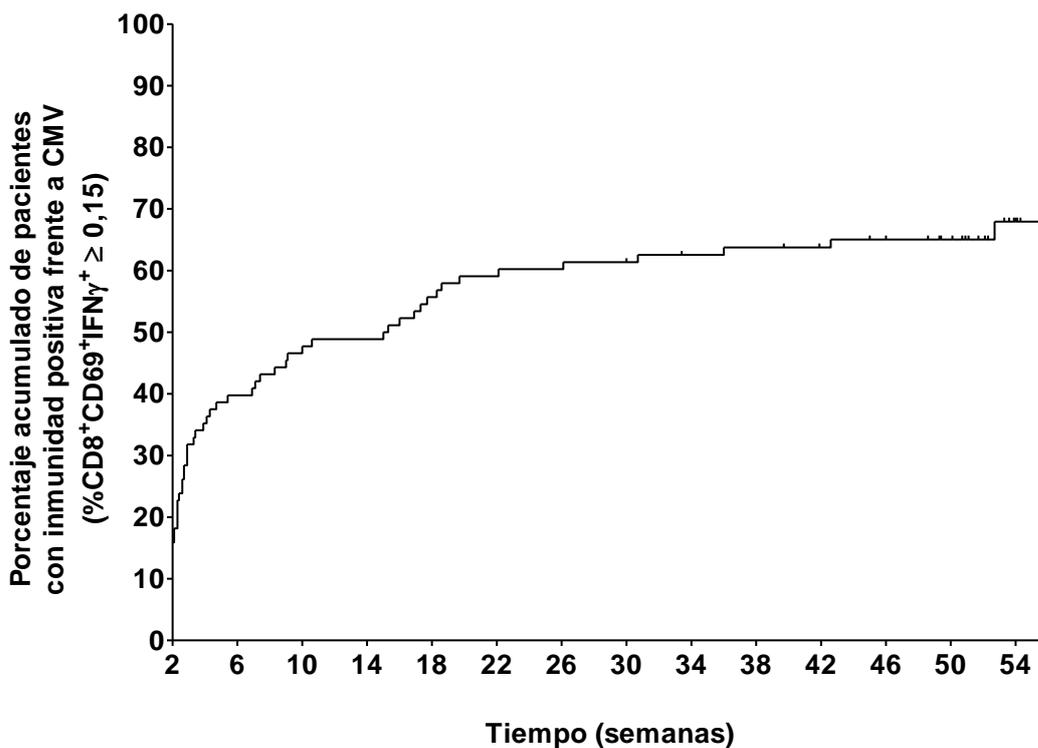


Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney

### 2.3. Cronología de la respuesta inmune celular específica considerando como inmunidad positiva el porcentaje de células $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ específicas de CMV $\geq 0,15$

En la figura 25 se analiza la evolución del porcentaje acumulado de pacientes que adquieren inmunidad positiva frente a CMV ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) a lo largo del seguimiento. A las 2 semanas del trasplante, 27 pacientes (30,7%) tenían inmunidad celular positiva específica de CMV con una mediana de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de 0,41% (RIQ 0,27 – 0,83). Otros 31 pacientes (35,2%) desarrollaron inmunidad celular positiva con una mediana de 10,6 semanas desde el trasplante (RIQ 5,4 – 18,6), y un porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de 0,26% (RIQ 0,20 – 0,42), mientras que 30 pacientes (34,1%) nunca alcanzaron inmunidad celular positiva al final del seguimiento (Fig. 25).

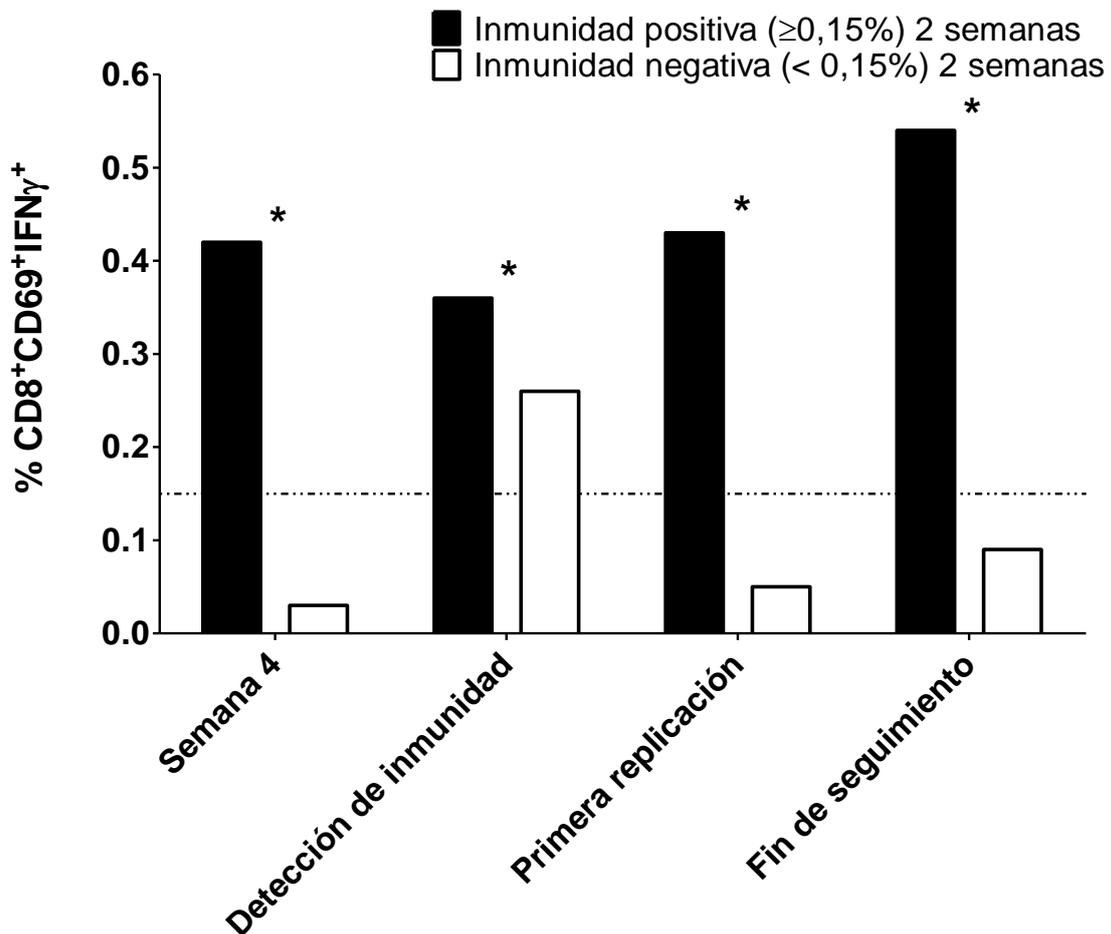
**Figura 25.** Evolución de la adquisición de inmunidad celular específica de CMV en receptores de trasplante a partir de la segunda semana postrasplante con un punto de corte de  $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ .



*Tipo de análisis estadístico: Kaplan-Meier*

En la figura 26 se comparan los 27 pacientes con inmunidad positiva (%CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq$ 0,15) en la semana 2 postrasplante frente a los 61 que no presentaban inmunidad positiva (%CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,15) en la semana 2 postrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunoviológico y respecto al porcentaje de células CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$ . De esta manera, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva y los pacientes sin inmunidad en la semana 4 postrasplante: 0,42% (RIQ 0,33 – 0,94) vs. 0,03% (RIQ 0 – 0,16),  $p < 0,001$ ; en el momento de detección de inmunidad: 0,36% (RIQ 0,28 – 0,83) vs. 0,26% (RIQ 0,2 – 0,42),  $p = 0,024$ ; antes del primer episodio de replicación: 0,43% (RIQ 0,32 – 0,76) vs. 0,05% (0,005 – 0,15),  $p = 0,006$ , y al final de seguimiento: 0,54% (RIQ 0,36 – 2,17) vs. 0,09% (0 – 0,57),  $p < 0,001$ .

**Figura 26.** Porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) a las 2 semanas postrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad. La línea discontinua indica un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,15\%$ , a partir del cual se considera la respuesta inmune como positiva.

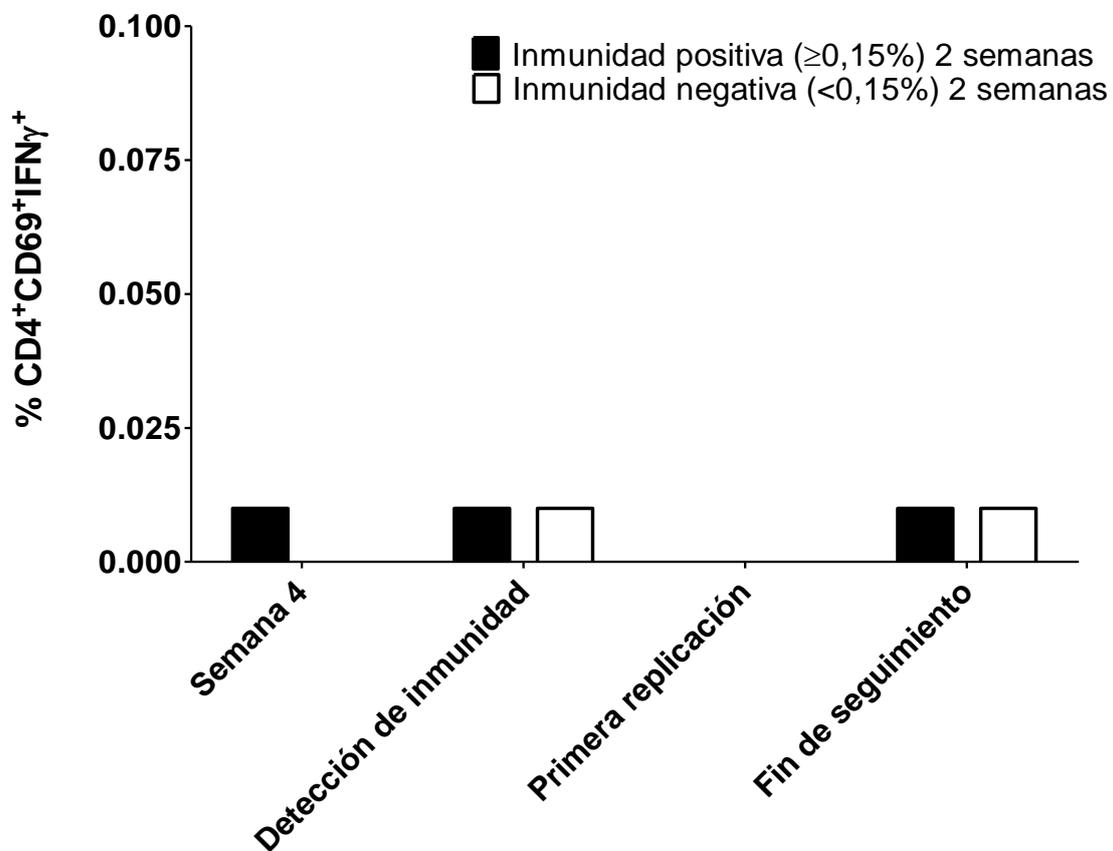


*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

En la figura 27, se comparan los 27 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) en la semana 2 postrasplante frente a los 61 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15$ ) en la semana 2 postrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunovirológico, pero en esta ocasión respecto al porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva y los pacientes sin inmunidad en ninguno de los momentos del seguimiento analizados. El punto del seguimiento ‘Detección de la inmunidad’ se refiere al momento de detección de un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15\%$ , ya que en el caso del porcentaje de células  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  no se pudo determinar un punto de corte estadísticamente significativo debido probablemente a la heterogeneidad de la muestra y a la reducida respuesta encontrada.

**Figura 27.** Porcentaje mediano de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) a las 2 semanas postrasplante.



*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

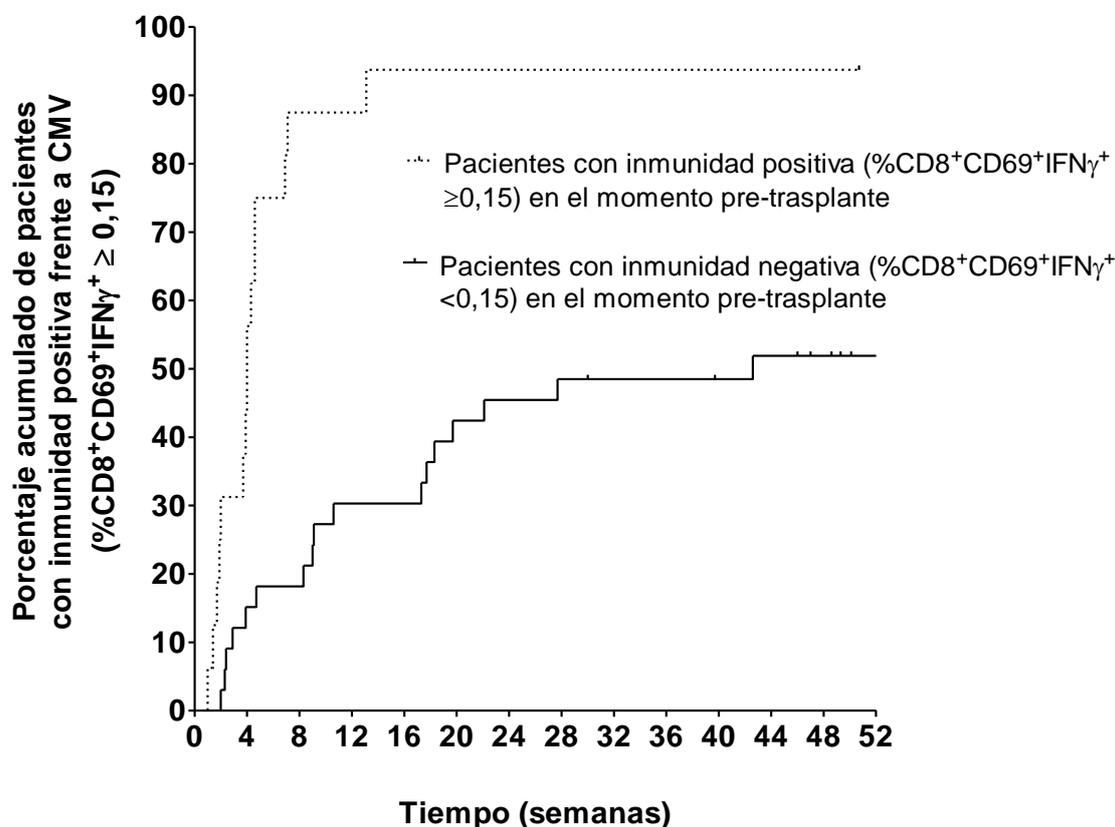
Al analizar los 49 pacientes con muestras pretrasplante, 16 (32,7%) pacientes tuvieron inmunidad específica frente a CMV positiva (considerando el punto de corte de

$\geq 0,15\%$ ) en la muestra pretrasplante con una mediana de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de  $0,33\%$  (RIQ  $0,22 - 0,97$ ). El  $50\%$  de los pacientes conservó la inmunidad positiva en la determinación realizada en la semana 2 postrasplante. El  $25\%$  de los pacientes recuperó valores de porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15\%$  a la cuarta semana y el  $18,8\%$  de pacientes en la semana 13,1. El  $6,3\%$  restante nunca alcanzaron inmunidad celular positiva al final del seguimiento.

De los 49 pacientes con muestra pretrasplante analizados, 33 ( $67,3\%$ ) pacientes tuvieron inmunidad específica frente a CMV negativa con un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15\%$  en el momento pretrasplante. El  $51,5\%$  consiguió una respuesta inmune específica positiva a una mediana de 9,1 semanas (RIQ  $3,4 - 19,0$ ) desde el trasplante y con una mediana de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de  $0,26\%$  (RIQ  $0,21 - 0,66$ ) (Fig. 28). El otro  $48,5\%$  de pacientes no llegaron a alcanzar una respuesta inmune específica positiva, con un porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  de  $0,0\%$  ( $0,0 - 0,0$ ) a final de seguimiento (Fig. 28).

Los pacientes con inmunidad positiva pretrasplante tuvieron una probabilidad  $3,38$  veces mayor de tener inmunidad positiva a las 2 semanas postrasplante ( $p = 0,041$ , IC95%  $1,13 - 10,1$ ) y una probabilidad  $3,54$  veces mayor de tener inmunidad positiva a las 4 semanas del trasplante ( $p < 0,001$ , IC95%  $1,73 - 7,23$ ) que aquellos que carecían de inmunidad específica pretrasplante.

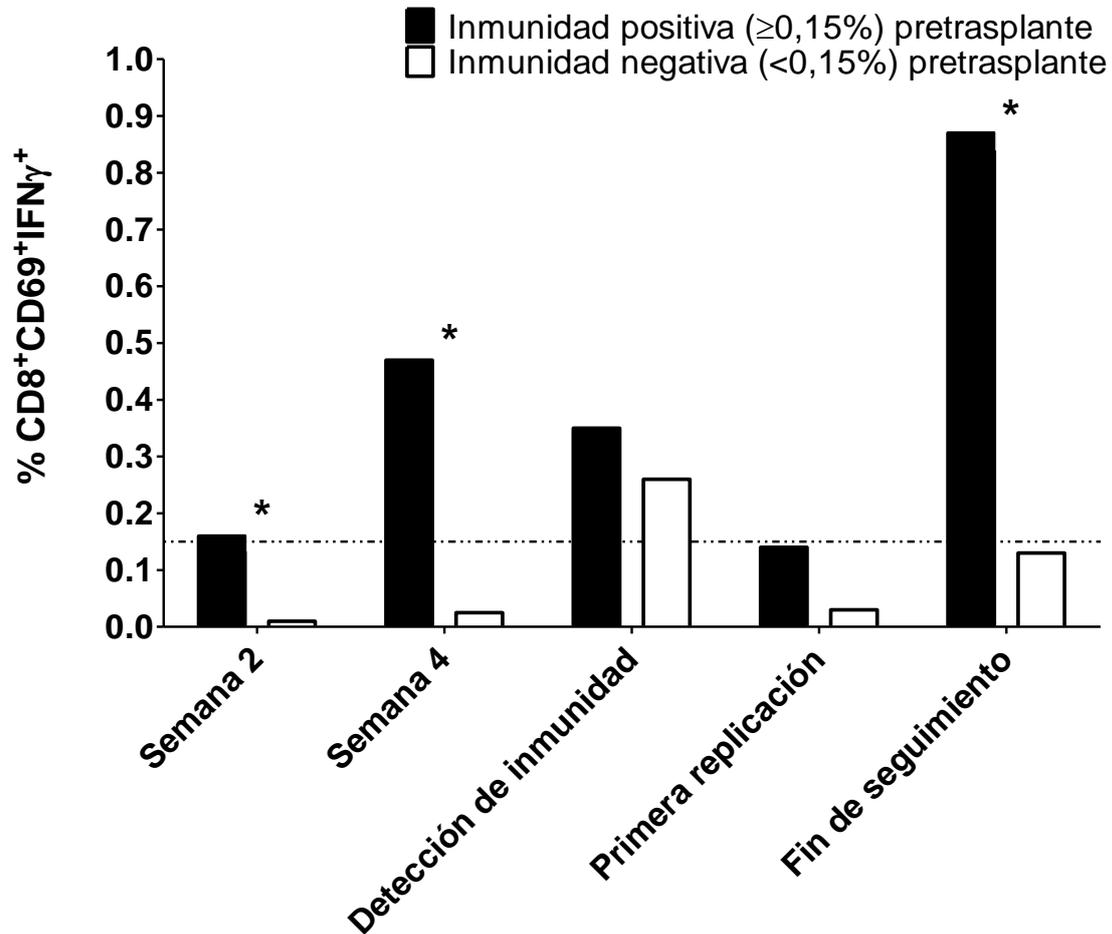
**Figura 28.** Evolución de la adquisición de inmunidad celular específica postrasplante frente a CMV ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) en función de los datos de inmunidad celular específica pretrasplante.



*Tipo de análisis estadístico: Kaplan-Meier*

En la figura 29 se comparan los 16 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) en el momento pretrasplante frente a los 33 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15$ ) en el momento pretrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunovirológico y respecto al porcentaje de células  $CD8^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . De esta manera, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva pretrasplante y los pacientes sin inmunidad pretrasplante en la semana 2 después del trasplante: 0,16% (RIQ 0,075 – 0,61) vs. 0,01 (RIQ 0 – 0,058),  $p = 0,005$ ; en la semana 4 postrasplante: 0,47% (RIQ 0,28 – 0,93) vs. 0,025% (RIQ 0 – 0,12),  $p < 0,001$ , y al final de seguimiento: 0,87% (RIQ 0,46 – 1,9) vs. 0,13% (RIQ 0 – 0,77),  $p = 0,002$ .

**Figura 29.** Porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) pretrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad. La línea discontinua indica un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,15\%$ , a partir del cual se considera la respuesta inmune como positiva.

