

# **TESIS DOCTORAL**

## **RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE A CMV Y SU RELACIÓN CON LA PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA**

**Pilar Blanco Lobo**

Licenciada en Biotecnología

### **Directores de la Tesis:**

Dra. Pilar Pérez Romero, Dra. Elisa Cordero Matía, Dr. Michael McConnell.

### **Tutor de Tesis:**

Dr. Jerónimo Pachón Díaz

**" Biología Molecular, Biomedicina e  
Investigación Clínica"**

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla







## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN**

La Dra. 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, la Dra. 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, el Dr. Michael McConnell, investigador del Programa Miguel Servet, y el Prof. Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla,

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigación que lleva por título "**Respuesta inmune específica frente a CMV y su relación con la protección frente a la infección para el diseño de una vacuna**", ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada Doña Pilar Blanco Lobo, 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 04 de Febrero de 2016.

**Mª Pilar Pérez Romero**  
Directora

**Mª Elisa Cordero Matía**  
Co-Directora

**Michael McConnell**  
Co-Director

**Jerónimo Pachón Díaz**  
Catedrático de Medicina, Universidad de Sevilla  
Tutor

# ÍNDICE

<b>I. Introducción .....</b>	<b>8</b>
1. Características del citomegalovirus humano.....	9
1.1 Estructura y replicación del CMV.....	9
1.2. Epidemiología y patogenicidad de CMV .....	12
2. Infección causada por CMV en el paciente trasplantado de órgano sólido .....	14
2.1 . Diagnóstico de la infección por CMV.....	15
2.2 Factores de riesgo para la infección y enfermedad por CMV.....	19
2.3 Prevención de la infección por CMV .....	21
3. Respuesta inmune frente a CMV y su papel en el control de la infección.....	24
3.1 Respuesta innata frente a CMV.....	24
3.2 Respuesta adaptativa frente a CMV.....	25
4. Vacunas .....	30
4.1 Antígenos de CMV que inducen una respuesta celular y humoral .....	30
4.2 Antígenos y vacunas evaluadas en ensayos .....	32
5. Uso de nuevas tecnologías para la identificación de antígenos .....	34
5.1 Análisis del transcriptoma.....	34
5.2 Secuenciación masiva de nueva generación y RNAseq.....	35
5.3 Análisis del transcriptoma de CMV .....	37
<b>II. Justificación .....</b>	<b>40</b>
<b>III. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>44</b>
Hipótesis.....	45
Objetivos .....	45
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>48</b>
Use of Antibodies Neutralizing Epithelial Cell Infection to Diagnose Patients at Risk for CMV-Disease After Transplantation .....	49
Applying Lessons Learned from Cytomegalovirus Infection in Transplant Patients to Vaccine Design .....	80

Using Transcriptional Profile During Cytomegalovirus Infection of Human Fibroblast and Epithelial Cells for Antigen Identification.....	106
<b>V. Resumen de resultados .....</b>	<b>140</b>
<b>VI. Discusión .....</b>	<b>150</b>
<b>VII. Limitaciones .....</b>	<b>168</b>
<b>VIII. Conclusiones .....</b>	<b>172</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
APC	Células presentadoras de antígenos
APS	Adenosin fosfosulfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ARPE-19	Células humanas del epitelio pigmentario de la retina
ATP	Adenosin trifosfato
CMV	Citomegalovirus
D-	Donador del trasplante seronegativo para CMV
D+	Donador del trasplante seropositivo para CMV
dNTP	Deoxinucleotidos
E	Fase temprana de expresión génica durante la e infección de CMV
ELISPOT	Enzimoimmunospot
gB	Glicoproteína B de CMV
gH	Glicoproteína H de CMV
gL	Glicoproteína L de CMV
gM	Glicoproteína M de CMV
gN	Glicoproteína N de CMV
gO	Glicoproteína O de CMV
HHV-5	Herpesvirus humano tipo 5
IE	Fase inmediata de expresión génica durante la infección de CMV
IE-1/2	Proteínas de expresión inmediata de CMV (del inglés, <i>immediate early</i> )
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

IL-2	Interleukina 2
IMP	Proteína integral de membrana
L	Fase tardía de expresión génica durante la e infección de CMV
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP1-b	Proteína inflamatoria de macrófago
MRC-5	Fibroblastos de pulmón humano
NGS	Secuenciación de nueva generación
NK	Linfocitos T citolíticos naturales ( <i>Natural Killer</i> )
ORF	Pauta abierta de lectura
Pb	Pares de base
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )
pp150	Fosfolipoproteína 150 de CMV
pp65	Fosfolipoproteína pp65 de CMV
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
QRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R-	Receptor del trasplante seronegativo para CMV
R+	Receptor del trasplante seropositivo para CMV
RNA-Seq	Secuenciación de ARN por tecnología de nueva generación
ROC	Curva Característica Operativa del Receptor
RPKM	Del inglés <i>reads per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	polimorfismos de un nucleótido simple
SOTR	Receptor de trasplante de órgano sólido
TLR	Receptores de tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TOS	Trasplante de órgano sólido

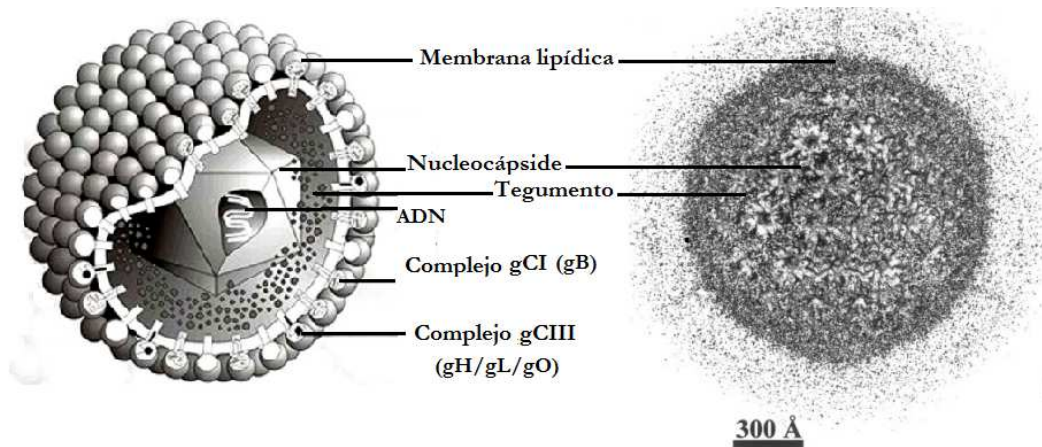
## ***I. Introducción***



## 1. Características del citomegalovirus humano

### 1.1 Estructura y replicación del CMV

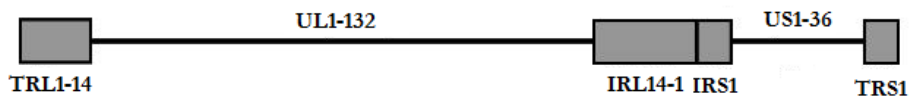
El herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5) o citomegalovirus humano (CMV) pertenece a la familia *Herpesviridae* y subfamilia *Betaherpesviridae*. La estructura de CMV, con un diámetro de entre 150-200 nanómetros, se ha dividido en tres regiones principales: una nucleocápsida icosaédrica que contiene el genoma de ADN lineal de doble cadena del virus; un tegumento proteico que rodea a la cápsida; y una bicapa lipídica exterior que envuelve todo en la que se distinguen tanto glicoproteínas virales como celulares adquiridas durante la liberación de los viriones tras una infección lítica (Figura 1) [1-3]. Aunque la envoltura del virión es sumamente compleja, algunas de las glicoproteínas de superficie como gB, gH, gL y gO son responsables de la unión a los receptores celulares implicados en la entrada del virus durante la infección [4]. Aunque la composición proteica del CMV ha sido identificada a través de aproximaciones bioquímicas e inmunológicas [5, 6], el conjunto de proteínas virales y celulares que constituyen la cápsida, el tegumento y la envuelta de las partículas infectivas no ha sido completamente definido.



**Figura 1.** Esquema (izquierda) tridimensional de la estructura de CMV (obtenido y modificado de <http://www.virology.net>), y representación de un mapa 3D de resolución 18-Å de la porción icosaédrica de la partícula de CMV (Chen *et al.* Virology 1999).

CMV es el virus de mayor tamaño capaz de infectar humano con un genoma de unas 230 Kb con aproximadamente 200 pautas abiertas de lectura (ORFs; del inglés Open Reading Frames) [7-11]. El genoma se divide en dos secuencias una larga (UL) y

una corta (US), en función de su tamaño, flanqueadas por secuencias terminales repetidas (TRL y TRS) e internas (IRL y IRS) (Figura 2). La secuencia completa de la cepa de laboratorio AD169 fue publicada por primera vez en 1990 [7] con una predicción de 208 posibles ORFs, 14 de las cuales estaban duplicadas entre las repeticiones TRL e IRL. Más recientemente se han publicados nuevas secuencias del genoma de CMV en las que se ha propuesto entre 165-252 ORFs gracias a estudios comparativos utilizando las secuencias disponibles del CMV de chimpancé, macaco, murino y aislados clínicos del genoma de CMV humano [8, 10, 12, 13]. Sin embargo, sigue existiendo una gran variabilidad entre las secuencias disponibles en las bases de datos públicas y aún se requieren nuevos estudios para conocer la naturaleza y número definitivo de genes de CMV.



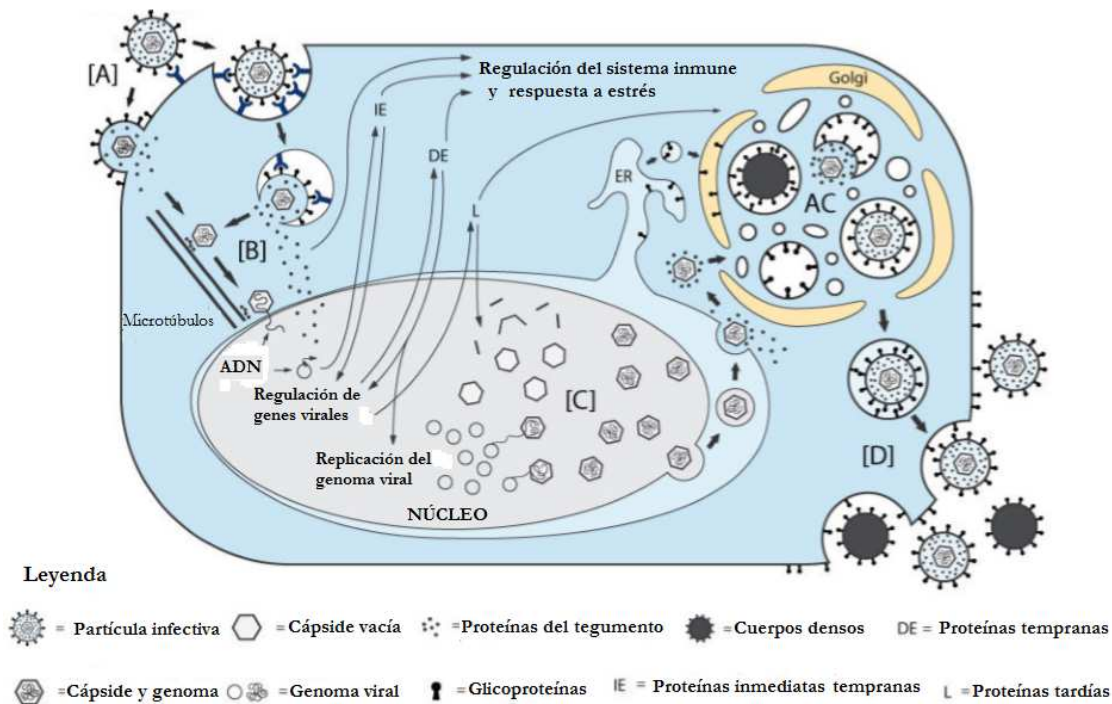
**Figura 2. Esquema del genoma de CMV.** Las regiones únicas (UL y US) se representan como líneas horizontales y las repeticiones (TRL, IRL, IRS, y TRS) como rectángulos. El número de ORFs representado en cada región ha sido obtenido de la secuencia de la cepa de CMV AD169 (GenBank: X17403.1)

La infección requiere la interacción de las glicoproteínas de la membrana de CMV con las proteínas de la membrana extracelular de la célula hospedadora que actúan como receptores que desencadena la fusión de membranas o la endocitosis del virión [14]. Varios estudios sugieren que las proteínas del tegumento como las pUL47 y pUL48 asociadas a la nucleocápsida interaccionan con la maquinaria de microtúbulos celulares para transportar la cápsida viral a la membrana nuclear y acceder al núcleo de la célula hospedadora [15].

Al mismo tiempo, otras proteínas del tegumento como pUL26 y pUL83, liberadas en el citoplasma celular, interaccionan con proteínas celulares para modular la respuesta inmune y la expresión de genes virales [16-18]. En el interior del núcleo tiene lugar la transcripción de los genes virales, la replicación y la encapsulación del nuevo ADN [15, 19, 20]. Durante la infección lítica la expresión de los genes virales se

produce en tres fases, cada una de ellas regulando diferentes aspectos del ciclo de infección. La fase inmediatamente temprana (IE, del inglés *immediate early*) en la que se transcriben los genes que controlan el entorno celular, regulan la expresión de otros genes virales y son responsables de la activación de los genes tempranos y tardíos [18, 21, 22]. La disminución de la expresión de estos genes desemboca en el establecimiento de la infección latente en ciertos tipos celulares como células mieloides no diferenciadas (monocitos y progenitores de células dendríticas)[23]. Durante la fase temprana (E, del inglés *early*) se transcriben los genes tempranos que incluyen factores de transcripción y enzimas como la ADN polimerasa vírica responsables de la replicación del ADN [24]. Finalmente, en la fase tardía (L, del inglés *late*) se transcriben los genes tardíos que codifican proteínas estructurales del virión y son expresados una vez finalizada la replicación viral [25-28]. Tras el ensamblaje de la cápsida en el núcleo, su salida al citoplasma se produce por la disrupción de la lámina nuclear y formación de un complejo nuclear de salida [29-31]. Una vez en el citoplasma, el ensamblaje y el transporte de los viriones implica la interacción con la maquinaria celular encargada del mecanismo de secreción, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la maquinaria de formación de endosomas [32-34] (Figura 3). Finalmente, una mezcla de partículas no infectivas, cuerpos densos y partículas infectivas son liberadas al exterior celular, donde las partículas infectivas podrán producir una nueva infección de las células adyacentes [34]. Las partículas no infectivas son prácticamente idénticas a las partículas infectivas y están compuestas por una envuelta, tegumento y la cápsida proteica pero carecen del genoma viral en el interior de la cápsida. Por otra parte, los cuerpos densos están compuestos principalmente por proteínas del tegumento y la envuelta proteica viral sin la cápsida icosaédrica [35].

**Figura 3. Ciclo de vida de CMV (Adaptado de J.Beltran y M. Cristea, 2014).**(A) Entrada del virus en la célula hospedadora. La cápsida y el tegumento son liberadas al citosol. (B) Transporte de la cápsida y proteínas del tegumento al núcleo. (C) Ensamblaje de la cápsida en el núcleo, egresión al citosol y transporte hasta el complejo viral de ensamblaje (AC), donde se suman más proteínas del tegumento y envuelta viral. (D) Liberación de las partículas infectivas, no infectivas y cuerpos densos.



## 1.2. Epidemiología y patogenicidad de CMV

CMV humano infecta a la mayor parte de la población mundial, con una prevalencia en países desarrollados de aproximadamente el 60% frente al 90% estimado en los países subdesarrollados [36]. La transmisión de CMV puede ser horizontal o vertical. La transmisión horizontal se produce a través de la sangre, tejidos o por el contacto directo con la orina, saliva, secreciones vaginales, semen o leche materna de una persona infectada.. En el trasplante de órgano sólido por ejemplo, los donantes seropositivos para CMV transmiten el virus a receptores seronegativos (D+/R-) con una frecuencia que varía entre el 30-70% [37, 38].

Asimismo, la transmisión puede darse de forma vertical, de madre a hijo en diferentes momentos durante el embarazo o durante el parto [39, 40]. En mujeres seronegativas que desarrollan una infección primaria durante el embarazo se produce una transmisión transplacentaria en el 30-40% de los casos produciendo una infección intrauterina del feto [41, 42]. En este contexto, el riesgo de enfermedad severa por CMV varía entre el 10%-20% de los casos [42]. Sin embargo, también puede producirse transmisión vertical de madres seropositivas, por reactivación del virus latente o por re-infección con una estirpe diferente de CMV, aunque en este caso, la probabilidad de producirse la

infección congénita se reduce a un 1% debido probablemente a la inmunidad desarrollada por la madre [43-45].

Es probable que el amplio tropismo celular que caracteriza a CMV contribuya al diverso número de patologías asociadas con la infección. A excepción de la transmisión por transfusión sanguínea o trasplante, la primera barrera de contacto durante la infección por CMV es una barrera epitelial a través del tracto genitourinario, el tracto digestivo superior y el tracto respiratorio [46]. Tras la infección de las células epiteliales, CMV establece una infección diseminada a través de la infección de leucocitos y endotelio vascular. Tras la infección primaria, CMV permanece en estado latente en distintos tipos celulares, principalmente en células del linaje mieloide no diferenciadas a través de un mecanismo poco conocido hasta el momento [47, 48]. Estas células servirán como reservorio para posteriores procesos de reactivación de la infección a lo largo de la vida del sujeto infectado, especialmente en condiciones de inmunosupresión como es el caso de pacientes trasplantados.

Aunque la infección por CMV suele ser asintomática en personas inmunocompetentes, puede ocasionar síntomas similares a la mononucleosis acompañado por fiebre, elevación de transaminasas y linfocitosis con linfocitos atípicos [49]. Durante la infección congénita, las manifestaciones clínicas sólo ocurren entre el 10%-20% de los fetos [42]. Entre ellas, las más comunes son el retardo en el crecimiento intrauterino, hepatoesplenomegalia, encefalitis o microencefalia, además del riesgo de muerte en aproximadamente el 0,5% de los casos durante la infancia para los niños gravemente afectados [50]. Sin embargo, los recién nacidos asintomáticos, aunque con mejor pronóstico, también pueden desarrollar secuelas a largo plazo como déficits cognitivos y motores, y afectación visual y auditiva [51]. Por otra parte, la infección por CMV en pacientes inmunodeprimidos como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), con un recuento muy bajo de linfocitos CD4<sup>+</sup>, también puede producir enfermedad grave, frecuentemente retinitis, o en menor medida a esofagitis, colitis incluso una mayor tasa de mortalidad [52, 53]. Por otro lado, en pacientes con trasplante de precursores hematopoyéticos la infección suele darse por reactivación del virus del propio receptor, con poca frecuencia de transmisión de CMV desde el donante [54]. La manifestación clínica más frecuente en este tipo de pacientes es la neumonitis, seguida de la enfermedad gastrointestinal y en menor medida hepatitis, encefalitis y retinitis. Finalmente, la relevancia de la infección por

CMV en pacientes inmunodeprimidos con trasplante de órgano sólido objeto de esta tesis será descrita de forma detallada en el apartado 2.

## **2. Infección causada por CMV en el paciente trasplantado de órgano sólido**

Aunque la mayoría de infecciones por CMV son asintomáticas, la enfermedad por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido puede presentarse como síndrome viral o como enfermedad invasiva de tejido. El síndrome viral se manifiesta generalmente con síntomas como fiebre y malestar frecuentemente asociado a leucopenia o trombocitopenia. Sin embargo, la enfermedad invasiva de tejido afecta a un órgano específico, siendo la enfermedad gastrointestinal la más común entre pacientes trasplantados [55]. El CMV afecta al órgano trasplantado debido a la alteración local de los mecanismos inmunes en el injerto, además de porque el órgano procedente del donante seropositivo puede servir como reservorio para CMV. La diana y evolución de la infección y de la enfermedad por CMV varía en función del órgano trasplantado. De esta forma, puede manifestarse más frecuentemente hepatitis, nefritis, neumonitis, miocarditis y pancreatitis en pacientes trasplantados de hígado, riñón, pulmón, corazón y páncreas, respectivamente [56]. Pero además de los efectos directos, han sido descritos numerosos efectos indirectos como consecuencia de las propiedades inmunomoduladoras de CMV [57, 58]. Algunos efectos indirectos producidos tras la infección por CMV incluyen nefropatía crónica tras el trasplante de riñón, trombosis arterial hepática tras el trasplante de hígado, vasculopatía coronaria tras el trasplante cardíaco o bronquiolitis tras el trasplante de pulmón [59-63]. Además, se ha relacionado con un incremento en el riesgo de otras infecciones oportunistas producidas por bacterias, hongos, u otros virus [64-66]; con el desarrollo del rechazo agudo o crónico y con un posible fracaso del injerto [60, 61]. Aunque existen datos que demuestran que la infección por CMV podría incrementar el riesgo de rechazo agudo en trasplantados renales [60, 67], otros estudios discrepan sobre este aspecto [68]. Finalmente, CMV se ha asociado con la ocurrencia de diabetes mellitus tras el trasplante. De hecho, se ha demostrado que los pacientes con trasplantante renal con infección por CMV asintomática presentan un riesgo 4 veces superior de padecer diabetes que los pacientes que no desarrollan infección (26 % vs. 6%) [69, 70].

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

La presencia de infección por CMV en sangre o tejidos tras el trasplante está asociada a la posibilidad de desarrollo de síntomas relacionados [71]. Por tanto se han hecho grandes esfuerzos por determinar la viremia por CMV tras el trasplante y desarrollar nuevos ensayos diagnósticos para la determinación de la carga viral, así como determinar si se ha producido enfermedad de órgano.

Las técnicas diagnósticas disponibles para la determinación de la infección son el cultivo viral, la antigenemia y las técnicas de cuantificación o detección de ácidos nucleicos . Por otra parte, la técnica utilizada para diagnosticar la enfermedad por CMV es la histopatología. Las medidas indirectas como la serología pueden servir para determinar el contacto previo del paciente con el virus.

### *2.1.1 Cultivo viral*

El método más tradicional para detectar infección por CMV es el cultivo convencional utilizado en casos de infección perinatal pero no se utiliza generalmente para diagnosticar infección en pacientes trasplantados [72]. Esta estrategia utiliza muestras clínicas, como sangre, orina o tejido que son homogeneizadas y utilizadas para la inoculación de fibroblastos en cultivo que son incubados y observados entre 2 y 21 días. Esta técnica es cara, consume mucho tiempo, presenta una baja sensibilidad desde sangre y una pobre especificidad desde orina, heces o esputo [73]. Por estos motivos, aunque en la mayoría de los casos ha sido sustituida por la antigenemia (apartado 2.1.2) y técnicas de detección de ácidos nucleicos (apartado 2.1.4), actualmente se sigue utilizando esta técnica diagnóstica para el aislamiento de CMV desde muestras de tejidos, particularmente para muestras gastrointestinales (como muestras de biopsias de colon).

### 2.1.2 Antigenemia pp65

La antigenemia ha sido usada ampliamente para el diagnóstico rápido de la infección por CMV en pacientes trasplantados durante más de una década. Es una técnica semi-cuantitativa que consiste en la cuantificación por tinción directa de linfocitos en sangre periférica con anticuerpos específicos frente a la proteína pp65 viral. Los resultados se expresan en un número de células positivas por cada 200.000 leucocitos y se correlacionan estrechamente con la gravedad clínica de enfermedad en pacientes inmunocomprometidos [74-76]. Generalmente, un número entre 1 y 400 células positivas por cada 200.000 leucocitos se ha relacionado con un mayor riesgo de enfermedad [77-80], mientras que un recuento celular más bajo está relacionado con una infección asintomática [81]. Sin embargo, este valor es variable ya que depende de la pericia del observador y se ha observado una alta variabilidad de resultados en distintos centros y también en función del grupo de riesgo del paciente (apartado 2.2.1). A pesar de presentar una sensibilidad más alta que el cultivo viral y no requerir un equipamiento muy sofisticado, su utilidad es limitada en pacientes con leucopenia o neutropenia (con cifras de neutrófilos por debajo de 1.000 neutrófilos/ $\mu$ l). Además, requiere un procesamiento inmediato de la muestra de entre 4 a 6 horas después de su extracción, por lo que en la actualidad esta técnica está siendo sustituida por nuevos métodos de detección como la PCR en tiempo real (apartado 2.1.3).

### 2.1.3 Detección o cuantificación de ácidos nucleicos

Los métodos moleculares, a pesar de ser más caros que la antigenemia, son más rápidos, más reproducibles y sensibles y además, permiten la automatización. Actualmente, las técnicas de detección y cuantificación de ácidos nucleicos como la PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) son utilizadas en la mayoría de los centros en los que está disponible para el diagnóstico de infección por CMV en pacientes trasplantados, siendo la mejor alternativa a la antigenemia [82-87]. Las principales dianas de la PCR son generalmente genes de CMV de expresión temprana y tardía y se utilizan cebadores específicos frente a regiones mejor conservadas [88, 89]. El genoma de CMV puede ser extraído de sangre completa, leucocitos, plasma o cualquier otro tipo de tejido (muestras de biopsias) o fluidos corporales [89-93]. De esta forma también



puede detectarse ARN mensajero por el gen IE en monocitos y leucocitos polimorfonucleares indicando infección activa [94-96]. Sin embargo, esta estrategia parece ser menos sensible que la detección del antígeno pp65 y la QRT-PCR para el diagnóstico de infección por CMV [97, 98].

A pesar de las mejoras introducidas con la utilización de la QRT-PCR, debido a la falta de estandarización y a la variabilidad elevada de los resultados de cargas virales de los distintos ensayos disponibles comercialmente como demuestran distintos estudios comparativos [99, 100], durante mucho tiempo no se han podido establecer puntos de corte de carga viral para el inicio de tratamiento en la estrategia de tratamiento anticipado. Además, existen diferencias entre cargas virales observadas en función del tipo de muestra utilizada para la determinación [58, 101-104]. Las guías de práctica clínica recomendaban que cada centro estableciera su propio umbral de replicación en función de la metodología disponible, de la experiencia previa y del riesgo de infección de cada paciente [80]. En 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó por primera vez una referencia internacional para la cuantificación de ácidos nucleicos de CMV, que permitió la calibración y estandarización entre laboratorios [105]. Este estándar permitió la conversión de las copias por mililitros (copias/mL) obtenidas tradicionalmente a Unidades Internacionales por mililitro (UI/mL) facilitando la extrapolación y comparación entre diferentes centros.

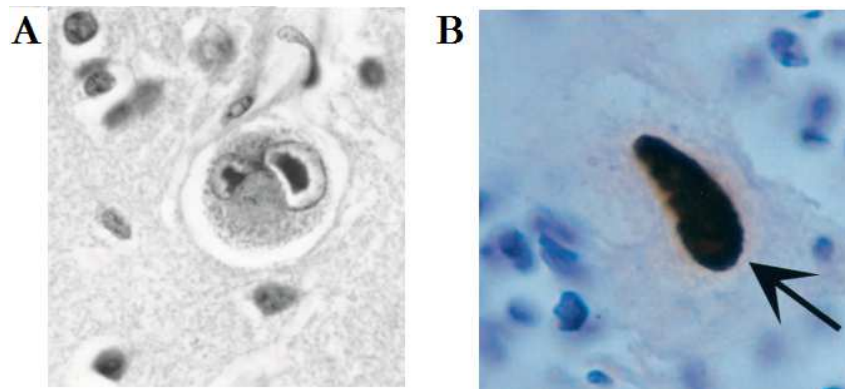
#### *2.1.4 Determinación de serología*

Aunque se han evaluado y descrito diversas técnicas de detección de anticuerpos específicos frente a CMV IgG o IgM, los métodos inmunoenzimáticos (ELISA) son los más utilizados por su alta sensibilidad y capacidad de cuantificación. La detección de IgM específica de CMV se utiliza como indicador de infección aguda reciente. Por su parte, la detección de anticuerpos IgG se utiliza en el periodo pre-trasplante como marcador subrogado de infección previa por CMV, para determinar el riesgo de infección por CMV de los pacientes (apartado 2.2.1). Aunque la conversión serológica es el marcador de primoinfección en pacientes receptores seronegativos, el papel de la serología en el periodo pos-trasplante en cuanto al diagnóstico de infección es muy limitado, y no es útil para el diagnóstico de enfermedad activa de CMV [106]. Además, las transfusiones de sangre de donantes con serología positiva pueden alterar la

serología de receptores con serología negativa, por lo que el resultado de un test de serología realizado previamente a la realización de estos procesos son más fiables.

### 2.1.5 Histopatología

La infección por CMV se caracteriza por la formación de inclusiones con forma de "ojo de búho" o efecto citomegálico, identificada por primera vez en 1910 en recién nacidos [107] (Figura 4A) y posteriormente en 1964 entre pacientes trasplantados de órgano sólido [108]. La enfermedad de órgano causada por CMV, excepto en el caso de la retinitis o enfermedad del sistema nervioso central, debe ser confirmada por inmunohistoquímica (Figura 4B) o hibridación *in situ* de DNA [109-111]. La identificación de cuerpos de inclusión o antígenos virales en material biopsiado o células de lavado broncoalveolar mediante tinción inmunológica muestra una alta especificidad para CMV [112, 113]. Sin embargo, presenta una serie de limitaciones como su naturaleza invasiva y la discordancia entre los hallazgos en tejido y otras técnicas de cuantificación de carga viral [114].