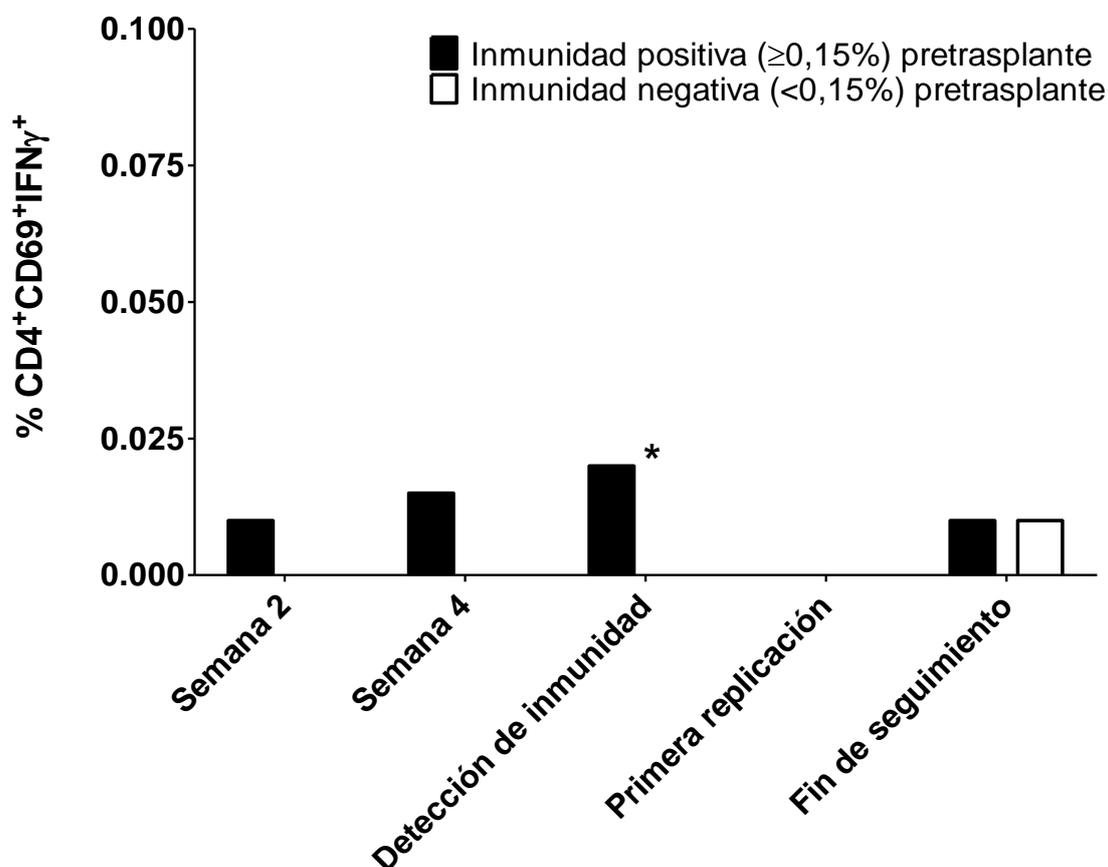


*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

En la figura 30 se comparan los 16 pacientes con inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) en el momento pretrasplante frente a los 33 que no presentaban inmunidad positiva ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15$ ) en el momento pretrasplante, a diferentes puntos destacados del seguimiento inmunovirológico, pero en este caso respecto al porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  productoras de  $IFN\gamma$ . De esta

manera, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con inmunidad positiva pretrasplante y los pacientes sin inmunidad pretrasplante en el momento de detección de la inmunidad: 0,02% (RIQ 0 – 0,1) vs. 0% (RIQ 0 – 0,01),  $p = 0,007$ . Como se explicó antes, el punto del seguimiento ‘Detección de la inmunidad’ se refiere al momento de detección de un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ , ya que en las células  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  no se pudo determinar un punto de corte estadísticamente significativo debido, probablemente, a la heterogeneidad de la muestra y a la reducida respuesta encontrada.

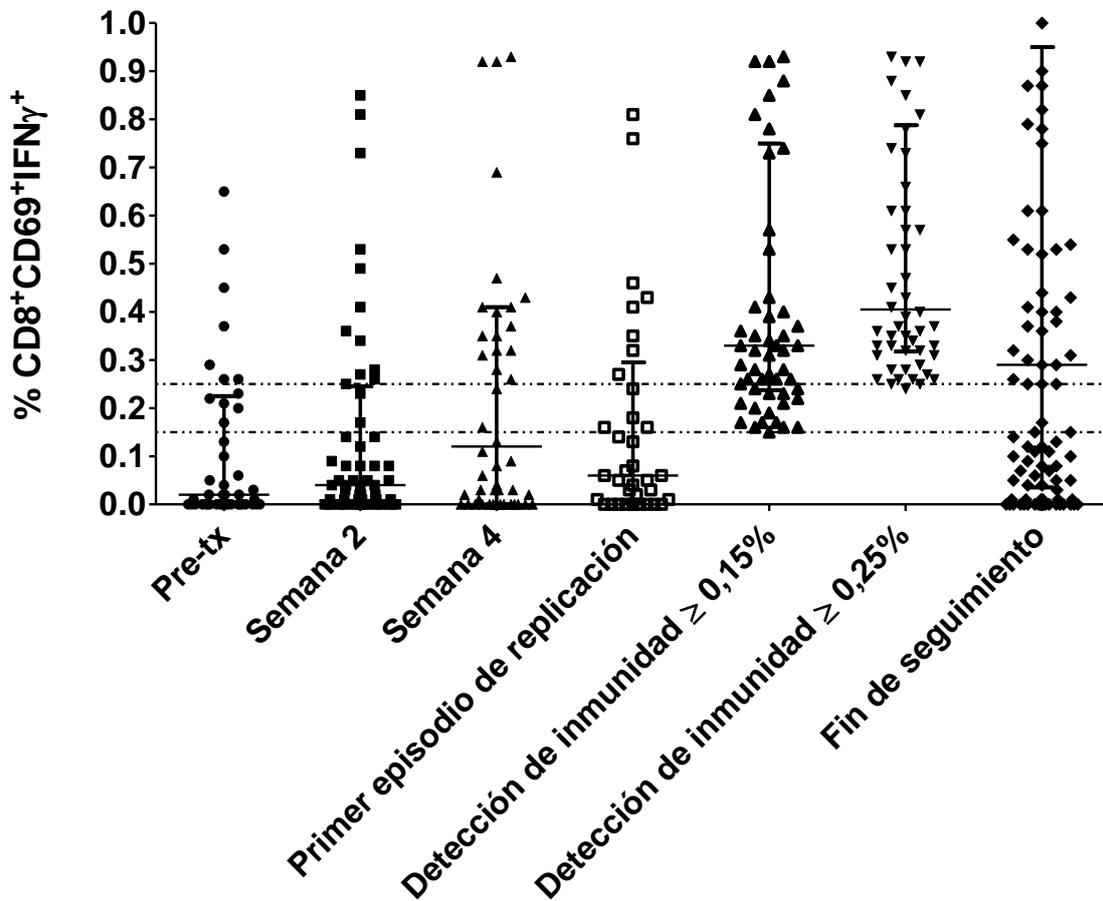
**Figura 30.** Porcentaje mediano de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados en función de los datos de inmunidad celular ( $\%CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15$ ) pretrasplante. Los asteriscos indican los hitos en los que existen diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes con y sin inmunidad.



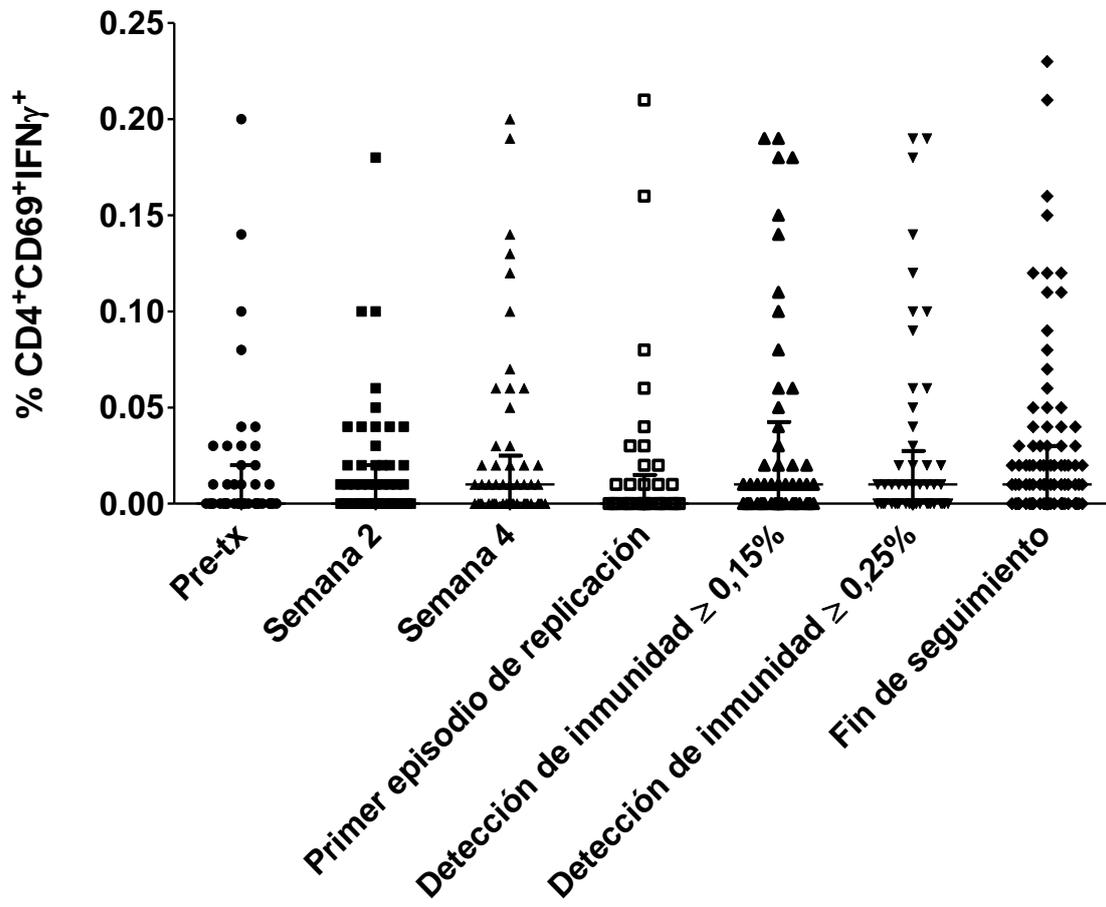
Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney

A modo resumen, en las figuras 31 y 32 se pueden observar los hitos más destacados para las respuestas inmunes  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  y  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ , respectivamente, para todos los pacientes con muestra disponible.

**Figura 31.** Porcentaje de células  $CD8^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados. Las líneas discontinuas indican un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ = 0,25\%$  y  $0,15\%$ , respectivamente, a partir de los cuales se consideran las respuestas inmunes como positivas según el punto de corte establecido.



**Figura 32.** Porcentaje de células  $CD4^+CD69^+$  que secretan  $IFN\gamma$  en respuesta a la estimulación in vitro por CMV en los principales hitos indicados.



#### **2.4. Punto de corte de 0,15 en la semana 2 como predictor del punto de corte de 0,25 en la semana 4 postrasplante**

Se analizaron 88 pacientes con datos de inmunidad en las semanas 2 y 4 postrasplante. De los 27 pacientes con inmunidad positiva en la segunda semana considerando el punto de corte  $\geq 0,15\%$ , 26 (96,3%) tuvieron valores de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  en la determinación de las cuatro semanas postrasplante. Sin embargo, de los 61 (69,3%) pacientes con inmunidad negativa en la segunda semana considerando el punto de corte  $\geq 0,15\%$ , sólo 6 (9,8%) tuvieron valores de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$  a las 4 semanas ( $p < 0,001$ ). Además, mientras que a las 2 semanas postrasplante sólo el 57,1% de los pacientes conservó la inmunidad positiva pretrasplante ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ ), a las 4 semanas la conservó el 90,9% de los pacientes. En cambio, cuando se tiene en cuenta un punto de corte para la inmunidad de  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15\%$ , sólo el 50% de los pacientes conservó la inmunidad positiva pretrasplante en la semana 2 postrasplante, llegando a recuperarlo el 75% de los pacientes en la semana 4.

Estos datos indican que un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15\%$  a las 2 semanas es un predictor de conseguir 0,25% a las 4 semanas postrasplante.

### **3. Relación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV con el desarrollo de infección por CMV en los receptores de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por CMV**

#### **3.1. Relación de la respuesta de células T frente a CMV con el nivel de replicación e indicación de tratamiento anticipado**

En la muestra pretrasplante, el porcentaje mediano de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  no fue significativamente diferente en los pacientes que no desarrollaron infección por CMV en el postrasplante comparados con los pacientes que sí tuvieron infección: 0,035% (RIQ 0 – 0,35) vs. 0,02% (RIQ 0 – 0,135),  $p = 0,406$ .

De la misma forma, tampoco se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  determinado en la muestra pretrasplante entre los pacientes que aclararon la infección por CMV espontáneamente sin necesidad

de tratamiento antiviral, y aquellos en los que se indicó la administración de tratamiento antiviral: 0,02% (RIQ 0 – 0,275) vs. 0,005% (RIQ 0 – 0,55),  $p = 0,24$ .

No hubo diferencias en el porcentaje de células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  determinado en la muestra pretrasplante entre los pacientes que desarrollaron replicación y los que no: 0% (RIQ 0 – 0,015) vs. 0% (RIQ 0 – 0,033),  $p = 0,322$ , o entre pacientes que aclararon espontáneamente los episodios de infección y a los que se indicó tratamiento anticipado: 0% (RIQ 0 – 0,025) vs. 0% (RIQ 0 – 0,025),  $p = 0,826$ .

En pacientes que no desarrollaron viremia en el postrasplante, el recuento linfocitario pretrasplante fue de 108,3 células  $CD8^+/\mu l$  (RIQ 38,3 – 275,8) y de 214,4 células  $CD4^+/\mu l$  (102,2 – 524,3), mientras que en aquellos que desarrollaron viremia fue de 63,3 células  $CD8^+/\mu l$  (RIQ 31,6 – 291,4) y 132,9 células  $CD4^+/\mu l$  (RIQ 76,1 – 445,1), con valores de  $p$  no significativos de 0,403 y 0,298, respectivamente.

Cuando se compararon los niveles de células  $CD8^+$  y  $CD4^+$  pretrasplante en pacientes que recibieron y que no recibieron tratamiento anticipado se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de la subpoblación de linfocitos  $CD8^+$ , la mediana del valor pretrasplante en los pacientes que aclararon espontáneamente la infección o no replicaron fue de 121,8 cél/ $\mu l$  (RIQ 43,3 – 305,4), mientras que en los pacientes en los que se indicó tratamiento anticipado fue significativamente menor: 43,6 cél/ $\mu l$  (RIQ 25,8 – 75,9),  $p = 0,014$ . Del mismo modo, los valores medianos de linfocitos  $CD4^+$  pretrasplante en los pacientes que aclararon espontáneamente la infección fue de 223,4 cél/ $\mu l$  (RIQ 104,4 – 652,1), mientras que en los pacientes en los que se indicó tratamiento fue significativamente menor: 128,9 cél/ $\mu l$  (RIQ 72,1 – 177,5),  $p = 0,032$ .

De la misma manera, se compararon las respuestas de las células T  $CD8^+$  y  $CD4^+$  específicas frente a CMV, así como el recuento linfocitario de cada subpoblación, a las dos y a las cuatro semanas del trasplante respecto de los pacientes con y sin replicación postrasplante (Tabla 16) y respecto a aquéllos con y sin indicación de tratamiento anticipado (Tabla 17), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes.

**Tabla 16.** Porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, así como subpoblaciones linfocitarias de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> expresados en células/ $\mu$ l, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante de los pacientes que desarrollan o no infección por CMV durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con episodios de replicación, N=54</b>	<b>Pacientes sin episodios de replicación, N=52</b>	<b>P</b>
<b>% CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	0,05 (0 – 0,2)	0,03 (0 – 0,25)	0,917
<b>% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	0 (0 – 0,01)	0,01 (0 – 0,04)	0,050
<b>Total CD8<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	188,4 (114,2 – 295,3)	158,4 (73,6 – 287,6)	0,694
<b>Total CD4<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	419,7 (236,2 – 839,1)	341,5 (203,5 – 651,3)	0,334
<b>% CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	0,095 (0 – 0,39)	0,185 (0,01 – 0,46)	0,420
<b>% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	0 (0 – 0,02)	0,01 (0 – 0,035)	0,317
<b>Total CD8<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	220,8 (72,2 – 284,4)	253,9 (154,4 – 401,9)	0,140
<b>Total CD4<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	507,8 (301,5 – 835,8)	488,9 (315,5 – 898,9)	0,791

*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

**Tabla 17.** Porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, así como subpoblaciones linfocitarias de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> expresados en células/ $\mu$ l, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante de los pacientes en función de la indicación de tratamiento durante el seguimiento.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con tratamiento, N=32</b>	<b>Pacientes sin tratamiento, N=74</b>	<b>P</b>
<b>% CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	0,04 (0,005 – 0,1)	0,04 (0 – 0,27)	0,790
<b>% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	0 (0 – 0,01)	0,01 (0 – 0,02)	0,055
<b>Total CD8<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	188,4 (91,2 – 352,4)	172,9 (103,5 – 277,9)	0,812
<b>Total CD4<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 2 semanas, mediana (RIQ)</b>	462,8 (276,2 – 888,9)	345,2 (210,9 – 673,9)	0,175
<b>% CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	0,08 (0 – 0,41)	0,185 (0,02 – 0,44)	0,274
<b>% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN<math>\gamma</math><sup>+</sup> a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	0,01 (0 – 0,06)	0,01 (0 – 0,02)	0,546
<b>Total CD8<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	213,1 (64,8 – 267,1)	255,4 (155,9 – 397,7)	0,073
<b>Total CD4<sup>+</sup> (cél/<math>\mu</math>l) a las 4 semanas, mediana (RIQ)</b>	439,5 (308,9 – 900,6)	507,8 (311,9 – 857,2)	0,990

*Tipo de análisis estadístico: U de Mann-Whitney*

Resulta interesante el hecho de que durante los 3 primeros meses la población de células T CD8<sup>+</sup> totales es mayor en el grupo de pacientes que no replica. A partir del cuarto mes, la población de CD8<sup>+</sup> totales se mantiene constante en el grupo que no replica, mientras que en el grupo de pacientes que sí replica el número total de linfocitos T CD8<sup>+</sup> aumenta progresivamente mes a mes, siendo las diferencias entre ambos grupos de pacientes estadísticamente significativas en los meses 9 y 10.

### **3.2. Valoración de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV como factor de riesgo de enfermedad por CMV en los pacientes evaluables de bajo riesgo**

Aunque debido al reducido tamaño de la población no se pudieron realizar análisis bivalente ni multivalente para estudiar la relación entre la enfermedad por CMV y la inmunidad específica frente a CMV de células T, todos los casos de infección sintomática ocurrieron en pacientes sin inmunidad celular específica frente a CMV con porcentajes de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en un rango entre 0% – 0,06%.

### **3.3. Definición de un umbral de respuesta inmune específica de células T frente a CMV con efecto terapéutico a partir del cual el paciente de bajo riesgo por enfermedad puede controlar espontáneamente la viremia por CMV**

#### **3.3.1. Determinación del umbral mediante curvas ROC**

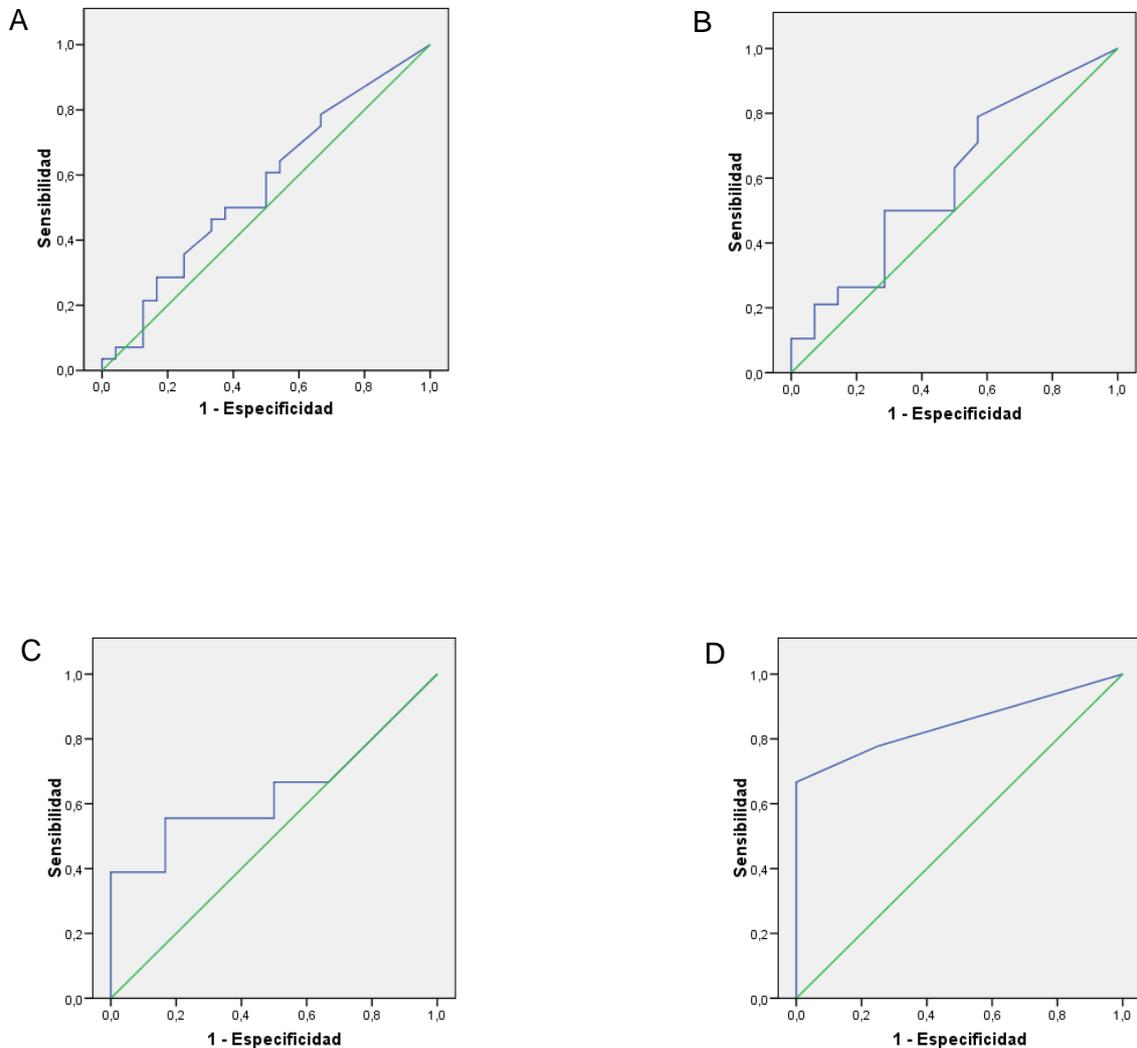
Para determinar un umbral de respuesta inmune celular específica frente a CMV predictor de viremia tras el trasplante se llevaron a cabo una serie de curvas ROC. Se probó la respuesta inmune de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  a diferentes tiempos del seguimiento inmunovirológico (pretrasplante, semana 2 postrasplante, semana 4 y final de seguimiento) como predictor de desarrollar viremia. La curva con mayor área bajo la curva (AUC = 0,565) se obtuvo con la respuesta inmune de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en la semana 4 postrasplante (Fig. 33A).

Cuando se tomó como variable resultado la indicación de tratamiento anticipado (debido a que se trata de una variable resultado del control espontáneo de la viremia por CMV), la curva con mayor área bajo la curva (AUC = 0,6) se obtuvo con la respuesta inmune de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en la semana 4 postrasplante (Fig. 33B).

Así pues, la determinación de un punto de corte para la respuesta inmune celular específica en función de la indicación de tratamiento anticipado o la viremia a partir de una curva ROC no fue posible, ya que el área bajo la curva obtenida fue menor a 0,7, que es el límite para considerar una prueba diagnóstica estadísticamente buena.

En base a estos resultados, se realizó la curva ROC separando la población por tipo de trasplante. Debido al pequeño número de trasplantes cardíacos y hepato-renales realizados e incluidos en la cohorte estudiada no se pudieron analizar los datos de inmunidad y tratamiento aislados. En el grupo de trasplante renal, se obtuvo una AUC de 0,6 para la respuesta inmune de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en el momento pretrasplante (Fig. 33C), mientras que en el grupo de trasplante hepático el AUC fue de 0,847 para la respuesta inmune de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en la semana 4 postrasplante (Fig. 33D).

**Figura 33.** Curvas ROC de la respuesta inmune celular específica frente a CMV (porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>). **A.** Curva ROC de todos los pacientes trasplantados (N=106) del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en la semana 4 postrasplante frente a la viremia. **B.** Curva ROC de todos los pacientes trasplantados (N=106) del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en la semana 4 postrasplante frente a la indicación de tratamiento. **C.** Curva ROC de los pacientes trasplantados renales (N=54) del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en el momento pretrasplante frente a la indicación de tratamiento. **D.** Curva ROC de los pacientes trasplantados hepáticos (N=46) del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en la semana 4 postrasplante frente a la indicación de tratamiento.



Debido a que no se pudo determinar, en base al análisis realizado, un punto de corte de inmunidad celular específica con valores óptimos de sensibilidad y especificidad con un valor predictivo negativo suficientemente alto como para poderlo aplicar en la práctica clínica, el resto de análisis realizado en la cohorte se llevó a cabo utilizando los dos puntos de corte de porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> de 0,15 y 0,25% utilizados en estudios previamente publicados.

### **3.3.2. Relación entre la respuesta inmune de células T específica (utilizando el punto de corte de $\geq 0,25\%$ ) y la infección por CMV**

#### **3.3.2.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,25%**

En primer lugar, se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo de viremia de CMV en el grupo de pacientes con muestra pretrasplante. De los 49 pacientes, 11 (22,4%) tenían inmunidad de células T específica de CMV (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,25\%$ ), frente a los 38 (77,6%) que no tenían (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $< 0,25\%$ ) en el momento pretrasplante. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de pacientes que desarrollaron viremia, que fue del 18,2% en pacientes con inmunidad y del 50% en pacientes sin inmunidad (RR 0,36 IC95% 0,09 – 1,33, p = 0,087). Esta diferencia fue similar cuando se comparó la proporción de pacientes que desarrollaron viremias por encima de 2000 UI/ml, que fue del 0% en pacientes con inmunidad y del 26,3% en pacientes sin inmunidad (p = 0,090). El número de episodios de replicación fue significativamente menor en los pacientes con inmunidad que en pacientes sin inmunidad pretrasplante: 0 (0 – 1) vs. 0,5 (0 – 3), p = 0,045. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la duración de la viremia en pacientes con y sin inmunidad: 32  $\pm$  35,4 días y 34  $\pm$  19,4 días, p = 0,472; en las cargas virales picos: 370,5 UI/ml (RIQ 271 - 470) y 2857 (RIQ 386 - 4186) en pacientes con y sin inmunidad (p = 0,151). Para analizar la relación entre el umbral de 0,25% y el aclaramiento espontáneo de la viremia por CMV sin necesidad de tratamiento, se tomó como variable resultado la indicación de tratamiento anticipado. Mientras que el 31,6% de los pacientes sin inmunidad celular específica pretrasplante requirieron tratamiento anticipado, ningún de los paciente con inmunidad celular

específica pretrasplante recibió tratamiento anticipado ( $p = 0,045$ ). O lo que es lo mismo, todos los pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV con un porcentaje de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  específicas frente a CMV  $\geq 0,25$  controlaron espontáneamente los episodios de infección por CMV, bien porque no llegaron a tener viremia o no fue detectada en las visitas de seguimiento o bien porque si desarrollaron viremias fueron capaces de controlarla sin necesidad de recibir tratamiento antiviral. Por último, los 3 episodios de enfermedad detectados ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 18).

**Tabla 18.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular pretrasplante específica frente a CMV, considerando como punto de corte 0,25%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=11</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=38</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección por CMV, n (%)</i></b>	2 (18,2%)	19 (50,0%)	0,087
<b><i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i></b>	0 (0%)	10 (26,3%)	0,090
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 1)	0,5 (0 – 3)	0,045
<b><i>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i></b>	32,0 $\pm$ 35,4	34,0 $\pm$ 19,4	0,472
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	370 (271 - 470)	2857 (386 – 4186)	0,151
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	0 (0%)	12 (31,6%)	0,045
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	0	27,5 (23,3 – 36)	ND
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	3 (15,8%)	1,000

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### **3.3.2.1.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%**

Se analizó la relación entre la respuesta inmune específica frente a CMV y el desarrollo de infección por CMV en los 54 receptores renales evaluables. De los 24 pacientes con trasplante renal con muestra pretrasplante, 7 (29,2%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 17 (70,8%) que no tenían en el momento pretrasplante. Aunque no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas, la proporción de pacientes con inmunidad y sin inmunidad que desarrollaron viremia fue del 28,6% y del 52,9%, respectivamente (RR 0,54 IC95% 0,15 – 1,89,  $p = 0,386$ ). Ningún paciente con inmunidad desarrolló cargas virales por encima de 2000 UI/ml, hecho que ocurrió en el 29,4% de pacientes sin inmunidad ( $p = 0,272$ ). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de episodios de replicación: 0 (0 -1) vs. 1 (0 – 3),  $p = 0,172$ ; en la duración de la viremia:  $32 \pm 35,4$  vs.  $47,9 \pm 20,3$  días,  $p = 0,346$ ; carga viral pico: 370,5 UI/ml (RIQ 271 - 470) vs. 2857 (RIQ 379 - 4541),  $p = 0,239$ ; indicación de tratamiento anticipado: 0% vs. 35,3%, entre los pacientes con y sin inmunidad ( $p = 0,130$ ). Por último, no hubo casos de enfermedad por CMV en este grupo (Tabla 19).

**Tabla 19.** Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular CMV específica pretrasplante con un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=7</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=17</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección por CMV, n (%)</b>	2 (28,6%)	9 (52,9%)	0,386
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	0 (0%)	5 (29,4%)	0,272
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 – 1)	1 (0 – 3)	0,172
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	$32 \pm 35,4$	$47,9 \pm 20,3$	0,346
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	370,5 (271 – 470)	2857 (379 – 4541)	0,239
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	0 (0%)	6 (35,3%)	0,130
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	0	28 (16,3 – 42,3)	ND
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles

### **3.3.2.1.2. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%**

Se analizó la relación entre la respuesta inmune específica frente a CMV y el desarrollo de infección por CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De los 24 pacientes con trasplante hepático con muestra pretrasplante, 4 (16,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a 20 (83,3%) que no tenían en el momento pretrasplante. Aunque no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas, la proporción de pacientes con inmunidad y sin inmunidad que desarrollaron viremia fue del 0% y del 45%, respectivamente ( $p = 0,259$ ). Ningún paciente con inmunidad desarrolló cargas virales por encima de 2000 UI/ml, hecho que ocurrió en el 25% de pacientes sin inmunidad ( $p = 0,544$ ). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de episodios de replicación: 0 vs. 0 (0 – 2),  $p = 0,105$ ; ni en la indicación de tratamiento anticipado: 0% vs. 30% ( $p = 0,539$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad detectados en pacientes con trasplante hepático ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 20).

**Tabla 20.** Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante hepático con y sin respuesta inmune celular pretrasplante específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=4</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=20</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	0 (0%)	9 (45%)	0,259
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	0 (0%)	5 (25%)	0,544
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0	0 (0 – 2)	0,105
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	0	34 $\pm$ 15,6	ND
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	0	3085 (740 – 4886,5)	ND
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	0 (0%)	6 (30%)	0,539
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	0	26,5 (23,8 – 37)	ND
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (15%)	1,000

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### 3.3.2.2. Respuesta inmune de células T específicas frente a CMV a las 2 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,25%

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas postrasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 88 receptores de TOS con muestras disponibles. De los 88 pacientes, 25 (28,4%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 63 (71,3%) que no tenían inmunidad a las dos semanas postrasplante. No encontramos diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 48,0% vs. 55,6%, (RR 0,86 IC95% 0,54 – 1,37, p = 0,522); el número de episodios de replicación: 0 (0 - 2) vs. 1 (0 - 3), p = 0,256; la duración de la viremia: 30,5  $\pm$  19,1 vs. 40  $\pm$  23,9 días, p = 0,181; la carga viral pico: 739 UI/ml (RIQ 595,5 – 3182,5) vs. 2857 (RIQ 677 - 5578), p = 0,251; ni el porcentaje de pacientes a los que se indicó tratamiento anticipado: 16% vs. 36,5%

(RR 0,44 IC95% 0,17 – 1,14,  $p = 0,06$ ). Sin embargo, cuando se comparó la proporción de pacientes con viremias por encima de 2000 UI/ml, resultó significativamente menor en pacientes con inmunidad (12,0% vs. 33,3%, RR 0,36 IC95% 0,12 – 1,10,  $p = 0,043$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad detectados ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 21).

**Tabla 21.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=25</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=63</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	12 (48,0%)	34 (55,6%)	0,522
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	3 (12,0%)	21 (33,3%)	0,043
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 - 2)	1 (0 - 3)	0,256
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	30,5 $\pm$ 19,1	40,9 $\pm$ 23,9	0,181
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	739 (595,5 – 3182,5)	2857(677 - 5578)	0,251
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	4 (16,0%)	23 (36,5%)	0,060
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	29,5 (22,5-40,3)	29 (20-37)	0,722
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (8,8%)	0,557

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

A las 2 semanas del trasplante tener inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,25\%$ ) fue un factor protector independientemente relacionado con la presencia de viremia  $>2000$  UI/ml controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, el tratamiento de inducción, la serología del donante y/o el rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,031, IC95% 0,003 – 0,359,  $p = 0,006$ ) (Tabla 22).

**Tabla 22.** Análisis multivariante de las variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV  $>2000$  UI/ml.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	0,967	0,867-1,078	0,545
<i>Trasplante renal</i>	2,832	0,386-20,768	0,306
<i>Tratamiento de inducción</i>	0,770	0,093-6,381	0,809
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	0,482	0,020-11,699	0,654
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	0,098	0,007-1,403	0,087
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,25</math> a las 2 semanas postrasplante</i>	0,031	0,003-0,359	0,006

*Tipo de análisis estadístico: Regresión logística binaria*

A las 2 semanas del trasplante tener inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,25\%$ ) fue un factor protector independientemente relacionado con la indicación de tratamiento anticipado controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, el tratamiento de inducción, la serología del donante y/o el rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,192, IC95% 0,046 – 0,813, p = 0,025) (Tabla 23).

**Tabla 23.** Análisis multivariante de las variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,017	0,962-1,074	0,556
<i>Trasplante renal</i>	2,447	0,687-8,717	0,168
<i>Tratamiento de inducción</i>	1,667	0,448-6,197	0,446
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	0,993	0,147-5,939	0,941
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	2,116	0,346-12,944	0,417
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,25</math> a las 2 semanas postrasplante</i>	0,192	0,046-0,813	0,025

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

### **3.3.2.2.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%.**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas postrasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 54 receptores renales evaluables. A las 2 semanas postrasplante, se pudieron analizar muestras de 46 pacientes, de los cuales 14 (30,4%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 32 (69,6%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 64,3% vs. 62,5%, (RR 1,03 IC95% 0,64 – 1,65,  $p = 0,908$ ); en la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 21,4% vs. 43,8%, (RR 0,45 IC95% 0,15 – 1,44,  $p = 0,149$ ); en el número de episodios de replicación: 1 (0 -2) vs. 1 (0 – 3),  $p = 0,473$ ; la duración de la viremia:  $31 \pm 21,8$  vs.  $47,6 \pm 25,7$  días,  $p = 0,094$ ; ni la carga viral pico: 613 UI/ml (RIQ 601 – 6119,5) vs. 2975,5 (RIQ 482 – 5797),  $p = 0,604$ . De los pacientes con inmunidad celular específica a las 2 semanas postrasplante, en el 28,6% se indicó tratamiento anticipado, mientras que de los pacientes sin inmunidad

celular específica se indicó en el 43,8% ( $p = 0,332$ ). Por último, no hubo casos de enfermedad por CMV en este grupo (Tabla 24).

**Tabla 24.** Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=14</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=32</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	9 (64,3%)	20 (62,5%)	0,908
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	3 (21,4%)	14 (43,8%)	0,149
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	1 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,473
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	31 $\pm$ 21,8	47,6 $\pm$ 25,7	0,094
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	613 (601 – 6119,5)	2975,5 (482 – 5797)	0,604
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	4 (28,6%)	14 (43,8%)	0,332
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	29,5 (23 – 38,5)	33 (26 – 44)	0,671
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

### **3.3.2.2.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas postrasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De los 37 pacientes con muestra disponible para el análisis a las 2 semanas, 10 (27%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 27 (73%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante hepático con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia:

30% vs. 48,1%,  $p = 0,461$ ; la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 0% vs. 25,9%,  $p = 0,154$ ; el número de episodios de replicación: 0 (0 – 1) vs. 0 (0 – 2),  $p = 0,218$ ; la duración de la viremia:  $29 \pm 10,6$  días vs.  $32,9 \pm 18,2$  días,  $p = 1,000$ ; ni en la carga viral pico: 865 (307 – 1183) vs. 2191 (RIQ 879 – 4912),  $p = 0,201$ . Mientras que a ningún paciente con inmunidad celular específica a las 2 semanas se le indicó posteriormente tratamiento anticipado, en el 33,3% de los pacientes sin inmunidad celular específica sí se hizo ( $p = 0,079$ ). Por último, todos los episodios de enfermedad ocurrieron en los pacientes sin inmunidad celular específica frente a CMV (Tabla 25).

**Tabla 25.** Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=10</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=27</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	3 (30%)	13 (48,1%)	0,461
<b><i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i></b>	0 (0%)	7 (25,9%)	0,155
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 1)	0 (0 – 2)	0,218
<b><i>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i></b>	$29 \pm 10,6$	$32,9 \pm 18,2$	1,000
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	865 (307 – 1183)	2191 (879 – 4912)	0,201
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	0 (0%)	9 (33,3%)	0,079
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	0	23 (17 – 31)	ND
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	3 (11,1%)	0,548

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### 3.3.2.3 Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,25%

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas postrasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 106 pacientes disponibles. De ellos, 39 (36,8%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 67 (63,2%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 46,2% vs. 53,7% (RR 0,86 IC95% 0,57 – 1,29,  $p = 0,452$ ); el número de episodios de replicación: 0 (0 - 2) vs. 1 (0 - 3),  $p = 0,326$ ; la duración de la viremia:  $31,7 \pm 20,1$  días vs.  $42,4 \pm 23,9$  días,  $p = 0,106$ ; ni en la carga viral pico: 834 UI/ml (RIQ 560 – 4354,25) vs. 2862 (RIQ 955 – 4089,5),  $p = 0,169$ . Sin embargo, cuando se comparó la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml, resultó significativamente menor en pacientes con inmunidad que sin inmunidad (12,8% vs. 32,8%, RR 0,39 IC95% 0,16 – 0,95,  $p = 0,023$ ). Además, el porcentaje de pacientes en los que se indicó tratamiento anticipado fue significativamente menor en los pacientes con inmunidad que en los pacientes sin inmunidad (15,4% vs. 38,8%, RR 0,40 IC95% 0,18 – 0,48,  $p = 0,011$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad detectados ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 26).

**Tabla 26.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin inmunidad celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando el punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=39</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=67</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	18 (46,2%)	36 (53,7%)	0,452
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	5 (12,8%)	22 (32,8%)	0,023
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,326
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	31,7 $\pm$ 20,1	42,4 $\pm$ 23,9	0,106
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	834 (560 – 4354,25)	2862 (955 – 4089,5)	0,169
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	6 (15,4%)	26 (38,8%)	0,011
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	30 (23,5 – 36,8)	29 (19,8 – 38,8)	0,772
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (8,3%)	0,543

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

A las 4 semanas del trasplante, tener inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,25\%$ ) fue un factor protector independientemente relacionado con el desarrollo de viremias  $>2000$  UI/ml controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, tratamiento de inducción, serología del donante y/o rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,131 IC95% 0,023-0,739,  $p=0,021$ ) (Tabla 27).

**Tabla 27.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV  $>2000$  UI/ml.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	0,989	0,912-1,072	0,782
<i>Trasplante renal</i>	1,936	0,332-11,279	0,463
<i>Tratamiento de inducción</i>	0,665	0,109-4,074	0,660
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	0,982	0,068-14,126	0,989
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	0,177	0,024-1,297	0,088
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,25</math> a las 4 semanas postrasplante</i>	0,311	0,023-0,739	0,021

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

A las 4 semanas del trasplante, tener inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,25\%$ ) fue un factor protector independientemente relacionado con la indicación de tratamiento anticipado controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, tratamiento de inducción, serología del donante y/o rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,221, IC95% 0,066 – 0,736,  $p = 0,014$ ) (Tabla 28).

**Tabla 28.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,25\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,025	0,974-1,079	0,342
<i>Trasplante renal</i>	2,219	0,664-7,415	0,195
<i>Tratamiento de inducción</i>	1,073	0,312-3,694	0,911
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	1,514	0,257-8,925	0,647
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	2,464	0,563-10,777	0,231
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,25</math> a las 4 semanas postrasplante</i>	0,221	0,066-0,736	0,014

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

### **3.3.2.3.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,25%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas postrasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 54 receptores de trasplante renal evaluables. De ellos, 22 (40,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 32 (59,3%) que no tenían inmunidad a las 4 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante renal con o sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 59,4% vs. 59,1% (RR 1,0 IC95% 0,63 – 1,56,  $p = 0,983$ ), ni en la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 22,7% vs. 37,5% (RR 0,61 IC95% 0,25 – 1,48,  $p = 0,251$ ). Tampoco se encontraron diferencias en el número de episodios de replicación: 1 (0 -2) vs. 1 (0 – 3),  $p = 0,525$ ; la duración de la viremia:  $33,2 \pm 23,1$  vs.  $47,5 \pm 25,1$  días,  $p = 0,115$ ; la carga viral pico: 1064 UI/ml (RIQ 601 – 7130) vs. 2857 (RIQ 423 - 4896),  $p = 0,954$ ; ni en la indicación de tratamiento anticipado: 27,3% vs. 40,6% ( $p = 0,313$ ). Por último, no ocurrieron episodios de enfermedad por CMV en este grupo (Tabla 29).