**Figura 4. Identificación histopatológica de CMV.** (A) Formación de inclusiones intranucleares con forma de "ojo de búho" en una célula epitelial infectada (Griffiths *et al.* 2015). (B) Típica inmunohistoquímica positiva por tinción de CMV en células con efecto citomegálico. Las células que se tiñen por presencia de CMV muestran una coloración marrón, mientras que las que no están infectadas se mantienen azules (Chemaly *et al.* 2004).

## 2.2 Factores de riesgo para la infección y enfermedad por CMV

Los factores de riesgo de infección por CMV y enfermedad tras el trasplante están determinados por el seroestatus frente a CMV del donante y del receptor, el tipo de órgano trasplantado, el estado basal de inmunosupresión del paciente y la estrategia de prevención de infección por CMV utilizada.

### 2.2.1 Seroestatus del donante y el receptor

El seroestatus del donante y del receptor previos al trasplante es la variable más utilizada para determinar el riesgo de infección tras el trasplante. De esta forma, en el trasplante de órgano sólido, los pacientes seronegativos (R-) que reciben un órgano de un donante seropositivo (D+) presentan un mayor riesgo de infección y por tanto enfermedad por CMV, como resultado de la reactivación del virus latente transmitido en el órgano donado que ocurre entre 30%-70% de los casos [56]. Los pacientes R- además de estar sometidos a una inmunosupresión farmacológica alta, no han desarrollado una infección previa al trasplante y por tanto no han adquirido una respuesta inmune específica frente a CMV. Además, los receptores positivos que reciben un injerto de un donante seropositivo (R+/D+) o seronegativo (R+/D-) se consideran de riesgo intermedio, en los que el desarrollo de infección puede deberse a una reactivación del virus latente o a una súper-infección con una estirpe diferente [115]. Los trasplantes R-/D- son los que presentan el menor riesgo de enfermedad por CMV entre el 1-2% en el primer año pos-trasplante. En un estudio reciente realizado en una cohorte de 641 pacientes trasplantados de riñón demostró una incidencia acumulada de enfermedad por CMV tras la discontinuación de la profilaxis universal de 26,2 % en pacientes D+/R-, 7,4% en D+/R+ y 3,1% en D-/R+ a los 6 meses [116]. Otro estudio de pacientes trasplantados de riñón e hígado que recibían profilaxis universal, la incidencia de enfermedad por CMV fue de 19,2 % y 31,3 % respectivamente en una cohorte de alto riesgo (D+/R-), una incidencia mucho mayor que en pacientes R-/D-, con un 2,5 % y 3,2 % respectivamente [117].

### 2.2.2 Tipo de órgano trasplantado

Entre los trasplantes de órgano sólido, los pacientes con trasplante de pulmón, páncreas e intestino presentan un mayor riesgo de desarrollo de infección por CMV comparado con pacientes trasplantados de riñón e hígado, que está relacionado con la intensidad de la inmunosupresión y la cantidad de tejido linfoide trasplantado [118]. La mayor incidencia de infección y enfermedad por CMV se produce en el trasplante de pulmón con un 54%-92%, datos que varían en función de la serología del receptor/donante, y entre el 40%-75% de neumonitis causada por CMV [71, 119]. De hecho, la mortalidad asociada a infección primaria por CMV puede ser de hasta el 54%, que se asocia al incremento de super-infecciones pulmonares en el primer año post-trasplante [120]. Finalmente, el trasplante de riñón es el que presenta menor riesgo de enfermedad por CMV (8%-32%) aunque el trasplante simultáneo de riñón y páncreas aumenta el riesgo de enfermedad [121].

### 2.2.3 Inmunosupresión o defectos del sistema inmune

Los pacientes con inmunosupresión grave presentan alto riesgo de enfermedad por CMV. El nivel de inmunosupresión está influenciado por muchos factores como son la dosis, duración y tipo de inmunosupresor, enfermedad basal del sistema inmune adaptativo, la edad o el desarrollo de comorbilidades [122]. Los inmunosupresores que se han asociado con mayor incidencia de enfermedad por CMV son altas dosis de micofenolato mofetilo (MMF) [123], la globulina anti-linfocito humana, la globulina anti-timocito, los anticuerpos anti-CD3 y los anticuerpos anti-CD52, especialmente cuando son usados para el tratamiento del rechazo agudo [67]. Sin embargo, otros inmunosupresores como los inhibidores de m-TOR y el everolimus se han asociado con un menor riesgo de infección y enfermedad por CMV [124]. Por otra parte, los defectos en el sistema inmune adaptativo pueden disminuir la capacidad de respuesta del sistema inmune a la infección y relacionarse, por tanto, con un mayor riesgo de enfermedad por CMV. Estos defectos incluyen polimorfismos en los genes TLR (del inglés Toll-like receptor), deficiencia o polimorfismos en la lectina de unión a manosa (MBL, del inglés mannose binding lectin) [125, 126], deficiencias en la expresión de citoquinas [127] o deficiencia de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> [128, 129].

### 2.3 Prevención de la infección por CMV

Como resultado de los avances realizados en las estrategias de prevención de la infección por CMV se ha producido una disminución en la mortalidad relacionada con CMV, en la enfermedad invasiva de tejido y en la incidencia de efectos indirectos en pacientes trasplantados. Las dos estrategias recomendadas para prevenir la enfermedad por CMV en el paciente trasplantado son la profilaxis universal y la terapia anticipada con monitorización de la viremia de CMV.

#### *a) Profilaxis universal*

La profilaxis universal implica la administración de tratamiento antiviral a todos los pacientes en riesgo de infección por CMV, inmediatamente después del trasplante (normalmente en los primeros 10 días), y se continua por un periodo que varía entre los 3 y 6 meses, dependiendo del seroestatus del donante y del receptor, así como del tipo de órgano trasplantado. En este sentido, la duración óptima del periodo profiláctico ha sido objetivo de varios estudios. Humar *et al.* demostraron que en pacientes trasplantados de riñón de alto riesgo de infección por CMV, la incidencia de enfermedad tardía por CMV era significativamente menor en pacientes con 200 días de profilaxis con valganciclovir comparado con pacientes tratados durante 100 días [130]. Como consecuencia, la ampliación de la profilaxis a 200 días ha sido adoptada en muchos programas de trasplante de hígado, corazón y páncreas. Por otra parte, otro beneficio aportado por la profilaxis universal es la disminución de los efectos indirectos relacionados con la infección por CMV, relacionados con el rechazo o pérdida del injerto, las infecciones oportunistas y la mortalidad [55, 131]. Sin embargo, la utilización de esta estrategia profiláctica está asociadas a desventajas como la toxicidad causada por el tratamiento antiviral y la incidencia de enfermedad tardía por CMV que se produce una vez finalizado el periodo profiláctico [55, 130].

#### *b) Tratamiento anticipado*

La estrategia de tratamiento anticipado consiste en la administración de tratamiento antiviral sólo cuando se detectan eventos de replicación viral, por encima de un umbral definido. Esta estrategia anticipada implica la monitorización regular y seguimiento de los pacientes y la determinación de las cargas virales con técnicas de

diagnóstico cuantitativas (antigenemia o QRT-PCR). En aquellos pacientes con carga viral de CMV positiva se instaura el tratamiento antiviral evitando la progresión de la infección que es discontinuado una vez deja de detectarse replicación viral, evitando efectos adversos como la toxicidad del tratamiento antiviral y el coste asociado. Además, como se explica en apartados posteriores, debido a que el paciente se expone de forma controlada al virus se facilita el desarrollo de una inmunidad celular específica frente a CMV, que se traduce en una menor incidencia de enfermedad por CMV [132-134]. Sin embargo, una de sus principales desventajas es el elevado coste de monitorización de los pacientes y el aumento del seguimiento del paciente que requiere una buena coordinación. Además, no protege al paciente de otras infecciones oportunistas ni de los efectos indirectos causados por la exposición del organismo a CMV [135]. Por otro lado, una de las dificultades de la utilización de esta estrategia es que no existe un consenso generalizado en la práctica clínica respecto a la carga viral de CMV a partir de la cual administrar tratamiento. Un estudio reciente realizado en nuestro grupo, ha determinado un punto de corte de 3.983 UI/ml para el inicio del tratamiento antiviral en pacientes con TOS seropositivos [136]. Sin embargo, sería necesario comprobar y establecer puntos de cortes para otros grupos de trasplantes y su aplicabilidad en diferentes centros.

### *c) Comparación de estrategias*

Varios estudios han comparado la administración de profilaxis universal y el tratamiento anticipado generando controversia respecto a la estrategia más segura o efectiva. En un ensayo clínico llevado a cabo en una cohorte de 98 pacientes con trasplante de riñón, se demostró que ambas estrategias de tratamiento reducían el riesgo de enfermedad y mortalidad por CMV, y no se encontraron diferencias significativas [137, 138]. Sin embargo, en otro estudio realizado en el mismo tipo de pacientes se sugirió un posible efecto beneficioso de la estrategia profiláctica. La profilaxis redujo hasta el 65% (13/73 versus 33/65 pacientes) la incidencia de infección por CMV en un periodo de 12 meses pos-trasplante y la supervivencia del órgano trasplantado incrementó hasta 4 años pos-trasplante [139]. Contrariamente, varios meta-análisis han demostrado que el tratamiento anticipado es más efectivo en reducir el riesgo relativo de infección por CMV, aunque la mortalidad global era similar [135, 140].

Aunque en teoría la profilaxis debería inducir una mayor tasa de resistencias, la aparición de resistencias a antivirales no se ha asociado especialmente a ninguna de las estrategias preventivas [141, 142]. Sin embargo, se ha asociado una mayor incidencia de rechazo agudo (comprobado por biopsia) y una menor supervivencia del injerto en pacientes con tratamiento anticipado [143].

Aunque las guías recomiendan el uso de profilaxis frente a tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo de infección por CMV, en algunos centros se utiliza la combinación de ambas estrategias, donde la profilaxis es administrada durante el periodo de mayor riesgo de enfermedad por CMV, y se continúa con terapia anticipada en el periodo de menor riesgo. Sin embargo, en cada centro se debe hacer balance de los beneficios aportados por cada una de las estrategias en función de la frecuencia de enfermedad por CMV diagnosticada, la capacidad de monitorizar a los pacientes, el coste de tratamiento antivirales y diagnóstico y la incidencia de otras infecciones oportunistas, pérdida de injerto y mortalidad [144].

### 2.3.1 Fármacos antivirales.

En las últimas dos décadas, la primera estrategia de prevención y tratamiento de la infección por CMV ha sido la administración de ganciclovir, o valganciclovir, fármaco que inhiben la síntesis de ADN viral por la polimerasa. Generalmente, el valganciclovir oral es preferido con respecto al ganciclovir debido a su mayor biodisponibilidad y su comparable efectividad en la prevención de enfermedad por CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido. La eficacia de la utilización de valganciclovir vs. ganciclovir ha sido objeto de varios estudios. Un estudio realizado por Paya *et al.* en 364 pacientes trasplantados de órgano sólido de alto riesgo de infección por CMV demostró una eficacia similar entre la profilaxis con valganciclovir vs. ganciclovir. Sin embargo, en el contexto de trasplante hepático el valganciclovir se asoció con un mayor ratio de enfermedad invasiva de tejido comparado con ganciclovir oral [145], aunque otros estudios no observaron diferencias independientemente del fármaco administrado [146], y demostraron un incremento de hasta 4 veces en el riesgo de enfermedad tras la discontinuación de la profilaxis con valganciclovir comparado con ganciclovir intravenoso u oral (22%, 5% y 6 %, respectivamente) [147]. Por otro lado, la administración prolongada de valganciclovir o ganciclovir podrían

desencadenar el desarrollo de resistencias. Las guías para el manejo de la infección por CMV sugieren en los casos de detectarse resistencia la posibilidad de incrementar la dosis de ganciclovir en pacientes con riesgo de enfermedad moderada o leve, o administrar foscarnet en pacientes con enfermedad más grave, [148]. Foscarnet es un análogo del pirofosfato inorgánico que inhibe la unión del pirofosfato a la polimerasa, impidiendo la replicación de CMV. Sin embargo, dada a su elevada toxicidad, otras alternativas están siendo investigadas en la actualidad[149].

### **3. Respuesta inmune frente a CMV y su papel en el control de la infección**

CMV se controla de forma efectiva en individuos sanos, lo que sugiere la existencia de un balance entre el virus y la respuesta inmune del hospedador que permite la persistencia del virus de forma sub-clínica. Sin embargo, en ciertas situaciones como la inmunosupresión en las que este balance está alterado, se produce la replicación de CMV no controlada y por tanto los individuos inmunodeprimidos presentan un mayor riesgo de infección o reactivación de CMV. El control inmunológico de CMV implica la combinación de ambas respuestas del sistema inmune: innata y adaptativa.

#### **3.1 Respuesta innata frente a CMV**

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a la infección por CMV. La detección de virus se lleva a cabo por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre los que se encuentran los receptores Toll (TLR) [14]. Varios estudios han demostrado que las glicoproteínas gB y gH de CMV están implicadas en el reconocimiento de los receptores TLR de tipo 2 provocando la activación de rutas de transducción de señales dependiente de NF- $\kappa$ B [150]. Al mismo tiempo se produce el reclutamiento de células presentadoras de antígenos (APC, del inglés antigen presenting cells), fagocitos y células NK (del inglés natural killer o asesina natural) [14]. Estas últimas células son consideradas el puente entre el sistema inmune innato y adaptativo



por su habilidad de ejercer una función citotóxica y además liberar citoquinas que producen la maduración del sistema inmune adaptativo y en particular de las células T [151]. Entre los diversos mecanismos y rutas activados destaca la producción de citoquinas inflamatorias, IFN de tipo I y moléculas co-estimuladoras implicadas en regulación, necesarias para controlar la infección y subsecuentemente dar lugar a una respuesta inmune adaptativa de alta calidad [14]. Además, existen un gran número de evidencias que sugieren que las células NK juegan un papel crucial en la defensa frente a infecciones virales, aunque su papel específico en la infección por CMV no está del todo caracterizado [152, 153].

### **3.2 Respuesta adaptativa frente a CMV.**

#### *3.2.1 Respuesta celular específica mediada por linfocitos T*

CMV es un gran inductor del sistema inmune comparado con otros virus. De hecho, en individuos sanos inmunocompetentes con serología positiva aproximadamente el 10% de las células T presentes en sangre periférica son específicas para antígenos de CMV [45] y esta proporción puede llegar hasta el 40% en ancianos [154-157]. Las células T efectoras CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> αβT son imprescindibles para la resolución de los episodios de replicación por CMV [158, 159]. Mientras que la expansión de las células T CD4<sup>+</sup> funcionales es necesaria para el mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> funcionales [160], las células T CD8<sup>+</sup> activadas específicas de CMV secretan citoquinas con actividad antiviral y capacidad de lisar células infectadas por CMV [161].

En pacientes inmunodeprimidos, el desarrollo de una inmunidad celular específica de CMV se ha relacionado con un menor riesgo de desarrollo de infección y enfermedad [133, 162-166]. La utilidad de la inmunidad específica ha sido demostrada en diferentes escenarios, como el efecto terapéutico, ya que en algunos casos los pacientes aclaran la infección tras adquirir inmunidad celular específica frente a CMV sin necesidad de tratamiento [133], o la correlación encontrada entre los niveles de secreción de IFN-γ medidos por QuantiFERON®-CMV tras la finalización de la profilaxis universal en la que los pacientes con un test positivo tenían una menor

incidencia de enfermedad comparados con los pacientes con resultados negativos o indeterminados (6,4% , 22,2% y 58,3%,  $P < 0.001$ ) [167]. También se ha demostrado la utilidad de la medición de la respuesta de células T específica de CMV previa al trasplante. Bestard *et al.* propusieron la medición pre-trasplante de la respuesta celular específica al antígeno IE-1 para identificar a los pacientes con mayor riesgo de infección por CMV, ya que aquellos pacientes con infección mostraban una menor respuesta celular T pretrasplante [168], y más recientemente Cantisan *et al.* demostraron que los pacientes con prueba pre-trasplante “no reactiva” medida por QuantiFERON®-CMV ( $\text{IFN}\gamma < 0,2$  UI/ml) tenían mayor riesgo de replicación viral en el pos-trasplante respecto a los pacientes “reactivos” ( $\text{IFN}\gamma \geq 0,2$  UI/ml) [169]. Por el contrario, otros autores han publicado resultados donde no se encuentra una asociación significativa entre la respuesta celular a antígenos específicos de CMV y la ocurrencia de replicación viral [170, 171]. La Rosa *et al.* analizaron los niveles de viremia y la producción de  $\text{IFN-}\gamma$  por los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  y  $\text{CD4}^+$  en 17 pacientes trasplantados D+/R- tras la discontinuación de la profilaxis. Utilizando los péptidos PepMix IE-1 y pp65, demostraron que la respuesta a ambos antígenos no predecía el desarrollo posterior de enfermedad. De hecho, en el grupo de pacientes con enfermedad, la respuesta  $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  frente a pp65 en el primer mes tras la discontinuación de la profilaxis fue mayor que para el grupo de los pacientes asintomáticos. Por estas razones, propusieron la utilidad de caracterizar otras citoquinas además de  $\text{IFN-}\gamma^+$  o utilizar otros antígenos de CMV para la evaluación de la respuesta celular. Del mismo modo, Eid *et al.* no encontraron asociación entre la respuesta de células T específicas de CMV con el desarrollo subsecuente de viremia en un grupo de pacientes trasplantados de riñón tratados con profilaxis universal. Sin embargo, atribuyen este resultado al bajo número de pacientes D+/R- incluidos ( $n=11$ ) y la escasa ocurrencia de viremia en los receptores seropositivos.

Una alternativa interesante que ha surgido como consecuencia de los resultados que demostraban la utilidad de la respuesta celular T  $\text{CD8}^+$  y  $\text{CD4}^+$  para conferir protección frente a CMV ha sido la inmunoterapia [172, 173]. Para llevar a cabo esta terapia, las células T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  específicas de CMV de un donante son estimuladas *in vitro* usando un lisado o péptidos específicos de CMV para luego ser transferidas al paciente. Esta estrategia ha dado resultados prometedores especialmente en el contexto de trasplante hematopoyético [160]. Aunque su estudio ha sido limitado en trasplante de

órgano sólido, se ha estudiado un caso de trasplante de pulmón con neumonía causada por CMV resistente a ganciclovir demostrando una rápida expansión celular *in vivo* tras la inmunoterapia que se asoció a una eficiente prevención de la replicación viral [174].

### 3.2.2 Respuesta humoral y anticuerpos neutralizantes

El papel de la respuesta mediada por anticuerpos en la protección frente a la infección por CMV sigue siendo un tema de debate [175-178]. La infección por CMV induce la producción de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG. Mientras que los anticuerpos IgM e IgA pueden persistir entre 2-8 meses y hasta un año, respectivamente, las IgG perduran de por vida, incrementando su título tras sucesivas reactivaciones pero declinando con el paso del tiempo [49]. La detección de IgG específicos de CMV se utiliza para establecer el riesgo de infección por CMV de los pacientes que van a someterse a un trasplante. Sin embargo, la relación entre los niveles de IgG y el riesgo de infección pos-trasplante no ha sido caracterizada. Humar *et al.* compararon 100 días de profilaxis con ganciclovir o valganciclovir en 352 pacientes D+/R-, y observaron que la seroconversión a los 6 meses pos-trasplante era predictiva de enfermedad subsecuente entre los 6 y 12 meses. El índice de enfermedad fue de 1,3% en pacientes que seroconvertían y de 10 % en pacientes que no seroconvertían [106].

Debido a su posible efecto beneficioso, algunos centros administran inmunoglobulinas intravenosas frente a CMV como estrategia profiláctica, particularmente a pacientes trasplantados de corazón, pulmón o intestino. Un relevante ensayo clínico realizado en trasplantados pediátricos de pulmón demostró que la profilaxis con inmunoglobulinas reducía tres veces la probabilidad de desarrollar infección por CMV. Sin embargo, no pudo asociarse con una disminución de enfermedad, ni con el desarrollo de morbilidad tras el trasplante, lo que sugería la necesidad de ampliar este estudio [179].

Los anticuerpos IgG dirigidos a glicoproteínas de la envuelta de CMV capaces de bloquear la infección se identifican como anticuerpos neutralizantes. La mayoría de información disponible sobre estos anticuerpos se basa en la infección congénita por CMV. Varios estudios han relacionado la presencia de anticuerpos anti-CMV en

mujeres seropositivas o tratadas con inmunoglobulinas durante el embarazo con una reducción de la infección congénita por CMV [176, 177]. Sin embargo, existen estudios contradictorios en los que la administración de inmunoglobulinas en mujeres embarazadas comparando con placebo no pudo asociarse a una reducción de la transmisión intrauterina de CMV [180]. En el contexto del trasplante, el papel de los anticuerpos neutralizantes y su cinética de adquisición tras la infección primaria está poco caracterizado. Un meta-análisis de 698 pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS) demostró que la administración de inmunoglobulinas aumenta la supervivencia general y reduce la enfermedad y muerte asociadas a CMV [178]. Recientemente se ha iniciado un nuevo ensayo clínico que está todavía en marcha, en el que se han seleccionado dos grupos de receptores de trasplante renal de alto riesgo para recibir infusiones de anticuerpos específicos frente a CMV o placebo, para determinar si los anticuerpos reducen la transmisión de CMV (Clinical Trials Gov. No. NCT01753167). En el contexto de pacientes trasplantados de progenitores hematopoyéticos, Muñoz *et al.* analizaron la cinética de anticuerpos en 296 sueros de 26 pacientes seropositivos por ensayo de microneutralización y análisis específico de anticuerpos anti-gB por inmunofluorescencia. Además de que los niveles de anticuerpos eran muy variables entre pacientes, no encontraron relación entre los niveles de anticuerpos y la presencia o ausencia de infección activa por CMV. En estos pacientes, el aclaramiento de la infección por CMV no se asoció con un aumento en el título de los anticuerpos funcionales presentes en el suero [181]. Una limitación de los estudios realizados hasta la fecha es que la mayoría de ellos han estudiado los anticuerpos neutralizantes en modelos de infección de fibroblastos. Sin embargo, las cepas de CMV que replican en fibroblastos presentan diversos cambios genéticos respecto a cepas silvestres, y muestran menor patogenicidad en voluntarios humanos sanos [182]. Además, durante la infección *in vivo* la primera barrera de infección por CMV son las células epiteliales y endoteliales. Estudios recientes han demostrado que el mecanismo de entrada de CMV varía dependiendo de la célula hospedadora. De esta forma, mientras que la glicoproteína gB y los complejos gH/gL/gO y gM/gN juegan el papel principal en la entrada en fibroblastos [14, 183], el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a es indispensable para la infección de células epiteliales y no para la infección de fibroblastos [184-186]. Por estas razones, todos los resultados obtenidos en estudios previos en los que se estudiaban los anticuerpos neutralizantes usando modelos de fibroblasto, podrían no estar identificando completamente el espectro de actividad

neutralizante, ya que los anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de epitelio no estarían siendo identificados [187]. Como consecuencia, diferentes estudios sugieren que el uso de modelos de infección de fibroblastos no sería suficiente para describir la respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV y que sería necesario, por tanto, testar la actividad neutralizante de la infección por CMV sobre células epiteliales y analizar su relación con la progresión clínica del paciente [188-190]. De hecho, los estudios en este sentido se han realizado en el contexto del embarazo. Gerna *et al.* en un estudio con 18 mujeres embarazadas con infección primaria por CMV en el que también se incluyó 5 receptores de TOS, identificaron una actividad de anticuerpos neutralizantes frente a CMV en células epiteliales 128 veces más elevada que en fibroblastos [190]. En la misma línea, Gernini *et al.* observaron una asociación entre altos niveles de anticuerpos neutralizantes de la infección de células epiteliales y un menor riesgo de infección congénita [188]. Este conjunto de resultados podría sugerir que el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a requerido para la infección de células epiteliales es la principal diana de la inmunidad mediada por anticuerpos y responsable de la inducción de una respuesta efectiva frente a la diseminación del virus *in vivo*.

### 3.2.3. Métodos de detección de la respuesta inmune específica frente a CMV

En la actualidad existen varios métodos disponibles para la cuantificación y caracterización funcional de la respuesta de células T específica de CMV [191]. Entre ellos destacan los ensayos de determinación de IFN- $\gamma$ . La técnica de QuantiFERON®-CMV basada en ELISA, la única que ha sido aprobada en Europa, es una técnica sencilla, de mínima manipulación, estandarizada y disponible comercialmente [50, 192-195]. Sin embargo, sólo evalúa la inmunidad mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y no CD4<sup>+</sup>. Por otra parte, los métodos basados en la tinción de receptores de superficie y citoquinas intracelulares utilizando citometría de flujo se han convertido en el modelo de referencia para evaluar el fenotipo funcional de la población de células T previamente estimuladas. Una ventaja de esta técnica es que se pueden incorporar diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas intracelulares (TNF $\alpha$ , IL-2, MIP1-b, CD107a y sobre todo IFN $\gamma$ ) o proteínas de superficie (CD4, CD8, CD27,CD28, CCR7,CD62L).

En este ensayo la sangre completa o células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son estimuladas con antígenos seleccionados de CMV cuya naturaleza (lisado de células infectadas, proteínas recombinantes, células dendríticas cargadas con proteínas o péptidos inmunogénicos, péptidos inmunogénicos individuales o librerías de péptidos solapantes) depende de la población de células T diana que se quiera estimular.

Por otro lado, la técnica de ELISPOT aunque es altamente sensible, no diferencia entre células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Ha sido comercializada recientemente (Lophius kit T-Track® CMV, Lophius Biosciences, Germany) basada en la estimulación de PBMCs con proteínas de CMV (pp65 y IE1) y la subsecuente cuantificación del número de células T que secretan IFN- $\gamma$ . Finalmente, los ensayos basados en multímeros de MHC se basan en la tinción directa de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV con tetrámeros, pentámeros o más recientemente dexámeros de MHC de clase I unidos a su péptido antigénico. Este ensayo puede ser realizado sobre PBMCs o sangre completa y mide la frecuencia de fenotipos de células T [196-198]. Sin embargo, no da información sobre si las células detectadas son funcionales, como con la tinción de citoquinas intracelulares [199]. Por este motivo, a pesar de ser una técnica muy poderosa, su valor con fines diagnósticos puede ser limitado.

## **4. Vacunas**

### **4.1 Antígenos de CMV que inducen una respuesta celular y humoral**

Aunque el genoma de CMV es de aproximadamente 235 Kb con más de 165 ORFs [7], sólo se ha estudiado la respuesta inmune y su correlación con el control de la replicación de un número de proteínas virales muy reducido. Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de células T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T específicas de CMV en sangre periférica se correlaciona con el control de la infección por CMV en el periodo postrasplante [133, 157]. La mayoría de los estudios de inmunidad celular han empleado los antígenos virales UL123 (proteína IE-1) y UL83 (proteína pp65) que se expresan a altos niveles durante la infección viral [200], y se han asociado a la inducción de una respuesta celular T efectiva frente al control de la infección por CMV en el periodo postrasplante [200-204].

Otros trabajos han caracterizado la respuesta celular inducida por otros antígenos virales, aunque su correlación con la protección frente a la infección por CMV necesita ser estudiada en más profundidad. En un estudio reciente, se utilizaron péptidos solapantes de 15 aminoácidos que cubrían todas las ORFs de CMV para estimular linfocitos de individuos sanos seropositivos para CMV. En este estudio se demostró que las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas de CMV respondían a más del 70% de las ORFs virales, indicando que la infección *in vivo* por CMV induce una amplia respuesta celular dirigida a un gran número de antígenos [157]. Además de esta forma fueron identificadas como altamente antigénicas las proteínas pp28, pp50, gH, gB, US2, US3, US6, UL18, UL55, UL83, UL86, UL99, UL153, UL32, IE-1 y pp65 ya que fueron capaces de inducir una respuesta inmune de células T [157]. En otros dos estudios se demostró que las proteínas virales gH, gB, IMP (UL100), US6-US11, pp28, pp150, IE2 y UL68 inducían una respuesta de células T de memoria en células de individuos sanos seropositivos [205, 206]. El conjunto de estos hallazgos, sugieren una vez más que la respuesta celular frente a CMV es una respuesta robusta y que está dirigida hacia un gran número de antígenos virales diferentes.