**Tabla 29.** Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=22</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=32</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	13 (59,1%)	19 (59,4%)	0,983
<b><i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i></b>	5 (22,7%)	12 (37,5%)	0,251
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	1 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,525
<b><i>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i></b>	33,2 $\pm$ 23,1	47,5 $\pm$ 25,1	0,115
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	1064 (601 – 7130)	2857 (423 – 4896)	0,954
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	6 (27,3%)	13 (40,6%)	0,313
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	30 (23,5 – 36,8)	32 (19,5 – 51)	0,759
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### **3.3.2.3.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,25%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,25%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De ellos, 16 (34,8%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 30 (65,2%) que no tenían inmunidad a las 4 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante hepático con o sin inmunidad a las 4 semanas del trasplante en la proporción de pacientes con viremia: 31,3% vs. 46,7% (RR 0,67 IC95% 0,29 – 1,52,  $p = 0,362$ ); en el número de episodios de replicación: 0 (0 – 2) vs. 0 (0 – 3),  $p = 0,340$ ; ni en la duración de la viremia: 27,8  $\pm$  9,1 días vs. 38,6  $\pm$  20,7 días,  $p = 0,354$ . Sin embargo, la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml en

pacientes con inmunidad fue significativamente menor que la de los pacientes sin inmunidad: 0% vs. 30% ( $p = 0,018$ ), así como la carga viral pico: 803 (RIQ 277 – 1024) vs. 3003 (RIQ 1053,5 – 4356),  $p = 0,010$ . Ningún paciente con inmunidad celular específica pretrasplante requirió indicación de tratamiento anticipado respecto al 40% de los pacientes sin inmunidad celular específica que sí lo requirieron ( $p = 0,004$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad por CMV ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 30).

**Tabla 30.** Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 4 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,25%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=16</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=30</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	5 (31,3%)	14 (46,7%)	0,362
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	0 (0%)	9 (30%)	0,018
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 – 2)	0 (0 – 3)	0,340
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	27,8 $\pm$ 9,1	38,6 $\pm$ 20,7	0,354
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	803 (277 – 1024)	3003 (1053,5 – 4356)	0,010
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	0 (0%)	12 (40%)	0,004
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	0	24 (19,3 – 32)	ND
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (10%)	0,542

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### 3.3.3. Relación entre la respuesta inmune de células T específica (utilizando el punto de corte de $\geq 0,15\%$ ) y la infección por CMV

### 3.3.3.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV utilizando un punto de corte de 0,15%

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica en el momento pretrasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en el grupo de 49 receptores de trasplante con muestra pretrasplante disponible. De ellos, 16 (32,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,15\%$ ), frente a los 33 (67,3%) con inmunidad negativa ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ < 0,15\%$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante con o sin inmunidad en el momento pretrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 31,3% vs. 48,5% (RR 0,64 IC95% 0,29 – 1,45,  $p = 0,253$ ); en la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 31,3% vs. 48,5% (RR 0,52, IC95% 0,12 – 2,15,  $p = 0,464$ ); en el número de episodios de replicación: 0 (0 - 2) vs. 0 (0 - 3),  $p = 0,184$ ; en la duración de la viremia:  $35,6 \pm 24,1$  días vs.  $39,8 \pm 19,6$  ( $p = 0,694$ ); ni en la carga viral pico: 803 UI/ml (RIQ 370,5 - 3143) vs. 2029 (RIQ 375,5 – 4718,5),  $p = 0,457$ . Para analizar la relación entre el umbral de 0,15% y el aclaramiento espontáneo de los episodios de infección por CMV sin necesidad de tratamiento, al igual que antes, se tomó como variable resultado la indicación de tratamiento anticipado. El porcentaje de pacientes que requirió tratamiento no fue significativamente diferente en los pacientes con inmunidad respecto a los pacientes sin inmunidad: 12,5% vs. 30,3%, (RR 0,41, IC95% 0,10 – 1,67,  $p = 0,290$ ). Los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular específica frente a CMV (Tabla 31).

**Tabla 31.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV pretrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=16</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=33</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	5 (31,3%)	16 (48,5%)	0,253
<b><i>Pacientes con cargas virales ≥2000 UI/ml, n (%)</i></b>	5 (31,3%)	16 (48,5%)	0,464
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 2)	0 (0 – 3)	0,184
<b><i>Duración viremia (días), media ± DE</i></b>	35,6 ± 24,1	39,81 ± 19,6	0,694
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	803 (370,5 – 3143)	2029 (375,5 – 4718,5)	0,457
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	2 (12,5%)	10 (30,3%)	0,290
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	19 (14 – 24)	29,5 (23,8 – 40)	0,176
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	3 (9,1%)	0,549

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

### **3.3.3.1.1. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica en el momento pretrasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 54 receptores de trasplante renal evaluables. De los 24 pacientes con muestra pretrasplante, 10 (41,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 14 (58,3%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante renal con o sin inmunidad en el momento pretrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 30% vs. 57,1% (RR 0,53, IC95% 0,18 – 1,50, p = 0,240); en la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 10% vs. 28,6% (RR 0,35, IC95% 0,05 – 2,68, p = 0,358); en el número de episodios de replicación: 0 (0 – 1) vs. 1 (0 – 3), p = 0,087; en la duración de la viremia: 42,3 ± 30,7 vs. 46 ± 20,8 días, p = 0,838; ni la carga viral pico: 470 UI/ml

(271 - 2857) vs. 2019,5 (RIQ 375,5 – 4718,5),  $p = 0,414$ . Mientras que a sólo un paciente (10%) con inmunidad celular específica pretrasplante se le indicó tratamiento anticipado, el 35,7% de los pacientes sin inmunidad celular específica sí lo requirieron ( $p = 0,341$ ). Por último, no se detectaron episodios de enfermedad por CMV en los receptores de trasplante renal (Tabla 32).

**Tabla 32.** Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante renal con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV en el pretrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=10</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=14</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	3 (30%)	8 (57,1%)	0,240
<b><i>Pacientes con cargas virales ≥2000 UI/ml, n (%)</i></b>	1 (10%)	4 (28,6%)	0,358
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 1)	1 (0 – 3)	0,087
<b><i>Duración viremia (días), media ± DE</i></b>	42,3 ± 30,7	46 ± 20,8	0,838
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	470 (271 – 2857)	2019,5 (375,5 – 4718,5)	0,414
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	1 (10%)	5 (35,7%)	0,341
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	14	30 (21,5 – 47,5)	0,143
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### **3.3.3.1.2. Respuesta inmune pretrasplante de células T específica frente a CMV en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica en el momento pretrasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De los 24 pacientes con

muestra pretrasplante, 6 (25%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 18 (75%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante hepático con o sin inmunidad en el momento pretrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 33,3% vs. 38,9% (RR 0,86 IC95% 0,24 – 3,06,  $p = 1,000$ ); en la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 16,7% vs. 22,2% (RR 0,75, IC95% 0,10 – 5,8,  $p = 1,000$ ); en el número de episodios de replicación: 0 (0 – 2) vs. 0 (0 – 2),  $p = 0,907$ ; en la duración de la viremia:  $25,5 \pm 9,2$  días vs.  $36,4 \pm 16,7$  días,  $p = 0,242$ ; ni en la carga viral pico: 2116,5 UI/ml (803 – 3430) vs. 3085 UI/ml (RIQ 677 – 6024),  $p = 0,770$ . No hubo diferencias significativas entre los pacientes hepáticos con y sin inmunidad celular específica que requirieron la indicación de tratamiento anticipado: 16,7% vs. 30% de ( $p = 1,000$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular CMV específica (Tabla 33).

**Tabla 33.** Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular CMV específica pretrasplante con un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=6</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=18</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	2 (33,3%)	7 (38,9%)	1,000
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	1 (16,7%)	4 (22,2%)	1,000
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 – 2)	0 (0 – 2)	0,907
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	$25,5 \pm 9,2$	$36,4 \pm 16,7$	0,242
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	2116,5 (803 – 3430)	3085 (677 – 6024)	0,770
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	1 (16,7%)	5 (27,8%)	1,000
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	24 (24-24)	29 (23,5 – 41)	0,552
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (16,7%)	0,546

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

### **3.3.3.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 88 pacientes con muestras disponibles. De ellos, 27 (31,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a 61 (69,3%) que no tenían inmunidad a las 2 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 44,4% vs. 57,4% (RR 0,77 IC95% 0,48 – 1,24,  $p = 0,262$ ); el número de episodios de replicación: 0 (0 - 2) vs. (0 - 3),  $p = 0,096$ ; la duración de la viremia:  $30,5 \pm 19,1$  vs.  $41,6 \pm 23,9$  días,  $p = 0,176$ ; ni en la carga viral pico: 739 UI/ml (RIQ 595,5 – 3182) vs. 2857 (RIQ 677 - 5578),  $p = 0,251$ . Sin embargo, cuando se comparó la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml, resultó significativamente menor en pacientes con inmunidad que sin inmunidad (11,1% vs. 34,4%; RR 0,32, IC95% 0,11 – 0,99,  $p = 0,024$ ), así como el porcentaje de pacientes en los que se indicó tratamiento anticipado (14,8% vs. 37,7%; RR 0,39, IC95% 0,15 – 1,02,  $p = 0,032$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular CMV específica (Tabla 34).

**Tabla 34.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular CMV específica a las 2 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=27</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=61</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	12 (44,4%)	35 (57,4%)	0,262
<b><i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i></b>	3 (11,1%)	21 (34,4%)	0,024
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,096
<b><i>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i></b>	30,5 $\pm$ 19,1	41,6 $\pm$ 23,9	0,176
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	739 (595,5 – 3182)	2857 (677 – 5578)	0,251
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	4 (14,8%)	23 (37,7%)	0,032
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	29,5 (22,5 – 40,3)	29,0 (20 – 37)	0,722
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	3 (8,8%)	0,557

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.*

A las 2 semanas del trasplante, tener inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,15\%$ ) fue un factor protector independientemente relacionado con la presencia de viremia  $>2000$  UI/ml controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, tratamiento de inducción, serología del donante y/o rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,107, IC95% 0,020 – 0,558,  $p = 0,008$ ) (Tabla 35).

**Tabla 35.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV  $>2000$  UI/ml.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,014	0,958-1,074	0,625
<i>Trasplante renal</i>	2,679	0,717-10,009	0,143
<i>Tratamiento de inducción</i>	1,445	0,370-5,653	0,597
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	0,699	0,099-4,922	0,719
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	1,040	0,148-7,298	0,969
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,15</math> a las 2 semanas postrasplante</i>	0,107	0,020-0,558	0,008

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

A las 2 semanas del trasplante, tener inmunidad celular específica ( $\geq 0,15\%$ ) también fue un factor protector independientemente relacionado con la indicación de tratamiento anticipado controlado por otras posibles variables confusoras como son el tipo de trasplante, tratamiento de inducción, serología del donante y/o rechazo previo a la infección por CMV (OR 0,165, IC95% 0,039 – 0,692, p = 0,014) (Tabla 36).

**Tabla 36.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 2 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,016	0,961-1,074	0,570
<i>Trasplante renal</i>	2,485	0,694-8,895	0,162
<i>Tratamiento de inducción</i>	1,625	0,433-6,094	0,471
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	0,804	0,121-5,358	0,821
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	2,003	0,324-12,368	0,455
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,15</math> a las 2 semanas postrasplante</i>	0,165	0,039-0,692	0,014

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

### **3.3.3.2.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 54 receptores de trasplante renal con muestras disponibles. De los 46 pacientes con muestra disponible, 15 (32,6%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a 31 (67,4%) que no tenían inmunidad a las 2 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 60% vs. 64,5% (RR 0,93 IC95% 0,57 – 1,52, p = 1,000); la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 20% vs. 45,2% (RR 0,44 IC95% 0,15 – 1,31, p = 0,097); el número de episodios de replicación: 1 (0 -2) vs. 1 (0 – 3), p = 0,287; la duración de la viremia: 31  $\pm$  21,8 vs. 47,6  $\pm$  25,7 días, p = 0,094; la carga viral pico: 613 UI/ml (RIQ 601 – 6119,5) vs. 2975,5 (RIQ 482 - 5797), p = 0,604; ni la indicación de tratamiento anticipado: 26,7% vs. 45,2% (p = 0,228). Por último, no se detectaron casos de enfermedad por CMV en los pacientes de trasplante renal (Tabla 37).

**Tabla 37.** Características de la infección por CMV en pacientes con trasplante renal con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=15</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=31</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	9 (60%)	20 (64,5%)	0,766
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	3 (20%)	14 (45,2%)	0,097
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	1 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,287
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	31 $\pm$ 21,8	47,6 $\pm$ 25,7	0,094
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	613 (601 – 6119,5)	2975,5 (482 – 5797)	0,604
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	4 (26,7%)	14 (45,2%)	0,228
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	29,5 (22,5 – 40,3)	33 (24,5 – 47,5)	0,671
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### 3.3.3.2.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 2 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De los 37 pacientes con muestra disponible a las 2 semanas postrasplante, 11 (29,7%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 26 (70,3%) que no tenían inmunidad. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con o sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 27,3% vs. 50% (RR 0,55, IC95% 0,19 – 1,54, p = 0,285); la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 0% vs. 26,9%, p = 0,135; el número de episodios de replicación: 0 (0 – 1) vs. 0,5 (0 – 2), p = 0,135; la duración de la viremia: 29  $\pm$  10,6 días vs. 32,9  $\pm$  18,2

días,  $p = 1,000$ ; ni en la carga viral pico: 865 (307 – 1183) vs. 2191 (RIQ 879 – 4912),  $p = 0,201$ . Mientras que ningún paciente con inmunidad celular específica pretrasplante requirió indicación de tratamiento anticipado, el 34,6% de los pacientes sin inmunidad celular específica sí lo requirieron ( $p = 0,036$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular CMV específica (Tabla 38).

**Tabla 38.** Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 2 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b><i>Pacientes con inmunidad, N=11</i></b>	<b><i>Pacientes sin inmunidad, N=26</i></b>	<b><i>P</i></b>
<b><i>Pacientes con infección CMV, n (%)</i></b>	3 (27,3%)	13 (50%)	0,285
<b><i>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</i></b>	0 (0%)	7 (26,9%)	0,080
<b><i>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</i></b>	0 (0 – 1)	0,5 (0 – 2)	0,135
<b><i>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</i></b>	29 $\pm$ 10,6	32,9 $\pm$ 18,2	1.000
<b><i>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</i></b>	865 (307 – 1183)	2191 (879 – 4912)	0,201
<b><i>Tratamiento anticipado, n (%)</i></b>	0 (0%)	9 (34,6%)	0,036
<b><i>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</i></b>	0	23 (17 – 31)	ND
<b><i>Enfermedad CMV, n (%)</i></b>	0 (0%)	3 (11,5%)	0,540

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

### **3.3.3.3. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas del trasplante utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 106 pacientes con muestras disponibles. De ellos, 44 (41,5%)

tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 62 (58,5%) que no tenían inmunidad a las 4 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante con o sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 50,0% vs. 51,6% (RR 0,97, IC95% 0,66 – 1,42,  $p = 0,870$ ); la proporción de pacientes con viremias por encima de 2000 UI/ml: 20,5% vs. 29,0% (RR 0,70, IC95% 0,35 – 1,42,  $p = 0,318$ ); el número de episodios de replicación: 0,5 (0 -2) vs. 1 (0 – 3),  $p = 0,845$ ; la duración de la viremia:  $34,6 \pm 21,3$  días vs.  $42,8 \pm 24,0$  días,  $p = 0,269$ ; la carga viral pico: 1114,5 UI/ml (RIQ 606,5 – 5651,0) vs. 2589 (RIQ 746,5 – 3373,25),  $p = 0,916$ ; ni en la indicación de tratamiento anticipado: 22,7% vs. 35,5% (RR 0,64, IC95% 0,24 – 1,21,  $p = 0,159$ ). Los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular CMV específica (4,8% vs. 0%,  $p = 0,265$ ) (Tabla 39).

**Tabla 39.** Características de la infección por CMV en pacientes con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante con un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=44</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=62</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	22 (50,0%)	32 (51,6%)	0,870
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	9 (20,5%)	18 (29,0%)	0,318
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0,5 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,845
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	$34,6 \pm 21,3$	$42,8 \pm 24,0$	0,269
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	1114,5 (606,5 – 5651)	2589 (746,5 – 3373,3)	0,916
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	10 (22,7%)	22 (35,5%)	0,159
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	35,5 (25,5 – 46)	25 (19 – 33,5)	0,328
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (4,8%)	0,265

Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney.

A las 4 semanas del trasplante la presencia de inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,15\%$ ) no fue un factor protector independientemente relacionado con la presencia de viremia  $>2000$  UI/ml (OR 0,441, CI95% 0,145 - 1,342,  $p = 0,149$ ) (Tabla 40).

**Tabla 40.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en el desarrollo de viremia de CMV  $>2000$  UI/ml.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,018	0,966-1,072	0,505
<i>Trasplante renal</i>	2,289	0,683-7,672	0,180
<i>Tratamiento de inducción</i>	0,801	0,232-2,768	0,726
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	1,373	0,237-7,941	0,723
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	1,292	0,274-6,097	0,746
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,15</math> a las 4 semanas postrasplante</i>	0,441	0,145-1,342	0,149

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística*

A las 4 semanas del trasplante la presencia de inmunidad celular específica frente a CMV ( $\geq 0,15\%$ ) tampoco fue un factor protector independientemente relacionado con la indicación de tratamiento anticipado cuando se controló por otras variables confusoras (OR 0,377, IC95% 0,126 – 1,122,  $p = 0,079$ ) (Tabla 41).

**Tabla 41.** Análisis multivariante de variables confusoras del efecto de la inmunidad celular específica a las 4 semanas ( $\geq 0,15\%$ ) en la indicación de tratamiento anticipado.

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>I.C. 95,0%</b>	<b>P</b>
<i>Edad</i>	1,023	0,972-1,076	0,383
<i>Trasplante renal</i>	2,225	0,685-7,225	0,183
<i>Tratamiento de inducción</i>	1,025	0,308-3,403	0,968
<i>Serología CMV de donante positiva</i>	1,444	0,250-8,337	0,681
<i>Rechazo tratado con bolos esteroides previo</i>	2,728	0,639-11,645	0,175
<i>% de células CD8<sup>+</sup> CMV específicas productoras de IFN<math>\gamma</math> <math>\geq 0,15</math> a las 4 semanas postrasplante</i>	0,377	0,126-1,122	0,079

*Tipo de análisis estadístico: regresión logística binaria*

### **3.3.3.3.1. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores renales utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 54 receptores renales evaluables. De los 54 pacientes con muestra disponible, 26 (48,1%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 28 (51,9%) que no tenían inmunidad a las 4 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante renal con o sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante en la proporción de pacientes con viremia: 65,4% vs. 53,6% (RR 1,22, IC95% 0,78 – 1,90,  $p = 0,377$ ); la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml: 34,6% vs. 28,6%, (RR 1,21, IC95% 0,55 – 2,67,  $p = 0,633$ ); el número de episodios de replicación: 1 (0 -2) vs. 1 (0 – 3),  $p = 0,639$ ; la duración de la viremia:  $36,7 \pm 23,6$  vs.  $47,4 \pm 26,1$  días,  $p = 0,290$ ; la carga viral pico: 3849 UI/ml (RIQ 612,5 – 7130) vs. 2566 UI/ml (RIQ 386 – 3084,  $p = 0,206$ ; ni en la indicación de tratamiento anticipado: 38,5% vs. 32,1% ( $p = 0,627$ ). Por último, no se detectaron casos de enfermedad por CMV en los pacientes de trasplante renal (Tabla 42).

**Tabla 42.** Características de la infección por CMV en pacientes renales con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=26</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=28</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	17 (65,4%)	15 (53,6%)	0,377
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	9 (34,6%)	8 (28,6%)	0,633
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	1 (0 – 2)	1 (0 – 3)	0,639
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	36,7 $\pm$ 23,6	47,4 $\pm$ 26,1	0,290
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	3849 (612,5 – 7130)	2566 (386 – 3084)	0,206
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	10 (38,5%)	9 (32,1%)	0,627
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	35,5 (25,5 – 46)	26 (18 – 38)	0,111
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	ND

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles.*

### **3.3.3.3.2. Respuesta inmune de células T específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante en receptores hepáticos utilizando un punto de corte de 0,15%**

Se analizó la relación entre la presencia de inmunidad celular específica a las 4 semanas del trasplante (tomando como punto de corte 0,15%) y el desarrollo posterior de viremia de CMV en los 46 receptores hepáticos evaluables. De ellos, 17 (37%) tenían inmunidad de células T específica de CMV, frente a los 29 (63%) que no tenían inmunidad a las 4 semanas postrasplante. No se encontraron diferencias significativas entre los receptores de trasplante hepático con o sin inmunidad a las 4 semanas del trasplante en la proporción de pacientes con viremia: 29,4% vs. 48,3% (RR 0,61, IC95% 0,27 – 1,39, p = 0,210); el número de episodios de replicación: 0 (0 – 2) vs. 0 (0 – 3), p = 0,235; ni en la duración de la viremia: 27,8  $\pm$  9,1 días vs. 38,6  $\pm$  20,7 días, p = 0,354. Sin embargo, la proporción de pacientes con viremia por encima de 2000 UI/ml en

pacientes con inmunidad fue menor (0%) que la de los pacientes sin inmunidad (31%) ( $p = 0,017$ ), así como la carga viral pico: 803 UI/ml (RIQ 277 – 1024) vs. 3003 UI/ml (RIQ 1053,5 – 4356),  $p = 0,010$ . Mientras que ningún paciente con inmunidad celular específica a las 4 semanas postrasplante requirió indicación de tratamiento anticipado, el 41,4% de los pacientes sin inmunidad celular específica sí lo requirieron ( $p = 0,002$ ). Por último, los 3 episodios de enfermedad ocurrieron en pacientes sin respuesta inmune celular CMV específica (Tabla 43).

**Tabla 43.** Características de la infección por CMV en pacientes hepáticos con y sin respuesta inmune celular específica frente a CMV a las 4 semanas postrasplante utilizando un punto de corte de 0,15%.