Aunque la infección por CMV induce una fuerte respuesta inmune humoral, su papel en la defensa frente a la infección ha sido secundario y sólo parcialmente investigado. Durante los 80 y hasta finales de los 90 el uso de antígenos recombinantes de CMV ayudó a la identificación de anticuerpos frente a CMV en el suero de pacientes en diferentes contextos clínicos [207-211]. La mayoría de proteínas no estructurales como las proteínas tempranas inmediatas (IE1 e IE2), la proteína de unión al ADN pUL57 y la ADN polimerasa (UL54) se han identificado como inductores débiles de la respuesta humoral comparado con otros antígenos estructurales [212-214]. Por el contrario, la proteína accesoria de polimerasa (UL44) induce una fuerte respuesta inmune en la mayoría de individuos tras la infección natural [212, 213]. Entre las proteínas del tegumento, pp28 (UL99), pp38 (UL80a) y especialmente pp65 (UL83) y pp150 (UL32) han sido identificadas como las más inmunogénicas [215-218]. Las fosfolipoproteínas pp65 y pp150 son altamente reactivas para ambos IgG y IgM tras la infección primaria y son reconocidas por casi el 100% de sueros de sujetos seropositivos para CMV. Además, los anticuerpos anti-pp150 son altamente estables y pueden ser detectados varios años tras el trasplante y pp65 ha sido usada para determinar el estado serológico y por tanto el riesgo de infección tras el trasplante [207,

215, 219]. Sin embargo, ninguna de estas proteínas, localizadas en la parte interna de las estructuras del virión o expresadas durante la infección por CMV sería capaz de inducir una respuesta de anticuerpos capaces de neutralizar la infección.

Las glicoproteínas B (UL55) y H (UL65) han sido las proteínas de la envuelta mejor investigadas hasta el momento por su capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y que son detectadas en el 100% de sueros de individuos infectados [218, 220, 221]. Asimismo, la glicoproteína M es de particular interés por el hecho de ser una de las glicoproteínas más abundantes en la envuelta viral [222, 223]. Tradicionalmente la atención se ha centrado en los complejos gH/gO/gL (UL75/UL74/UL115) and gN/gM (UL73/UL100) como principales complejos de glicoproteínas inductoras de una respuesta de anticuerpos neutralizantes durante infección natural. Sin embargo, hallazgos recientes que relacionan la administración de inmunoglobulinas específicas de CMV con la protección frente a la infección [178], han renovado el interés en el estudio de los anticuerpos neutralizantes dirigidos a epítomos del complejo pentamérico gH/gL/pUL128-130-131 que previenen la infección *in vitro* de células epiteliales y endoteliales pero no de fibroblastos [207, 223] y que parecen ser los más abundantes en el pool de anticuerpos de individuos con menor riesgo de infección por CMV [190, 207]. El conjunto de datos obtenidos desde estudios *in vitro* y ensayos clínicos sugieren que los anticuerpos neutralizantes frente a ciertas proteínas virales podrían jugar un papel fundamental en el control de la replicación y diseminación de la infección por CMV.

#### **4.2 Antígenos y vacunas evaluadas en ensayos**

De las evidencias aportadas por los numerosos trabajos que demuestran la compleja interacción entre CMV y el sistema inmune, se ha propuesto que una vacuna capaz de inducir una respuesta inmune humoral neutralizante y celular específica podría ser eficaz para el control y prevención de la infección por CMV. El desarrollo de una vacuna para CMV ha sido propuesta como prioridad en la investigación biomédica por el Instituto de Medicina (IOM) [224]. Sin embargo, aunque numerosos ensayos pre-clínicos y clínicos de fase 1 y 2 han sido desarrollados con diversos candidatos de vacunas, ninguna ha sido licenciada hasta el momento. Uno de los problemas



principales que ha obstaculizado el desarrollo de una vacuna es la falta de un modelo animal de infección por CMV [225] y la falta de consenso respecto al punto final de los ensayos clínicos [226]. A pesar de ello, múltiples estrategias de vacuna se han desarrollado en las pasadas cuatro décadas [227].

Hasta el momento, sólo se han llevado a cabo tres ensayos clínicos de fase 2 en la población trasplantada. En los años 80 se realizó un estudio en 177 pacientes trasplantados de riñón seronegativos para CMV en el que se evaluó una vacuna de CMV formulada con la cepa Towne atenuada. Esta vacuna fue efectiva en la reducción de la incidencia de infección en comparación con el placebo, aunque redujo la gravedad de la enfermedad por CMV [228]. Además, no se consiguieron altos niveles de anticuerpos neutralizantes de la infección por CMV en los individuos vacunados [229]. Posteriormente, una segunda vacuna basada en la glicoproteína B adyuvantada con MF59 fue evaluada en una cohorte de pacientes trasplantados de riñón e hígado, siendo la enfermedad de órgano por CMV la variable analizada como endpoint. En este caso, no hubo diferencias en la incidencia de enfermedad encontrada en el grupo vacunado o placebo, por lo que se analizaron las cargas virales y los anticuerpos neutralizantes de unión a gB para evaluar la eficacia de la vacuna. De esta forma no se detectaron diferencias en la incidencia de viremia entre grupos, aunque se observó que un incremento de anticuerpos neutralizantes dirigidos a gB se correlacionaba con una menor duración de viremia [230]. Por último, basándose en la idea de que los anticuerpos anti-gB podrían ser efectivos en neutralizar la infección viral, mientras que la respuesta celular inducida por la pp65 podría ser efectiva en la reducción de la replicación viral, se evaluó en pacientes trasplantados una tercera vacuna consistente en ADN plasmídico que codifica para los antígenos virales gB y pp65. Esta vacuna ha sido evaluada en receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos seropositivos para CMV, demostrando que los pacientes vacunados experimentaban menos episodios de replicación y de menor duración que los pacientes del grupo placebo en el primer año postrasplante [231]. Estos estudios, en los que se generaron bajos niveles de anticuerpos y pocas células T específicos de gB, sugerían que el efecto protector observado en los ensayos clínicos se asociaban principalmente a la respuesta celular inducida por el antígeno pp65 [231].

## 5. Uso de nuevas tecnologías para la identificación de antígenos

El número de antígenos de CMV evaluados como candidatos de vacuna en ensayos preclínicos y clínicos ha sido relativamente bajo, sugiriendo que existen antígenos que aunque no han sido caracterizados, podrían tener la capacidad de estimular una respuesta celular y/o humoral. En este contexto, el uso de las tecnologías de genómica, transcriptómica y proteómica emergentes podrían ser útiles para identificar antígenos virales que tengan características deseables para el diseño de una vacuna. Las técnicas basadas en el análisis de transcriptoma, pueden ser utilizadas para identificar genes virales que están altamente expresados durante la infección de diferentes tipos celulares, como han sugerido estudios recientes que emplean el RNA-Seq para caracterizar el transcriptoma de CMV humano y murino durante la infección [232, 233].

### 5.1 Análisis del transcriptoma

La transcriptómica estudia el conjunto de ARNs transcritos desde el genoma de un tipo celular en un tiempo y en unas condiciones determinadas. El conocimiento del transcriptoma es esencial para poder interpretar los elementos funcionales del genoma y entender el desarrollo de enfermedades. De acuerdo al dogma central de la Biología Molecular, un gen es transcrito a ARN mensajero y posteriormente es traducido a proteína. Aunque el ARN mensajero ha sido tradicionalmente considerado como un simple mediador entre el ADN y la proteína, el desarrollo de nuevas herramientas de secuenciación ha demostrado que la complejidad de un organismo no es proporcional a un incremento del número de genes, sino al tamaño del proteoma y por consiguiente a la complejidad del transcriptoma. En el procesamiento del ARN mensajero para eliminar los intrones en un proceso regulado denominado *splicing* (término inglés) para producir un ARN maduro, ocasionalmente un exón puede ser escindido en un proceso denominado *splicing* alternativo, dando por tanto lugar a un ARN mensajero distinto que dará lugar a una proteína diferente. Este proceso es considerado una de las fuentes más importantes de diversidad en los vertebrados [234]. En los últimos 10 años se ha hecho evidente que el transcriptoma tanto de células eucariotas como de algunos virus

es más complejo de lo supuesto previamente, y está compuesto por distintas especies de transcritos, incluyendo ARN mensajero, ARN no codificante y pequeños ARNs.

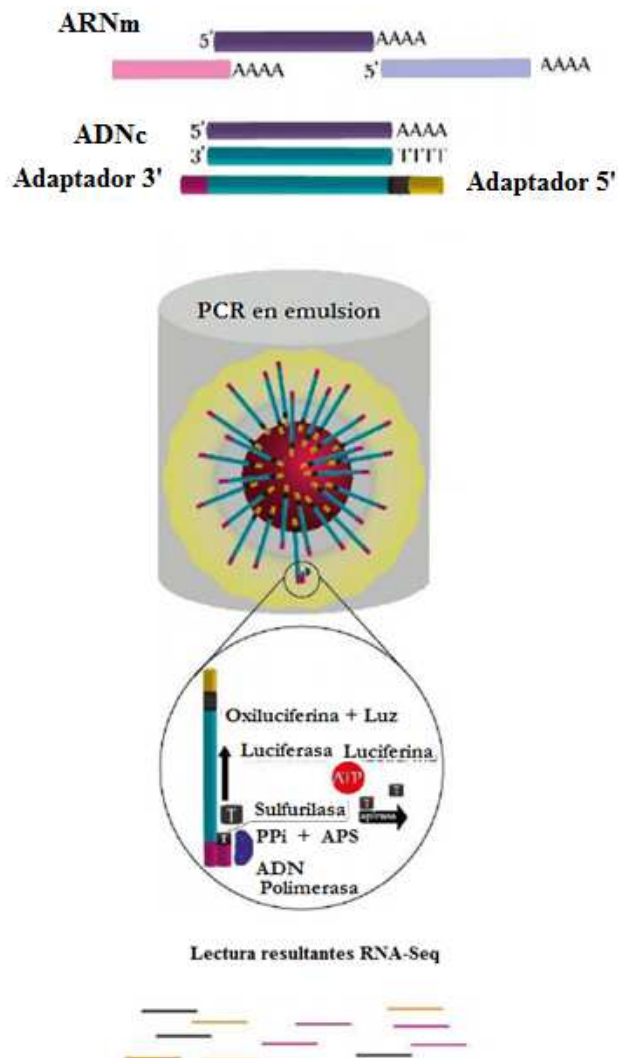
A diferencia del genoma, el transcriptoma es diferente entre distintos tipos celulares en un mismo organismo, es muy dinámico y puede estar sujeto a cambios rápidos en respuesta a diferentes estímulos (estrés, fase del ciclo celular, infección, o presencia de diferentes drogas). El conocimiento de los perfiles transcripcionales tanto de células como de microorganismos es esencial para el entendimiento de cómo ocurre una infección, su desarrollo y la patogénesis producida.

## **5.2 Secuenciación masiva de nueva generación y RNAseq.**

El desarrollo de la secuenciación masiva de nueva generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*) ha permitido una secuenciación de alto rendimiento y mayor resolución que las técnicas anteriores sin la necesidad de clonar y con independencia de las secuencias disponibles en las bases de datos. La tecnología NGS incluye un número de métodos que se agrupan según la preparación de la muestra y la plataforma de secuenciación, con una gran variedad de aplicaciones, entre ellas la caracterización de los transcriptomas celulares, de microorganismos y tejidos. El ensayo de RNA-Seq es el primer método basado en secuenciación que permite analizar el transcriptoma completo con alto rendimiento y de forma cuantitativa. Es posible determinar la cantidad absoluta de cada una de las moléculas de ARN en una población celular, y hacer comparaciones directas entre experimentos. Además, permite la detección de nuevas isoformas, fusiones de genes, mutaciones puntuales y otros aspectos sin necesidad de conocer previamente los genes estudiados. A diferencia del microarray esta técnica tiene muy poco ruido de fondo y no presenta límite superior de cuantificación. Consecuentemente tiene un amplio rango dinámico para detectar los transcritos. Además es una técnica muy reproducible dando lugar a resultados poco variables cuando se comparan tanto réplicas técnicas como biológicas.

La población de ARN (total o fraccionado como poli(A)+) es convertido a una librería de fragmentos de ADNc con adaptadores universales unidos a uno o ambos extremos [235] (Figura 5). Tras la amplificación de los fragmentos de ADNc procedentes de la muestra problema, se llevará a cabo la secuenciación de las mismas

utilizando procesos específicos de la plataforma que está siendo usada [236]. De esta forma se obtendrán lecturas típicamente de entre 30-400 pb dependiendo de la tecnología utilizada, que serán utilizadas para posteriores análisis. Las lecturas resultantes son alineadas a un genoma de referencia o son ensambladas *de novo* para construir un mapa de transcripción. De esta forma se podrá revelar la localización precisa de cambios de un solo nucleótido, la conexión entre exones e incluso identificar nuevos transcritos no identificados [237]. Pero además de la identificación de nuevos transcritos, uno de los objetivos de la tecnología RNA-Seq es cuantificar el nivel de expresión de cada uno de los transcritos detectados y comparar el perfil de expresión génica entre diferentes muestras [238].



**Figura 5. Secuenciación masiva de ADNc (RNA-Seq) por la tecnología Roche 454.**

(Adaptado de Sedano et al. 2012). Secuenciación basada en el principio de PCR en emulsión y piro-secuenciación

### 5.3 Análisis del transcriptoma de CMV

Desde la primera publicación del genoma de CMV en 1990 [8, 12], numerosos estudios han tratado de identificar la totalidad de genes virales mediante aproximaciones bioinformáticas o proteómicas, utilizando las secuencias de ORFs anotadas en otros microorganismos o por similitud con otras proteínas conocidas para completar la información existente de las ORFs de CMV. De esta forma, se identificaron unas 150 ORFs para la cepa AD169 de CMV [7, 8]. Sin embargo, debido a las limitaciones de los modelos celulares de infección para CMV, el crecimiento lento de CMV en células en cultivo y la falta de métodos efectivos para generar virus mutante a causa del gran tamaño del genoma todavía se desconoce la funcionalidad de aproximadamente la mitad de estas ORFs. El uso de las nuevas tecnologías de base molecular ha permitido ir avanzando en el conocimiento del genoma y el transcriptoma de CMV.

La clonación del genoma de CMV en un báculo en el año 1999 facilitó la manipulación genética del virus [239], y posteriormente se han generado librerías de mutantes por mutagénesis dirigida o aleatoria para estudiar la funcionalidad de las ORFs. En un estudio realizado en fibroblastos se demostró que 41 de los ORFs eran funcionalmente esenciales, 88 no esenciales y 27 estaban implicados en el crecimiento viral [11].

Por otra parte, varios estudios han tratado de analizar el perfil de expresión de los genes de CMV. A través de plataformas de microarray se identificaron un total de 151 ORFs para la cepa AD169 de CMV [5]. Esta técnica fue también utilizada por Towler *et al.* para monitorizar la actividad del transcriptoma de la cepa Merlin de CMV a las 12, 14, 48 y 72 horas pos-infección en fibroblastos, en células epiteliales pigmentadas de retina y en astrocitos. Identificaron una gran variedad de genes diferencialmente regulados entre las tres etapas de infección (inmediata, temprana y tardía) dependiendo de tipo celular, sugiriendo que las diferencias entre los factores celulares expresados podrían ser responsables de la modulación de la expresión de genes virales [240]. Sin embargo, es posible que este análisis por microarray no abarcara el perfil total de expresión ya que para el diseño del experimento sólo se utilizan sondas generadas previamente en base a las ORFs publicadas, por lo que aquellos genes que no están incluidos no serán cuantificados.

Utilizando librerías de ADNc se ha analizado el transcriptoma durante las diferentes fases de replicación de CMV en fibroblastos, demostrando que el 45% de los clones provenían de regiones genómicas que habían sido identificadas como no codificantes, y el 55% de los clones de ADNc fueron antisentidos a ORFs conocidas o predichas [241, 242]. Además de que este tipo de transcrito podría servir como nuevas dianas para el desarrollo de estrategias de intervención y tratamientos, estos resultados sugieren que los mapas genómicos disponibles actualmente basados en ORFs podrían estar subestimando la verdadera complejidad de los productos de los genes de CMV.

Más recientemente, se ha utilizado RNA-Seq para analizar el transcriptoma de la cepa Merlin de CMV en fibroblastos infectados (72 horas posinfección) demostrando una alta complejidad en el patrón transcripcional de CMV identificando un gran número de regiones codificantes de proteínas, un gran número de eventos de *splicing*, solapamiento de transcritos, y la presencia de ARN no codificante y antisentido [232].

El conjunto de resultados expuestos, sugieren que varios aspectos deben tenerse en cuenta en el estudio del transcriptoma de CMV: a) las diferencias en la expresión génica de CMV en función del tipo celular infectado; b) a pesar de contener un genoma con alto número de ORFs, contiene relativamente pocas señales de poliadenilación requeridas para la terminación de la transcripción de los ARN mensajeros. Esto conlleva la producción de largos RNAs de elevada complejidad y con solapamientos de ORFs [243] y una gran cantidad de eventos de *splicing*. [244, 245].

A pesar del número de resultados disponibles, el conocimiento del transcriptoma de CMV es aún parcial debido a las limitaciones de los ensayos y las condiciones utilizadas, así como a la complejidad propia que presenta el transcriptoma de CMV. Todo ello sugiere que el mapa genómico actualmente disponible de CMV podría no ser completo, además de ser necesaria el conocimiento del transcriptoma del virus y de la célula durante la infección de la célula hospedadora.



## ***II. Justificación***



A pesar de que la infección por CMV es generalmente asintomática en individuos inmunocompetentes, continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tras el trasplante de órgano sólido. En los últimos años se han realizado numerosos avances en las estrategias de administración de tratamiento, así como en los agentes antivirales utilizados para prevenir la ocurrencia de enfermedad por CMV. Los receptores de trasplante de órgano sólido seronegativos para CMV que reciben un órgano de un donante seropositivo, son considerados de alto riesgo de desarrollar infección por CMV. Las guías de práctica clínica recomiendan la administración de profilaxis universal en estos pacientes para prevenir la infección por CMV. Sin embargo, la terapia anticipada en la que el tratamiento es administrado únicamente cuando se desarrolla infección por CMV presenta numerosas ventajas. En un estudio previo realizado por nuestro grupo demostramos que la terapia anticipada en receptores de alto riesgo era segura y promovía la adquisición de una respuesta de células T específica de CMV que se asoció con un efecto terapéutico frente a la infección. Los pacientes con inmunidad específica desarrollaron episodios de replicación con cargas virales menores tras la inmunidad que fueron controladas sin necesidad de tratamiento antiviral. Aunque encontramos una relación clara entre la adquisición de la respuesta inmune celular específica de CMV, sería necesario analizar el papel de otros brazos de la respuesta inmune específica que podrían estar influyendo en este efecto protector, así como establecer puntos de corte para poder aplicarlo a la práctica clínica.

Existen pocos estudios sobre la cinética de adquisición de la respuesta humoral específica frente a CMV en pacientes de trasplante de órgano sólido así como la relación de dicha respuesta con el control de la infección y enfermedad por CMV. La función fisiológica de los anticuerpos durante la infección natural por CMV no está claramente definida. No se ha descrito una correlación clara entre niveles elevados de anticuerpos séricos específicos frente a CMV y la ausencia de infección por CMV. Por otra parte, la respuesta mediada por anticuerpos neutralizantes ha sido principalmente estudiada en el contexto de infección congénita. Además, la mayoría de estudios realizados se han llevado a cabo en modelos de fibroblastos. Sin embargo, durante la infección *in vivo* la primera barrera de infección por CMV son las células epiteliales y endoteliales, por lo que es importante estudiar la capacidad de los anticuerpos neutralizantes de bloquear la infección en estos tipos celulares. Además, es necesario llevar a cabo la caracterización de la cinética de adquisición de anticuerpos

neutralizantes en pacientes de alto riesgo de infección y su relación con la respuesta celular específica y el control de la infección y enfermedad por CMV.

Por su parte, el desarrollo de una vacuna preventiva frente a la infección por CMV ha ganado fuerza en los últimos años desde que fue propuesto como prioridad por el Instituto de Medicina americano (IOM). Se han realizado distintos diseños de vacunación utilizando virus atenuados, DNA o proteínas recombinantes, pero hasta el momento ninguna de estas formulaciones han sido licenciadas para su uso en humanos. Es por ello que el conocimiento de los antígenos virales, su expresión, y su papel durante la infección serían buenas aproximaciones al desarrollo de una vacuna efectiva.



### ***III. Hipótesis y Objetivos***

## ***Hipótesis***

Las hipótesis de este estudio son:

- a) El tratamiento anticipado, facilitado el contacto entre el virus y el hospedador y permite el desarrollo de una respuesta inmune específica de CMV en receptores TOS de alto riesgo.
- b) Además de la adquisición de una respuesta inmune específica de células T frente a CMV para el control de la infección por CMV, es importante el papel de otros componentes de la inmunidad como los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV.
- c) El control de la replicación por CMV tras el trasplante se relaciona con el aumento de células T específicas frente a CMV y de anticuerpos neutralizantes.
- d) Las cinéticas de adquisición de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección de células fibroblastos y epitelio podría ser diferentes.
- e) No está claro el efecto protector frente al desarrollo de enfermedad por CMV y si es el mismo de los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV capaces de bloquear la infección de células fibroblastos y epitelio.
- f) Una vacuna eficaz sería aquella capaz de inducir una respuesta inmune específica de células T y de anticuerpos neutralizantes, similar a lo que ocurre tras la infección por CMV *in vivo* en los pacientes trasplantados

## ***Objetivos***

### **2.1 Objetivo general**

El objetivo general del presente estudio es caracterizar la respuesta inmune celular y humoral específica de CMV tras el trasplante y su relación con la protección frente a la infección en pacientes que reciben un trasplante de órgano sólido de alto riesgo para la infección por CMV (R-/D+) y determinar si la respuesta protectora puede ser utilizada para el diseño de una vacuna.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterización de la cinética de la respuesta humoral específica frente a CMV tras el trasplante en receptores de TOS de alto riesgo para la infección por CMV.
- b) Relacionar la respuesta humoral y la respuesta de células T específicas de CMV y su relación con la replicación viral tras el trasplante y la progresión clínica de los pacientes tales como protección de la enfermedad por CMV, la mortalidad relacionada con el trasplante y la supervivencia.
- c) Determinar si los títulos de anticuerpos neutralizantes frente a CMV capaces de bloquear la infección de células epiteliales y fibroblastos tienen alguna relación con el control de la replicación viral y el desarrollo de enfermedad tras el trasplante.
- d) Determinar si la seroconversión tras el trasplante de los receptores R- y los niveles de IgG específicos de CMV tienen alguna relación con el control de la replicación viral y el desarrollo de enfermedad.
- e) Determinar umbrales de la respuesta humoral y de la respuesta de células T específicas de CMV de protección frente a la infección.
- f) Analizar la respuesta inmune específica de CMV protectora frente a la infección.
- g) Identificar proteínas virales capaces de inducir una respuesta inmune protectora para el diseño de una vacuna.



## ***IV. Resultados***



**Artículo 1. Manuscrito enviado a *Journal of Infection***

***Use of Antibodies Neutralizing Epithelial Cell Infection to Diagnose Patients at Risk for CMV-Disease After Transplantation***

Blanco-Lobo P a\*, Cordero E a\*, Martín-Gandul C a, Gentil MA b, Suárez-Artacho G c, Sobrino M d, Aznar J a, Pérez-Romero P a

a. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Sevilla, Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Spain.

b .Service of Nephrology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

c. Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Hepatic Transplant Unit, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

d. Service of Cardiology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

\* Both authors contributed equally to the work.

**Corresponding author:**

Dr Elisa Cordero. Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Avenida Manuel Siurot s/n,

Hospital Universitario Virgen del Rocío, Edificio IBIS Laboratorio 208, 41013 Sevilla,

Running title: CMV-specific Antibody Neutralizing infection

---

**Abstract**

**Objectives.** Although a CMV-specific T-cell response is associated with reduced risk for infection after transplantation, some patients still develop CMV-disease. Thus, the characterization of additional parameters of the CMV-specific immune response that correlate with the control of CMV-infection and disease and their use in defining thresholds that can be applied to clinical practice is of interest. **Methods.** In a cohort of high-risk solid organ transplant recipients we characterized CMV-specific T-cell responses using intracellular cytokine staining upon stimulation with pp65 and IE-1 peptides, and levels of CMV-specific antibodies neutralizing infection in fibroblast (MRC-5) and epithelial (ARPE-19) cells using microneutralization assays.

**Results.** Although patients with a positive ( $\geq 0.25\% \text{CD8}^+ \text{CD69}^+ \text{IFN-}\gamma^+$ ) T-cell response were 6.4 fold more protected (OR 6.4, 95% CI 1.6-25.3;  $p < 0.001$ ) from CMV-infection than patients without a response, 2 (4.2%) patients developed disease. We defined a cutoff titer for epithelial cell neutralizing antibodies of  $\geq 480$  that correlated with disease protection. Thus, patients with a CMV-specific T-cell response and titers  $\geq 480$  were 14.2 fold more protected from CMV-infection (OR 14.2, 95% CI 5-40.2;  $p < 0.001$ ) and had no episodes of CMV-disease.

**Conclusions.** Our results indicate that antibodies neutralizing epithelial cell infection may have an important role in long-term protection. Quantification of antibodies neutralizing epithelial cells, in addition to the T-cell response, may be useful for identifying patients with lower risk for CMV-disease

**Key words:** Cytomegalovirus; Antibodies Neutralizing Epithelial Cell Infection; Solid organ transplant patients; Immune monitoring; Preemptive therapy.

---

## Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection continues to be a major cause of direct and indirect complications after solid organ transplantation (SOT)[1]. Although the potential utility of monitoring the CMV-specific T-cell response has been investigated in various posttransplant scenarios, defining cut-off values for immune parameters that can be used to determine risk of infection is of interest. Unfortunately however, these studies are scarce [2, 3]. In addition, the role played by other components of the immune response is still unclear [4-7]. For instance, CMV-specific IgG levels are used to establish the recipient's risk for developing CMV infection after transplantation however, the relationship between IgG levels and post- transplantation risk for infection has not been characterized. Additionally, most data regarding the ability of neutralizing antibodies to control CMV infection come from studies describing congenital infection [6]. In the transplant setting, little is known about the role and kinetics of neutralizing antibodies after primary infection. A meta-analysis analyzing 698 solid organ transplant recipients (SOTR), demonstrated that hyperimmunoglobulin administration improved total survival, and reduced CMV disease and CMV-associated deaths [8]. CMV neutralizing antibodies have mostly been evaluated in the context of *in vitro* models using human derived fibroblasts. However, epithelial and endothelial cells are the first physiologic barrier encountered by CMV during natural infection, and thus results from fibroblast based assays may fail to identify the whole spectrum of neutralizing activity[9].

Different studies suggest that the use of fibroblast models does not fully describe the CMV specific antibody response, and that it would be necessary to assess epithelial cell specific neutralizing activity and its relationship with clinical outcomes [10-12]. In fact, Gerna *et al.* reported a more than 128-fold higher neutralizing activity against CMV in epithelial cells compared to fibroblasts in a study that included 18 pregnant women with primary CMV infection and 5 SOTR [12]. CMV infection in SOTR at high risk for CMV infection, (seronegative recipients receiving a graft from a seropositive donor (D+/R-), is an ideal context for characterizing the CMV-specific immune response for a number of reasons. First, patients have had no previous CMV infection and approximately 50% of them develop primary infection after discontinuing prophylaxis [13]. Thus, the CMV-specific immune response can be characterized *de novo*. Additionally, SOT recipients at high risk that receive pre-emptive treatment for CMV

infection have been shown to control infection after acquiring a T-cell immune response [2, 7, 14-16].

Based on these premises, the aim of this study was to define parameters of the CMV specific immune response, both humoral and cellular, that correlate with the control of CMV-infection and disease by characterizing the kinetics of the immune response and its relationship with CMV infection in a cohort of SOTR at high risk (D+/R-) for CMV infection.

---

## Methods

**Patient follow-up.** We conducted an observational prospective cohort study at the University Hospital Virgen del Rocío in Spain. Adult D+/R- SOTR giving written informed consent were included in the study from April 2007 to December 2014. Patients were excluded if they died within the first 14 days after transplantation or if they received thymoglobulin as induction therapy. Blood samples were collected weekly for the first 3 months after transplantation, every other week from month 3 to 6, and monthly thereafter until one year of follow-up was completed. The study was approved by the local Ethics Committee for Clinical Research and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guidelines for Good Clinical Practice.

**Definitions.** CMV infection and disease were defined according to the GESITRASEIMC/ REIPI recommendations based on the definitions published by Ljungman *et al.* and The International Consensus Guidelines [17-19]. As previously described [2], patients received preemptive regimens, that consisted of oral valganciclovir (900 mg/12 hr) according to current institutional guidelines, when a positive real-time PCR test (above the limit of detection of the PCR assay) was detected, before the detection of a CMV-specific T-cell response, and was continued for at least 2 weeks or until CMV viral loads were undetectable below the limit of detection. A replication episode was considered the period of time with detectable viremia (above the limit of detection). Once a CMV-specific T-cell response was detected, further episodes of CMV replication were not treated and patients were monitored [2]. However, if a significant increase in viral load was detected (doubling time of 1 day) patients were treated to avoid uncontrolled viral rebounds. All patients received an immunosuppressive regimen according to the hospital transplant protocol (see Supplementary material).

**Viral load detection.** CMV viral loads were determined in plasma using the Affigene CMV trender assay (Sangtec Molecular Diagnostics AB, Bromma, Sweden) from April 2007 to October 2008, using the Quant CMV LightCycler 2.0 real-time PCR system (Roche Applied Science) from October 2008 to April 2012 and using the Cobas Ampliprep/Cobas Taqman CMV (Roche Applied Science) from April 2012 to December 2014. Results were standardized to international units per millilitre (IU/ml)

using the WHO International Standard for Human CMV for Nucleic Acid Amplification Technique (National Institute for Biological Standards and Controls, NIBSC 09/162). The replication episode was considered as the period between the day of the first positive PCR result and the day of the first negative result.

**Cells and viruses.** MRC-5 human fetal lung fibroblasts (ATCC CCL-171) and Human ARPE-19 retinal pigment epithelial cells (ATCC CRL-2302) were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium-DMEM- (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (HyClone Laboratories), 10,000 IU/L penicillin, 10 mg/L streptomycin (Gibco-BRL). CMV strain AD169 (ATCC VR-538) was propagated in MRC-5 cells and CMV strain BADrUL131-Y4 (kindly provided by Dr. T. Shenk Princeton University, USA), was propagated in ARPE-19 cells [20]. Viral titers were determined by limiting dilution in 96-well plates using MRC-5 cells.

**Determination of neutralizing antibody titers.** Neutralizing antibody titers were determined by microneutralization assay as previously published, with minor modifications [21] (see Supplementary material). We defined the neutralizing antibody titer as the serum titer that reduced virus infectivity by 50% or more compared with the infected control using the following equation: [(average OD of VC cells)-(average OD of CC cells)]/2. Experiments were performed in duplicate and for each patient, neutralizing antibody titers were determined at baseline, five weeks after each replication episode and at the end of follow-up.

**Quantification of the CMV-specific T-cell response.** The CMV-specific T-cell response was quantified as previously described [2] (see Supplementary material). Cytomegalovirus IgG Quantification. Total CMV-specific IgG was quantified using Elecsys 2010 (Roche) and samples were considered positive when higher than 1 IU/ml.

**Statistical analysis.** For analyzing categorical variables the Chi-square test or Fisher Exact tests were used, and the Mann-Whitney test was used for continuous variables. CD69 expression and cytokine secretion were compared in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells between the different time points by the Wilcoxon rank sum test and Mann-Whitney *U* test. To determine a cut-off value of neutralizing antibodies and IgG levels that correlates with protection from CMV infection, receiver operating characteristic (ROC) plots were performed. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and

negative predictive value (NPV) were obtained with the G-Stat software package (version 2.0). The correlation between the acquisition of a CMV-specific immune response and the decrease in the incidence of CMV viral load was compared by the Pearson correlation test. Logistical regression models were performed to control for the effect of the specific T-cell response and neutralizing antibodies response in protection against CMV. Differences were considered statistically significant for P-values less than 0.05. All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 software (SPSS, Chicago, IL).

---

## Results

**Study population.** A total of 54 D+/R- patients fulfilled study requirements and 47 (25 kidney, 19 liver, 1 heart, 1 liver-kidney and 1 face-composite) completed follow-up for analysis. The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1.

**CMV infection.** Forty-four (93.6%) patients developed a total of 115 CMV replication episodes with a median of 3 episodes per patient (IQR 2-3). The 44 (38.3%) episodes of primary infection occurred at a median of 4 weeks (IQR 3-6) after transplantation and had a median duration of 28 days (IQR 22-47) with a median peak viral load of 7,077 IU/ml (IQR 2,061-23,332). The other 71 (61.7%) replication episodes were recurrent episodes of infection occurring at a median of 18 weeks (IQR 14-26), with significantly lower duration (23 days; IQR 11-35,  $p=0.014$ ) and peak viral load (2850 IU/ml; IQR 1,193-7,206;  $p=0.007$ ; Table 2).

**The CMV-specific T-cell immune response.** Forty-two (89.3%) patients developed a CMV-specific T-cell response at a median of 15 weeks (IQR 13-18), with a median of 1.01% CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T-cells producing INF- $\gamma$  (IQR 0.4-1.6; Figure 1A) and 0.3% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T-cells producing INF- $\gamma$  (IQR, 0.19-0.7; Figure 1B). Five (10.7%) patients did not develop a CMV-specific T-cell response despite the fact that four of them developed at least one CMV replication episode during the follow-up period (Figure 2A), with peak viral loads that ranged from 1,347-13,923 IU/ml (median of 10,733 IU/ml), a duration of viremia of 21.5 days (IQR 17-27.5 days), that needed a median of 28.5 days of treatment (IQR 22-43.5 days).

**Titers of antibodies neutralizing CMV infection of MRC-5 fibroblasts and ARPE-19 epithelial cells.** During the follow-up period a moderate increase in titers of antibodies neutralizing fibroblast infection, that did not depend on the number of replication episodes, was detected, reaching a median titer of 40 (IQR, 5-160) at the end of follow-up (Figure 3). In contrast, we found a significant increase in antibodies neutralizing epithelial cell infection that was dependent on the number of CMV replication episodes, reaching a median titer of 2560 (IQR, 160-2560, Figure 3) at the end of follow-up.



**Determination of a CMV-specific neutralizing antibody cut-off.** We performed ROC curve analysis to characterize the relationship between having epithelial cell and fibroblast neutralizing antibody titers and protection from CMV infection, and to define neutralizing antibody cut-offs that correlate with protection. We found no correlation between having fibroblast neutralizing antibodies and the incidence of infection (see Supplementary Figure 1A). However, the presence of epithelial cell neutralizing antibody titers was predictive of protection against CMV infection. The diagnostic accuracy of epithelial cell neutralizing titers was 85.6% (CI 80-91.2; Figure 4A) by determining the area under the ROC curve. An epithelial cell neutralizing antibody titer of 480 had a positive predictive value of 80.5%, a sensitivity of 70.1%, a specificity of 88.2% and a negative predictive value of 80.9%; (Figure 4B). In our cohort, 35 (74.5%) patients reached an epithelial cell neutralizing antibody titer of 480 at a median of 31 weeks (IQR 20-47; Figure 2B). The other twelve (25.5%) patients did not reach an epithelial cell neutralizing antibody titer of 480 despite the fact that 9 of them developed a total of 24 replication episodes with a median peak viral load of 4459 IU/ml (IQR 2184-11461 UI/ml) and a median duration of 26 days (IQR 13-31 days). Twenty-one (87.5 %) of these episodes needed a median of 22 days (IQR 6-49.2 days) of treatment.

**Correlation between CMV-specific immune response and CMV infection.** We next compared the incidence of CMV replication and the acquisition of a CMV-specific immune response, using the following cut-offs: for T-cell immunity (0.25% of CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , established previously) and for epithelial cell neutralizing titer ( $\geq$ 480, established here). Overall, a significant correlation was found between the acquisition of a T-cell immune response and the acquisition of epithelial cell neutralizing antibodies with titers  $>$ 480 (linear regression  $r^2$  0.477, Pearson correlation 0.691.;  $p < 0.001$ ; Figure 5). Of the 33 (70.2%) patients who had developed positive T-cell immunity and an epithelial cell neutralizing titer  $\geq$ 480, 29 (87.9%) of them had developed a T-cell response first compared with 4 (12.1%) patients that developed an epithelial cell neutralizing antibody titer of 480 first. In the individual analysis of the immune response, we found a delay of a median of 16 weeks (range 1-40) between the acquisition of both types of immune responses. In 60.1% of patients, a

---

median of 24 weeks separated the acquisition of one type of immune response and the acquisition of the second.

We found that the decline in incidence of episodes of CMV replication inversely correlated with the acquisition of the CMV-specific T-cell immune response (linear regression  $r^2$  0.743, Pearson correlation -0.862;  $p < 0.001$ ) and especially with the acquisition of epithelial cell neutralizing antibodies (linear regression  $r^2$  0.951, Pearson correlation -0.975;  $P < 0.001$ ; Figure 5). Patients with a positive T-cell response were 6.4 fold more protected from developing CMV infection (OR 6.4, 95% CI 1.6-25.3;  $p < 0.001$ ) and patients with epithelial cell neutralizing antibodies  $> 480$  were 14.2 fold more protected from developing CMV infection (OR 14.2, 95% CI 5-40.2;  $p < 0.001$ ), than patients without a response.

Twelve (28.5%) patients did not develop further episodes of replication after acquiring a T-cell response. However, the other 28 (66.6%) patients experienced 42 replication episodes in the post-immunity period, although with significantly lower peak viral loads (median peak viral load 2,318 IU/ml, IQR 1,129-5,481) compared with the episodes occurring before T-cell immunity ( $p = 0.01$ , Table 2). Twenty-one (50%) of these episodes, with a median initial viral load of 881 UI/ml (IQR 534-1319 UI/ml) and a median peak viral load of 1,174 IU/ml (IQR 810-2,149), cleared without administration of treatment within a median of 15 days (IQR 7-26.5 days). The other 21 (50%) episodes needed a median of 28 days (IQR 17-47) of treatment and had significantly higher peak viral loads (median 4,141 IU/ml, IQR 2,563-12,105) compared with those that spontaneously cleared ( $p < 0.001$ ; Figure 2A).

Of the 35 patients that reached an epithelial cell neutralizing titer of 480, 27 (77.1%) had no further replication episodes. The other 8 (22.9%) patients developed a total of 12 recurrent replication episodes, of which only 6 needed antiviral treatment (Figure 2B). The median peak viral load in patients with neutralizing antibodies titers  $\geq 480$  was significantly lower (1,129 IU/ml [IQR 533-2,354.1] vs. 4,176 IU/ml [IQR 1,575.9-16,198];  $p = 0.001$ ) and needed fewer days of treatment (22 days [IQR 20-32] vs. 38 days [IQR 23-53];  $p = 0.05$ ) compared with replication episodes that occurred in patients with neutralizing antibodies  $< 480$  (Table 2).

---

**Correlation between CMV-specific IgG levels and CMV infection.** Forty-four (93.6%) patients seroconverted early after transplantation at a median of 7 weeks (IQR 2-30.5) while the other 3 patients did not seroconvert during follow-up (Figure 2C). The increase in IgG levels did not correlate with the number of replication episodes (see Supplementary Figure 2). In addition, due to the variability in IgG levels, (range: 0.25 to 500 IU/ml) it was not possible to establish a cut-off value for protection from CMV infection (Figure 6).

**Incidence of CMV disease.** Four (8.5%) patients were diagnosed with CMV disease, at a median of 101 days (IQR 53-214 days) after transplantation with viral loads ranging from 1,556 to 118,728 IU/ml. At the onset of symptoms, none of the patients had epithelial cell neutralizing antibody titers >480 although, two (4.2%) of them had acquired T-cell immunity (Table 3). The patient diagnosed with typhlitis after acquiring a T-cell immune response did not complete the follow-up protocol. All four patients had positive outcomes.

**Patient outcomes.** Eleven (23.4%) patients had 12 episodes of acute rejection. Eleven (91.6%) of the episodes occurred in the period with neutralizing antibody titers <480 and 10 (83.3%) in the period without T-cell immunity (Table 2). One patient had a concomitant episode of CMV infection while the other 10 patients had later replication episodes a median of 14 days (IQR 7-42). None of the 3 deaths were related to CMV infection (1 biliary septic shock, 1 liver failure and 1 intestinal ischemia).

---

## Discussion

We analyzed the kinetics of acquisition of both humoral and cellular responses and their correlation with control of CMV infection in a cohort of SOTR at high risk (D+/R-) that received preemptive treatment for CMV infection. Although numerous studies have demonstrated the utility of assessing the CMV-specific T-cell immune response after transplantation to predict the risk of viral infection and late-onset disease in the posttransplant setting [3, 15, 22], other studies found no association between a T-cell response against pp65 or IE1 antigens and the prediction of CMV disease or viremia [23, 24]. In addition, no thresholds have been defined to apply these results in clinical practice. We previously demonstrated that preemptive therapy, in addition to allowing a reduction in treatment, was safe and effective for treating episodes of CMV infection after transplantation and for preventing CMV disease in SOT patients at high risk [2, 4]. Data presented here, from a larger cohort, confirm that preemptive treatment of CMV infection in patients at high risk promotes the acquisition of a CMV-specific T-cell response that correlated with protection from infection. However, there is still a minority of patients with an acquired CMV-specific T-cell response at risk for developing late-onset CMV disease, similarly to previously published results by Kumar *et al.* [3] ranging from 4-10%. These data suggest that either a higher cut-off may be necessary for defining a positive CMV-specific T-cell response to assure that it reliably predicts protection against CMV disease, or that alternate immune markers from other arms of the adaptive immune response (such as the level of neutralizing antibodies) should be considered.

We investigated the kinetics of CMV-specific IgG, and as previously reported we found a heterogeneous pattern of seroconversion in terms of CMV-specific IgG levels after transplantation [25], raising doubts about the clinical utility of this variable as an indicator of protection from CMV infection after transplantation. We also investigated the kinetic of CMV-specific neutralizing antibodies and one important novelty of the present study is that D+/R- SOT recipients at high risk for CMV infection develop *de novo* a wide range of neutralizing antibodies with differential activity in epithelial cells. Levels of epithelial cell neutralizing antibodies increased significantly after each replication episode and we were able to define a cut-off value of epithelial cell

---

neutralizing antibodies of  $\geq 480$  that correlates with decreased CMV infection, fewer days of treatment, and complete protection from CMV disease in patients with a CMV-specific T-cell response. This result suggests that antibodies neutralizing epithelial cell infection may have an important role in long-term protection. Our results also suggested that antibodies neutralizing fibroblasts had no clinical utility as indicators of protection from CMV infection after transplantation. To our knowledge, this is the first study showing a correlation between antibodies neutralizing epithelial cell infection and control of CMV infection in SOT patients at high risk for CMV infection. In immunocompetent individuals, antibodies targeting different epitopes of the pentameric complex gH/gL/pUL128-131a, required for infection of epithelial but not fibroblast cells [20, 26-28], were shown to control infection [29]. In addition, Gernini *et al.* observed an association between high levels of antibodies blocking *in vitro* CMV epithelial cell infection and a reduced risk of CMV congenital infection, suggesting that the CMV pentamer complex is a major target of antibody-mediated maternal immunity [10]. This study has some limitations. Due to the number of patients included, this should be considered as a pilot study that provides evidence that may be used to justify additional,

larger studies. In addition, since all patients in the study received preemptive treatment for CMV infection, the conclusions of this study may not be applicable to patients receiving other treatment regimens. In conclusion, although several studies have demonstrated that the CMV-specific T-cell response is associated with spontaneous clearance of CMV viremia, a small percentage of patients with a T-cell response are still at risk of developing late-onset CMV disease.

Our results indicate that quantification of epithelial cell neutralizing antibody titers, in addition to positive a T-cell response, may be useful as a marker to discriminate between patients who require close monitoring versus patients with lower risk for CMV disease. The combination of virologic and immunological monitoring of patients may also allow for more efficient administration of preemptive treatment in patients at high risk for CMV infection. However, larger prospective studies are needed to generate more evidences in this area.

### **Conflicts of Interest Statement**

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria [PI1101537] and Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases [REIPI 06/0008/0000]. A portion of this work was previously presented at the 25th ECCMID in Copenhagen.

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The authors thank other members of the laboratory and the staff members of the hospital whose collaboration was crucial to make this study possible. The authors thank David Navarro and Michael McConnell for critical reading of the manuscript.

---

**References**

1. Razonable R. Direct and indirect effects of cytomegalovirus: Can we prevent them? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; **28**: 1-5.
2. 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.
3. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009; **9**: 1214-1222.
4. BenMarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Gomez-Cia T, et al. First face composite tissue transplant recipient successfully treated for cytomegalovirus infection with preemptive valganciclovir treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; **55**: 5949-5951.
5. Gimenez E, Blanco-Lobo P, Munoz-Cobo B, et al. The role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting. *The Journal of General Virology*. 2015.
6. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England Journal of Medicine*. 2005; **353**: 1350-1362.
7. Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, et al. Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS One*. 2013; **8**: e59863.

- 
8. Bonaros N, Mayer B, Schachner T, Laufer G, Kocher A. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ 17 transplant recipients: A meta-analysis. *Clinical Transplantation*. 2008; **22**: 89-97.
  9. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *The Journal of General Virology*. 1995; **76 ( Pt 4)**: 741-750.
  10. Genini E, Percivalle E, Sarasini A, Revello MG, Baldanti F, Gerna G. Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *Journal of Clinical Virology*. 2011; **52**: 113-118.
  11. Wang D, Li F, Freed DC, et al. Quantitative analysis of neutralizing antibody response to human cytomegalovirus in natural infection. *Vaccine*. 2011; **29**: 9075-9080.
  12. Gerna G, Sarasini A, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *The Journal of General Virology*. 2008; **89**: 853-865.
  13. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2010; **10**: 1228-1237.
  14. Torre-Cisneros J. Toward the individualization of cytomegalovirus control after solid-organ transplantation: The importance of the "individual pathogenic balance". *Clinical Infectious Diseases*. 2009; **49**: 1167-1168.
  15. Manuel O, Husain S, Kumar D, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high risk solid-organ transplant recipients: A multicenter cohort study. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; **56**: 817-824.



- 
16. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation*. 2012; **93**: 195-200.
17. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; **34**: 1094-1097.
18. de la Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, et al. Gesitra-seimc/reipi recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant patients. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; **29**: 735-758.
19. 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.
20. Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *Journal of Virology*. 2005; **79**: 10330-10338. 21 Cui X, Meza BP, Adler SP, McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*. 2008; **26**: 5760-5766.
22. 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. *Transplant International*. 2010; **23**: 506-513.
23. La Rosa C, Limaye AP, Krishnan A, Longmate J, Diamond DJ. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver 19 transplant recipients at high risk for late cmv disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; **195**: 633-644.
24. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Clinical predictors of relapse after treatment of primary gastrointestinal cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2010; **10**: 157-161.

25. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2005; **5**: 1065-1070.
26. Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; **102**: 18153-18158.
27. Hahn G, Revello MG, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *Journal of Virology*. 2004; **78**: 10023-10033.
28. Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/ul128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *Journal of Virology*. 2008; **82**: 60-70.
29. Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, Gerna G. Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pul128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *Journal of Clinical Immunology*. 2012; **32**: 1324-1331.

**Table 1. Patient's clinical characteristics.**

<b>Parameter</b>	<b>Patients, n=47</b>
<b>Age, median (range), years</b>	48 (20-67)
<b>Sex, male, n (%)</b>	31 (66)
<b>Solid organ transplant, n (%)</b>	
Kidney	25 (53.2)
Liver	19 (40.4)
Heart	1
Kidney-Liver	1
Face-composite	1
<b>Immunosuppressive regimen</b>	
<b>Induction therapy, n (%)</b>	
None	30 (63.8)
Basilixumab	13 (27.7)
Daclizumab	4 (8.5)
<b>Maintenance therapy, n (%)</b>	
Tac/Pred/MMF	34 (72.3)
CsA/Pred/MMF	9 (19.1)
Pred/Tac	4 (8.5)

Table 2. CMV replication episodes and patient outcomes.

	AbNEI<480	AbNEI<480	p-value	Pre immunity	T-cell Post immunity	T-cell p-value	Total
<b>N episodes (%)</b>	103 (89.6)	12 (10.4)	<0.001	73 (63.5)	42 (36.5)	0.004	115
<b>N episodes per patient, median (IQR)</b>	2 (2-3)	0	<0.001	2 (1-2)	1 (0-2)	0.012	3 (2-3)
<b>Primary infection, episodes (%)</b>	44 (100)	0	-	43 (97.7)	1 (2.3)	<0.001	44
<b>Recurrent infection, episodes (%)</b>	59 (83.1)	12 (16.9)	<0.001	30 (42.3)	41 (57.7)	0.239	71
<b>Duration of viremia, median days (IQR)</b>	27 (16-36)	17 (7-27)	0.109	28 (17-39)	23 (10-35)	0.095	26 (15-35)
<b>Peak viral load, median UI/ml (IQR)</b>	4,176 (1,575-16,198)	1,129 (533-2,354)	0.001	5,293 (1,820-16,983)	2318 (1,129-5,481)	0.01	3,753 (1,429-13,923)
<b>Duration treatment, median days (IQR)</b>	38 (23-53)	22 (20-32)	0.05	39 (23-53)	28 (16-47)	0.133	28 (6-47)
<b>N episodes of acute rejection</b>	11 (91.6)	1 (8.4)	0.007	10 ( 83.3)	2 (16.7)	0.035	12
<b>Death</b>	2 (66.6)	1(33.4)	0.564	2 (66.6)	1(33.4)	0.564	3

**Table 3. Clinical, immunological, virological characteristics and outcomes of cases of CMV disease.**

CMV disease	Organ	Time from transplantation (days)	VL (IU/ml)	Clearance of viremia after treatment (days)	T-cell immunity	%CD8+CD69+ IFN $\gamma$ +	AbNEI	IgG (IU/ml)	Outcome
Typhlitis	Kidney	252	12,179	23	Positive	0.3%	320	0.95	Cured
Gastritis	Liver	38	2,601	24	Negative	<0.25%	80	5.64	Cured
Viral Syndrome	Liver	103	118,728	5	Positive	0.9%	10	3.75	Cured
Viral Syndrome	Liver	99	1,556	25	Negative	<0.25%	40	15.4	Cured

NOTES: VL. Viral load; AbNEI: Antibodies neutralizing epithelial cell infection.

Figure 1

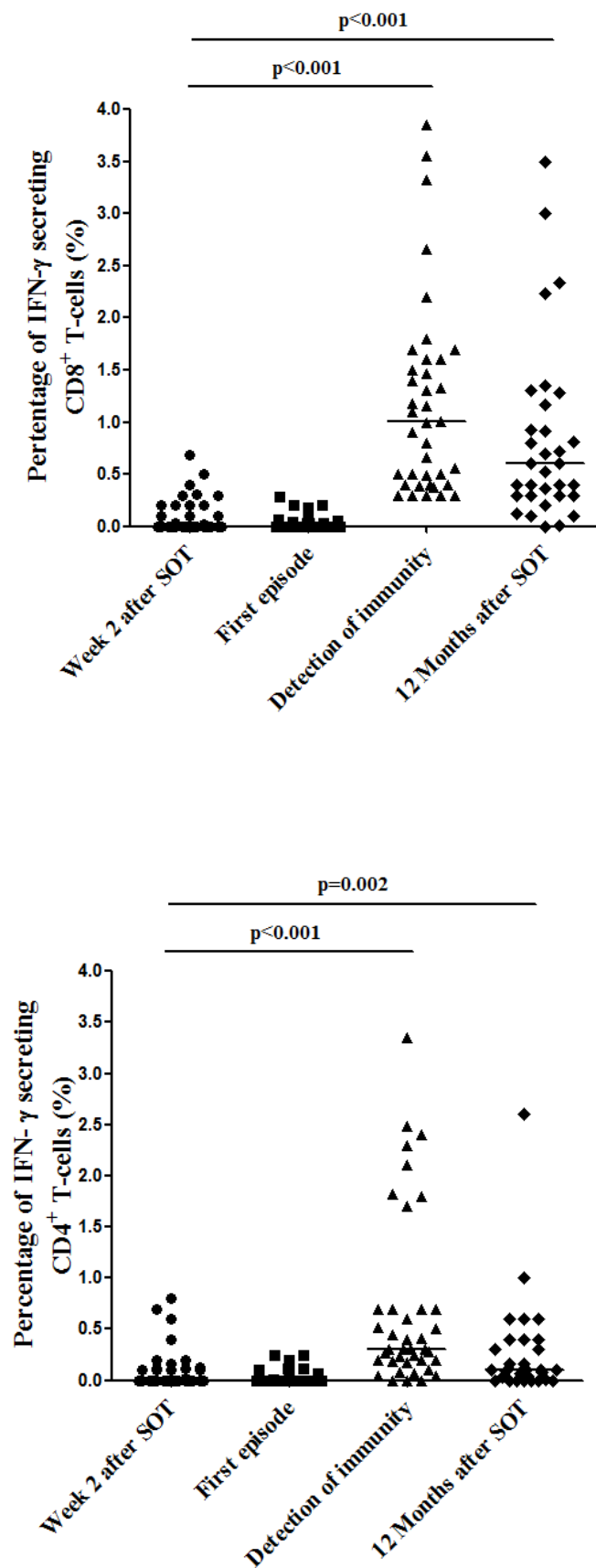
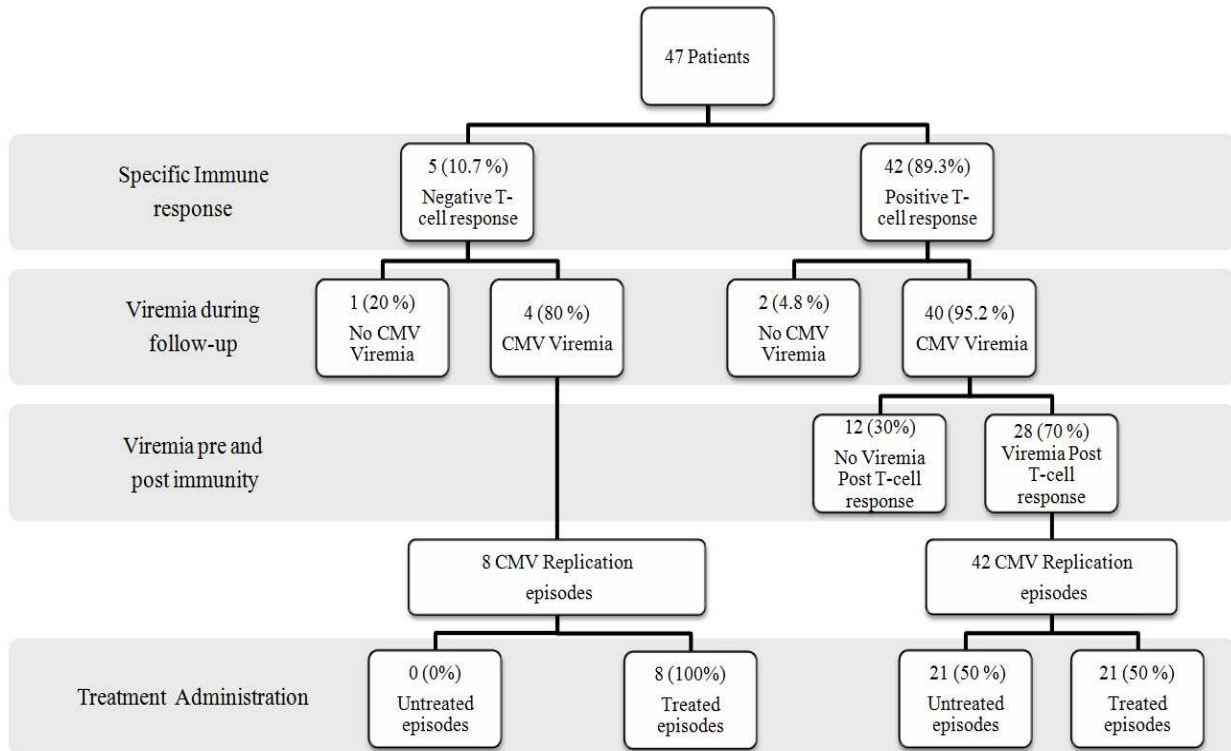
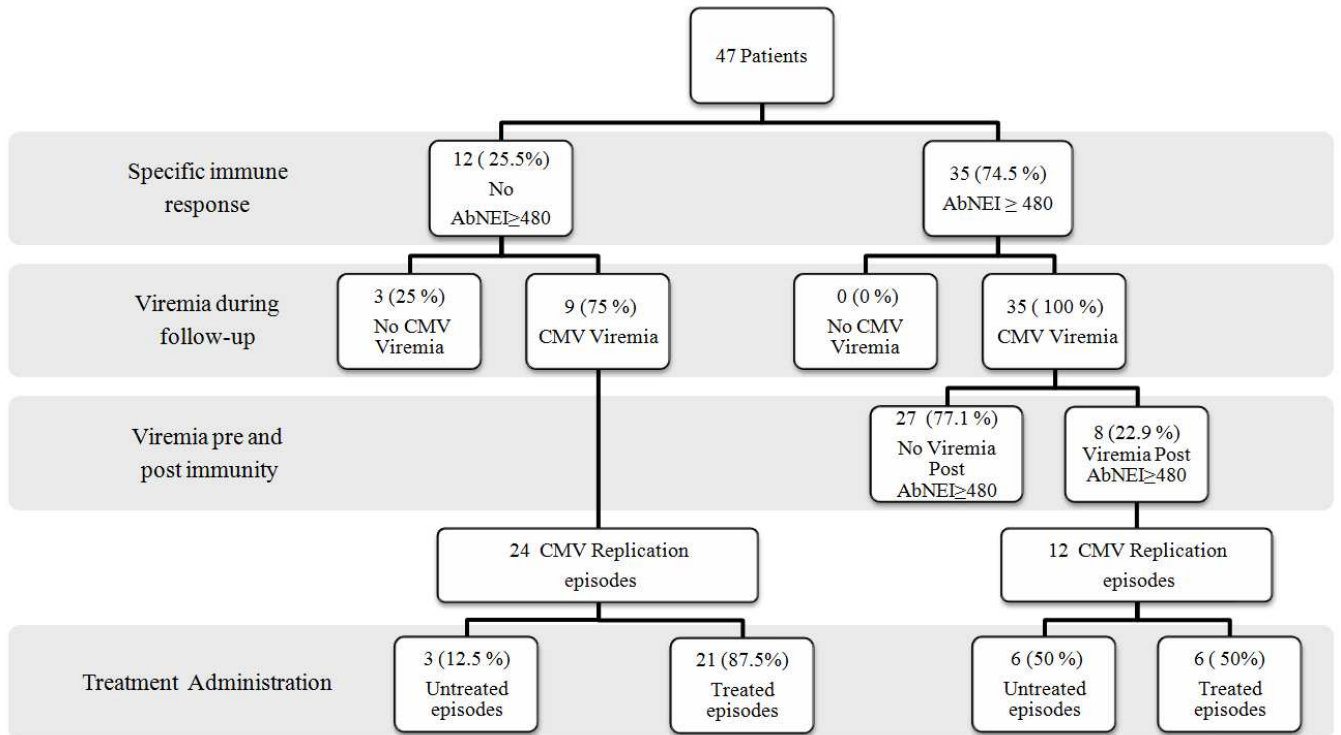