<b>Variable</b>	<b>Pacientes con inmunidad, N=17</b>	<b>Pacientes sin inmunidad, N=29</b>	<b>P</b>
<b>Pacientes con infección CMV, n (%)</b>	5 (29,4%)	14 (48,3%)	0,210
<b>Pacientes con cargas virales <math>\geq 2000</math> UI/ml, n (%)</b>	0 (0%)	9 (31%)	0,017
<b>Nº episodios/paciente, mediana (rango)</b>	0 (0 – 2)	0 (0 – 3)	0,235
<b>Duración viremia (días), media <math>\pm</math> DE</b>	27,8 $\pm$ 9,1	38,6 $\pm$ 20,7	0,354
<b>Carga viral pico (UI/ml), mediana (RIQ)</b>	803 (277 – 1024)	3003 (1053,5 – 4356)	0,010
<b>Tratamiento anticipado, n (%)</b>	0 (0%)	12 (41,4%)	0,002
<b>Duración tratamiento (días), mediana (RIQ)</b>	0	24 (19,3 – 32)	ND
<b>Enfermedad CMV, n (%)</b>	0 (0%)	3 (10,3%)	0,286

*Tipo de análisis estadístico: chi-cuadrado, T-student y U de Mann-Whitney. ND: datos no disponibles*

En resumen, cuando se disminuye el punto de corte a 0,15%, el porcentaje de pacientes con inmunidad celular específica positiva pretrasplante aumenta a un tercio. Sin embargo, este grado de inmunidad no se asocia con ninguna de las características relacionadas con la infección por CMV ni predice el control espontáneo de la infección

por CMV. Lo mismo ocurre cuando se estudia esta relación a las 4 semanas. Sin embargo, cuando se estudia la inmunidad a las 2 semanas postrasplante, los pacientes con inmunidad celular específica frente a CMV positiva utilizando el punto de corte  $\geq 0,15\%$  tienen un riesgo 0,165 veces inferior de requerir tratamiento que los pacientes sin inmunidad, comportándose además como un factor protector independiente de desarrollo de viremia elevada en el postrasplante.

Según los datos expuestos, tener un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  específicas frente a CMV  $\geq 0,15\%$  en la cuarta semana del trasplante, que es el momento a partir del cual se producen la mayoría de los episodios de viremia (mediana 5,7, RIQ 4 - 7,5 semanas), no es suficiente para controlar espontáneamente la infección. Sin embargo, a las 2 semanas postrasplante este umbral es un predictor de conseguir un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  específicas frente a CMV  $\geq 0,25\%$  a las 4 semanas, valor que sí predice qué pacientes podrán controlar espontáneamente la infección por CMV.

Cuando se analiza la relación entre la presencia de inmunidad celular específica y el desarrollo de infección por CMV postrasplante en función del órgano trasplantado (en este caso, sólo en receptores renales y hepáticos debido al reducido tamaño muestral de los receptores cardíacos y hepato-renales), los resultados obtenidos son similares en el caso de los receptores hepáticos y no son reproducibles en los receptores renales. Es decir, en los pacientes trasplantados de hígado, tener un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  específicas frente a CMV  $\geq 0,15\%$  a las 2 semanas postrasplante sí es un factor predictor de qué pacientes podrán controlar espontáneamente la infección por CMV.

Sin embargo, en los pacientes trasplantados de riñón, ninguno de los puntos de corte analizados en ninguno de los momentos, antes o después del trasplante, predijo qué pacientes controlarán espontáneamente sin la indicación de tratamiento anticipado los episodios de replicación por CMV.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en las curvas ROC del apartado 3.3.1., así como con los resultados obtenidos en otros estudios de nuestro grupo, en los que el punto de corte para el inicio de tratamiento en receptores renales es más elevado (5500 UI/ml) que en los receptores hepáticos (4000 UI/ml), por lo que

podría diferirse la indicación de tratamiento anticipado para el grupo de pacientes renales.

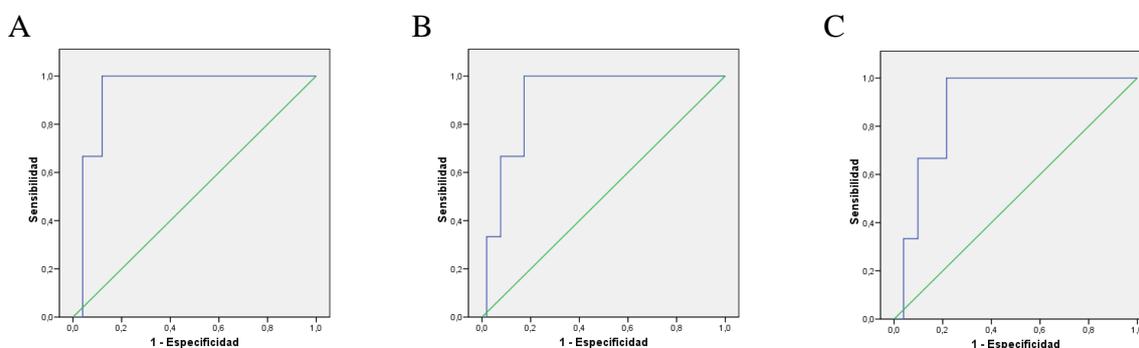
Únicamente con un punto de corte de 0,25% de células T CD8<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> se pudo predecir una menor indicación de tratamiento anticipado para los pacientes de TOS con inmunidad positiva ( $\geq 0,25\%$ ). Sin embargo, ni con un punto de corte de 0,15%, ni en trasplantados renales o hepáticos por separado, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con y sin inmunidad, a pesar de existir una tendencia clara. Probablemente dicha circunstancia tenga su origen en el menor tamaño muestral de la población con muestras pretrasplante disponibles.

#### **3.4. Definición de un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en función de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en pacientes de bajo riesgo**

En pacientes con inmunidad, pre o postrasplante, no pudo determinarse ningún punto de corte debido a que no se observó ningún episodio de enfermedad en estos pacientes, que han realizado tratamiento anticipado y monitorización virológica según el protocolo expuesto.

En pacientes sin inmunidad (pretrasplante  $< 0,25\%$ , a las 4 semanas  $< 0,25\%$  y a las 2 semanas  $< 0,15\%$ ), las curvas ROC analizando el desarrollo de viremia como predictor del desarrollo de enfermedad por CMV se pueden observar en la Figura 34.

**Figura 34.** Curvas ROC analizando el desarrollo de viremia como predictor de desarrollo de enfermedad por CMV en pacientes con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> menor a: A) 0,25 antes del trasplante, B) 0,25 a las 4 semanas postrasplante y C) 0,15 a las 2 semanas postrasplante.



Para los pacientes con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,25% en el momento pretrasplante, el AUC de la curva ROC fue de 0,933 (IC95% 0,84 – 1,03, p = 0,016). El punto de corte que predice el desarrollo de enfermedad por CMV sería de 3589 UI/ml (S = 100%, IC95% 31 – 100, E =80%, IC95% 67,66 – 96,84, VPP =50%, IC95% 13,95 – 86,05, VPN =100%, IC95% 81,5 - 100) (Tabla 44).

**Tabla 44.** Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad pretrasplante (porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,25%). Se detallan los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y del valor predictivo negativo (VPN). La carga viral óptima se definió en función de los valores más altos de VPN y VPP.

<b>Punto corte, UI/ml</b>	<b>S (IC95%)</b>	<b>E (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>VPN (IC95%)</b>
<b>133770</b>	0 (0 – 69)	100 (83,4 – 100)	ND	89,3 (70,6 – 97,2)
<b>80034</b>	0 (0 – 69)	96 (77,7 – 99,8)	0 (0 – 94,5)	88,9 (69,7 – 97,1)
<b>16161</b>	33,3 (17,7 – 87,5)	96 (77,7 – 99,8)	50 (2,7 – 97,3)	92,3 (73,4 – 98,7)
<b>5460</b>	66,7 (12,5 – 98,2)	96 (77,7 – 99,8)	66,7 (12,5 – 98,2)	96 (12,5 – 98,2)
<b>4541</b>	66,7 (12,5 – 98,2)	92 (72,5 – 98,6)	50 (9,2 – 90,8)	95,8 (76,9 – 99,8)
<b>3967</b>	66,7 (12,5 – 98,2)	88 (67,7 – 96,8)	40 (7,3 – 83)	95,7 (76,0 – 99,8)
<b>3589</b>	<b>100 (31 – 100)</b>	<b>88 (67,7 – 96,8)</b>	<b>50 (14,0 – 86,1)</b>	<b>100 (81,5 – 100)</b>
<b>3257</b>	100 (31 – 100)	84 (63,1 – 94,8)	42,9 (11,8 – 79,8)	100 (80,8 – 100)
<b>3084</b>	100 (31 – 100)	80 (58,7 – 92,4)	37,5 (10,2 – 74,1)	100 (80,0 – 100)
<b>2970</b>	100 (31 – 100)	76 (54,5 – 89,8)	33,3 (9,0 – 69,1)	100 (79,1 – 100)
<b>2648</b>	100 (31 – 100)	72 (50,4 – 87,1)	30 (8,1 – 64,6)	100 (78,1 – 100)
<b>2047</b>	100 (31 – 100)	68 (46,5 – 84,3)	27,3 (7,3 – 60,7)	100 (77,1 – 100)
<b>1615</b>	100 (31 – 100)	64 (42,6 – 81,3)	25 (6,7 – 57,2)	100 (75,9 – 100)
<b>1274</b>	100 (31 – 100)	60 (38,9 – 78,2)	23,1 (6,2 – 54,0)	100 (74,7 – 100)
<b>964</b>	100 (31 – 100)	56 (35,3 – 75,0)	21,4 (5,7 – 51,2)	100 (73,2 – 100)
<b>879</b>	100 (31 – 100)	52 (31,8 – 71,7)	20 (5,3 – 48,6)	100 (71,7 – 100)
<b>740</b>	100 (31 – 100)	48 (28,3 – 68,3)	18,8 (5,0 – 46,3)	100 (69,9 – 100)
<b>676</b>	100 (31 – 100)	44 (25,0 – 64,7)	17,7 (4,7 – 44,2)	100 (67,9 – 100)
<b>603</b>	100 (31 – 100)	40 (21,8 – 61,1)	16,7 (4,4 – 42,3)	100 (65,6 – 100)
<b>458</b>	100 (31 – 100)	36 (18,7 – 57,4)	15,8 (4,2 – 40,5)	100 (62,9 – 100)
<b>379</b>	100 (31 – 100)	32 (15,7 – 53,6)	15 (4,0 – 38,9)	100 (59,8 – 100)
<b>351</b>	100 (31 – 100)	28 (12,9 – 49,6)	14,3 (3,8 – 37,4)	100 (56,1 – 100)
<b>318</b>	100 (31 – 100)	24 (10,2 – 45,5)	13,6 (3,6 – 36,0)	100 (51,7 – 100)
<b>303</b>	100 (31 – 100)	20 (7,6 – 41,3)	13,0 (3,4 – 34,7)	100 (46,3 – 100)
<b>262</b>	100 (31 – 100)	16 (5,3 – 36,9)	12,5 (3,3 – 33,5)	100 (39,6 – 100)
<b>216</b>	100 (31 – 100)	12 (3,2 – 32,3)	12 (3,2 – 32,3)	100 (31 – 100)
<b>203</b>	100 (31 – 100)	8 (3,2 – 32,3)	11,5 (3,2 – 32,3)	100 (31 – 100)
<b>198</b>	100 (31 – 100)	4 (0,2 – 22,3)	11,1 (3,0 – 30,3)	100 (5,5 – 100)
<b>197</b>	100 (31 – 100)	0 (0 – 16,6)	10,7 (2,9 – 29,4)	ND

*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, ND: datos no disponibles*

Para los pacientes con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,25% a las 4 semanas postrasplante, el AUC de la curva ROC fue de 0,910 (IC95% 0,81 – 1,01, p = 0,018). El punto de corte que predice el desarrollo de enfermedad por CMV sería de 3589 UI/ml (S = 100%, IC95% 62,9 – 100, E = 93,4%, IC95% 81,1 – 98,3, VPP = 75%, IC95% 42,8 – 93,3, VPN =100%, IC95% 89,8 – 100) (Tabla 45).

**Tabla 45.** Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad a las 4 semanas postrasplante (porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,25%). Se detallan los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y del valor predictivo negativo (VPN), La carga viral óptima se definió en función de los valores más altos del VPN y del VPP.

<b>Punto corte, UI/ml</b>	<b>S (IC95%)</b>	<b>E (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>VPN (IC95%)</b>
<b>133770</b>	0 (0 – 69)	100 (91,4 – 100)	ND	94,6 (83,9 – 98,6)
<b>80034</b>	25 (1,3 – 78,1)	100 (91,3 – 100)	100 (5,5 – 100)	94,4 (83,7 – 98,6)
<b>18837</b>	33,3 (1,8 – 87,5)	98,1 (88,4 – 99,9)	50 (2,7 – 97,3)	96,2 (85,9 – 99,3)
<b>9581</b>	50 (9,2 – 90,8)	98,0 (88,2 – 99,9)	66,7 (1,3 – 98,2)	96,2 (85,7 – 99,3)
<b>7415</b>	60 (17,0 – 92,7)	98 (87,9 – 99,9)	75 (21,9 – 98,7)	96,1 (85,4 – 99,3)
<b>6533</b>	66,7 (24,1 – 94)	98,0 (87,8 – 99,9)	80 (29,9 – 99,0)	96 (85,1 – 99,3)
<b>5801</b>	80 (29,9 – 98,9)	96 (85,1 – 99,3)	66,7 (24,1 – 94)	98,0 (87,8 – 99,9)
<b>5237</b>	83,3 (36,5 – 99,1)	95,9 (84,9 – 99,3)	71,4 (30,3 – 94,9)	97,9 (87,5 – 99,9)
<b>4541</b>	85,7 (42,0 – 99,3)	95,8 (84,6 – 99,3)	75 (35,6 – 95,6)	97,9 (87,3 – 99,9)
<b>4030</b>	87,5 (46,7 – 99,3)	95,7 (84,3 – 99,3)	77,8 (40,2 – 96,1)	97,8 (87,0 – 99,9)
<b>3837</b>	88,9 (50,7 – 99,4)	95,7 (84,0 – 99,2)	80 (44,2 – 96,5)	97,8 (86,8 – 99,9)
<b>3774</b>	90 (54,1 – 99,5)	95,6 (83,6 – 99,2)	81,8 (47,8 – 96,8)	97,7 (86,5 – 99,9)
<b>3589</b>	<b>100 (62,9 – 100)</b>	<b>93,5 (81,1 – 98,3)</b>	<b>75 (42,8 – 93,3)</b>	<b>100 (89,8 – 100)</b>
<b>3316</b>	100 (65,6 – 100)	93,3 (80,7 – 98,3)	76,9 (46,0 – 93,8)	100 (89,6 – 100)
<b>3144</b>	100 (67,9 – 100)	93,2 (80,3 – 98,2)	78,6 (48,8 – 94,3)	100 (89,3 – 100)
<b>3084</b>	100 (69,9 – 100)	93,0 (79,9 – 98,2)	80 (51,4 – 94,7)	100 (89,1 – 100)
<b>3028</b>	100 (71,7 – 100)	92,9 (79,5 – 98,1)	81,3 (53,7 – 95,0)	100 (88,8 – 100)
<b>2946</b>	100 (73,2 – 100)	92,7 (79,0 – 98,1)	82,4 (55,9 – 95,3)	100 (88,6 – 100)
<b>2894</b>	100 (74,7 – 100)	92,5 (78,5 – 98,0)	83,3 (57,7 – 95,6)	100 (88,3 – 100)
<b>2862</b>	100 (75,9 – 100)	92,3 (78,0 – 98,0)	84,2 (59,5 – 95,8)	100 (88,0 – 100)
<b>2734</b>	100 (77,1 – 100)	92,1 (77,5 – 97,9)	85 (61,1 – 96,0)	100 (87,7 – 100)
<b>2589</b>	100 (78,1 – 100)	91,9 (76,9 – 97,9)	85,7 (62,6 – 96,2)	100 (87,4 – 100)
<b>2502</b>	100 (79,1 – 100)	91,7 (76,4 – 97,8)	86,4 (64,0 – 96,4)	100 (87,0 – 100)
<b>2315</b>	100 (80,0 – 100)	91,4 (75,8 – 97,8)	87,0 (65,3 – 96,6)	100 (86,7 – 100)
<b>2106</b>	100 (80,8 – 100)	91,2 (75,2 – 97,7)	87,5 (66,5 – 96,7)	100 (86,3 – 100)

<b>Punto corte, UI/ml</b>	<b>S (IC95%)</b>	<b>E (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>VPN (IC95%)</b>
<b>1943</b>	100 (81,5 – 100)	90,9 (74,5 – 97,6)	88 (67,7 – 96,9)	100 (85,9 – 100)
<b>1760</b>	100 (82,2 – 100)	90,6 (73,8 – 97,6)	88,5 (68,7 – 97,0)	100 (85,4 – 100)
<b>1615</b>	100 (82,8 – 100)	90,3 (73,1 – 97,5)	88,9 (69,7 – 97,1)	100 (85,0 – 100)
<b>1428</b>	100 (83,4 – 100)	90 (72,3 – 97,4)	89,3 (70,6 – 91,2)	100 (84,5 – 100)
<b>1278</b>	100 (84,0 – 100)	89,7 (71,5 – 97,3)	89,7 (71,5 – 97,3)	100 (84,0 – 100)
<b>1188</b>	100 (84,5 – 100)	89,3 (70,6 – 97,2)	90 (73,3 – 97,4)	100 (83,4 – 100)
<b>1095</b>	100 (85,0 – 100)	88,9 (69,7 – 97,1)	90,3 (73,1 – 97,5)	100 (82,8 – 100)
<b>1084</b>	100 (85,4 – 100)	88,5 (68,7 – 97,0)	90,6 (73,8 – 97,6)	100 (82,2 – 100)
<b>1027</b>	100 (85,9 – 100)	88 (67,7 – 96,9)	90,9 (74,5 – 97,6)	100 (81,5 – 100)
<b>966</b>	100 (86,3 – 100)	87,5 (66,5 – 96,7)	91,2 (75,2 – 97,7)	100 (80,8 – 100)
<b>957</b>	100 (86,7 – 100)	87 (65,3 – 96,6)	91,4 (75,8 – 97,8)	100 (80,0 – 100)
<b>816</b>	100 (87,4 – 100)	85,7 (62,6 – 96,2)	91,9 (77,0 – 97,9)	100 (78,1 – 100)
<b>676</b>	100 (87,7 – 100)	85 (61,1 – 96,0)	92,1 (77,5 – 97,9)	100 (77,1 – 100)
<b>667</b>	100 (88,0 – 100)	84,2 (59,5 – 95,8)	92,3 (78,0 – 98,0)	100 (75,9 – 100)
<b>636</b>	100 (88,3 – 100)	83,3 (57,7 – 95,6)	92,5 (78,5 – 98,0)	100 (74,7 – 100)
<b>608</b>	100 (88,6 – 100)	82,4 (55,8 – 95,3)	92,7 (79,0 – 98,1)	100 (73,2 – 100)
<b>513</b>	100 (88,8 – 100)	81,3 (53,7 – 95,0)	92,9 (79,5 – 98,1)	100 (71,7 – 100)
<b>404</b>	100 (89,1 – 100)	80 (48,8 – 94,3)	93,0 (80,3 – 98,2)	100 (67,9 – 100)
<b>382</b>	100 (89,3 – 100)	78,6 (48,8 – 94,3)	93,2 (80,3 – 98,2)	100 (67,9 – 100)
<b>375</b>	100 (89,6 – 100)	76,9 (46,0 – 93,8)	93,3 (80,7 – 98,3)	100 (65,6 – 100)
<b>365</b>	100 (89,8 – 100)	75 (42,8 – 93,3)	93,5 (81,1 – 98,3)	100 (62,9 – 100)
<b>344</b>	100 (90,0 – 100)	72,7 (39,3 – 92,7)	93,6 (81,4 – 98,3)	100 (59,8 – 100)
<b>314</b>	100 (90,2 – 100)	70 (35,4 – 91,9)	93,8 (81,8 – 98,4)	100 (56,1 – 100)
<b>293</b>	100 (90,4 -100)	66,7 (30,9 – 91,0)	93,9 (82,1 – 98,4)	100 (51,7 – 100)
<b>283</b>	100 (90,6 – 100)	62,5 (25,9 – 89,8)	94 (82,5 – 98,4)	100 (46,3 – 100)
<b>252</b>	100 (90,8 – 100)	57,1 (20,2 – 88,2)	94,1 (82,8 – 98,5)	100 (39,6 – 100)
<b>216</b>	100 (90,9 – 100)	50 (14,0 – 86,1)	94,2 (83,1 – 98,5)	100 (31,0 – 100)
<b>203</b>	100 (91,1 – 100)	40 (7,3 – 83,0)	94,3 (83,4 – 98,5)	100 (19,8 – 100)
<b>198</b>	100 (91,3 – 100)	25 (1,3 – 78,1)	94,4 (83,7 – 98,6)	100 (5,5 – 100)
<b>197</b>	100 (91,4 – 100)	0 (0 – 69)	94,6 (83,9 – 98,6)	ND

*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, ND: datos no disponibles*

Para los pacientes con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,15% a las 2 semanas postrasplante, el AUC de la curva ROC fue de 0,882 (IC95% 0,77 – 1,0, p = 0,027). El punto de corte que predice el desarrollo de enfermedad por CMV sería de 3476 UI/ml (S = 100%, IC95% 31 – 100, E = 78,4%, IC95% 64,3 – 88,3, VPP = 21,4%, IC95% 5,7 – 51,2, VPN = 100%, IC95% 89,1 - 100) (Tabla 46).