Figure 2

A



**B**





C

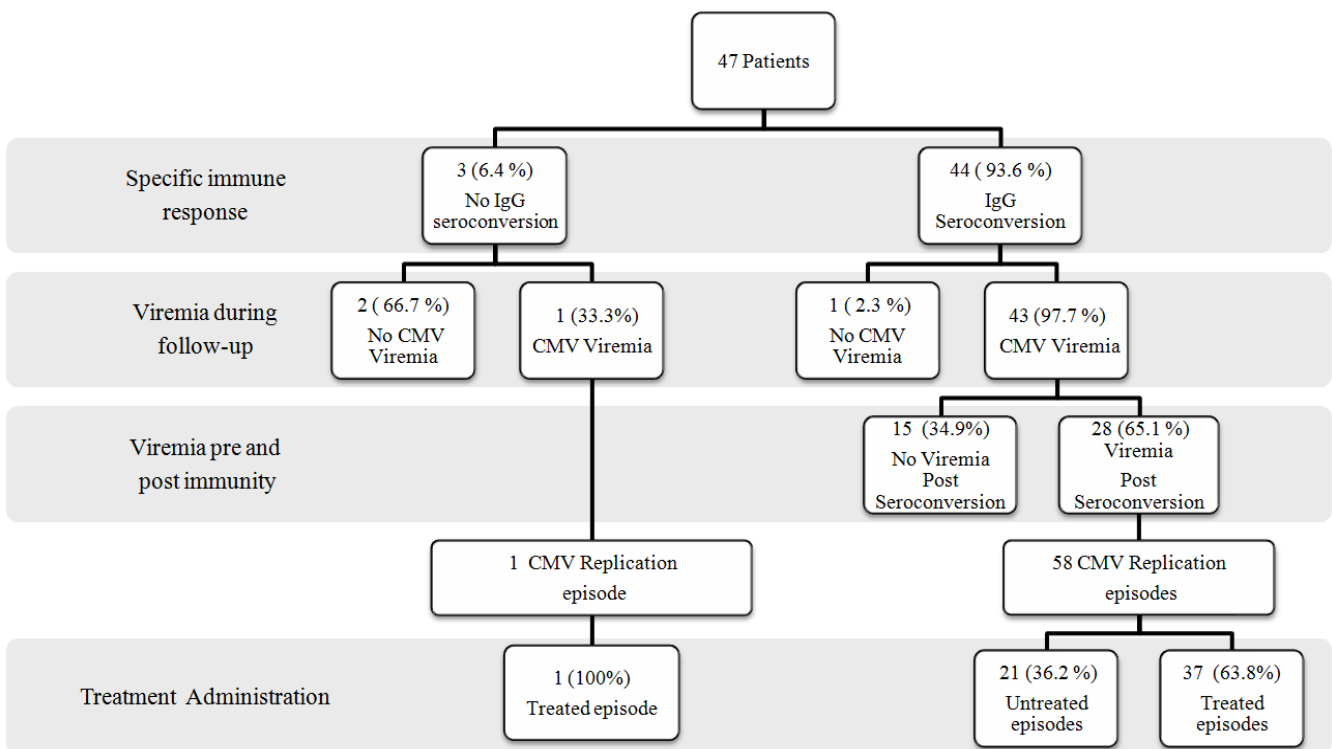


Figure 3

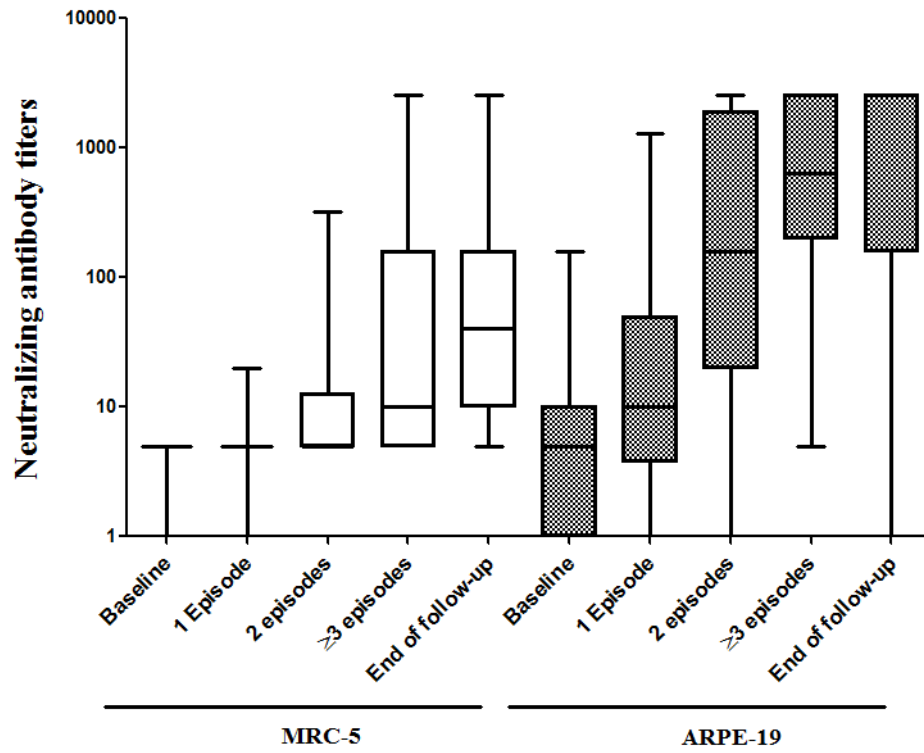
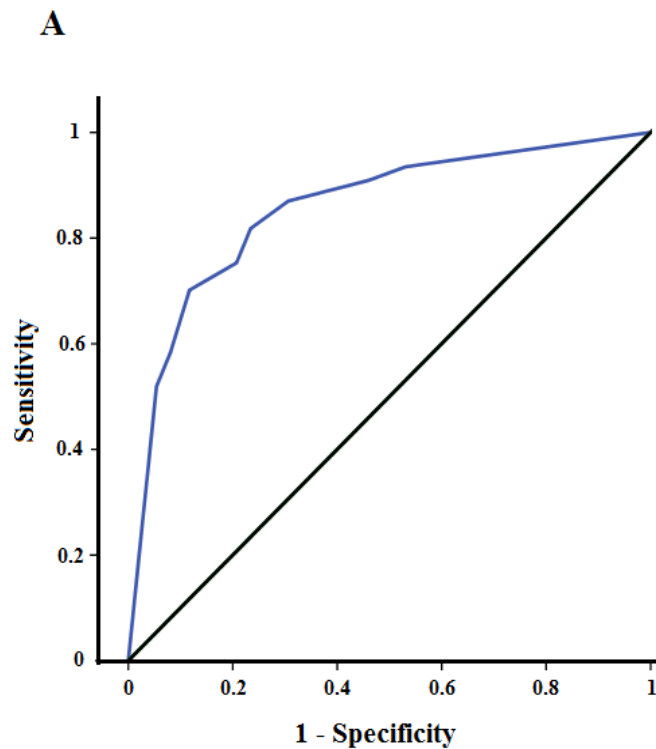


Figure 4

**B**

AbNEI Titer	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
>2,560	0	100	-	59
1,920	51.9	94.5	86.9	73.9
960	58.4	91.8	83.3	76.1
480	70.1	88.2	80.5	80.9
240	72.7	83.7	75.6	81.5
120	75.3	79.2	71.6	82.2
60	81.8	76.2	70.7	85.8
30	87	69.3	66.3	88.5
15	90.9	54.0	57.8	89.5
7.5	93.5	46.8	54.9	91.2
<5	100	0	40.9	-

Figure 5

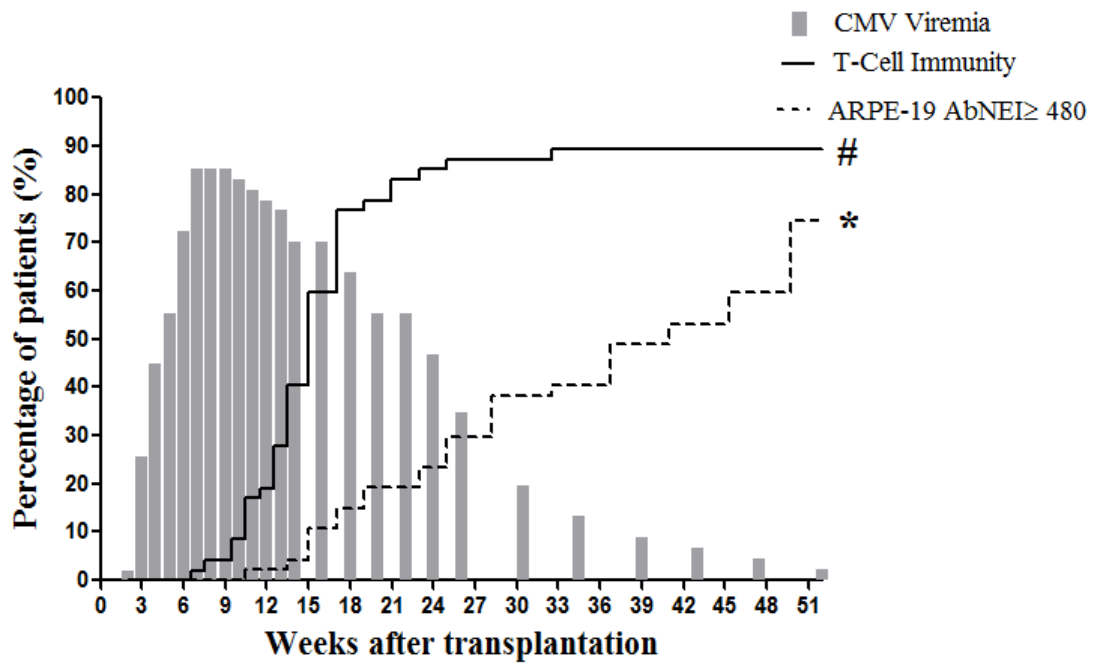
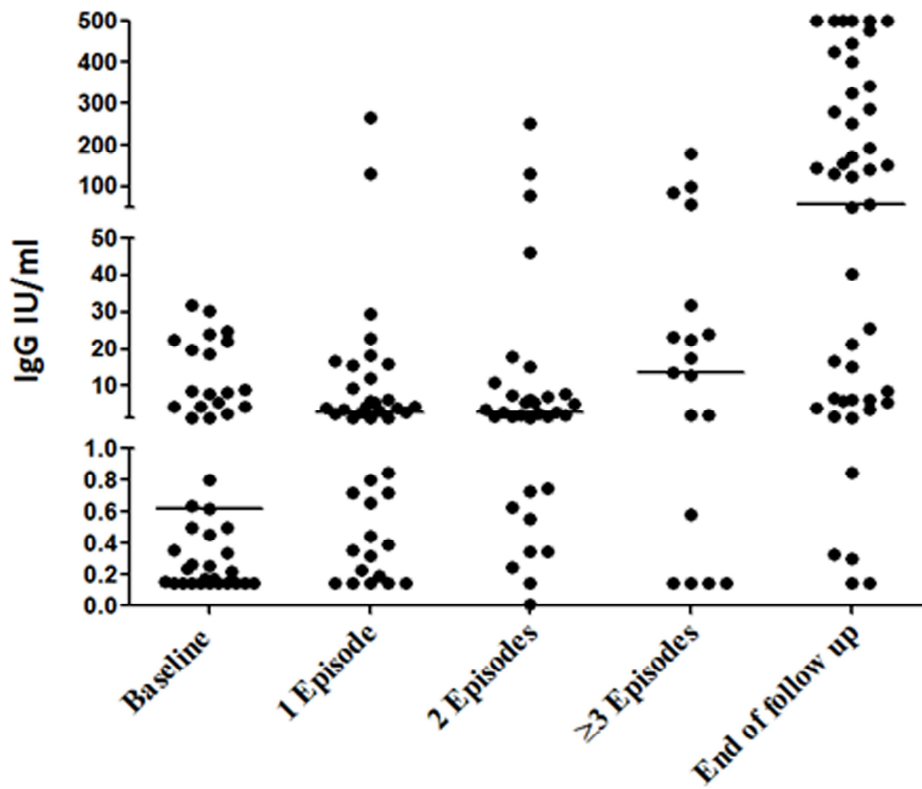


Figure 6



---

**Figure legends**

**Figure 1. Kinetics of the CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells.** The CMV-specific T-cell response was evaluated by detecting intracellular secretion of IFN- $\gamma$  at the indicated times after transplantation in CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T-cells by flow cytometry. Percentages of CD8<sup>+</sup> T cells (A) and CD4<sup>+</sup> T cells (B) expressing IFN- $\gamma$  from each patient are represented at week 2 after transplantation, after the first episode of replication, at the time of the cell-immunity acquisition and at the end of follow-up. Percentages were calculated referring to the total number of CD3-positive cells analyzed and normalized to the unstimulated control. The black line represents median values. Percentages were compared by Wilcoxon rank sum test and  $p < 0.05$  were considered significantly different.

**Figure 2. Study flow chart.** Patients were divided into two groups according to: A) the acquisition of CMV-specific T-cell response, B) the development of AbNEI titers  $>480$  and C) the seroconversion (CMV-specific IgG levels  $>1\text{IU/mL}$ ). For each group we describe the number of patients with viremia during the follow-up, the number of patients with viremia pre and post-immunity and the number of CMV replication episodes that required treatment.

**Figure 3. Kinetics of the CMV-specific neutralizing antibodies.** Box and whisker plot showing the evolution of neutralizing antibody titers measured in fibroblast (MRC-5) and epithelial cells (ARPE-19) from baseline to the end of the follow-up and after each replication episode. Box plots show median levels of antibody titer (solid horizontal line), 25th to 50th percentile (box outline) and minimum and maximum observation (whiskers). The increase of antibody neutralizing fibroblast infection titer did not depend on the number of replication episodes. However, antibody neutralizing epithelial infection titer increased significantly from the first to the second episode of CMV replication from a median titer of 10 to 160 ( $p < 0.001$ ), as well as from the second replication episode to the end of the follow-up period from a median titer of 160 to 2,560 ( $p < 0.001$ ). AbNEI: Epithelial cell neutralizing antibodies.

**Figure 4. Receiver-operator curve.** A) Relationship between the sensitivity and specificity of different antibody fibroblast cell neutralizing titers for determining protection from CMV replication. The black line represents values for a test that is unable to

discriminate positive and negative samples. B) Percentage values of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) for different titer values of antibodies neutralizing epithelial infection (AbNEI).

**Figure 5. CMV replication and specific immune response kinetics.** Evolution during the first year after transplantation of the incidence of CMV infection measured by polymerase chain reaction (grey bars), the acquisition of a CMV-specific T-cell response detected by intracellular cytokine staining using flow cytometry (continuous black line), and the acquisition of epithelial cell neutralizing titers (AbNEI)  $\geq 480$  determined through microneutralization assay (discontinuous black line). The correlation between the acquisition of a CMV-specific immune response and the decrease in the incidence of CMV viral load was compared by the Pearson correlation test # Linear regression  $r^2$  0.743, Pearson correlation 0.862;  $p < 0.001$ ; \* Linear regression  $r^2$  0.951, Pearson correlation 0.975;  $p < 0.001$ .

**Figure 6. Kinetics of CMV-specific IgG antibodies.** Evolution of IgG levels measured at baseline, at the end of the follow-up and after each replication episode. The levels of IgG (IU/ml) from each patient (black circle) are represented at the different time points. Although IgG levels tended to increase from baseline to the end of follow-up (median of 0.63 IU/ml vs. 132.3 IU/ml,  $p < 0.001$ ), no differences were found comparing median IgG levels at baseline with median values after the first (0.63 IU/ml vs. 2.4 IU/ml,  $p = 0.72$ ), second (0.63 IU/ml vs. 2.6 IU/ml,  $p = 0.61$ ) or more than three replication episodes (0.63 IU/ml vs. 13.5 IU/ml,  $p = 0.1$ ). Black line represents median values. Percentages were compared by Wilcoxon rank sum test and  $p < 0.05$  were considered significantly different.

**Artículo 2. Enviado a *Drug Discovery Today***

***Applying Lessons Learned from Cytomegalovirus Infection in Transplant Patients to Vaccine Design***

Pilar Blanco-Lobo<sup>1\*</sup>, Angel Bulnes-Ramos<sup>1\*</sup>, Michael J. McConnell<sup>1</sup>, David Navarro<sup>2</sup>,  
3, Pilar Pérez-Romero<sup>1</sup>

1. Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine Unit.

2. Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Fundación INCLIVA, Valencia, Spain.

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

\*These authors contributed equally to this work.

**Key words:** Cytomegalovirus; Vaccine design; CMV-specific immune response; Transplant recipients

**Corresponding author:** Pérez-Romero P. (mperez-ibis@us.es); Telephone: +34 955923100

**Teaser:** The wealth of information that has emerged from recent studies aiming to characterize the immune response to cytomegalovirus infection in transplant patients has provided insights that can be used to guide vaccine design and development.



**Abstract**

Studies in transplant recipients over the last decade aiming to characterize the immune response to CMV replication have provided insights that can be used to guide CMV vaccine development. These studies have characterized multiple aspects of the immune response to virus infection in humans, and have identified immunological variables that correlate with the ability to control virus replication. These findings can be used to guide vaccine development by informing decisions regarding antigen selection and the type of immune response that must be elicited by these antigens in order to promote protective immunity. In addition, these studies have provided information that may aid in the identification of immunological endpoints in vaccine clinical trials, thus facilitating their design and implementation.

Cytomegalovirus continues to be a significant cause of morbidity in a number of at-risk populations, most notably in newborns and in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. For this reason, the U.S. Institute of Medicine has identified the development of a vaccine for the prevention of CMV disease as a public health priority [1]. Unfortunately however, no vaccine for CMV has yet been approved for use in humans despite multiple clinical trials evaluating diverse vaccine candidates, although a small number of recent trials have given promising results [2, 3]. The results obtained with these candidates during both pre-clinical and clinical testing have highlighted a number of challenges associated with CMV vaccine development including, a lack of animal models for studying human CMV infection that mimic human disease, poorly-defined correlates of protective immunity, and the identification of appropriate endpoints during clinical trial design and implementation. In this context, data from recent studies characterizing CMV infection in patients undergoing solid organ and hematopoietic stem cell transplantation have yielded information regarding the immune response during active CMV infection and subsequent immune control of virus replication that may be used to address challenges related to vaccine development. Due to the necessity of administering potent immunosuppressive therapies, CMV disease continues to affect a significant percentage of transplant recipients during the post-transplant period. Over the last decade, multiple studies have aimed to characterize the immunological variables that correlate with the prevention of CMV disease in these patients. These studies have produced vast amounts of information regarding effectors of both the cellular and humoral responses that contribute to controlling CMV replication, and have been used to successfully guide post-transplantation antiviral therapy [4]. In the present review, we synthesize the results of recent studies that have characterized the immune response to CMV infection during the post-transplant period, highlight the findings of recent clinical trials characterizing CMV vaccine candidates in transplant patients, and discuss the implications of these studies in the context of current and future efforts aimed at the design and development of vaccines for the prevention of CMV disease.

---

## The immune response to CMV infection in transplant patients

In transplant patients, CMV may cause the so-called CMV syndrome, which manifests as fever and/or malaise, leukopenia or thrombocytopenia, and end-organ disease, all of which are related to viral cytopathogenicity. Persistent or intermittent CMV replication has been causally linked to the development of acute or chronic allograft dysfunction or rejection, and the occurrence of bacterial or fungal superinfection or Epstein–Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disease [5]. These indirect effects are thought to be related to the immunosuppressive and pro-inflammatory properties of CMV. Control of CMV infection in normal hosts and in the transplant recipient depends upon a complex, yet not fully elucidated, interplay between innate and adaptive immune mechanisms (Figure 1). It has long been known that functional effector CMV-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T cells are crucial for resolution of CMV replication episodes [6, 7]. Upon activation, CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells produce and secrete cytokines with antiviral activity and become fully competent for lysing CMV-infected cells. Expansion of functional CMV-specific CD4<sup>+</sup> T cells is imperative for maintenance of functional CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells [8]. In addition they appear to be capable of mediating cytolysis of infected cells in an HLA-II background [9]. In this context, there is increasing evidence suggesting that CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells displaying multiple effector functions (polyfunctional) are more relevant than monofunctional T cells in controlling CMV infection [10-14]. The role of regulatory T cells (Tregs; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), which primarily function through the release of inhibitory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ , in modulating CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell functions is being increasingly recognized, although remains poorly characterized.

The role of CMV-specific antibodies displaying antiviral activity (i.e. neutralizing free virions or preventing virus cell-to-cell spread) in preventing primary infection has been clearly demonstrated. Specifically, antibodies against neutralization epitopes of the complex gH–gL–pUL131A–pUL130–pUL128, which has been shown to be required for infection of endothelial, epithelial and myeloid cells [15-18] have been shown to correlate with virus control in immunocompetent individuals [19] and protection from fetal CMV transmission [20]. Nevertheless, in the Allo-SCT setting it was recently shown that both baseline and peak neutralizing titres were not predictive of the dynamics of CMV replication within episodes, and did not appear to provide protection against the

development of viremia [13]. Nevertheless, the role of CMV specific neutralizing antibodies, if any, in the prevention of CMV reactivation or in the control of CMV viremia in the transplantation setting remains to be conclusively established.

### **CMV antigens involved in the antiviral immune response**

The CMV genome is approximately 235 Kb in size and contains more than 165 predicted open reading frames [21]. For this reason, detailed information regarding the immune response to individual proteins and their correlation with suppressed viral replication is available for only a small subset of antigens. As mentioned above, the presence of CMV-specific T cells in peripheral blood correlates strongly with fewer viral replication episodes and significantly lower peak viral loads during the post transplantation period (Figure 2), with multiple studies indicating a critical role for both CD4+ and CD8+ T cells in limiting viral replication and preventing clinical disease [4, 22]. The majority of these studies have employed the viral antigens UL123 (immediate early protein 1; IE1), a regulator of viral gene expression, and UL83 (phosphoprotein 65; pp65), a matrix protein, as markers for measuring cellular immunity. IE1 and pp65 are highly expressed during viral infection [23], and a robust T cell response is elicited against both proteins during viral replication episodes that occur in the post-transplant period [23-27]. Multiple studies have demonstrated that increased levels of IE1- and pp65-specific T cells correlate with the control of virus replication in the absence of antiviral therapy, suggesting that increased cellular immunity plays a role in limiting infection [4, 28, 29]. In three different studies with SOTR at high risk for CMV infection that received preemptive treatment, acquisition of IE1- and pp65-specific CD8+ T cells expressing IFN- $\gamma$  inversely correlated with the incidence of CMV replication in addition to spontaneous clearance of 97.8%-100% of replications episodes that occurred after the detection of a CMV-specific immune response [4, 28, 29].

Adequate reconstitution of IE1- and pp65-specific CD8+ T cells expressing IFN- $\gamma$  within the first months after transplantation has also been suggested to be a marker for predicting improved clinical outcomes, including survival [30]. A handful of studies have provided some information regarding the cell mediated response to other viral antigens in addition to IE1 and pp65, although there is little data characterizing how the response to these antigens correlates with the suppression of viral replication. In a recent study, overlapping 15-mer

peptides from all predicted CMV open reading frames were used to stimulate lymphocytes from a large cohort of HLA-disparate, CMV-seropositive subjects. Quantification of antigen specific T cell frequencies indicated that pp28, pp50, gH, gB, US2,US3, US6, UL18 UL55, UL83, UL86, UL99, UL153 and UL32, in addition to IE1 and pp65, stimulated robust responses [22]. Interestingly, it was also demonstrated that antigen specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were directed against more than 70% of viral open reading frames, indicating that a broad cell mediated response is elicited during active CMV infection [22]. Separate studies in which the T cell response to different viral antigens in healthy, CMV seropositive individuals (individuals with detectable levels of pp65-specific IgG) demonstrated the presence of antigen-specific T cells for gH, gB, IMP, proteins US6-US11, pp28, pp150, IE2, and UL69 [31, 32]. These findings, together with data from studies indicating that the proportion of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in healthy, seropositive individuals is approximately 10% [33, 34]), suggest once again that the cell-mediated response to CMV infection is broad and robust. Although CMV infection elicits a strong humoral response, it is not as well characterized as the cell-mediated response with respect to its role in suppressing viral replication.

During the 1980's and 90's, a number of studies using recombinant viral antigens identified antibodies against CMV in human sera from different clinical settings [35-39], indicating that multiple viral proteins elicit an antibody response. Most nonstructural proteins, such as the immediate early proteins (IE1 and IE2), the DNA binding protein pUL57 and the DNA polymerase (UL54) elicit a weaker humoral response compared with other structural antigens [40-42]. Among tegument proteins, pp28 (UL99), pp38 (UL80a), and specially pp65 (UL83) and pp150 (UL32) have been identified as the most immunogenic [35, 43-45]. The phosphoproteins pp65 and pp150 are highly reactive to both IgG and IgM after primary infection and are recognized by nearly 100% of sera samples from CMV-seropositive subjects [36, 43, 46]. However, neither of these proteins induce antibodies that are able to neutralize infection, and their physiological function during CMV natural infection is not clear [47].

Antibodies able to neutralize CMV infection have mostly been evaluated using *in vitro* models employing fibroblast cell lines, although it is important to note that epithelial and endothelial cells are the first physiologic barrier encountered by CMV during natural infection [48]. The envelope glycoproteins gB (UL55) and gH (UL75) elicit a strong

neutralizing antibody response, and they have been detected in 100% of serum samples in naturally infected individuals [45, 49, 50]. Furthermore, glycoprotein complexes that elicit a neutralizing antibody response during natural infection consisted of gH/gO/gL (UL75/UL74/UL115) and gN /gM (UL73/UL100). Glycoprotein M is of particular interest because it represents the most abundant glycoprotein in the viral envelope [51, 52]. Importantly, in hematopoietic stem cell transplant recipients, titers of antibodies neutralizing fibroblast infection were not associated with the absence of detectable active infection or survival in patients with CMV disease [53, 54]. Recently, renewed interest in studying the role of neutralizing antibodies has come from two findings; the first is that a beneficial effect with respect to CMV infection was observed in transplanted patients after the administration of CMV-specific hyperimmune globulin [55], and secondly, it has been demonstrated that the most potent neutralizing antibodies are directed against epitopes of the pentameric complex consisting of gH/gL/pUL128-130-131 [56]. The pentameric complex has been shown to be necessary for in vitro infection of epithelial and endothelial cells, but not fibroblasts [57, 58]. The in vivo activity of neutralizing antibodies directed against the pentameric complex was demonstrated in a study performed in pregnant woman showing that non transmitting mothers had higher antibody titers and controlled viral infection more rapidly [20]. Taken together, both in vitro and clinical studies suggest that antibodies directed against certain viral antigens can play a role in controlling virus dissemination and replication.

### **Vaccine clinical trials in transplant patients**

Three phase II clinical trials with different vaccine candidates have been carried out in transplant recipient populations. A study that included 177 seronegative kidney transplant recipients for evaluating the ability of a whole virus vaccine employing the attenuated Towne strain was carried out in the 1980's. Vaccination did not result in a significant reduction in infection rates compared to placebo, however disease severity was attenuated in those receiving the vaccine [59]. Analysis of the immune response in immunized individuals demonstrated that the vaccine did not generate high levels of antibodies able to neutralize viral infection [60]. A second vaccine based on recombinant gB formulated with the adjuvant MF59 was evaluated for its ability to prevent CMV-induced end organ disease in liver and kidney transplant patients. Low frequencies of end organ disease were detected

in both study arms, requiring that blood levels of viral DNA and levels of anti-gB antibodies be included evaluated in order to characterize vaccine efficacy. The study demonstrated that vaccinated and placebo patients experienced similar rates of viremia, although increased anti-gB antibody titers correlated with a decreased duration of viremia [2]. The third vaccine that has been evaluated in transplant recipients consists of plasmid DNA encoding the two viral antigens gB and pp65, based on the idea that gB specific antibodies may be effective in neutralizing viral infection whereas a cell-mediated response may be effective in suppressing viral replication. The ability of the vaccine to decrease viral replication episodes in seropositive bone marrow transplant recipients during the first year after transplantation was evaluated [3]. The results of the study demonstrated that vaccinated participants experienced fewer and shorter replication episodes, and that viremia-free periods were significantly longer compared to the placebo group [3]. Importantly, characterization of the cellular and humoral response elicited by vaccination with the bivalent vaccine indicated that only low levels of antigen specific antibodies and T cells were elicited against gB, suggesting that the observed protective effect was primarily due to the cellular response elicited against the pp65 antigen [3]. Taken together, the results of these clinical trials provide compelling evidence suggesting that CMV vaccination can have protective effects in both seropositive and seronegative transplant recipients. These studies also highlight the difficulties associated with the clinical evaluation of CMV vaccines with respect to the selection of appropriate trial endpoints and the need for identifying appropriate immune correlates of protection that can be measured during these studies in order to adequately evaluate vaccine efficacy. In addition, the results of these trials may also suggest that the evaluation of additional viral antigens for inclusion of vaccines may lead to more robust immune responses that increase the protective effects of vaccination.

### **Implications for vaccine design**

Information gained from studies characterizing the immune response to CMV infection in transplant recipients may be useful for guiding vaccine design and development efforts for a number of reasons. Perhaps the most obvious positive aspect associated with using data from these studies is that they provide information regarding the immune response to CMV infection in humans. Vaccine development often requires the extensive use of data

generated in animal models for identifying candidate antigens and evaluating their ability to provide protective immunity. The extent to which vaccines based on these antigens will behave similarly in humans often remains unknown until the completion of early stage clinical trials, which are typically performed only after considerable time and financial resources have been invested in a vaccine candidate. In addition, due to the fact that transplant recipients represent one of the target populations for CMV vaccination, data regarding components of the antiviral immune response that correlate with protective immunity in this population may be of special value. It is important to note, however, that these studies do have limitations. Due to the fact that these studies are often observational, in many cases they yield data describing correlations between immune variables and virus replication, and therefore do not provide mechanistic information regarding immune control of virus replication. A second important consideration is the immune status of the patients included in studies evaluating the immune response to CMV infection during the post-transplant period. Since these patients are being monitored in the context of potent immunosuppressive therapy, the results obtained from these studies may not be directly transferable to healthy, immune competent individuals.

The components of the immune system that must be stimulated in order to achieve protective immunity against CMV, specifically the type of immune response that must be elicited and the antigens targeted by this response, have not been well defined. The type of immune response required for disease prevention may depend upon the disease type and the target population, given suggestions that antibodies may be more effective at preventing primary infection whereas a cell mediated response may be more effective at suppressing viral replication in previously infected individuals [61]. Studies characterizing immune control of CMV replication in seropositive transplant recipients during the post-transplant period support this idea given data from multiple studies showing that the acquisition of CMV-specific cell mediated immunity has protective effects [23-26, 31]. It is important to note that the majority of studies identifying a correlation between cellular immunity and suppressed viral replication quantified frequencies of IE1- and pp65-specific T cells in peripheral blood. These findings should not be interpreted as meaning that these two antigens are the most suitable for vaccine design, although they may contribute to a protective response. In these studies the cellular response to IE1 and pp65 were used as markers, whereas the frequencies of circulating T cells specific for other viral antigens were not characterized. Thus, while these data strongly suggest that the



stimulation of cell mediated immunity would likely be a desirable characteristic of vaccines for use transplant patients, which viral antigens elicit the most effective cellular response is a topic that remains to be fully studied. Studies in transplant patients have provided somewhat less information regarding the potential role of vaccine induced antibodies in preventing infection and suppressing viral replication. The phase II clinical trial with the MF59-adjuvanted gB vaccine demonstrating a correlation between anti-gB antibody titers and reduced duration of virus replication episodes suggests that virus specific antibodies may contribute to protective immunity. However, the finding that the presence of antibodies able to neutralize fibroblast infection did not correlate with reduced infection rates or survival in hematopoietic stem cell transplant recipients [13], together with the results of two of the vaccine trials described in the previous section indicating that some benefits were observed in the absence of a strong humoral response may suggest that a cellular response alone provides some protective effects. As with the cell-mediated response, relatively few antigens have been characterized with respect to their ability to induce antibodies capable of neutralizing virus infection. It is therefore possible that antibodies against other antigens or antigen complexes may more effectively prevent infection and/or suppress viral replication. The recent characterization of the potent neutralizing activity of antibodies directed against the gH/gL/pUL128-130-131 pentameric complex in both experimental and clinical studies supports this idea [15-17, 62].

Clinical trials evaluating the efficacy of CMV vaccines have employed endpoints that can be difficult to measure for multiple reasons. Disease-based endpoints, such as end organ disease in transplant patients or sensorineural hearing loss in children, can be difficult to measure due to low disease incidence or the necessity for long follow up periods [61]. Infection-based endpoints, such as CMV viral load, can be more readily measured, but require that numerous samples are characterized in order to detect the presence of viral DNA. In this context, the identification of immunological correlates of protection that a vaccine candidate must achieve in order to be considered effective is desirable. A number of studies characterizing viral replication and the acquisition of cell-mediated immunity during the post-transplant period have identified cut off values for the frequency of virus specific T cells that correlate with the ability to suppress virus replication in the absence of antiviral therapy. A study by Gerna et al. 2011 described that a high frequency of CMV-specific T-cells ( $>0.4$  cells/ $\mu$ l) conferred protection from CMV disease in SOTR at low

---

risk, while Benmarzouk-Hidalgo et al. defined a cut-off value of 0.25% of CD8+-IFN-g T cells that correlated with spontaneous clearance of infection [4, 63]. These studies may thus provide information that can be used to identify rational immune correlates of protection that can serve as endpoints in clinical studies.

### **Using novel technologies for antigen identification**

Only a small subset of predicted CMV open reading frames have been evaluated as potential vaccine candidates in preclinical and clinical studies, raising the possibility that antigens that have yet to be characterized could stimulate protective cellular and/or humoral immune responses. Due to the large number of predicted open reading frames in the CMV genome, a detailed characterization of the immune response elicited by all individual protein antigens would be costly and time consuming. In this context, the use of emerging genomic, transcriptomic and proteomic technologies may be useful for identifying viral antigens that have desirable characteristics for vaccine design (Figure 3). Transcriptomic techniques, for example, can be used to identify viral genes that are highly expressed during infection of different cell types, as evidenced by recent studies employing RNA-Seq to characterize global transcriptomes for both human and murine CMV during infection [64, 65]. These highly expressed gene products may be of interest for vaccine development as antigens for stimulating a cell-mediated response targeting virus infected cells. The idea that highly expressed genes may be of interest for development as antigens is supported by transcriptomic studies employing microarrays that have demonstrated that the genes encoding IE1 and pp65, both of which induce a cell-mediated immune response with correlates with the ability to control virus replication [4, 30, 63, 66], are highly expressed during infection [67].

Proteomic techniques also hold potential for identifying antigens of interest for vaccine development. Mass spectrometry-based analyses of virus particles have not only identified the virus proteins associated with infectious particles, but have also provided quantitative information regarding the relative abundance of each protein in virion [68].

These findings may facilitate the identification of antigens that produce an antibody response aimed at neutralizing virus infection. As these examples demonstrate, emerging “omics” technologies may have a role in identifying high value antigens for vaccine design.

## **Conclusions**

The morbidity that continues to be caused by CMV infection in multiple patient populations clearly demonstrates the potential clinical benefit that vaccination could afford. As described above, CMV vaccine development programs face a number of challenges during both pre-clinical and clinical development stages. In this context, the wealth of information that has emerged from recent studies aiming to characterize the immune response to virus replication in transplant patients has provided insights that can be used to respond to these challenges. Most importantly, these studies have characterized multiple aspects of the immune response to virus infection in humans, and have identified immunological variables that correlate with the ability to control virus replication. These findings can be used to guide vaccine development by informing decisions regarding antigens selection and the type of immune response that must be elicited by these antigens in order to promote protective effects. In addition, these studies have provided information that may facilitate the identification of immunological endpoints in vaccine clinical trials, thus facilitating their design and implementation. In summary, CMV infection in transplant patients provides a unique “model system” for studying the viral immunity and will likely continue to provide information that can be applied to vaccine design.

### **Acknowledgements**

This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III - co-financed by European's Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008/0000). MJM is supported by the Subprograma Miguel Servet from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP05/0226). PPR is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (CP11/00314) co-financed by the Programa Nicolás Monardes (S-C020) Servicio Andaluz de Salud, Junta de Andalucía.

### **Conflicts of interest**

Authors declare no conflict of interest related to this work.

---

**References**

1. Stratton K. R., D.J.S., Lawrence R. S., ed. Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking. (Washington (DC) 2000).
2. Griffiths, P.D., et al., Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. 2011. *Lancet*. 377(9773): p. 1256-63.
3. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2012. 12(4): p.290-9.
4. Benmarzouk-Hidalgo, O.J., et al., Therapeutic effect of the acquisition of cytomegalovirus-specific immune response during preemptive treatment. *Transplantation*. 2011. 91(8): p. 927-33.
5. Fishman, J.A., Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*, 2007. 357(25): p. 2601-14.
6. Quinnan, G.V., Jr., et al., Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLArestricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*, 1982. 307(1): p. 7-13.
7. Riddell, S.R., et al., Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 1992. 257(5067): p. 238-41.
8. Einsele, H., et al., Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 2002. 99(11): p.3916-22.

- 
9. Appay, V., et al., Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol*, 2002. 168(11): p. 5954-8.
  10. Zhou, W., et al., Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*, 2009. 113(25): p. 6465-76.
  11. Lacey, S.F., et al., Simultaneous reconstitution of multiple cytomegalovirus-specific CD8+ cell populations with divergent functionality in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J Infect Dis*, 2005. 191(6): p. 977-84.
  12. Snyder, L.D., et al., Polyfunctional cytomegalovirus-specific immunity in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant*, 2011. 11(3): p. 553-60.
  13. Gimenez, E., et al., Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting. *J Gen Virol*, 2015. 96(9): p. 2822-31.
  14. Gimenez, E., et al., Functional patterns of cytomegalovirus (CMV) pp65 and immediate early-1-specific CD8(+) T cells that are associated with protection from and control of CMV DNAemia after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 2015. 17(3): p. 361-70.
  15. Gerna, G., et al., Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 2): p. 275-84.
  16. Hahn, G., et al., Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol*, 2004. 78(18): p. 10023-33.

17. Ryckman, B.J., et al., Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol*, 2008. 82(1): p. 60-70.
18. Wang, D. and T. Shenk, Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(50): p. 18153-
19. Lilleri, D., 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(6): p. 1324-31.
20. Lilleri, D., et al., Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 complex during primary infection. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59863.
21. Chee, M.S., et al., Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990. 154: p. 125-69.
22. Sylwester, A.W., et al., Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 2005. 202(5): p. 673-85.
23. McVoy, M.A., Cytomegalovirus vaccines. *Clin Infect Dis*, 2013. 57 Suppl 4: p.S196-9.
24. Pipeling, M.R., et al., Primary cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific CD8+ T-cell responses and T-bet levels predict immune control during early chronic infection in lung transplant recipients. *J Infect Dis*, 2011. 204(11): p.1663-71.
25. Browne, E.P. and T. Shenk, Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(20): p. 11439-44.

- 
26. Kern, F., 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(12): p. 1709-16.
27. Borysiewicz, L.K., et al., Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol*, 1988. 18(2): p. 269-75.
28. BenMarzouk-Hidalgo, O.J., et al., First face composite-tissue transplant recipient successfully treated for cytomegalovirus infection with preemptive valganciclovir treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. 55(12): p. 5949-51.
29. Benmarzouk-Hidalgo, O.J., et al., Asymptomatic and symptomatic respiratory virus infection detected in naso-pharyngeal swabs from solid organ transplant recipients early after transplantation. *J Clin Virol*, 2011. 52(3): p. 276-7.
30. Espigado, I., et al., Timing of CMV-specific effector memory T cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int*, 2014. 27(12): p. 1253-62.
31. Borysiewicz, L.K., et al., Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med*, 1988. 168(3): p. 919-31.
32. McLaughlin-Taylor, E., et al., Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8<sup>+</sup> virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol*, 1994. 43(1): p. 103-10.
33. Crough, T., et al., Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections. *Eur J Immunol*, 2005. 35(1): p. 139-49.
34. Khan, N., et al., Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol*, 2004. 173(12): p. 7481-9.



- 
35. Landini, M.P., et al., Human cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 synthetic peptides. *J Clin Microbiol*, 1991. 29(9): p.1868-72.
36. Landini, M.P., et al., Serum antibodies to individual cytomegalovirus structural polypeptides in renal transplant recipients during viral infection. *Microbiol Immunol*, 1986. 30(7): p. 683-95.
37. Landini, M.P., et al., Large-scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens. *J Clin Microbiol*, 1990. 28(6): p. 1375-9.
38. Kropff, B., M.P. Landini, and M. Mach, An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol*, 1993. 39(3): p. 187-95.
39. Schoppel, K., et al., The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J Infect Dis*, 1997. 175(3): p. 533-44.
40. van Zanten, J., et al., Humoral immune response against human cytomegalovirus (HCMV)-specific proteins after HCMV infection in lung transplantation as detected with recombinant and naturally occurring proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995. 2(2): p. 214-8.
41. Landini, M.P., T. Lazzarotto, and P.F. Ertl, Humoral immune response to human cytomegalovirus DNA polymerase. *J Clin Microbiol*, 1993. 31(3): p. 724-6.
42. Vornhagen, R., et al., The DNA-binding protein pUL57 of human cytomegalovirus is a major target antigen for the immunoglobulin M antibody response during acute infection. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(7): p. 1927-30.
43. Jahn, G., et al., The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol*, 1987. 68 ( Pt5): p. 1327-37.

- 
44. Landini, M.P. and M. Mach, Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: is it diagnostically useful? When and how. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1995. 99: p. 18-23.
45. Greijer, A.E., et al., Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(1): p. 179-88.
46. Weber, B., et al., Humoral immune response to human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of immunoglobulin class and IgG subclass antibody response to human cytomegalovirus early and late antigens. *Clin Investig*, 1993. 71(4): p. 270-6.
47. Tomtishen, J.P., 3rd, Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol J*, 2012. 9: p. 22.
48. Sinzger, C., et al., Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*, 1995. 76 ( Pt 4): p. 741-50.
49. Britt, W.J., et al., Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol*, 1990. 64(3): p. 1079-85.
50. Urban, M., et al., Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol*, 1996. 77 ( Pt 7): p. 1537-47.
51. Shimamura, M., M. Mach, and W.J. Britt, Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J Virol*, 2006. 80(9): p. 4591-600.
52. Mach, M., et al., Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol*, 2000. 74(24): p. 11881-92.

- 
53. Munoz, I., et al., Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein B (gB)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from HCMV active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant. *J Med Virol*, 2001. 65(1): p. 77-84.
54. Volpi, A., et al., Neutralizing antibody response against human cytomegalovirus in allogeneic bone marrow-transplant recipients. *J Infect Dis*, 1999. 180(5): p. 1747-8.
55. Bonaros, N., et al., CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clin Transplant*, 2008. 22(1): p. 89-97.
56. Fouts, A.E., et al., Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti-cytomegalovirus (anti-CMV) neutralizing antibody response in CMV hyperimmune globulin. *J Virol*, 2012. 86(13): p. 7444-7.
57. Macagno, A., et al., Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol*, 2010. 84(2): p. 1005-13.
58. Genini, E., et al., Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 fiveprotein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *J Clin Virol*, 2011. 52(2): p. 113-8.
59. Plotkin, S.A., et al., Effect of Towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial. *Ann Intern Med*, 1991. 114(7): p. 525-31.
60. Adler, S.P., et al., Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis*, 1995. 171(1): p. 26-32.
61. Krause, P.R., et al., Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine*, 2013. 32(1): p. 4-10.

62. Wang, D. and T. Shenk, Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol*, 2005. 79(16): p. 10330-8.
63. Gerna, G., et al., Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant*, 2011. 11(11): p. 2463-71.
64. Gatherer, D., et al., High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(49): p. 19755-60.
65. Juranic Lisnic, V., et al., Dual analysis of the murine cytomegalovirus and host cell transcriptomes reveal new aspects of the virus-host cell interface. *PLoS Pathog*, 2013. 9(9): p. e1003611.
66. Solano, C., et al., Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*, 2008. 93(9): p. 1434-6.
67. Chambers, J., et al., DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol*, 1999. 73(7): p. 5757-66.
68. Jean Beltran, P.M. and I.M. Cristea, The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2014. 11(6): p. 697-711.

Figure 1

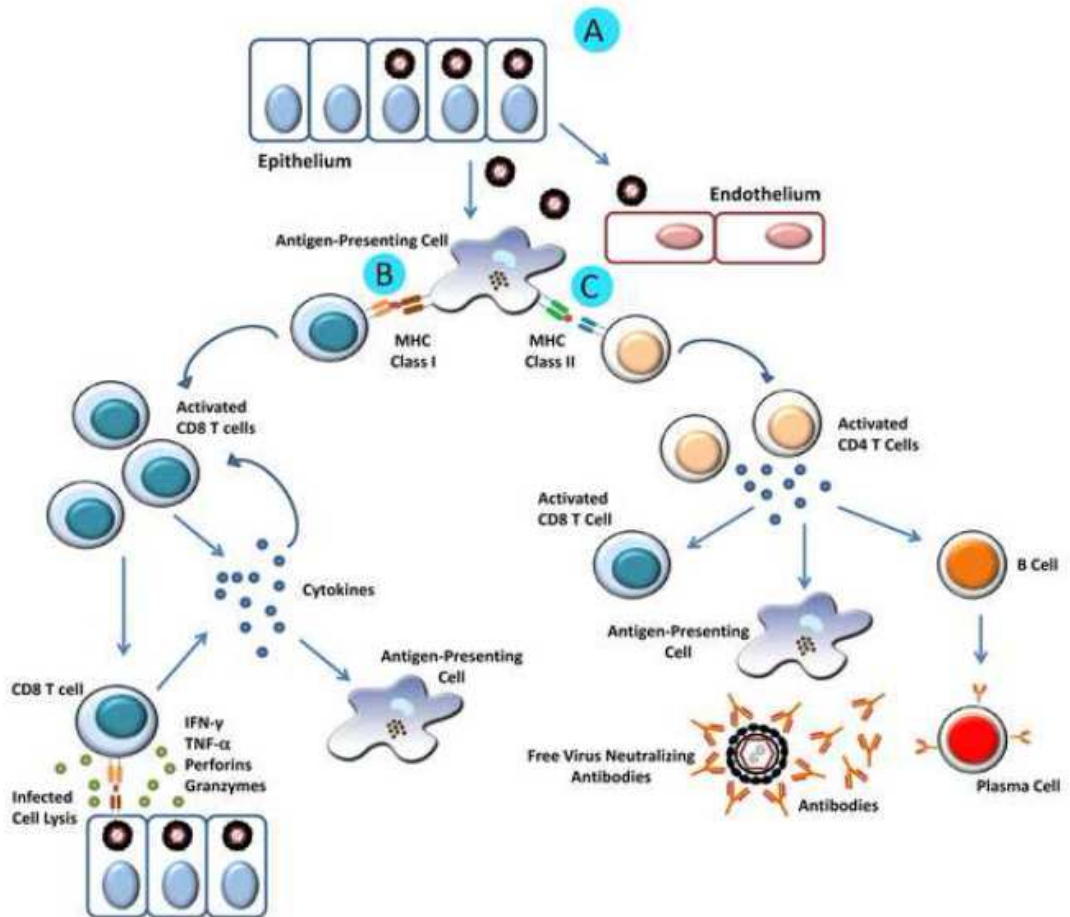


Figure 2

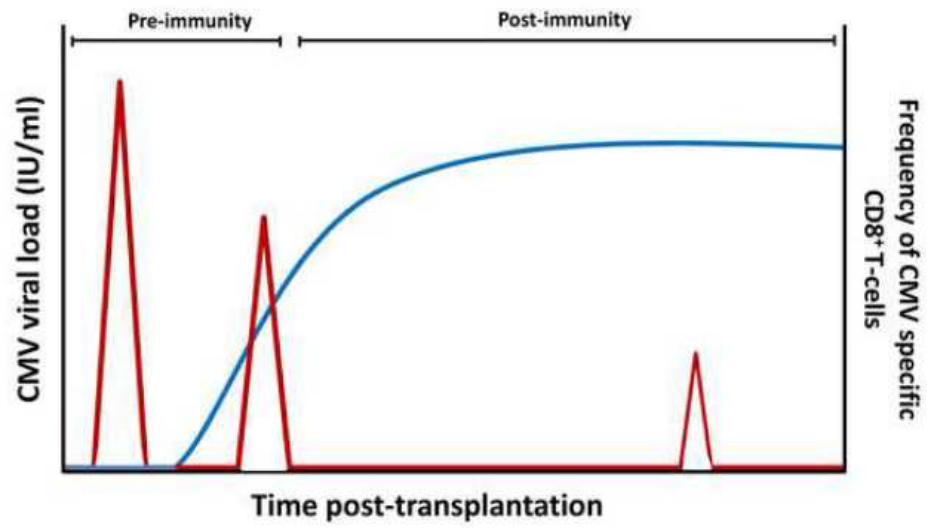
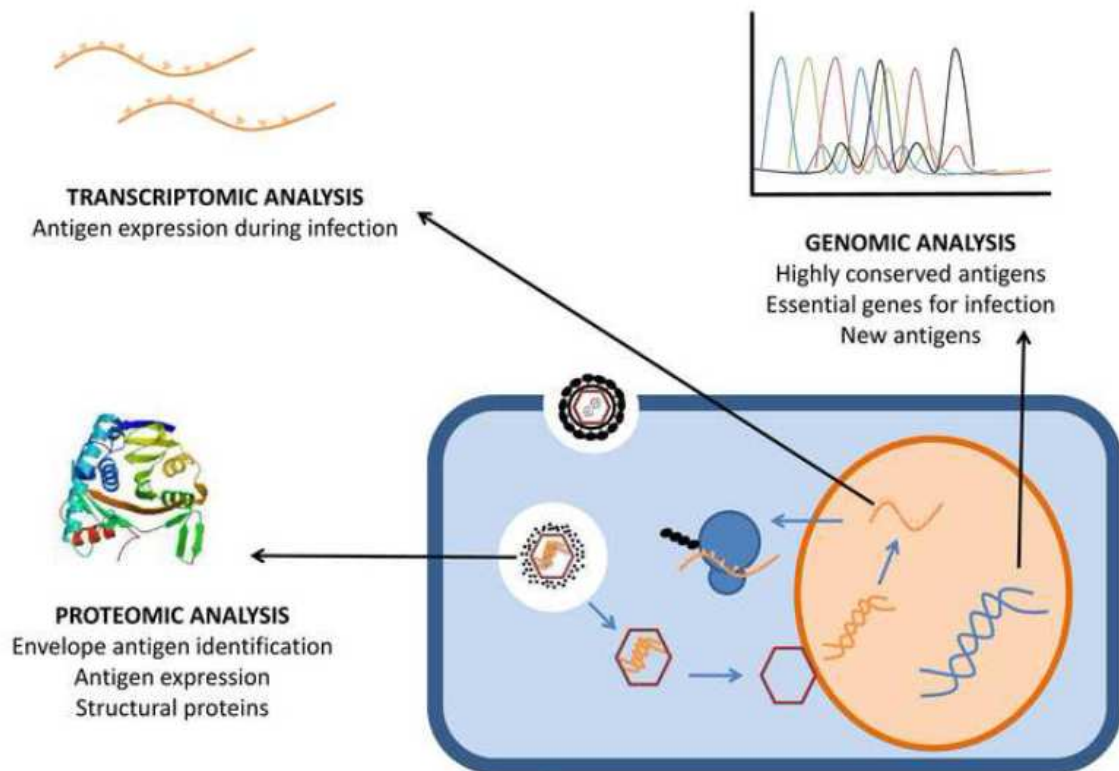


Figure 3



---

**Figure Legends**

**Figure 1. Immune response to CMV primary infection.** A) CMV infection first occurs in epithelial cells, and disseminates to other cell types. Professional antigen presenting cells (APC) process and display CMV antigens in major histocompatibility complexes (MHC) on their surfaces. B) The APCs can stimulate CD8<sup>+</sup> T-cells in the context of MHC class I. The activated CD8<sup>+</sup> T-cells can either directly lyse virusinfected cells by cytolysis through the secretion of granzymes and perforins or by inducing the supression of virus replication through the secretion of IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . C) The APCs can also promote adaptative immunity in the context via MHC class II presentation that are recognized by CD4<sup>+</sup> T-cells. Following activation of B cells and production of CMV-specific antibodies, extracellular virus can be controlled through antibody-mediated neutralization by blocking the infection of new cells. In addition, cytokines (e.g. IL-2) secreted by CD4<sup>+</sup> T-cells can also lead to the proliferation of CD8<sup>+</sup> T-cells and macrophages.

**Figure 2. Correlation between the acquisition of CMV-specific cellular immunity and virus suppression during the post-transplant period.** The figure represents the typical evolution of the frequency of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells (blue line) and CMV viral load (red line) after transplantation in a transplanted patient. Note the decreased frequency and lower peak viral load of virus replication episodes following the acquisition of cellular immunity.

**Figure 3. New technologies for vaccine development.** Use of genomic, transcriptomic, and proteomic technologies can be used to identify new antigens for CMV-vaccine development. The schematic represents the different technologies and the types of information that can be gained from the use of each.





**Artículo 3. Manuscrito en preparación**

***Using Transcriptional Profile During Cytomegalovirus Infection of Human Fibroblast and Epithelial Cells for Antigen Identification***

**Blanco-Lobo P<sup>a</sup>, Rueda A<sup>b\*</sup>, López FJ<sup>b\*</sup>, Vela-Boza A<sup>b</sup>, Pérez-Romero P<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Sevilla, Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Preventive Medicine, Spain.

<sup>b</sup>Genomics and Bioinformatics Platform of Andalusia (GBPA), Seville, Spain.

\* Both authors contributed equally to the work.

---

**Introduction**

Human cytomegalovirus (CMV; species *Human herpesvirus 5*) infects most humans during their lifetime and establishes a life-long latent infection in myeloid progenitor cells [1]. Although CMV infection is mainly asymptomatic in immunocompetent individuals, primary infection during pregnancy is associated with neurological damage to the fetus [2] in addition to be a major cause of morbidity and mortality among immunocompromised individuals such as solid organ transplant recipients [3]. For this reason, the U.S. Institute of Medicine has identified the development of a vaccine for the prevention of CMV disease as a public health priority [4]. Several vaccine candidates have been developed since the 1970s including live attenuated virus vaccines, peptides or recombinant proteins, DNA plasmids, virus-like particles and vectored envelope proteins [5, 6]. Most of these vaccines, except for the live attenuated vaccines, have been formulated using the viral envelope glycoprotein gB [7] to promote a humoral response and pp5 and IE-1 to promote a cellular response mostly a T-cell response [8]. Unfortunately, none of these vaccines has been licensed to date highlighting the necessity of evaluating additional viral antigens as candidate for vaccine that may lead to more robust immune response increasing the protective effects of vaccination. Only a small subset of predicted CMV open reading frames have been evaluated as vaccine candidates in preclinical and clinical studies [7-11]. Due to the large number of predicted open reading frames in the CMV genome, a detailed characterization of the immune response elicited by all individual protein antigens would be costly and time consuming. In this context, the use of emerging genomic, transcriptomic and proteomic technologies may be useful for identifying viral antigens that have desirable characteristics for vaccine design. RNA-seq techniques have been used to characterize global transcriptome for both human and murine CMV during infection [12, 13] and have identified highly expressed gene products that may be of interest for vaccine development. This idea is supported by transcriptomic studies that employing microarrays demonstrated that genes encoding IE1 and pp65 are highly expressed during infection [14] and both induce a T cell-mediated immune response which correlated with controlling virus replication [15-18].

Because of its complexity, CMV genetic repertoire is not completely understood, and presents a number of challenges for understanding CMV pathogenesis including the number of genes products, their function during infection and their interaction with the

---

cellular host. The introduction of Next Generation Sequence technology has revolutionized the study of genomic and molecular biology and has significantly improved the identification of ORFs [19]. RNA-Seq analysis of infected fibroblasts with the HCMV Merlin strain (72h post infection, hpi) demonstrated that transcription of HCMV is more complex and multifaceted than what had been described to date with a large number of protein coding regions, splicing and non coding RNAs such as non-coding , overlapping transcripts and antisense transcripts [12]. Previous transcriptional studies have focused on the characterization of gene expression during infection and they have provided important but partial insight about CMV transcriptome. For instance microarrays studies has measured the relative abundance of RNA transcripts but only those included in the designed array [20], in addition results of RNA-Seq studies have identified transcript profile at different phases during CMV replication but only using fibroblasts [21]. Although fibroblasts has been mostly used as cellular model of CMV infection *in vitro*, CMV infects a wide broad target type of cells establishing a complex interaction with the human host [22-25]. For instance, epithelial cells play an important role during host-to-host transmission since constitute the first physiological barrier encountered by CMV during natural infection [26]. In addition, we and other have found that neutralizing antibodies specifically blocking CMV infection of fibroblasts are present at low level after a course of CMV infection, while CMV specific humoral response is mainly directed to blocking infection of epithelial cells [27-29]. These results are in agreement with those reporting more than 128-fold neutralizing activity against CMV in epithelial cells compared to fibroblasts using serum from 18 pregnant women with primary CMV infection and 5 SOTR [30]. Together these evidences may indicate that epithelial cells may play a major role during infection and spread of CMV *in vivo*.