**Tabla 46.** Puntos de corte de carga viral en pacientes sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante (porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> <0,15%). Se detallan los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y del valor predictivo negativo (VPN). La carga viral óptima se definió en función de los valores más altos del VPN y del VPP.

<b>Punto corte, UI/ml</b>	<b>S (IC95%)</b>	<b>E (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>VPN (IC95%)</b>
<i>133770</i>	0 (0 – 69)	100 (91,3 – 100)	ND	94,4 (83,7 – 98,6)
<i>83765</i>	0 (0 – 69)	98,0 (88,2 – 99,9)	0 (0 – 94,5)	94,3 (83,4 – 98,5)
<i>30030</i>	0 (0 – 69)	96,1 (85,4 – 99,3)	0 (0 – 80,2)	94,2 (83,1 – 98,5)
<i>18837</i>	33,3 (1,8 – 87,5)	96,1 (85,4 – 99,3)	33,3 (1,8 – 87,5)	96,1 (85,4 – 99,3)
<i>9581</i>	33,3 (1,8 – 87,5)	94,1 (82,8 – 98,5)	25 (1,3 – 78,1)	96 (85,1 – 99,3)
<i>7415</i>	33,3 (1,8 – 87,5)	92,2 (80,3 – 97,5)	20 (1,1 – 70,1)	95,9 (84,9 – 99,3)
<i>6533</i>	33,3 (1,8 – 87,5)	90,2 (77,8 – 96,3)	16,7 (0,9 – 63,5)	95,8 (84,6 – 99,3)
<i>5947</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	90,2 (77,8 – 96,3)	28,6 (5,1 – 69,7)	97,9 (87,3 – 99,9)
<i>5724</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	88,2 (75,4 – 95,1)	25 (4,5 – 64,4)	97,8 (87,0 – 99,9)
<i>5237</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	86,3 (73,1 – 93,9)	22,2 (4,0 – 59,8)	97,8 (86,8 – 99,9)
<i>4541</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	84,3 (70,9 – 92,5)	20 (3,5 – 55,8)	97,7 (86,5 – 99,9)
<i>4030</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	82,4 (68,6 – 91,1)	18,2 (3,2 – 52,3)	97,7 (86,2 – 99,9)
<i>3837</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	80,4 (66,5 – 89,7)	16,7 (2,9 – 49,1)	97,6 (85,9 – 99,9)
<i>3774</i>	66,7 (12,5 – 98,2)	78,4 (64,3 – 88,3)	15,4 (2,7 – 46,3)	97,6 (85,6 – 99,9)
<i>3476</i>	<b>100 (31 – 100)</b>	<b>78,4 (64,3 – 88,3)</b>	<b>21,4 (5,7 – 51,2)</b>	<b>100 (89,1 – 100)</b>
<i>3144</i>	100 (31 – 100)	76,5 (62,2 – 86,8)	20 (5,3 – 48,6)	100 (88,8 – 100)
<i>3084</i>	100 (31 – 100)	74,5 (60,1 – 85,2)	18,8 (5,0 – 46,3)	100 (88,6 – 100)
<i>2975</i>	100 (31 – 100)	72,6 (58,0 – 83,7)	17,7 (4,7 – 44,2)	100 (88,3 – 100)
<i>2862</i>	100 (31 – 100)	70,6 (56,0 – 82,1)	16,7 (4,4 – 42,3)	100 (88,0 – 100)
<i>2734</i>	100 (31 – 100)	68,6 (54,0 – 80,5)	15,8 (4,2 – 40,5)	100 (87,7 – 100)
<i>2589</i>	100 (31 – 100)	66,7 (52,0 – 78,9)	15 (4,0 – 38,9)	100 (87,4 – 100)
<i>2502</i>	100 (31 – 100)	64,7 (50,0 – 77,2)	14,3 (3,8 – 37,4)	100 (87,0 – 100)
<i>2315</i>	100 (31 – 100)	62,8 (48,1 – 75,5)	13,6 (3,6 – 36,0)	100 (86,7 – 100)
<i>1923</i>	100 (31 – 100)	60,8 (46,1 – 73,8)	13,0 (3,4 – 34,7)	100 (86,3 – 100)
<i>1615</i>	100 (31 – 100)	58,8 (42,3 – 70,4)	12,5 (3,2 – 32,3)	100 (85,4 – 100)
<i>1428</i>	100 (31 – 100)	56,9 (42,3 – 70,4)	12 (3,2 – 32,3)	100 (85,4 – 100)
<i>1278</i>	100 (31 – 100)	54,9 (40,5 – 68,6)	11,5 (3,0 – 31,3)	100 (85,0 – 100)
<i>1196</i>	100 (31 – 100)	52,9 (38,6 – 66,8)	11,1 (2,9 – 30,3)	100 (84,5 – 100)
<i>1110</i>	100 (31 – 100)	51,0 (36,8 – 65,1)	10,7 (2,8 – 29,4)	100 (84,0 – 100)
<i>1095</i>	100 (31 – 100)	49,0 (35,0 – 63,2)	10,3 (2,7 – 28,5)	100 (83,4 – 100)
<i>1084</i>	100 (31 – 100)	47,0 (33,2 – 61,4)	10 (2,6 – 27,7)	100 (82,8 – 100)
<i>1019</i>	100 (31 – 100)	45,1 (31,4 – 59,6)	9,7 (2,5 – 26,9)	100 (82,2 – 100)
<i>957</i>	100 (31 – 100)	43,1 (29,6 – 57,7)	9,4 (2,5 – 26,2)	100 (81,5 – 100)
<i>879</i>	100 (31 – 100)	41,2 (27,9 – 55,8)	9,1 (2,4 – 25,5)	100 (80,8 – 100)

<b>Punto corte, UI/ml</b>	<b>S (IC95%)</b>	<b>E (IC95%)</b>	<b>VPP (IC95%)</b>	<b>VPN (IC95%)</b>
<b>740</b>	100 (31 – 100)	39,2 (26,2 – 53,9)	8,8 (2,3 – 24,8)	100 (80,0 – 100)
<b>668</b>	100 (31 – 100)	37,3 (24,5 – 52,0)	8,6 (2,2 – 24,2)	100 (79,1 – 100)
<b>636</b>	100 (31 – 100)	35,3 (22,8 – 50)	8,3 (2,2 – 23,6)	100 (78,1 – 100)
<b>608</b>	100 (31 – 100)	33,3 (21,2 – 48,0)	8,1 (2,1 – 23,0)	100 (77,1 – 100)
<b>567</b>	100 (31 – 100)	31,4 (19,5 – 46,0)	7,9 (2,1 – 22,5)	100 (75,9 – 100)
<b>477</b>	100 (31 – 100)	29,4 (17,9 – 44,0)	7,7 (2,0 – 22,0)	100 (74,7 – 100)
<b>404</b>	100 (31 – 100)	27,5 (16,3 – 42,0)	7,5 (2,0 – 21,5)	100 (73,2 – 100)
<b>382</b>	100 (31 – 100)	25,5 (14,8 – 39,9)	7,3 (1,9 – 21,0)	100 (71,7 – 100)
<b>375</b>	100 (31 – 100)	23,5 (13,3 – 37,8)	7,1 (1,9 – 20,6)	100 (69,9 – 100)
<b>365</b>	100 (31 – 100)	21,6 (11,8 – 36,7)	7,0 (1,8 – 20,1)	100 (67,9 – 100)
<b>328</b>	100 (31 – 100)	19,6 (10,3 – 33,6)	6,8 (1,8 – 19,7)	100 (65,6 – 100)
<b>293</b>	100 (31 – 100)	17,7 (8,9 – 31,4)	6,7 (1,7 – 19,3)	100 (62,9 – 100)
<b>283</b>	100 (31 – 100)	15,7 (7,5 – 29,1)	6,5 (1,7 – 18,9)	100 (59,8 – 100)
<b>262</b>	100 (31 – 100)	13,7 (6,2 – 26,9)	6,4 (5,8 – 25,5)	100 (56,1 – 100)
<b>238</b>	100 (31 – 100)	11,8 (4,9 – 24,6)	6,3 (1,6 – 18,2)	100 (51,7 – 100)
<b>228</b>	100 (31 – 100)	9,8 (3,7 – 22,2)	6,1 (1,6 – 17,9)	100 (46,3 – 100)
<b>218</b>	100 (31 – 100)	7,8 (2,5 – 19,8)	6 (1,6 – 17,5)	100 (39,6 – 100)
<b>208</b>	100 (31 – 100)	5,9 (1,5 – 17,2)	5,9 (1,5 – 17,2)	100 (31 – 100)
<b>203</b>	100 (31 – 100)	3,9 (0,7 – 14,6)	5,8 (1,5 – 16,9)	100 (19,8 – 100)
<b>198</b>	100 (31 – 100)	2,0 (0,1 – 11,8)	5,7 (1,5 – 16,6)	100 (5,5 – 100)
<b>197</b>	100 (31 – 100)	0 (0 – 8,7)	5,6 (1,5 – 16,3)	ND

*S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, ND: datos no disponibles*



## **VII. DISCUSIÓN**

En la presente tesis se ha comprobado en una cohorte de receptores de TOS de riñón e hígado con serología pretrasplante positiva, considerados de bajo riesgo de enfermedad por CMV, que siguiendo una estrategia de tratamiento anticipado se puede identificar qué pacientes van a controlar espontáneamente la viremia de CMV tras el trasplante a través de la monitorización de la respuesta inmune celular específica frente a CMV, principalmente a través de la respuesta  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ , con las muestras obtenidas inmediatamente antes del trasplante, a las 2 semanas y a las 4 semanas después del trasplante.

La monitorización virológica se realizó a través de PCR a tiempo real, cuya mayor sensibilidad, especificidad y eficacia como método diagnóstico de la infección por CMV ha sido demostrada en numerosos estudios, con un punto de corte específico para pacientes de bajo riesgo establecido previamente en nuestro laboratorio de 3983 UI/ml (100). De esta manera, el presente estudio se convierte en el único que utiliza un punto de corte estandarizado y comparable en otros centros de estudio para guiar el uso de tratamiento anticipado en pacientes TOS de bajo riesgo.

Para la inmunomonitorización se utilizó la tinción intracelular de citoquinas y posterior medición mediante citometría de flujo. Aunque los ensayos de ELISpot y QuantiFERON® son más sencillos, requieren menor infraestructura e incluso existe una estandarización de ambos gracias a su comercialización, la citometría de flujo ofrece una panorámica más específica en cuanto a la determinación de la respuesta inmune, dado que permite la caracterización y cuantificación de más subpoblaciones celulares, así como la detección simultánea de varias citoquinas expresadas o secretadas. Además, en un estudio desarrollado en nuestro laboratorio en el que se comparaba la capacidad de discriminar aquellos receptores de TOS que desarrollaban infección y controlaban la infección espontáneamente sin necesidad de indicación de tratamiento anticipado en función de la respuesta inmune medida por QuantiFERON® o por citometría de flujo (centrándose en el porcentaje de  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ ), se concluyó que esta última técnica fue capaz de predecir qué pacientes tendrán replicación posterior y cuáles requerirán tratamiento antivírico, mientras que con el ensayo comercial no se obtuvo correlación estadísticamente significativa en ningún caso. En cualquier caso, los estudios previos con pacientes de alto riesgo realizados en nuestro laboratorio mostraron que la tinción intracelular de citoquinas y medición por citometría de flujo y, en concreto un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25$ , resultó una técnica eficaz

para la inmunomonitorización durante el tratamiento anticipado en los receptores de TOS con serología pretrasplante negativa para CMV. Para la estimulación de las células T específicas frente a CMV se usó una mezcla de péptidos solapantes que cubren la totalidad de las secuencias de las proteínas pp65 y IE-1. Aunque existe contradicción en la literatura acerca de la consistencia y variabilidad en las respuestas producidas por esta combinación de péptidos, parece que inducen una mayor estimulación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> respecto a los CD4<sup>+</sup> (136, 139). En cualquier caso, son los antígenos predominantes en la mayoría de publicaciones en las que se realiza la monitorización de la respuesta inmune (114, 137), encontrándose resultados similares en la respuesta inmune celular específica frente a CMV cuando se utilizan lisados virales u otros métodos de detección (138). Para seleccionar las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas frente a CMV se utilizó el marcador de superficie de linfocitos T CD69<sup>+</sup>, que se expresa en respuesta a la estimulación antigénica de CMV (145, 146).

Se analizaron para el estudio un total de 106 receptores de trasplante de órgano sólido. Los receptores cardiacos fueron de forma significativa no incluidos o no evaluables con mayor frecuencia que el resto de receptores de trasplante. El motivo principal es que la mayoría de pacientes residían fuera de la provincia de Sevilla y no les fue posible seguir una monitorización inmunoviológica adecuada. Otro motivo frecuente para la no inclusión de receptores renales fue su mayor riesgo inmunológico por la administración de inducción con timoglobulina, que ocurrió en 43 pacientes.

## **1. Incidencia de infección y enfermedad por CMV en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV**

### **1.1. Replicación por CMV**

Uno de cada dos pacientes incluidos en esta cohorte tuvo una infección asintomática por CMV. Esta incidencia es similar a la descrita en estudios previos de pacientes de bajo riesgo de nuestro entorno (19, 100) y también está dentro del rango de estudios recientes publicados de receptores con serología pretrasplante positiva, que oscilan entre un 10-82% (132, 140). La gran variabilidad de incidencia de infección por CMV en las diferentes cohortes publicadas está relacionada con las diferencias entre las

variables importantes para el desarrollo de infección por CMV como la proporción de donantes seropositivos y seronegativos, las diferencias en el uso de timoglobulina, inhibidores de mTOR o micofenolato o los tipos de trasplante incluidos.

### **1.2. Administración de tratamiento anticipado**

El tratamiento antivírico para el control de la infección asintomática por CMV se indicó en casi un tercio de los pacientes, porcentaje similar al de otros estudios realizados de receptores de bajo riesgo. Un 20% del total de los pacientes consiguió aclarar espontáneamente los episodios de replicación. Estos pacientes tuvieron unas cargas virales picos más bajas y en ningún caso alcanzaron cargas virales superiores a 2000 UI/ml. Aunque de forma no significativa, éstos pacientes tuvieron menos episodios de replicación, empezaron a replicar más tarde y cesó la replicación antes que en los pacientes con tratamiento anticipado. Como se discutirá más adelante, la única diferencia que se encontró entre ambos grupos se relacionó con la presencia de respuesta inmune específica de células T frente a CMV.

### **1.3. Infección sintomática**

Comparado con los estudios anteriores (19, 132, 140), la cohorte objeto de análisis en la presente tesis presenta una tasa de infección sintomática muy baja: tan sólo el 2,8% de los pacientes desarrollaron enfermedad por CMV. No hubo ningún síndrome viral, sólo dos gastritis y una enfermedad hepática. Estos datos apoyan que el tratamiento anticipado con una adecuada monitorización es una estrategia muy eficaz para evitar la enfermedad por CMV en los receptores TOS.

### **1.4. Serología del donante**

Existe cierta controversia en la influencia de la serología de CMV del donante en la evolución postrasplante en el receptor de bajo riesgo. En las guías de práctica clínica, aunque se trate a los receptores seropositivos como a un único grupo, existen evidencias que demuestran diferencias en función de la serología donante receptor. En este sentido,

en un estudio con pacientes trasplantados de pulmón, el 34% de los pacientes D+/R+ y sólo el 6% de los pacientes D-/R+ desarrolló episodios de infección o enfermedad por CMV (164), mientras que en otro estudio con pacientes trasplantados renales, hasta el 54% de los pacientes D+/R+ vs.16% de los pacientes D-/R+ desarrollaron episodios de infección, siendo los episodios de enfermedad también significativamente superiores en el primer grupo respecto al segundo (165). En la presente tesis no se evidenciaron diferencias en la incidencia y características clínicas y evolutivas de la infección por CMV, ni en la respuesta inmunológica celular específica en función de la serología. Nuestros resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores que tampoco han encontrado diferencias relevantes en cuanto a características clínicas, episodios de infección por CMV o respuesta inmune celular específica frente a CMV entre los grupos D+/R+ y D-/R+ (141,142).

### **1.5. Inhibidores del mTOR e infección por CMV**

Existen estudios que demuestran la relación del uso de inhibidores del mTOR en pacientes TOS con una menor tasa de replicación de CMV, así como favoreciendo el desarrollo de la inmunidad celular específica frente al virus (66, 143, 144). Sin embargo, no todos los autores encuentran una correlación entre ambos fenómenos (141).

En nuestra cohorte, 12 pacientes modificaron el protocolo inmunosupresor incorporando inhibidores de mTOR (sirolimus o everolimus). Entre ellos, sólo un paciente desarrolló un episodio de replicación posterior al cambio de tratamiento, aunque de forma tardía más allá de la mediana de tiempo de la ocurrencia de viremia por CMV en la presente cohorte. En el caso de la respuesta inmune celular específica, en este grupo de 12 pacientes, 5 pacientes adquirieron respuesta inmune específica frente a CMV ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ ), sin embargo en todos los casos ocurrió antes de la conversión a sirolimus o everolimus, por lo que no contamos con datos para discutir si la sustitución del tratamiento inmunosupresor por inhibidores del mTOR podría favorecer la respuesta inmune celular específica o limitar la replicación de CMV.

## **2. Cronología de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV**

### **2.1. Respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV productoras de IFN $\gamma$**

Para responder al segundo objetivo planteado estudiamos la cronología de la respuesta inmune específica en los pacientes de bajo riesgo incluidos. En general, la respuesta celular medida por la secreción de citoquinas IFN $\gamma$  e IL-2 en las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> fue muy heterogénea, pudiéndose distinguir algo mejor en la producción de IFN $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup>. Se pueden proponer varias explicaciones a este hecho. En primer lugar, la elevada variabilidad de la respuesta inmune en cada paciente, que puede estar influenciada por la base genética del sistema inmunitario, la edad, la dosis, duración y tipo de agentes inmunosupresores utilizados durante el tiempo postrasplante, comorbilidades subyacentes o complicaciones surgidas tras el trasplante. En segundo lugar, la reconstitución de la respuesta inmune postrasplante puede depender de las diferencias encontradas en la inmunidad pretrasplante que, como se discutirá a continuación, puede conducir a una cinética de recuperación diferente en aquellos pacientes con y sin inmunidad previa. En tercer lugar, al ser una medición realizada en sangre, los niveles de linfocitos totales varían y disminuyen en respuesta a los procesos de replicación viral, ya que las células T migran a los nódulos linfoides para inducir la proliferación de clones específicos frente a CMV (147).

Al realizar el análisis utilizando como puntos de corte positivos de la respuesta inmune celular específica frente a CMV un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  mayor o igual a 0,15 o 0,25 y evaluar la evolución de la respuesta inmune específica de CMV durante el primer año tras el trasplante, destaca la gran discrepancia entre los datos de serología frente a CMV pretrasplante y los datos de inmunidad celular específica frente a CMV obtenidos en la muestra pretrasplante, donde el paciente aún no ha recibido tratamiento inmunosupresor. En la cohorte estudiada, el 70% de los pacientes con serología positiva no tenían respuesta inmune específica de células T específicas de CMV. Este hecho ya se había descrito en estudios previos en receptores con serología pretrasplante positiva frente a CMV (11, 128, 129), en los que los porcentajes de pacientes R+ con inmunidad celular específica negativa oscilan entre el 30% y el 50%. Sin embargo, en nuestra cohorte, esta discrepancia entre la serología y la respuesta inmune celular específica es más evidente, elevándose este porcentaje de

pacientes hasta un 70%. Una posible explicación es que el punto de corte elegido de 0,25% fuese demasiado elevado comparado con otros estudios en los que los métodos de medición de la respuesta inmune celular específica son el QuantiFERON® o el ELISpot, (133, 149). Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que, cuando relacionamos la respuesta inmune con la progresión clínica postrasplante, la disminución del punto de corte a un valor de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$   $\geq 0,15\%$  no predice qué pacientes van a aclarar la infección por CMV espontáneamente, por lo que, en principio, un punto de corte de 0,25 resulta más predictivo.

Del 70% de pacientes sin inmunidad a las 2 semanas del trasplante, sólo la mitad alcanzó un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$   $\geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ . Dicha adquisición se produjo en torno a la semana 11 postrasplante, de forma similar a la descrita en otras cohortes de bajo riesgo (150). La otra mitad, esto es, un tercio aproximadamente del total de pacientes incluidos en la cohorte, nunca alcanzaron un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$   $\geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ , es decir, nunca fueron positivos utilizando dichos puntos de corte. De estos pacientes, un 13% fueron capaces de controlar espontáneamente la infección asintomática sin necesidad de tratamiento antiviral con cargas virales picos por debajo de las 1000 UI/ml. Pacientes capaces de controlar la replicación del virus sin inmunidad celular específica han sido descritos previamente en prácticamente todas las cohortes estudiadas, sobre todo en receptores con serología CMV pretrasplante positiva (R+). Gerna *et al.* y Lozza *et al.* proponen que estos pacientes podrían tener inmunidad específica frente a CMV, pero que no está siendo detectada con los péptidos virales usados para la estimulación de las células T, en este caso, pp65 y IE-1 (150, 151). Otros elementos que podrían explicar este hecho es el papel de otros factores, como la inmunidad innata o humoral, en el control de la replicación viral (9, 91).