The goal of the present study was to analyze and compare the transcriptional profile of CMV during the infection of fibroblast and epithelial cells to identify the most expressed viral genes that are differentially transcribed in both cell types and to identify potential antigens for vaccine development.

---

## Material and methods

**Cells and viruses.** MRC-5 human fetal lung fibroblasts (ATCC CCL-171) and human ARPE-19 retinal pigment epithelial cells (ATCC CRL-2302) were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium-DMEM- (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (HyClone Laboratories), 10,000 IU/L penicillin, 10 mg/L streptomycin (Gibco-BRL). CMV strain AD169 (ATCC VR-538) was propagated in MRC-5 cells. CMV strain BADrUL131-Y4 (kindly provided by Dr. T. Shenk Princeton University, USA) is a derivative of a BAC clone of the AD169 HCMV in which the UL131 ORF has been repaired. The BAC CMV DNA was transfected into MRC-5 fibroblast cells and the viral progeny was propagated in ARPE-19 cells [27]. Viral titers were determined by limiting dilution in 96-well plates using MRC-5 cells.

**Western Blot analysis.** For western blot analysis 75 cm<sup>2</sup> flasks of MRC-5 and ARPE-19 were infected with 3 MOI of AD169 and BADrUL131-Y4 strains of HCMV, respectively. Cells were harvested in 1 ml of E1A buffer (50 mM HEPES, 250 mM NaCl and 1% protease inhibitor cocktail; Sigma) after two washes with 1X PBS at different time points after infection (1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48 hours post-infection). Mock-infected cells were used as negative control. Cells were spun down for 10 minutes at 1000 rpm and resuspended in 500 µL of cold EIA lysis buffer (E1A buffer, 0.1% NP40). Following centrifugation at 2500 rpm for 15 min, 15 µg of the protein supernatants were loaded into a SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Life Sciences) for western blot analysis. Membranes were blocked in blocking buffer (PBS, 0.1 % Tween 20, 5% (w/v) nonfat dry milk) for 1h at room temperature and incubated with 1:200 anti IE-1 (MAB810R, Millipore), 10 mg/ml anti-ICP36 (ab53482, abcam), 1:1000 anti-pp65 (ab49214, abcam) and 1:5000 anti-GAPDH (GTX627408; GeneTex) as primary antibodies. Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (PIERCE) dilute 1:10.000 was used as secondary antibody.

**Preparation of RNA from mock and HCMV-infected cells.** For RNA isolation, duplicate 75 cm<sup>2</sup> flasks of MRC-5 and ARPE-19 cells were infected at 3 M.O.I of AD169 and BADrUL131-Y4 HCMV strains, respectively and RNA were harvested at

---

8, 24 and 48 hpi for MRC-5 and 16, 36 and 48 hpi for ARPE-19. As a mock infection control duplicate 75 cm<sup>2</sup> flasks of MRC-5 and ARPE-19 cells were harvested at 48h. Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Life Technologies) and purified using RNeasy resins and the RNA cleanup kits (Qiagen) according to manufacturer's recommendations. The quality and purity of RNA preparation were tested by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm in addition to the confirmation of the integrity of the 28S and 18S rRNA by electrophoresis.

**Preparation of the transcriptome library.** The whole transcriptome library was prepared by adding universally accepted transcripts to the isolated RNA to control for external sources of variability (ERCC RNA Spike-In Mix, Thermofisher). Ribosomal RNA was depleted from the RNA library using the RiboMinus<sup>TM</sup> Concentration Module (Invitrogen). 250 ng of the rRNA-depleted total RNA was fragmented using the RNase III (Thermofisher), and yield and size distribution of the fragmented RNA was assessed using the Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Assay Kit (Invitrogen) and the Agilent<sup>®</sup> RNA 6000 Pico Chip Kit (Agilent) with the Agilent<sup>®</sup> 2100 Bioanalyzer<sup>TM</sup> Instrument. Hybridation and ligation of 120ng of the final product to the adaptors was performed using components from SOLiD<sup>™</sup> Total RNA-Seq Kit (Applied Biosystems). Reverse transcription of the cDNA was performed using ArrayScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Thermofisher) and to separate amplicons from contaminants the resulting cDNA were bound to magnetic beads using Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP (Beckman Coulter). cDNA was amplified using the SOLiD PCR Primer Set and the amplified DNA was purified using the PureLink<sup>®</sup> PCR Micro Kit (Invitrogen). Yield and size distribution of the purified DNA was analyzed using the NanoDrop<sup>®</sup> Spectrophotometer and using the DNA 1000 Kit (Agilent<sup>®</sup>) in the Agilent 2100 Bioanalyzer<sup>TM</sup> Instrument

**Next generation sequencing- Alignment and analysis.** Unique reads were mapped against a reference sequence formed by the Human Genome (build GRCh37, hg19) and the Virus genome (HCMV AD169 strain, GenBank accession no. X17403). Two mapping rounds were run: first mapping step was carried out by using TopHat v1.4.1 [31]. Then, unmapped reads were then remapped using SHRIMP v2.2.3 [32]. Results provided by both mappers were merged and read counts for each gene obtained by using

the HTSeq-count package (intersection-nonempty mode) with human ENSEMBL annotation (release 82) and virus genome annotation. Data regarding mapped reads and proportion of reads mapping to a coding DNA sequences (CDS), intergenic regions or non-coding genes are expressed as minimum to maximum values of the duplicate for each time point after infection.

**Identification of Most Abundant Transcripts (MAT).** RPKM values were calculated from gene read counts [33]. Then, the list of MAT was calculated for each pair (sample type, time point) as follows. Recall here that duplicated samples were available for each pair (sample type, time point). First, for each sample, the 10% most expressed genes was selected. Then, the two resulting sets of "most-expressed-genes" from duplicated samples were intersected, thus obtaining the final list of MAT for a given pair (sample type, time point).

---

## Results

**Identification of timing after CMV infection in MRC-5 and ARPE-cells.** Since the rate of cell growth is different in epithelial and fibroblast cells, we compared the protein level of expression of three different proteins known to be expressed at immediate early (IE-1 protein), early (ICP36 protein) and late (pp65 protein) phase after CMV infection of MRC-5 and ARPE-19 cells. We determined the hours post-infection (hpi) that had peak level of protein expression in both cell types. As shown in Figure 1 the following times were determined to have the same level of expression for fibroblast MRC-5 infection: 8 hpi for IE-1, 24 hpi for ICP36 and 48 hpi for pp65 (Figure 1A), and for epithelial cell ARPE-19 infection: 16 hpi for IE-1, 36 hpi for ICP36 and 48 hpi for pp65 (Figure 1B).

**Overview of the viral transcriptome analysis.** To describe the most expressed transcripts over the course of CMV infection, human fibroblast (MRC-5) cells were infected with the AD169 CMV strain and human epithelial (ARPE-19) cells with the BADrUL131-Y4 CMV and harvested at the indicated time points post-infection. Biological replicate experiments were performed for each time point. RNAs were pooled, converted to cDNA, and sequenced on the GS FLX RNASeq 454 system (Life Science). For MRC-5 infected cells, between 321,025-1,116,200 reads aligned to annotated regions of CMV genome (Table 1). Of them, a proportion between 63.6-89.0% mapped to coding DNA sequences (CDS), 8.9-34.2% mapped to intergenic regions and 1.6-3.5% non-coding genes (Figure 2A). The ranges depended on the duplicate sample and the time post infection. For ARPE infected cells, between 313,621-2,310,159 reads aligned to annotated regions of CMV genome (Table 1). Of them, a proportion between 60.9-76.3% mapped to coding DNA sequences, 22.8-37.4% to intergenic regions and 0.8-2.4% to non-coding genes (Figure 2B).

We assessed experimental reproducibility of the two independent biological replicates for each time point and for each cell line and the RNA measurements were highly reproducible in all cases demonstrating consistency in the methods (Figure 3).

**Most abundant transcripts (MAT) after HCMV infection.** We found that a high number of viral genes were differentially transcribed comparing fibroblast and epithelial



cells. Overall, 34 genes were highly expressed in ARPE-19 compared with MRC-5 in IE phase, 129 genes in E phase and 94 genes in L phase post-infection. Regarding those genes most expressed in MRC-5 than ARPE-19, we found 109 genes in IE, 14 genes in E, and 49 genes in L phase. To identify the most expressed viral transcripts during the course of infection of both cell types we determined the 10% most expressed genes for each time point and compared the profile of expression between the two cell types (Figure 4). During the infection of MRC-5 cells, at immediate early phase the most abundant transcripts were genes involved in immune evasion (US3 and US2) [34, 35], inhibition of apoptosis (UL36) [36], immediate early gene activation (UL26 and UL29) [37-39], replication and encapsulation of the viral DNA (UL51 and UL112) [40, 41], virus structure (UL4, UL48A and UL74A)[42, 43] and other proteins with uncharacterized functions (UL13, UL17 and US9)[44]. Of them, proteins UL4, UL13 and UL36 were also detected at high abundance in ARPE-19 infected cells at immediate early phase, while other proteins detected were involved in immune evasion (US20, US18, US11, UL40, UL42 and US10) [35, 45-47], virus structure (UL78) [48] and other proteins with unknown functions (UL5, UL41A, US19, and US34A; Figure 4A).

During the early phase of infection of MRC-5 cells the MAT detected were involved in inhibition of apoptosis (UL36) [36], viral structure (UL22A and UL78, US9) or unknown function (UL1 and US19). Other 5 different MAT were found during the infection of ARPE-19, UL21A and RL13 with unknown functions, UL44 and UL74A structural genes and US28 involved in immune evasion [49]. In addition, the glycoprotein UL4, and the genes UL17, UL40, UL41A, UL42 and US18 were the most abundant genes in both cell types (Figure 4B). Finally, during the late phase of infection we found the following MAT: UL13 and UL22A for MRC-5 while UL21A, UL74A and UL100 (glycoprotein M) for ARPE-19. In addition, UL4, UL5, UL17, UL40, UL41A, UL42, UL44, UL48A, US20, US28, and RL13 were simultaneously identified as MAT in both cell types (Figure 4C).

We also compared the differential expression of each MAT of MRC-5 and ARPE-19 infected cells for each time point (Table 2). Interestingly, we found that most MAT were significantly different ( $\log_2$  fold change  $>1$  or  $\log_2$  fold change  $<-1$ ) between both cell types. In fact, UL5, UL40, US10, US11 and specially US18 had always higher expression in epithelial infected cells ( $\log_2$  fold change  $>1$ ) for all three time points

despite of the fact that UL5, UL40 and US18 were the most abundant transcripts of infected fibroblasts.

**Identification of MAT of proteins known to induce a CMV-specific immune response.** We next selected the transcripts that were most abundant for all three time points. These genes were UL4, UL13, UL17 and UL48a for MRC-5 infected cells, and UL4, UL5, UL40, UL41A, UL42, US18 and US20 for ARPE-19. We compared the level of transcript expression between these identified MAT and the genes that have previously been used for CMV vaccine formulation such as pp65, gB, gH, gL, and IE-1 [7, 8, 50]. In all cases, the expression of the identified MAT in MRC-5 (Figure 5A) and in ARPE-19 (Figure 5C) were higher than proteins tested in CMV vaccines.

In addition, we analyzed the transcriptional level of genes that encode for proteins that have been previously identified to induce a CD8<sup>+</sup> T-cell immunity [51] such as UL48, US32, US29, US3, UL94, UL69, UL105, UL44, UL86, UL33, UL49, US1, UL34, IRS1, UL36, UL37, UL45, UL116 and UL54 (Figure 5A and B). Overall, the genes able to induce a CD8<sup>+</sup> T-cell response had similar levels than genes pp65, gB, gH, gL, and IE-1 used for CMV vaccine, although less expressed than the identified MAT. We found similar results for genes that code for proteins that were identified to induce a CD4<sup>+</sup> T-cell immunity such as UL86, UL36, UL48, UL25, UL121, US22, US23, UL69, US26, UL16, US3, US18, UL78, UL18, UL17, UL100, UL45, UL43, UL24, UL4, UL49, UL102 and UL87 [51]. Similarly to those genes recognized by CD8<sup>+</sup> T-cell, most of the transcripts identified as potential inducer of CD4<sup>+</sup> T-cell were detected at similar abundance than the previously used CMV vaccines but lower than the MAT (Figure 5B and C).

We found that three of the identified MAT (in at least one of the time points after infection) encode for proteins that elicit a CD8<sup>+</sup> T-cell response: UL44 MAT at 36 and 48 hpi of ARPE-19 cells, UL36 MAT at 8 hpi of MRC-5 cells and at 16 hpi of ARPE-19 cells and US3 MAT at 8 hpi of MRC-5 cells (Figure 5 A and B). We also found that three of the MAT identified for all three time points after infection encode for proteins that were described to induce a CD4<sup>+</sup> T-cell immunity: UL17, UL4 and US18, and UL36 that was identified as MAT only at 8 hpi of MRC-5 cells and at 16 hpi of ARPE-19 cells (Figure 5).

---

## Discussion

An extended knowledge of CMV genome expression, viral products and their function may help to develop effective antiviral drugs and identify new vaccine candidates. The introduction of high-throughput sequence techniques to obtain genomic information of microorganisms has revolutionized vaccine research field. Traditionally, the identification of potential vaccine targets has been performed based on the level of conservation of the antigens. However, further strategies have also been taken into consideration with the use of RNA-Seq [52] or DNA-microarray [53] to determine the transcription profile of antigens and its expression level in different conditions or tissues. Genes that are highly expressed during infection and have an important role in the pathogenesis are generally considered as potential vaccine candidates [54]. However, these approaches have not been applied to the development of a virus vaccine to date. This is the first study that using high-throughput sequence techniques as RNA-Seq analyzes the most abundant transcripts of CMV in different cells lines at different times after infection to search for new antigen candidates for an effective vaccine against CMV infection.

Most of the transcriptome of CMV data available have been performed using fibroblast as model of infection [12, 21]. However, epithelial cells have been described as the first physiological barrier encountered by CMV during natural infection, most of the neutralizing antibodies found in serum samples of CMV-infected patients were involved in blocking epithelial cell infection but not fibroblasts and additionally some studies have suggested that viral gene expression are influenced by host cell factors [20]. Based on these premises, we analyzed differences in CMV transcriptional profile at three different time points during the course of infection of fibroblast and epithelial cells.

In agreement with previous studies we found that a high number of viral genes were differentially transcribed in fibroblast vs. epithelial cells, which support the influence of the host cell factors in the viral gene expression. Towler *et al.* found that of the 165 known CMV protein-coding genes, 41 and 48 were differentially regulated in pigmented epithelial and astrocyte cells, respectively, compared with fibroblast cells, and 22 of these were regulated in both epithelial and astrocyte cells.[20].

A number of recent advances in the study of the protective cellular and humoral specific immune response against CMV [15, 28, 55] and the characterization of antigens able to

induce both types of response have been important approaches for the identification of novel potential vaccine targets. A relatively extensive group of antigens have shown to be recognized by CD4<sup>+</sup> T-cells or/and CD8<sup>+</sup> T-cells in CMV-seropositive healthy adults [51] or recognized by human sera from different clinical setting [56, 57]. Consequently, they may be potential inducer of the cytotoxic immune response by the CD8<sup>+</sup> T-cells or the production of neutralizing humoral response through the activation of CD4<sup>+</sup> T-cells and B lymphocytes. However, very few of these antigens detected in 100% of the serum samples from naturally infected individuals analyzed have been taken into account for vaccine design: IE-1 and pp65 used as inducer of the cellular immune response [58, 59] or glycoprotein B (which is only involved in fibroblast cell entry) used to induce an antibody response [7]. In addition, the pentameric complex involved in epithelial/endothelial cell entry was recently considered as potential target to improve the clinical efficacy of the future CMV vaccine candidates [60]. These antigens, in addition to be main targets of the cellular or humoral response, were considered due to their substantial abundance in the virion, the high degree of expression or protein accumulation during the infection. These facts support the idea that highly expressed proteins if they play a role in stimulating protective host immunity may be of interest for vaccine development. In the present work we have identified different transcripts as potential vaccine candidates based on the high transcriptional level and their immunogenic properties since they were identified to induce a CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell immune response [51]. Of them, UL4, UL17, UL36, US3 and US18 may be potential candidates to elicit a CD4<sup>+</sup> T-cell immune response and UL44, US3 and UL36 candidate to elicit a CD8<sup>+</sup> T-cell immune response.

Previous evidences support that the CMV-specific humoral response after natural infection is directed to block epithelial cell but not fibroblast infection. For this reason, the activation of a CD4<sup>+</sup> T-cell response targeting a protein highly expressed in epithelial cells may be a good alternative to induce a more protective specific humoral response. In this sense, the US18 also identified as NK evasion function [45] may be the most desirable since is the most expressed in the course of epithelial infection and is frequently recognized by CD4<sup>+</sup> T-cells . Further studies are necessary to elucidate the function of the unknown proteins as UL17 as well as to test their capacity to evoke a strong humoral or T-cell response in *in vivo* studies.

In addition, the antigens encoded by UL36 and US3 may be specially interesting since they activate both CD4+ and CD8+ T cells, which may result in the activation of both the cytotoxic response against infected cells and an antibody response directed against the free extracellular virions. The UL36 gene encodes the viral inhibitor of caspase-8 related with the activation of apoptosis processes [61] whereas US3 is a glycoprotein residing in the endoplasmic reticulum that modulate cell surface expression of MHC class I molecules and it is related with virus-mediated class I degradation during early times of infection[34]. Although it may seem paradoxical the use of a protein responsible for the immune evasion as an inductor of the immune system, other studies have also proposed this type of proteins to activate the T-cell immune response [62]. One of the best example is the tegument protein pp65, that despite of preventing the recognition of immediate-early proteins by components of the immune system and in addition to inhibiting the synthesis of various components involved in the host immune response [63], pp65 is one of the protein most used in vaccine development because of its capacity to induce a specific T-cell response [64].

In conclusion, using the transcriptional profile of CMV during the infection of fibroblast and epithelial cells we identified the most transcribed viral genes that are involved in activating T-cell response as potential novel antigens for vaccine development.

---

**References**

1. Kondo, K., H. Kaneshima, and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(25): p. 11879-83.
2. Dollard, S.C., S.D. Grosse, and D.S. Ross, *New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection*. Rev Med Virol, 2007. 17(5): p. 355-63.
3. Razonable, R., *Direct and indirect effects of cytomegalovirus: can we prevent them?* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. 28(1): p. 1-5.
4. Stratton K. R., D.J.S., Lawrence R. S, *Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking* K.R. Stratton, J.S. Durch, and R.S. Lawrence, Editors. 2000: Washington (DC).
5. Pérez Romero P, B.P., GiménezE, Solano C, Navarro D, *An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Future Virol, 2015. 10 (2): p. 113-114.
6. Plotkin, S., *The history of vaccination against cytomegalovirus*. Med Microbiol Immunol, 2015. 204(3): p. 247-54.
7. Griffiths, P.D., et al., *Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2011. 377(9773): p. 1256-63.
8. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., *A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial*. Lancet Infect Dis, 2012. 12(4): p. 290-9.

- 
9. Plotkin, S.A., et al., *Effect of Towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial.* Ann Intern Med, 1991. 114(7): p. 525-31.
10. Adler, S.P., et al., *Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age.* J Infect Dis, 1995. 171(1): p. 26-32.
11. Krause, P.R., et al., *Priorities for CMV vaccine development.* Vaccine, 2013. 32(1): p. 4-10.
12. Gatherer, D., et al., *High-resolution human cytomegalovirus transcriptome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(49): p. 19755-60.
13. Juranic Lisnic, V., et al., *Dual analysis of the murine cytomegalovirus and host cell transcriptomes reveal new aspects of the virus-host cell interface.* PLoS Pathog, 2013. 9(9): p. e1003611.
14. Chambers, J., et al., *DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression.* J Virol, 1999. 73(7): p. 5757-66.
15. Benmarzouk-Hidalgo, O.J., et al., *Therapeutic effect of the acquisition of cytomegalovirus-specific immune response during preemptive treatment.* Transplantation, 2011. 91(8): p. 927-33.
16. Gerna, G., et al., *Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation.* Am J Transplant, 2011. 11(11): p. 2463-71.

- 
17. Espigado, I., et al., *Timing of CMV-specific effector memory T cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Transpl Int*, 2014. 27(12): p. 1253-62.
18. Solano, C., et al., *Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection*. *Haematologica*, 2008. 93(9): p. 1434-6.
19. Sijmons, S., M. Van Ranst, and P. Maes, *Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing*. *Viruses*, 2014. 6(3): p. 1049-72.
20. Towler, J.C., et al., *Human cytomegalovirus transcriptome activity differs during replication in human fibroblast, epithelial and astrocyte cell lines*. *J Gen Virol*, 2012. 93(Pt 5): p. 1046-58.
21. Tirosh, O., et al., *The Transcription and Translation Landscapes during Human Cytomegalovirus Infection Reveal Novel Host-Pathogen Interactions*. *PLoS Pathog*, 2015. 11(11): p. e1005288.
22. Tumilowicz, J.J., et al., *Replication of cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells*. *J Virol*, 1985. 56(3): p. 839-45.
23. Tugizov, S., E. Maidji, and L. Pereira, *Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells*. *J Gen Virol*, 1996. 77 ( Pt 1): p. 61-74.
24. Sinzger, C., et al., *Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus*. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 12): p. 3021-35.
25. Ibanez, C.E., et al., *Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages*. *J Virol*, 1991. 65(12): p. 6581-8.



- 
26. Sinzger, C., et al., *Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues*. J Gen Virol, 1995. 76 ( Pt 4): p. 741-50.
27. Wang, D. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism*. J Virol, 2005. 79(16): p. 10330-8.
28. Lillieri, D., 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(6): p. 1324-31.
29. Gimenez, E., et al., *Role of cytomegalovirus (CMV)-specific polyfunctional CD8+ T-cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of CMV infection in an allogeneic stem-cell transplantation setting*. J Gen Virol, 2015. 96(9): p. 2822-31.
30. Gerna, G., et al., *Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection*. J Gen Virol, 2008. 89(Pt 4): p. 853-65.
31. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol, 2009. 10(3): p. R25. 32. David, M., et al., *SHRiMP2: sensitive yet practical SHort Read Mapping*. Bioinformatics, 2011. 27(7): p. 1011-2.
33. Dillies, M.A., et al., *A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis*. Brief Bioinform, 2013. 14(6): p. 671-83.
34. Noriega, V.M., et al., *Human cytomegalovirus US3 modulates destruction of MHC class I molecules*. Mol Immunol, 2012. 51(2): p. 245-53.

- 
35. Ahn, K., et al., *Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): p. 10990-5.
36. Skaletskaya, A., et al., *A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(14): p. 7829-34.
37. Munger, J., D. Yu, and T. Shenk, *UL26-deficient human cytomegalovirus produces virions with hypophosphorylated pp28 tegument protein that is unstable within newly infected cells*. J Virol, 2006. 80(7): p. 3541-8.
38. Lorz, K., et al., *Deletion of open reading frame UL26 from the human cytomegalovirus genome results in reduced viral growth, which involves impaired stability of viral particles*. J Virol, 2006. 80(11): p. 5423-34.
39. Mathers, C., C.M. Spencer, and J. Munger, *Distinct domains within the human cytomegalovirus U(L)26 protein are important for wildtype viral replication and virion stability*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88101.
40. Borst, E.M., et al., *The human cytomegalovirus UL51 protein is essential for viral genome cleavage-packaging and interacts with the terminase subunits pUL56 and pUL89*. J Virol, 2013. 87(3): p. 1720-32.
41. Wright, D.A. and D.H. Spector, *Posttranscriptional regulation of a class of human cytomegalovirus phosphoproteins encoded by an early transcription unit*. J Virol, 1989. 63(7): p. 3117-27.
42. Chen, J. and M.F. Stinski, *Activation of transcription of the human cytomegalovirus early UL4 promoter by the Ets transcription factor binding element*. J Virol, 2000. 74(21): p. 9845-57.
43. Scalzo, A.A., et al., *Transcriptional analysis of human cytomegalovirus and rat cytomegalovirus homologues of the M73/M73.5 spliced gene family*. Arch Virol, 2009. 154(1): p. 65-75.

- 
44. Wang, N., et al., *Transcription characteristics of the human cytomegalovirus UL13 gene*. Arch Virol, 2013. 158(2): p. 473-7.
45. Fielding, C.A., et al., *Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation*. PLoS Pathog, 2014. 10(5): p. e1004058.
46. Heatley, S.L., et al., *Polymorphism in human cytomegalovirus UL40 impacts on recognition of human leukocyte antigen-E (HLA-E) by natural killer cells*. J Biol Chem, 2013. 288(12): p. 8679-90.
47. Furman, M.H., et al., *The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules*. J Virol, 2002. 76(22): p. 11753-6.
48. Dunn, W., et al., *Functional profiling of a human cytomegalovirus genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14223-8.
49. Bongers, G., et al., *The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes intestinal neoplasia in transgenic mice*. J Clin Invest, 2010. 120(11): p. 3969-78.
50. Adler, S.P., *Immunization to prevent congenital cytomegalovirus infection*. Br Med Bull, 2013. 107: p. 57-68.
51. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. J Exp Med, 2005. 202(5): p. 673-85.
52. Azhikina, T., et al., *A new technique for obtaining whole pathogen transcriptomes from infected host tissues*. Biotechniques, 2010. 48(2): p. 139-44.

- 
53. Grifantini, R., et al., *Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays*. Nat Biotechnol, 2002. 20(9): p. 914-21.
54. Prachi, P., et al., *Deep sequencing in pre- and clinical vaccine research*. Public Health Genomics, 2013. 16(1-2): p. 62-8.
55. Zhou, W., et al., *Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients*. Blood, 2009. 113(25): p. 6465-76.
56. Landini, M.P., et al., *Serum antibodies to individual cytomegalovirus structural polypeptides in renal transplant recipients during viral infection*. Microbiol Immunol, 1986. 30(7): p. 683-95.
57. Kropff, B., M.P. Landini, and M. Mach, *An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus*. J Med Virol, 1993. 39(3): p. 187-95.
58. Slezak, S.L., et al., *CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects*. Transl Med, 2007. 5: p. 17.
59. Sung, H. and M.R. Schleiss, *Update on the current status of cytomegalovirus vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2010. 9(11): p. 1303-14.
60. Hofmann, I., et al., *Expression of the human cytomegalovirus pentamer complex for vaccine use in a CHO system*. Biotechnol Bioeng, 2015. 112(12): p. 2505-15.

61. McCormick, A.L., et al., *The human cytomegalovirus UL36 gene controls caspase dependent and -independent cell death programs activated by infection of monocytes differentiating to macrophages*. J Virol, 2010. 84(10): p. 5108-23.
62. Obar, J.J., et al., *T-cell responses to the M3 immune evasion protein of murid gammaherpesvirus 68 are partially protective and induced with lytic antigen kinetics*. J Virol, 2004. 78(19): p. 10829-32.
63. Gilbert, M.J., et al., *Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product*. Nature, 1996. 383(6602): p. 720-2.
64. McLaughlin-Taylor, E., et al., *Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes*. J Med Virol, 1994. 43(1): p. 103-10.