Cuando comparamos la evolución de la mediana del porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en aquéllos pacientes con y sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante en distintos puntos del seguimiento, se observa claramente cómo en los pacientes con inmunidad la respuesta apenas varía a lo largo del seguimiento, mientras que en el caso de los pacientes sin inmunidad, la respuesta aumenta progresivamente, hasta alcanzar el punto máximo en el momento de la adquisición de inmunidad positiva. Posteriormente, los niveles vuelven a disminuir coincidiendo con el episodio de la

primera replicación, que podría explicarse por el fenómeno de migración a los nódulos linfoides explicado anteriormente. Estos resultados van en la línea de los mostrados por Gerna *et al.*, en los que describió un aumento progresivo y constante de las células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a CMV de aquellos pacientes sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante, mientras que los pacientes que presentaron inmunidad específica a las 2 semanas postrasplante no mostraron apenas variación en el nivel de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a CMV durante el año de seguimiento (150). En el estudio de Eid *et al.*, donde se compara la cinética de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas frente a CMV en una cohorte de pacientes renales tratados con profilaxis universal en función de la serología pretrasplante del receptor, se observa cómo el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> específicas en los receptores de bajo riesgo disminuye hasta acabar el período profiláctico, momento a partir del cual aumenta progresivamente hasta acabar el año de seguimiento, mientras que en el grupo de alto riesgo, la respuesta inmune tarda más en constituirse. Este mismo hecho ocurre en aquellos pacientes de bajo riesgo sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante (148). Estos resultados indican que la cinética de recuperación de la inmunidad celular de CD8<sup>+</sup> específica frente a CMV en pacientes R+ que no presentan inmunidad a las 2 semanas postrasplante es más parecida a la que ocurre en pacientes con serología pretrasplante frente a CMV negativa y de alto riesgo de infección por CMV (D+/R-), cuya respuesta inmune específica en una cohorte de pacientes de alto riesgo tratados anticipadamente ya fue caracterizada en nuestro laboratorio (124).

Esta diferencia en la cinética de recuperación de la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> se confirma cuando se estudia la evolución de la inmunidad postrasplante en función de los datos de inmunidad celular específica pretrasplante. Todos los pacientes con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,25\%$  en la determinación basal o pretrasplante recuperan la inmunidad con una mediana de 12 semanas postrasplante, mientras que entre los pacientes sin inmunidad pretrasplante o basal la mitad de los pacientes nunca alcanzaron este punto de corte. Es decir, utilizando el punto de corte de 0,25% todos los pacientes con inmunidad pretrasplante la recuperan durante el postrasplante, y sólo la mitad de los pacientes sin inmunidad la recupera. De hecho, la evolución del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> es diferente en ambos grupos de pacientes, repitiéndose el patrón antes descrito, manteniéndose prácticamente constante a partir de la cuarta semana en los pacientes con inmunidad pretrasplante,

mientras que aumenta lentamente y siempre con valores significativamente menores en los pacientes sin inmunidad pretrasplante. El valor tan alto de  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  obtenido antes del primer episodio de replicación se debe a que sólo dos pacientes del grupo de pacientes con inmunidad pretrasplante  $\geq 0,25\%$  desarrollaron infección asintomática por CMV.

Al realizar el análisis de la adquisición de la respuesta inmune pretrasplante en función del punto de corte de 0,15%, no todos los pacientes con inmunidad positiva (punto de corte  $\geq 0,15\%$ ) la recuperan después del trasplante. Este hecho apoya la hipótesis de que un punto de corte de 0,25% es más predictivo de la recuperación de la inmunidad celular con efecto terapéutico postrasplante que un punto de corte de 0,15%, aunque este último, medido a las 2 semanas postrasplante, sirva como predictor de alcanzar un porcentaje de 0,25% a las 4 semanas postrasplante.

## **2.2. Respuesta de células T $CD4^+$ específicas de CMV productoras de $IFN\gamma$**

Al igual que ocurre con el resto de citoquinas analizadas, la evolución de la respuesta de  $IFN\gamma$  por las células T  $CD4^+CD69^+$  se mostró muy heterogénea, mostrando un pico de expresión máximo en el décimo mes de seguimiento. Además, los valores son mucho más bajos que en el caso de los  $CD8^+$ , hecho que ya ha sido descrito por nuestro grupo en pacientes TOS de alto riesgo (124).

Cuando se estudia la evolución de la mediana del porcentaje de células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  en aquellos pacientes con y sin inmunidad a las 2 semanas postrasplante ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ ) en distintos puntos del seguimiento, no se observa un aumento o disminución del mismo a lo largo del seguimiento entre ambos grupos de pacientes, aunque se mantuvo mayor en los pacientes con inmunidad hasta el final de seguimiento. Cuando se estudia la evolución de la mediana del porcentaje de células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  en aquellos pacientes con y sin inmunidad pretrasplante ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ ) en distintos puntos del seguimiento se observa cierto aumento progresivo hasta el momento de detección de la inmunidad, para volver a disminuir durante el primer evento de replicación. Esta cinética de la respuesta de las células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  coincide con los resultados de Shabir *et al.*, Eid *et al.* y Sund *et al.*, en los que los valores se mantienen

prácticamente constantes a lo largo del seguimiento, no llegando a alcanzar los porcentajes basales o haciéndolo sólo a final de seguimiento (148, 152, 153).

Muchos estudios destacan el papel de las células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  en el control de la infección por CMV, proponiendo que sin dicha respuesta el control de la infección por CMV no resulta efectiva (131, 132, 139, 152). Sin embargo, la respuesta de células T  $CD4^+$  se relaciona con la protección a largo plazo en infecciones persistentes o latentes (133, 154). En nuestra cohorte, todos los episodios de replicación ocurren con una mediana de 7 semanas, por lo que, según la literatura, la respuesta de células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  no sería esencial para el control de la infección en ese momento.

Por todo ello, para predecir qué pacientes controlarán espontáneamente la infección, nos centramos en la respuesta de las células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ .

### **2.3. Respuesta de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ específicas de CMV productoras de IL2**

Debido al papel de la IL2 en la respuesta inmune celular, se estudió la producción de IL2 por células T  $CD8^+$  y  $CD4^+$  específicas de CMV a lo largo del seguimiento. Tanto en las células  $CD8^+$  como  $CD4^+$  la secreción de IL2 en respuesta a la estimulación específica de los péptidos de CMV fue muy heterogénea, con valores medianos que no superaron el 0,03% en ningún caso. Este hecho coincide con lo descrito por otros autores, ya que la producción de IL2, a pesar de ser esencial para desarrollar respuestas de memoria eficientes, es temporal, y no se ha demostrado claramente su relación con la respuesta celular inmediata y el control de la infección viral (155). En estudios realizados en pacientes con infección por VIH, se ha demostrado la pérdida en la expresión de ciertas citoquinas en la respuesta de células T específicas de antígeno, entre las que se encuentra la IL2 (156), pudiendo subyacer un mecanismo parecido en el caso del CMV.

### **2.4. Respuesta de células T $CD8^+$ y $CD4^+$**

La evolución del porcentaje total de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> siguió una cinética de recuperación como la que se ha descrito en otros estudios (150, 157). En el caso de las células T CD4<sup>+</sup> el aumento durante las primeras semanas postrasplante es más pronunciado que en el caso de las CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, la subpoblación de células CD8<sup>+</sup> se incrementa progresivamente hasta el final, mientras que la subpoblación de CD4<sup>+</sup> se mantiene constante, a partir del ascenso inicial. Este fenómeno ha sido descrito previamente y se conoce como inflación de la subpoblación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que ocurre tanto en linfocitos totales como en el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, y se ha relacionado con la infección crónica por CMV (158, 159).

La respuesta inmune específica medida a través de las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> constituye la defensa principal frente a la infección por CMV. Sin embargo, las técnicas utilizadas para la inmunomonitorización no se encuentran disponibles en todos los centros de salud. Además, no son métodos con puntos de corte estandarizados, los procedimientos son laboriosos y requieren equipos y personal especializados. Por este motivo resulta de interés comprobar si existe una correlación entre el número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> y el porcentaje de células CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> específicas frente a CMV, así como el número total de linfocitos CD4<sup>+</sup> y el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> específicas frente a CMV, para poder utilizar los valores de las subpoblaciones de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, medidas que están disponibles durante el seguimiento de los pacientes, como marcador subrogado en los centros donde las técnicas de inmunomonitorización no estén disponibles. Sin embargo, los resultados en esta cohorte de pacientes mostraron coeficientes de correlación muy por debajo del 0,8 necesario para considerar una correlación como estadísticamente buena, por lo que no podemos concluir que el número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> es un buen marcador subrogado para predecir la inmunidad celular específica frente a CMV.

### **3. Relación de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV con la infección en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV**

En el presente estudio, utilizando una cohorte de pacientes TOS de bajo riesgo de enfermedad e infección por CMV tratados anticipadamente, mostramos que estableciendo un punto de corte en la semana 2 y 4 postrasplante del porcentaje de

células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  específicas frente al virus, es posible identificar qué pacientes serán capaces de controlar espontáneamente la infección por CMV.

### **3.1. Definición de un umbral de respuesta inmune de células T con efecto terapéutico**

Existe controversia en torno a la relación directa entre la replicación del virus, asintomática o sintomática, y la inmunidad celular específica en receptores de TOS con serología pretrasplante positiva frente a CMV. Muchos estudios han encontrado una correlación inversa entre la proporción de pacientes que desarrollan infección o de las cargas virales pico y la respuesta inmune específica medida a partir de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  (101, 128, 131, 138, 139). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado correlación entre ambas variables (148, 150), o la encuentran a los 2 meses del trasplante, constituyendo un punto de escasa utilidad para la predicción de viremia (141, 152). Aunque existen pocos estudios sobre el tema, se puede observar una tendencia por una parte, entre la ausencia de infección por CMV tras el trasplante y la presencia de respuesta inmune específica en el momento basal, y por otra parte, entre la adquisición de inmunidad específica durante el postrasplante y la capacidad de resolver espontáneamente los episodios de viremia sin necesidad de tratamiento antiviral (133, 149). En ambos casos, nuestros datos coinciden con dichas observaciones.

Para responder al tercer objetivo planteado en este trabajo, analizamos el porcentaje total de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en el momento basal, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante en los pacientes que desarrollaron infección por CMV durante el seguimiento y los que no, y no se obtuvieron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias respecto a los pacientes en los que se indicó tratamiento anticipado y los que no. La explicación más probable, en primer lugar, podrían ser las diferencias observadas entre los pacientes que presenta inmunidad positiva y negativa antes del trasplante; en segundo lugar, la variabilidad observada en la recuperación de la inmunidad postrasplante; y en tercer lugar la heterogeneidad observada en la cinética de adquisición de la respuesta inmune en todos los pacientes.

También se compararon las subpoblaciones totales de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en función de la replicación y la indicación de tratamiento en los tres momentos del

seguimiento indicados, observándose que aquellos pacientes que necesitaron indicación de tratamiento anticipado en algún momento del seguimiento tuvieron un recuento linfocitario más bajo en la muestra pretrasplante. Este dato coincide con lo encontrado por Calarota *et al.*, en una cohorte de trasplantados renales y cardíacos, en la que los pacientes que tuvieron una tasa mayor de infecciones oportunistas, de las cuales la más común fue la infección por CMV, tuvieron un recuento linfocitario menor en la muestra basal (161). Sin embargo, en otro estudio el momento más predictivo resultó ser el primer mes postrasplante, por lo que se necesitan más estudios que arrojen luz sobre la inmunomonitorización de linfocitos en pacientes trasplantados de órgano sólido (157).

Realizamos curvas ROC para determinar el punto de corte de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  en el momento pretrasplante, a las 2 y a las 4 semanas postrasplante que pudiera predecir el desarrollo de viremia o la indicación de tratamiento antiviral, pero tampoco fueron valorables. Aunque en otros estudios se aportan curvas ROC con áreas bajo la curva (AUC) por debajo de 0,8, no se puede extraer información estadística y clínicamente útil de tales resultados (129, 138, 163). Una posible explicación de este resultado es la variabilidad y heterogeneidad observada en el conjunto de la muestra, debida a las razones discutidas en el apartado anterior. Una segunda explicación podría estar relacionada con los datos obtenidos por nuestro grupo, según los cuales el punto de corte de carga viral de CMV para el inicio de tratamiento antiviral en función al desarrollo de enfermedad difiere en los pacientes trasplantados hepáticos y renales (3000 UI/ml y 5500 UI/ml respectivamente, manuscrito en redacción). Cuando se analizaron las curvas ROC separando el grupo de pacientes hepáticos y renales, sólo se obtuvo una curva ROC con una AUC superior a 0,8, en concreto de 0,847, en los pacientes trasplantados hepáticos. Según estos resultados, el valor de la inmunidad celular específica para identificar qué pacientes realizarán tratamiento anticipado es discriminativo en el receptor de trasplante hepático, pero no en el trasplantado renal. Es posible que en el receptor de trasplante renal, el tratamiento anticipado pudiera diferirse hasta alcanzar cargas virales más elevadas sin aumentar el riesgo de desarrollo de enfermedad. El punto de corte que se establece a partir de la curva ROC en trasplante hepático con los mejores valores de VPP y VPN sería de 0,015% de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ . Sin embargo, son valores demasiados bajos que impiden su uso en la clínica, por lo que para analizar los resultados de toda la cohorte de pacientes se siguió utilizando los puntos de corte de 0,25 y 0,15.

Varios estudios han puesto de manifiesto que el resultado positivo de la respuesta inmune celular específica basal frente a CMV en pacientes de bajo riesgo (R+) es un predictor válido del desarrollo de enfermedad, viremia o control espontáneo de la infección por CMV (11, 128, 129, 138, 163). Los datos expuestos en la presente tesis muestran en los pacientes con inmunidad pretrasplante una tendencia menor en la tasa de replicación por CMV, en el número de episodios de replicación, en las cargas virales pico y en el resto de variables relacionadas con la infección respecto a los pacientes sin inmunidad celular pretrasplante. Sin embargo, sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en la indicación de tratamiento anticipado para un punto de corte de 0,25%. La explicación más probable para este hecho es el reducido tamaño muestral de pacientes con muestra pretrasplante disponible.

Sin embargo, la situación inmunológica del paciente cambia de forma importante a lo largo del primer mes del trasplante, ya que es el momento de mayor inmunosupresión, además de ser el periodo en que suelen ocurrir la mayoría de los episodios de rechazo tratados. Esto puede determinar que los pacientes con inmunidad celular específica pretrasplante puedan no tenerla a partir del segundo mes, momento en el que suelen ocurrir la gran mayoría de las infecciones por CMV.

En todo caso, tener un valor de células  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  a las cuatro semanas del trasplante fue un indicador para predecir el control de la viremia por CMV en el receptor de trasplante de bajo riesgo de infección por CMV.

Además este dato concuerda con los datos obtenidos en estudios en pacientes de alto riesgo en nuestro grupo, en los que se demostró que alcanzar este umbral ( $\geq 0,25\%$ ) en el porcentaje de las células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  tenía un efecto terapéutico frente a los eventos de infección y enfermedad por CMV posteriores (124). En otros estudios con pacientes de bajo riesgo se han propuesto otros puntos de corte protectores de enfermedad por CMV adquiridos en cualquier momento del postrasplante:  $\geq 0,4$  células T específicas/ $\mu l$  (132, 150),  $>50$  unidades formadoras de placa por 200000 células (141, 162) ó  $\geq 0,03\%$  células T  $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$  (139). Sin embargo, el único estudio comparable con el nuestro por la metodología utilizada es el publicado por Egli *et al.*, aunque, en su caso, los autores concluyeron que un porcentaje de 0,03 células T  $CD4^+$  específicas era predictor del desarrollo de viremia (139).

Según nuestros datos, un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,15\%$  en la cuarta semana del trasplante no es suficiente para controlar espontáneamente la infección por CMV. Sin embargo, a las 2 semanas del trasplante aquellos pacientes que alcanzan este porcentaje tienen un riesgo 0,165 veces inferior de requerir tratamiento y 0,107 veces inferior de desarrollar cargas virales superiores a 2000 UI/ml. Esto probablemente es debido a que este umbral es predictor de alcanzar un porcentaje protector de infección de CMV (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,25\%$ ) a las 4 semanas.

Cuando se estudiaron las características de la infección en función de tener inmunidad o no (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ ), pero esta vez en receptores hepáticos y renales por separado, los resultados obtenidos son aplicables a los receptores hepáticos, pero no a los renales. Es más, en el grupo de receptores hepáticos tener un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>  $\geq 0,15\%$  en la cuarta semana del trasplante también fue un factor predictor para determinar qué pacientes podrían controlar espontáneamente la infección, así como de ausencia de viremia elevada en el postrasplante. Sin embargo, en el grupo de pacientes trasplantados renales, no se pudieron obtener resultados concluyentes acerca de ninguno de los puntos de corte analizados en ningún momento antes o después del trasplante.

Como se explicó anteriormente, estos resultados están en concordancia con los obtenidos en las curvas ROC del apartado 3.3.1., así como con los resultados obtenidos en otros estudios de nuestro grupo, en los que el punto de corte para el inicio de tratamiento en receptores renales es más elevado (5500 UI/ml) que en los receptores hepáticos (3000 UI/ml). Por tanto, en el receptor renal de bajo riesgo podría diferirse la indicación de tratamiento anticipado, mientras que en el caso del receptor hepático quizás podría reducirse el punto de corte de inmunidad celular específica, en virtud del punto de corte obtenido en la curva ROC y de los análisis bivariantes de las características de la infección en función de la inmunidad.

Existen pocos estudios que relacionen las características de la infección por CMV en función de la inmunidad y del órgano trasplantado, aunque todos muestran diferencias tanto en la viremia como en el control de la infección (19, 101). Asimismo, las guías de práctica clínica (33, 91) ya recomiendan un seguimiento y tratamiento individualizado en función del tipo de órgano trasplantado, por lo que estos resultados podrán contribuir a dicho propósito.

Otros autores que proporcionan un punto de corte para predecir infección o enfermedad por CMV mediante tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo y usando una estrategia de tratamiento anticipado, aunque el proceso de estimulación antigénica sea diferente al empleado por nosotros, llegan a resultados similares a los expuestos en el presente trabajo, pero estratificando a los pacientes de acuerdo al estado de la respuesta inmune celular específica justo antes de la replicación por CMV, por lo que de esta manera no se puede predecir qué pacientes necesitarán tratamiento hasta realizar un análisis posterior del seguimiento (132, 150, 151). Sin embargo, en la presente tesis se ha determinado un valor a las 4 semanas, antes de que el paciente replique, que permite pronosticar qué pacientes aclararán la viremia de forma espontánea, sin ayuda de tratamiento, lo cual puede simplificar la monitorización y seguimiento posterior del paciente.

La presencia de rechazo y el tratamiento del mismo pueden modificar la respuesta inmune del paciente, incluida la respuesta inmune específica frente a CMV. En nuestro caso, los pacientes que requieren bolos de corticosteroides por rechazo modifican su situación inmunológica respecto al estudio pretrasplante, por lo que es importante determinar un umbral en el postrasplante antes de que desarrolle viremia. Dado que la mayoría de los episodios de rechazo ocurren en el primer mes de trasplante, obtener a las 4 semanas un predictor de la infección por CMV puede ser particularmente útil para el manejo de la infección por CMV en el trasplantado de órgano sólido. De hecho, de los pacientes que reciben bolos de esteroides como respuesta al rechazo agudo, dos terceras partes desarrollan episodios de infección por CMV, necesitando tratamiento anticipado más de la mitad de ellos. Probablemente, el uso de esteroides facilita la replicación del virus latente, pero no influye en el control espontáneo de la misma, que parece estar asociado a la existencia de inmunidad celular específica frente a CMV ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$ ). Estos resultados están en concordancia con estudios previos (19, 132, 140).

Dado que la situación de la inmunidad celular específica puede ser cambiante en el postrasplante, fundamentalmente en pacientes que requieren tratamiento con bolos de corticoides por rechazo, y que la muestra pretrasplante puede ser logísticamente compleja de obtener, medir la respuesta inmune específica a las dos semanas del trasplante permitiría definir un grupo de pacientes con muy bajo riesgo de enfermedad

por CMV y que no requeriría de tratamiento anticipado para controlar la infección, pudiendo ser prescindible su monitorización virológica. De esta manera, se ha aportado información crucial no disponible con anterioridad para el diseño de un ensayo clínico donde evaluar una estrategia global de prevención de enfermedad por CMV en pacientes con y sin inmunidad celular específica basada en la situación inmunológica y virológica del enfermo.

Aunque el control de CMV por el sistema inmunitario requiere de la participación de prácticamente todos sus componentes, uno de los objetivos del estudio era obtener un marcador simple y robusto de la respuesta inmune celular específica frente a CMV que prediga qué receptores de TOS de bajo riesgo tienen mayor riesgo de desarrollar infección y enfermedad. Según los resultados obtenidos en la cohorte analizada, un porcentaje de células T  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  es un buen predictor de los receptores que controlarán espontáneamente la infección. Sin embargo, sigue existiendo un pequeño porcentaje en los que esta respuesta sigue siendo insuficiente, por lo que se requieren más estudios que proporcionen más información sobre otros componentes de la respuesta inmune específica frente a CMV, en concreto el papel de las NK, Treg o los anticuerpos neutralizantes en la respuesta humoral.

### **3.2. Valoración de la respuesta inmune específica de células T como factor de riesgo de enfermedad por CMV**

Debido a la baja tasa de infección sintomática en la cohorte estudiada, no se pudo analizar estadísticamente si la respuesta inmune específica podía constituir un factor de riesgo de enfermedad por CMV. No obstante, los tres únicos pacientes que desarrollaron enfermedad de órgano no presentaban inmunidad celular específica ( $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+ \geq 0,25\%$  ó  $\geq 0,15\%$ ), ni basal ni previa al episodio de replicación. De los estudios con cohortes de pacientes de bajo riesgo que presentaron episodios de infección sintomática, todos van en la línea de los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que en cualquier caso, una respuesta positiva de inmunidad celular específica se correlaciona con una menor o nula tasa de enfermedad por CMV (11, 128, 132, 141, 160).

### **3.3. Definición de un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio del tratamiento antiviral en función de la respuesta inmune celular específica en pacientes de bajo riesgo de enfermedad por CMV**

En pacientes con inmunidad celular específica frente a CMV no se puede establecer un punto de corte debido a la ausencia de enfermedad. Sin embargo, no se puede concluir si en otras circunstancias, como por ejemplo, no indicando tratamiento anticipado en pacientes con inmunidad, estos resultados serían aplicables, y se seguiría sin observar enfermedad por CMV en dichos pacientes.

En pacientes sin inmunidad se ha conseguido obtener un punto de corte de carga viral de CMV para el inicio de tratamiento antiviral predictor del desarrollo de enfermedad a partir del análisis de curvas ROC. Los resultados obtenidos van en la línea de lo descrito previamente en nuestro grupo por Martín-Gandul *et al.*, que estableció como punto de corte óptimo para el inicio del tratamiento anticipado en una cohorte de pacientes TOS de bajo riesgo una carga viral de 3893 UI/ml. De esta manera, dentro del conjunto de pacientes con serología pretrasplante por CMV positiva (R+), se ha conseguido definir un grupo de pacientes en los que la monitorización virológica debe ser más estrecha por no tener inmunidad celular específica.

#### **Limitaciones**

Es necesario señalar algunas limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral de las determinaciones pretrasplantes ha impedido la realización de análisis multivariante en este punto. En segundo lugar, no se ha estudiado si la respuesta inmune celular CMV específica en el pretrasplante es estable en los pacientes antes del trasplante, ya que todas las muestras incluidas en este estudio fueron tomadas inmediatamente antes de cirugía. No se puede pues, establecer si estos resultados son aplicables con muestras tomadas anteriormente ya que es posible que la enfermedad de órgano terminal pudiera tener impacto en la respuesta CMV específica del candidato. En tercer lugar, dada la ausencia de enfermedad en pacientes con inmunidad celular específica de CMV, no se ha podido establecer un punto de corte de inmunidad celular específica para el inicio de tratamiento anticipado en esta población. Por último, se ha realizado un estudio observacional de cohortes, donde la indicación de tratamiento

anticipado era decisión del clínico que atendía al paciente, por lo que son necesarios ensayos clínicos aleatorizados que confirmen los resultados de este estudio.

En conclusión, los resultados de esta tesis han permitido identificar qué pacientes van a controlar espontáneamente la viremia de CMV tras el trasplante con muestras obtenidas inmediatamente antes del trasplante, a las 2 semanas y a las 4 semanas y en pacientes sin inmunidad establecer un punto de corte para el inicio de tratamiento antiviral anticipado.



## **VIII. CONCLUSIONES**

1. La enfermedad por CMV en pacientes de bajo riesgo con una monitorización virológica adecuada es muy infrecuente.
2. Existe una gran discrepancia entre los datos de serología frente a CMV e inmunidad celular específica frente a CMV.
3. La cinética de recuperación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos frente a CMV en pacientes sin inmunidad previa al trasplante es similar a la cinética de recuperación de los pacientes con serología frente a CMV negativa (R-).
4. En los pacientes con inmunidad celular específica frente a CMV pretrasplante positiva, ésta se pierde casi en la mitad de los casos a las 2 semanas del trasplante, llegando a recuperarla el 90% de los pacientes a las 4 semanas. En aquellos en los que la inmunidad pretrasplante es negativa, el 50% consigue una respuesta inmune específica superior al 0,25%, a una mediana de 11 semanas desde el trasplante.
5. Un porcentaje de células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$   $\geq 0,25$  CMV específicas a las 4 semanas reduce de forma independiente el riesgo de requerir tratamiento anticipado y el desarrollo de viremias elevadas.
6. Un porcentaje de células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$   $\geq 0,15$  específicas CMV a las dos semanas tras el trasplante es capaz de predecir qué población de pacientes alcanzarán 0,25% a las 4 semanas.
7. El recuento de linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> totales en el momento pretrasplante es más bajo en los pacientes en los que se indicó tratamiento anticipado para CMV que en aquéllos que aclararon la infección espontáneamente o no tuvieron infección.
8. Los receptores hepáticos y renales, aunque están considerados como receptores de órgano sólido de bajo riesgo de enfermedad por CMV, tienen un comportamiento en relación a esta infección diferente.
9. Sólo los pacientes sin inmunidad celular específica presentaron enfermedad por CMV.

10. En pacientes sin inmunidad celular específica frente a CMV se ha podido establecer un punto de corte diferenciado para el inicio de tratamiento antiviral, resultando en 3589 UI/ml, con un elevado valor predictivo negativo.



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Comité Internacional de la Taxonomía Viral. <http://www.ictvdb.org/>.
2. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11879-11883.
3. Mocarski ES, Jr. Shenk T, Griffith P, Pass RF. Cytomegaloviruses, p 1960-2014. In: Knipe DM, Howley PM (ED), *Fields virology*, 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007, Philadelphia, PA.
4. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 2004; 78: 10960-10966.
5. Kern F, Bunde T, Faulhaber N, et al. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 2002; 185: 1709-1716.
6. Reeves MB, Sinclair JH. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *J Gen Virol* 2010; 91, 599-604.
7. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 5-8.
8. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol* 2015; 235: 288-297.
9. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76-98.
10. Fietze E, Prosch S, Reinke P, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 1994; 58: 675-680.
11. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1031-1036.

12. Paulus C, Nevels M. The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses* 2009; 1, 760-779.
13. De Ory F, Ramírez R, García Comas L, et al. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol* 2004; 19: 85-89.
14. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007; 17: 253-276.
15. Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, et al. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; 302: 1073-1076.
16. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7: S701-710.
17. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, et al. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995; 86: 3598-3603.
18. Boeckh M, 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.
19. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am J Transpl* 2012; 12: 2457-2464.
20. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 1996; 39: 302-319.
21. Weller TH. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis* 1970; 122: 532-539.
22. Gandhi MK, Khanna. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 725-738.

23. Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Rev Med Virol* 2010; 20: 372-379.
24. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16: 44-49.
25. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, et al. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. *J Infect Dis* 1992; 166: 1223-1227.
26. Steininger CE, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 2006; 37: 1-9.
27. Salmon-Ceron D, Mazon MC, Chaput S, et al. Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14: 1041-1049.
28. Ljungman, P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 209-217.
29. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, et al Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 543-558.
30. Nichols WG, Corey L, Gooley T, et al. 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: 273-282.
31. 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.
32. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, et al. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol* 2009; 19: 47-56.

33. De la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 735-758.
34. Arthurs Sk, Eid AJ, Pedersen RA, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 840-846.
35. Perez-Sola MJ, Caston JJ, Solana R, et al. Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 38-47.
36. George MJ, Snyderman DR, Werner BG, et al. The independence role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. *Am J Med* 1997; 103: 106-113.
37. Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, et al. Exposure to cytomegalovirus from the donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 468-474.
38. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, et al. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1346- 1353.
39. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 850-856.
40. Streblow DN, Orloff SI, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 577-582.
41. Audard V, Matignon M, Hemery F, et al. Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *Am J Transplant* 2006; 6: 95-99.
42. Potena L, Valentine HA. Cytomegalovirus-associated allograft rejection in heart transplant patients. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 425-431.

43. Thomas LD, Milstone AP, Miller GG, et al. Long-term outcomes of cytomegalovirus infection and disease after lung or heart-lung transplantation with a delayed ganciclovir regimen. *Clin Transplant* 2009; 23: 476-483.
44. Hindupur S, Yeung M, Shroff P, et al. Vanishing bile duct syndrome in a patient with advanced AIDS. *HIV Med* 2007; 8: 70-72.
45. Leung Ki EL, Venetz JP, Meylan P, et al. Cytomegalovirus infection and new-onset post-transplant diabetes mellitus. *Clin Transplant* 2008; 22: 245-249.
46. Fletcher JM, Prentice HG, Grundy JE. Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J Immunol* 1998; 161: 2365-2374.
47. Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, et al. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 1997; 386: 514-517.
48. Schrier RD, Rice GP, Oldstone MB. Suppression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh isolates of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1986; 153: 1084-1091.
49. Sester U, Presser D, Dirks J, et al. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 2008; 8: 1486-1497.
50. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol* 2002; 76: 8596-8608.
51. Spiller OB, Hanna SM, Devine DV, et al. Neutralization of cytomegalovirus virions: the role of complement. *J Infect Dis* 1997; 176: 339-347.
52. Frascaroli G, Varani S, Blankenhorn N, et al. Human cytomegalovirus paralyzes macrophage motility through down-regulation of chemokine receptors,

- reorganization of the cytoskeleton, and release of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 2009; 182: 477-488.
53. Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient : the end of the 'silo hypothesis'. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 399-407.
  54. Fishman JA, Emery V, Freeman R, et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007; 21: 149-158.
  55. Sun HY, Cacciarelli TV, Wagener MM, et al. Preemptive therapy for CMV based on real-time measurement of viral load in liver transplant recipients. *Transplant Immunol* 2010; 23: 166-169.
  56. Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, et al. Cytomegalovirus infection after liver transplantation incidence, risk and benefits of prophylaxis. *Transplant Proceed* 2010; 42: 2634-2641.
  57. Emery VC, Asher K, Sanjuan C de J. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *J Clin Virol* 2012; 54: 125-129.
  58. Razonable RR, Humar A, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 93-106.
  59. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N England J Med* 2007; 357: 2601-2614.
  60. Cope AV, Sabin C, Burroughs A, et al. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient seroestatus, and administration of methylprednisolone as risk factor for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis* 1997; 176: 1484-1490.
  61. Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros JM, et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 173-180.

62. Luan FL. Six-month low-dose valganciclovir prophylaxis in cytomegalovirus D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup> kidney transplant patients receiving thymoglobulin induction. *Transplant Proc* 2013; 45: 175-177.
63. Portela D, Patel R, Larson-Keller JJ, et al. OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. *J Infect Dis* 1995; 171: 1014-1018.
64. Peleg AY, Husain S, Kwak EJ, et al. Opportunistic infections in 547 organ transplant recipients receiving alemtuzumab, a humanized monoclonal CD-52 antibody. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 204-212.
65. Sancho Calabuig A, Gavela Martínez E, Kanter Berga J, et al. Safety and efficacy of induction treatment with low thymoglobulin doses in kidney transplantation from expanded-criteria donors. *Transplant Proc* 2015; 47: 50-53.
66. Nashan B, Gaston R, Emery V, et al. Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* 2012; 93: 1075-1085.
67. Humar A, Asberg A, Kumar D, et al. An assessment of herpesvirus co-infections in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes. *Am J Transplant* 2009; 9: 374-381.
68. Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001; 184: 1461-1464.
69. Stratta RJ, Pietrangeli C, Baillie GM. Defining the risk for cytomegalovirus infection and disease after solid organ transplantation. *Pharmacotherapy* 2010; 30: 144-157.
70. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, et al. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1315-1320.

71. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, et al. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 83: 359-362.
72. Krishnan A, Zhou W, Lacey SF, et al. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transpl Infect Dis* 2010; 12: 363-370.
73. Cummins NW, Deziel PJ, Abraham RS, et al. Deficiency of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in patients presenting with late-onset CMV disease several years after transplantation. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 20-27.
74. Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4849-4860.
75. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 746-752.
76. Hayden RT, Yan X, Wick MT, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 337-345.
77. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* 2011; 121: 1673-1680.
78. Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, et al. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol* 2008; 18: 177-210.
79. Dunn DL, Mayoral JL, Gillingham KJ, et al. Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir. *Transplantation* 1991; 51: 98-106.
80. Markham A, Faulds D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 1994; 48: 455-484.
81. Asberg A, Humar A, Rollag H, et al. Oral valganciclovir is non-inferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2106-2113.

82. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2010; 10: 1228-1237.
83. Kusne S, Shapiro R, Fung J. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1: 187-203.
84. Zegrí I, Gómez-Bueno M, Segovia J. Successful use of maribavir for drug-resistant cytomegalovirus colitis in a heart transplant recipient. *Rev Esp Cardiol* 2015; [Epub ahead of print].
85. Chemaly RF, Ullmann Aj, Stoelben S, et al. Letermovir for citomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2014; 8: 1781-1789.
86. Marty FM, Winston DJ, Rowley SD, et al. CMX001 to prevent cytomegalovirus disease in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2013; 369: 1227-1236.
87. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 689-712.
88. Hakki M, Chou S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 605-611.
89. Goldner T, Hempel C, Ruebsamen-Schaeff H, et al. Geno- and phenotypic characterization of human cytomegalovirus mutants selected in vitro after letermovir (AIC246) exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 610-613.
90. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, et al. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant* 2008; 22: 162-170.
91. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96: 333-360.

92. Boillat Blanco N, Pascual M, Venetz JP, et al. Impact of a preemptive strategy after 3 months of valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2011; 91: 251-255.
93. Small LN, Lau J, Snyderman DR. Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 869-880.
94. Paya C, Humar A, Dominguez E, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 611-620.
95. Finlen Copeland CA, Davis WA, Snyder LD, et al. Long-term efficacy and safety of 12 months of valganciclovir prophylaxis compared with 3 months after lung transplantation: a single-center, long-term follow-up analysis from a randomized, controlled cytomegalovirus prevention trial. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 990-996.
96. Bonaros N, Mayer B, Schachner T, et al. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clin Transplant* 2008; 22: 89-97.
97. Owers DS, Webster AC, Strippoli GF, et al. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database of Syst Rev* 2013; 2: CD005133.
98. Singh N. Antiviral drugs for cytomegalovirus in transplant recipients: advantages of preemptive therapy. *Rev Med Virol* 2006; 16: 281-287.
99. Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, et al. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med* 2005; 143: 870-880.
100. Martín-Gandul C, Pérez Romero P, Sánchez M, et al; Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol* 2013; 56: 13-18.

101. Sester U, Gatner BC, Wilkens H, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1483-1489.
102. Cervera C, Lozano F, Saval N, et al. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation* 2007; 83: 1493-1500.
103. De Rooij BJ, van der Beek MT, van Hoek B, et al. Mannose-binding lectin and ficolin-2 gene polymorphisms predispose to cytomegalovirus (re)infection after orthotopic liver transplantation. *J Hepatol* 2011; 55: 800-807.
104. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 163-194.
105. Stern M, Elsasser H, Honger G, et al. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; 8: 1312-1317.
106. Wu Z, Sinzger C, Reichel JJ, et al. Natural killer cells can inhibit the transmission of human cytomegalovirus in cell culture by using mechanisms from innate and adaptive immune responses. *J Virol* 2015; 89: 2906-2917.
107. Brizic I, Lenac Rovis T, Krmptotic A, et al. MCMV avoidance of recognition and control by NK cells. *Semin Immunopathol* 2014; 36: 641-650.
108. Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, et al. Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *J Clin Immunol* 2012; 32: 1324-1331.
109. Genini E, Percivalle E, Sarasini A, et al. Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *J Clin Virol* 2011; 52: 113-118.
110. Corales R, Chua J, Mawhorter S, et al. Significant post-transplant hypogammaglobulinemia in six heart transplant recipients: an emerging clinical phenomenon? *Transpl Infect Dis* 2000; 2: 133-139.

111. Doron S, Ruthazer R, Werner BG, et al. Hypogammaglobulinemia in liver transplant recipients: incidence, timing, risk factors, and outcomes. *Transplantation* 2006; 81: 697-703.
112. Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 2004; 65: 500-506.
113. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, et al. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78: 1373-1380.
114. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202: 673-685.
115. Egli A, Silva M Jr, O'Shea D, et al. An analysis of regulatory T-cell and Th-17 cell dynamics during cytomegalovirus replication in solid organ transplant recipients. *Plos One* 2012; 7: e43937.
116. Lilleri D, Zelini P, Fornara C, et al. Human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in primary infection of the immunocompetent and the immunocompromised host. *Clin Immunol* 2009; 131: 395-403.
117. Crough T, Fazou C, Weiss J, et al. Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *J Virol* 2007; 81: 11538-11542.
118. Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, et al. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells in protection against CMV disease. *Blood* 2003; 101: 2686-2692.
119. Costa C, Saldan A, Cavallo R. Evaluation of virus-specific cellular immune response in transplant patients. *World J Virol* 2012; 1: 150-153.
120. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N England J Med* 1995; 333: 1038-1044.

121. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 3916-3922.
122. Davignon JL, Castanie P, Yorke JA, et al. Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4<sup>+</sup> T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro. *J Virol* 1996; 70: 2162-2169.
123. Cassaza JP, Betts MR, Price DA, et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med* 2006; 203: 2865-2877.
124. BenMarzouk-Hidalgo OJ, Cisneros JM, Cordero E, et al. Therapeutic effect of the acquisition of cytomegalovirus-specific immune response during preemptive treatment. *Transplantation* 2011; 91: 927-933.
125. Fernández-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology* 2014; 3: e12.
126. Engstrand M, Tournay C, Peyrat MA, et al. Characterization of CMVpp65-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes using MHC tetramers in kidney transplant patients and healthy participants. *Transplantation* 2009; 69: 2243-2250.
127. Cantisán S, Navarro D. Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. *Tratamientos de base inmunológica. Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29: 28-32.
128. Cantisán S, Lara R, Montejo M, et al. Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 738-745.
129. López-Oliva MO, Martínez V, Buitrago A, et al. Pretransplant CD8 T-cell response to IE-1 discriminates seropositive kidney recipients at risk of developing CMV infection posttransplant. *Transplantation* 2014; 97: 839-845.
130. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-1097.

131. Sester M, Sester U, Gärtner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1287-1294.
132. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 2463-2471.
133. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 1678-1689.
134. Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1 specific IFN $\gamma$  CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *J Med Virol* 2010; 82: 1208-1215.
135. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infect Chemother* 2013; 45: 260-271.
136. Lilleri D, Zelini P, Fornara C, et al. Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T-cells to pp65 and IE-1 vs infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1997-2005.
137. Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 831-844.
138. Bestard O, Lucia M, Crespo E, et al. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 1793-1805.
139. Egli A, Binet I, Binggeli S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med* 2008; 6: 29.
140. Lee YM, Kim YH, Han DJ, et al. Cytomegalovirus infection after acute rejection therapy in seropositive kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2014; 16: 397-402.

141. 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. *J Infect Dis* 2010; 202: 585-594.
142. Verghese PS, Schmeling DO, Knight JA, et al. The impact of donor viral replication at transplant on recipient infections posttransplant: a prospective study. *Transplantation* 2015; 99: 602-608.
143. Brennan DC, Legendre C, Patel D, et al. Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: pooled analysis of three clinical trials. *Am J Transplant* 2011; 11: 2453-2462.
144. Kobashigawa J, Ross H, Bara C, et al. Everolimus is associated with a reduced incidence of cytomegalovirus infection following de novo cardiac transplantation. *Transpl Infect Dis* 2013; 15: 150-162.
145. Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1998; 212: 89-98.
146. Zimmermann C, Prévost-Blondel A, Blaser C, et al. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 1999; 29: 284-290.
147. Rentenaar RJ, Gamadia LE, van DerHoek N, et al. Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest* 2000; 105: 541-548.
148. Eid AJ, Brown RA, Arthurs SK, et al. A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int* 2010; 23: 506-513.
149. Lúcia M, Crespo E, Cruzado JM, et al. Human CMV-specific T-cell responses in kidney transplantation; toward changing current risk-stratification paradigm. *Transpl Int* 2014; 27: 643-656.

150. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2356-2364.
151. Lozza L, Lilleri D, Percivalle E, et al. Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1795-1804.
152. Sund F, Lidehäll AK, Claesson K, et al. CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clin Transplant* 2010; 24: 401-409.
153. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, et al. Impaired direct priming of CD8 T cells by donor-derived cytomegalovirus following kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 1698-1708.
154. Sester M, Sester U, Gärtner BC, et al. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2577-2584.
155. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 453-479.
156. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol* 2008; 38: 350-363.
157. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2014; 27: 674-685.
158. Snyder CM, Cho KS, Bonnett EL, et al. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity* 2008; 29: 650-659.
159. Klenerman P, Dunbar PR. CMV and the art of memory maintenance. *Immunity* 2008; 29: 520-522.

160. Chiereghin A, Gabrielli L, Zanfi C, et al. Monitoring cytomegalovirus T-cell immunity in small bowel/multivisceral transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; 42: 69-73.
161. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation* 2012; 93: 112-119.
162. Abate D, Fiscon M, Saldan A, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1974-1980.
163. Rittà M, Costa C, Sidoti F, et al. Pre-transplant assessment of CMV-specific immune response by Elispot assay in kidney transplant recipients. *New Microbiol* 2015; 38: 329-335.
164. Schoeppler KE, Lyu DM, Grazia TJ, et al. Late-onset cytomegalovirus (CMV) in lung transplant recipients: can CMV seroestatus guide the duration of prophylaxis? *Am J Transplant* 2013; 13: 376-382.
165. Witzke O, Hauser IA, Bartels M, et al. Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. *Transplantation* 2012; 93: 61-68.