**Table 1. Global overview of the RNASeq data of uninfected and infected cells**

	<b>Sample (replicate)</b>	<b>CMV mapped reads</b>
<b>MRC-5</b>	Uninfected control (1)	1,287
	Uninfected control (2)	747
	AD169-8 hpi (1)	419,318
	AD169-8 hpi (2)	321,025
	AD169-24 hpi (1)	347,312
	AD169-24 hpi (2)	365,638
	AD169-48 hpi (1)	1,307,679
	AD169-48 hpi (2)	1,116,200
<b>ARPE-19</b>	Uninfected control (1)	5,770
	Uninfected control (2)	4,777
	CMV BADrUL131 -16 hpi (1)	313,621
	CMV BADrUL131 -16 hpi (2)	427,743
	CMV BADrUL131 -36 hpi (1)	1,797,717
	CMV BADrUL131 -36 hpi (2)	1,589,482
	CMV BADrUL131 -48 hpi (1)	2,119,769
	CMV BADrUL131 -48 hpi (2)	2,310,159

**Table 2. Differential transcription (fold change) of MAT during the infection of ARPE-19 vs. MRC5**

<b>GENE</b>	<b>IE (log<sub>2</sub>FoldChange)</b>	<b>E (log<sub>2</sub>FoldChange)</b>	<b>L (log<sub>2</sub>FoldChange)</b>	<b>Function</b>
UL4	0.298	2.215	0.204	Glycoprotein
UL13	-1.729	0.376	0.225	Unknown
UL17	-1.366	1.349	1.731	Unknown
UL48A	-1.871	1.397	0.083	Structural
UL74A	-1.416	2.369	1.542	Structural
US3	-3.263	1.000	0.437	Immune evasion
US2	-0.773	1.475	1.199	Immune evasion
UL51	-0.741	0.201	-0.741	Replication/encapsulation
UL112	-1.668	1.094	0.964	Replication/encapsulation
UL26	-1.373	1.069	1.194	Impact IE gene expression
US9	-1.046	1.488	0.963	Unknown
UL36	-1.026	0.618	0.984	Apoptosis
UL100	-0.840	3.623	2.602	Glycoprotein M
UL29	-2.205	-0.455	-0.110	Impact IE gene expression
UI41a	0.646	2.305	1.383	Unknown
UL5	1.057	3.432	1.213	Unknown
US20	1.195	1.424	0.910	Immune evasion
UL40	1.097	2.575	1.799	Immune evasion
UL42	0.770	2.408	1.400	Immune evasion
US18	1.751	2.068	1.513	Immune evasion
US34A	1.869	1.599	0.753	Unknown
US10	1.896	2.154	2.702	Immune evasion
US11	1.283	1.339	1.831	Immune evasion
US19	0.724	1.337	0.794	Unknown
UL78	0.674	1.642	1.307	Structural

Figure 1

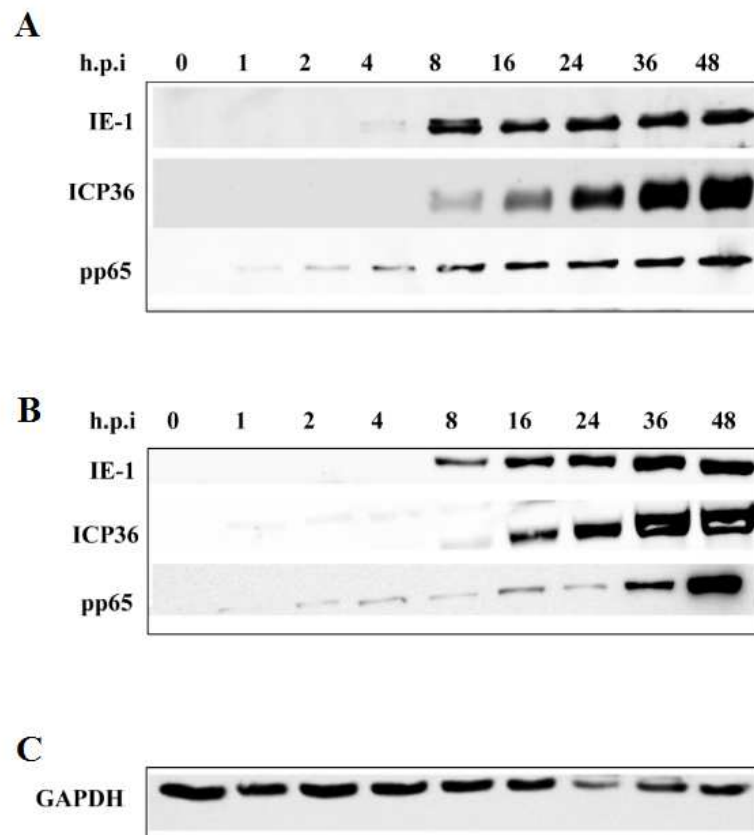
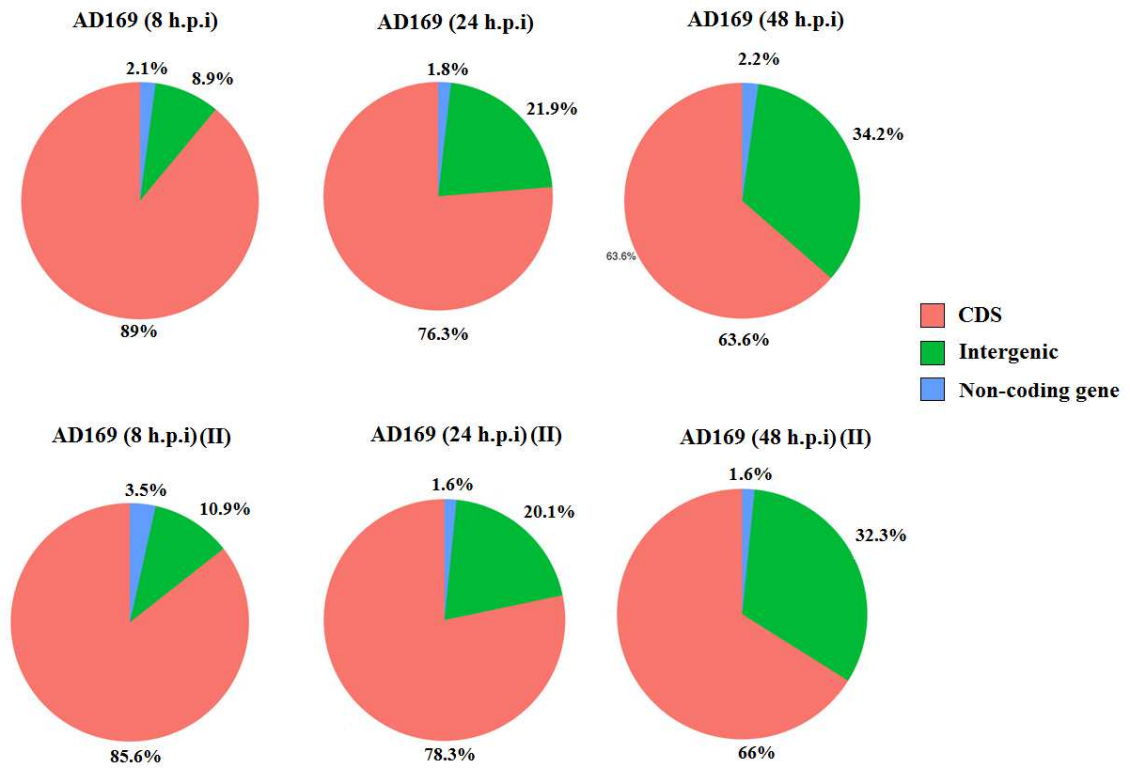




Figure 2

A



**B**

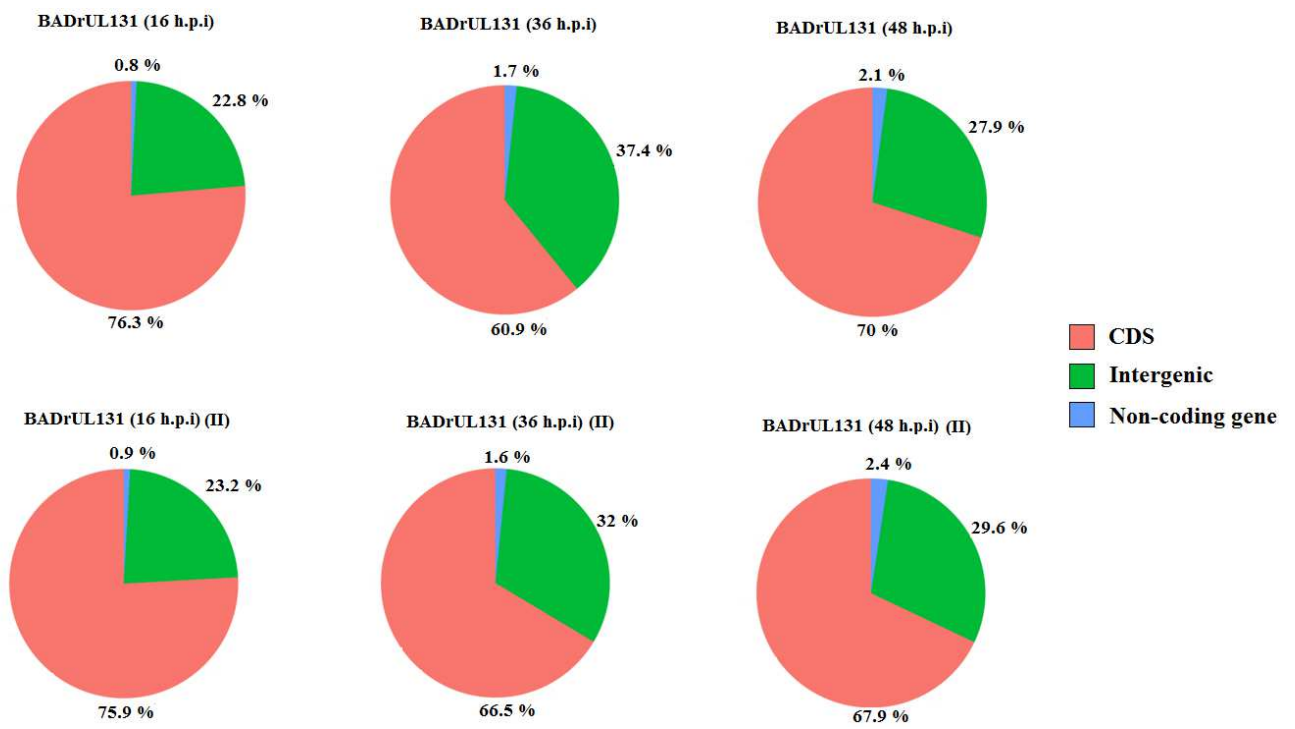


Figure 3

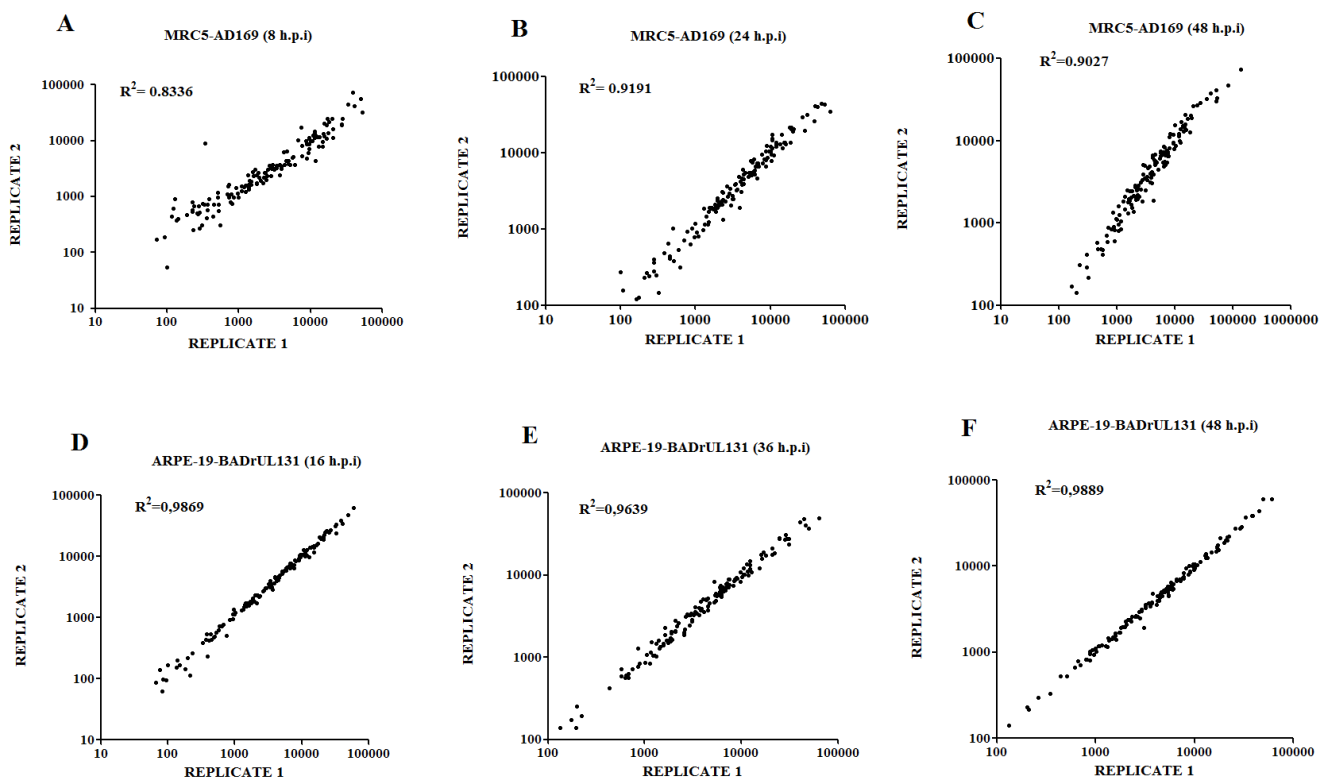
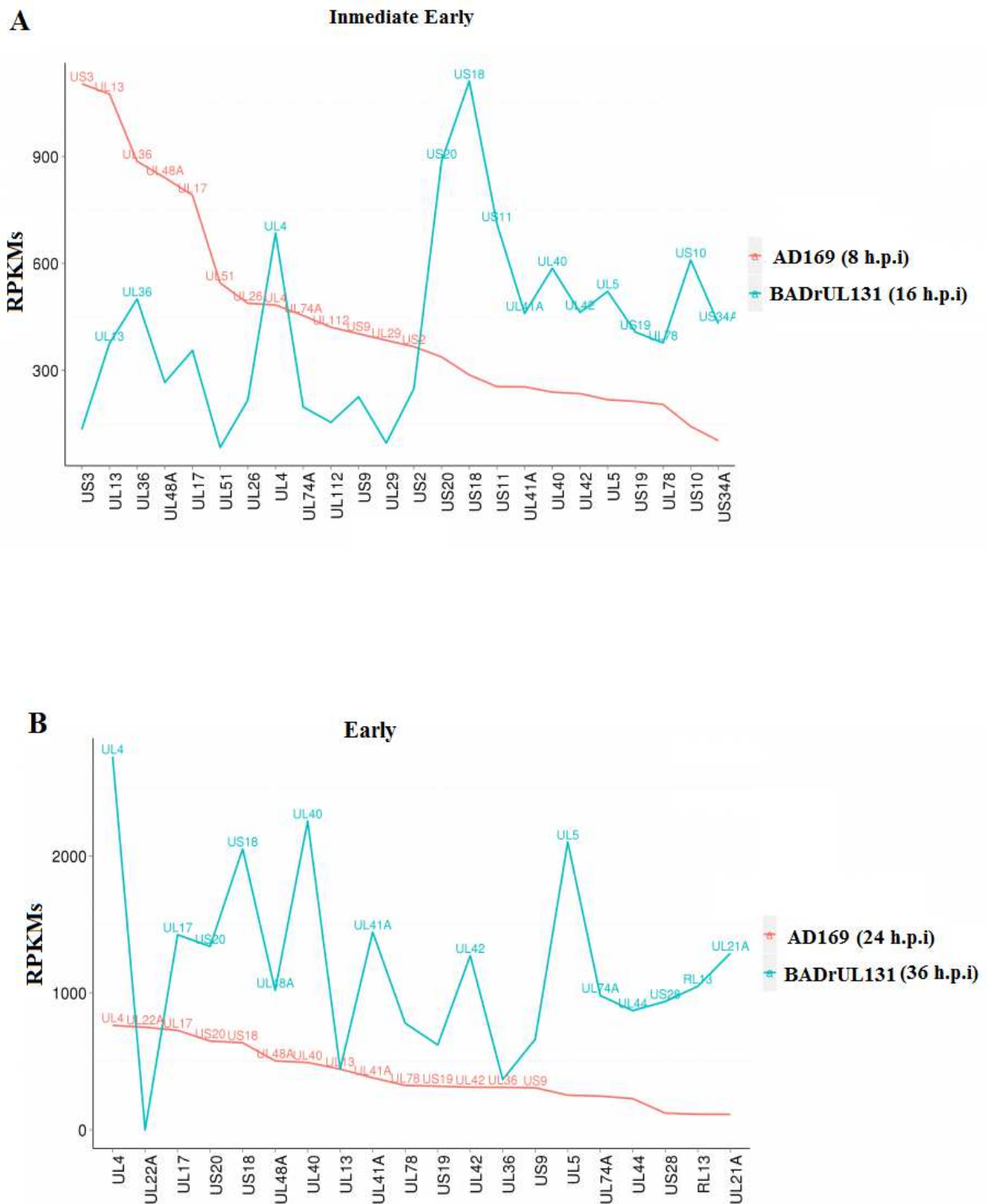


Figure 4



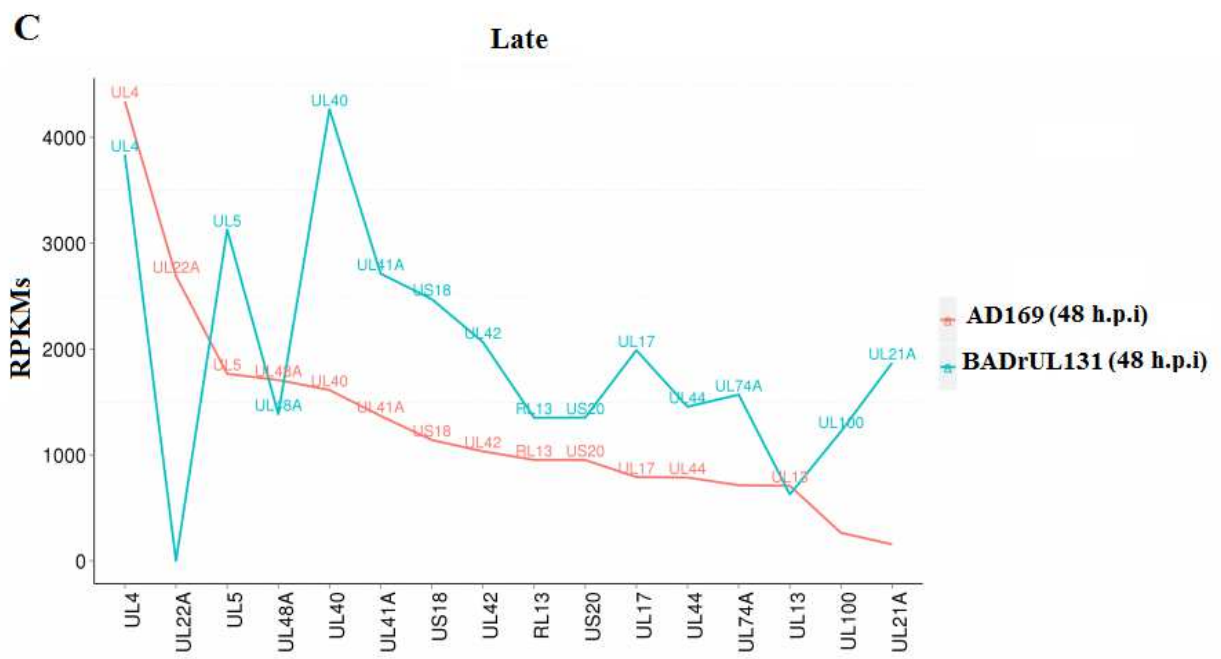
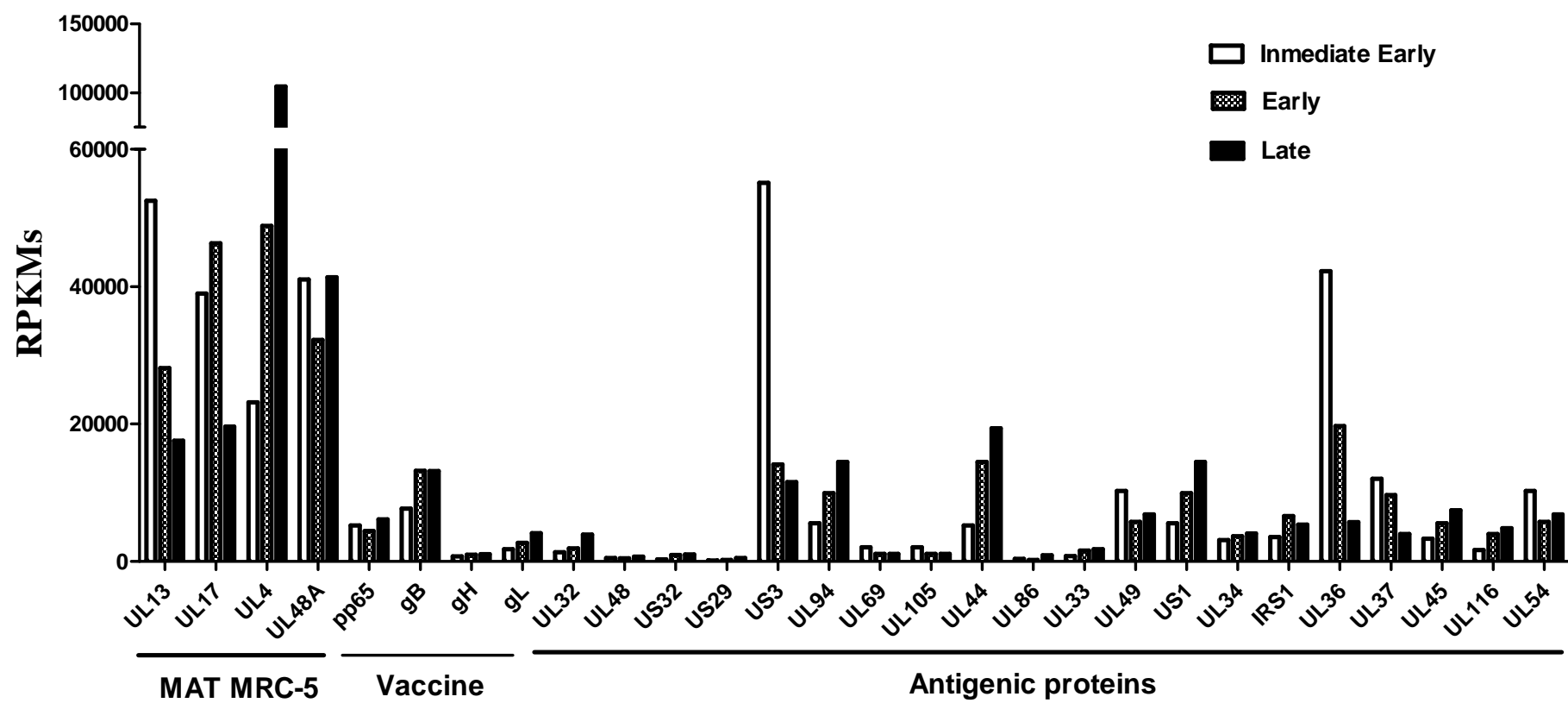
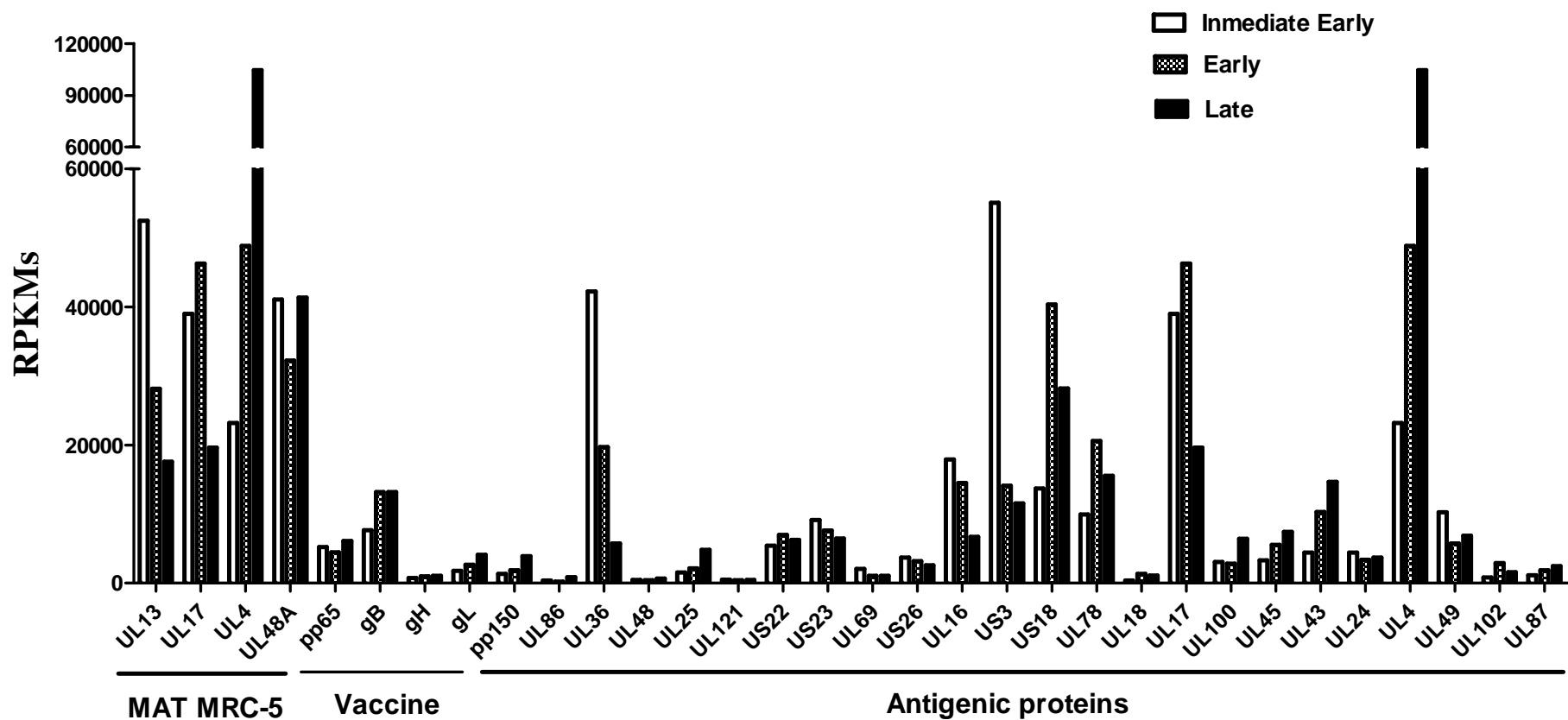


Figure 5

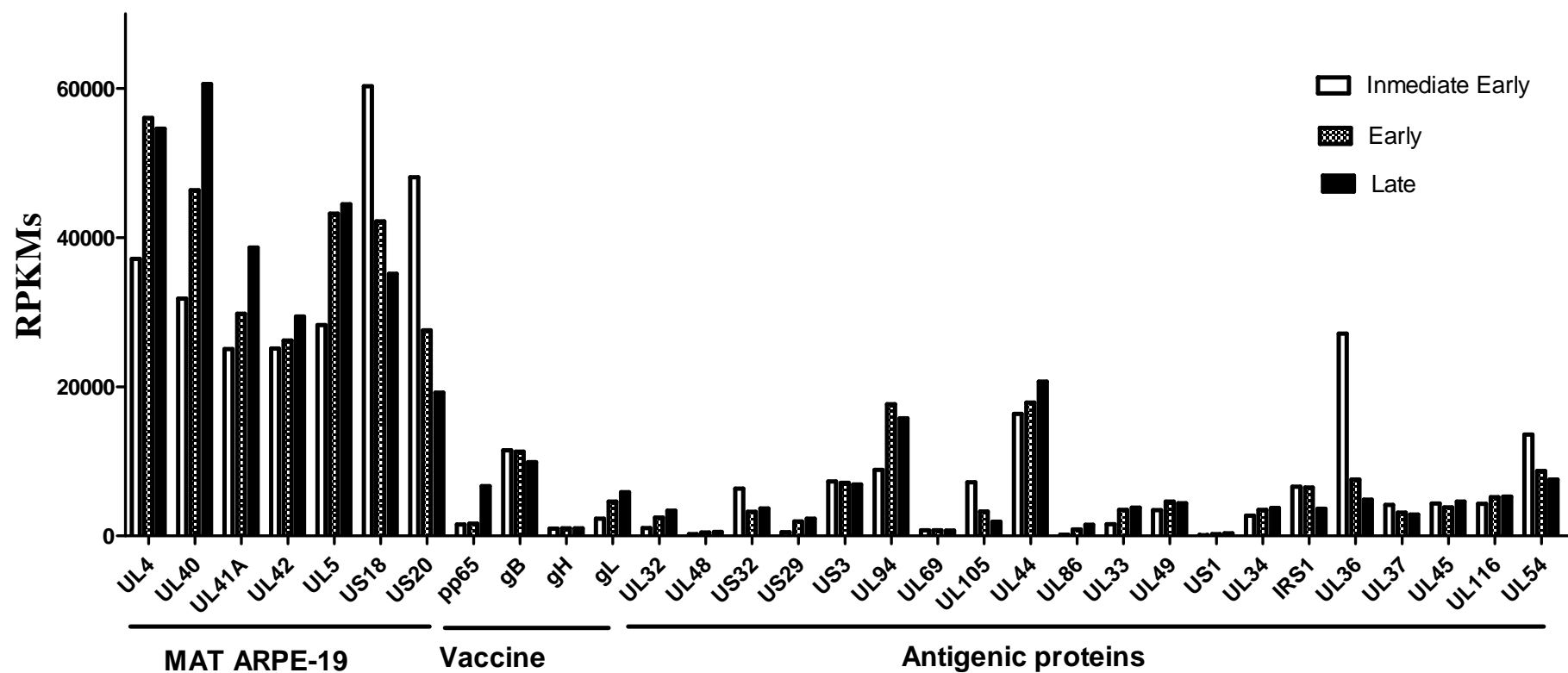
A



**B**

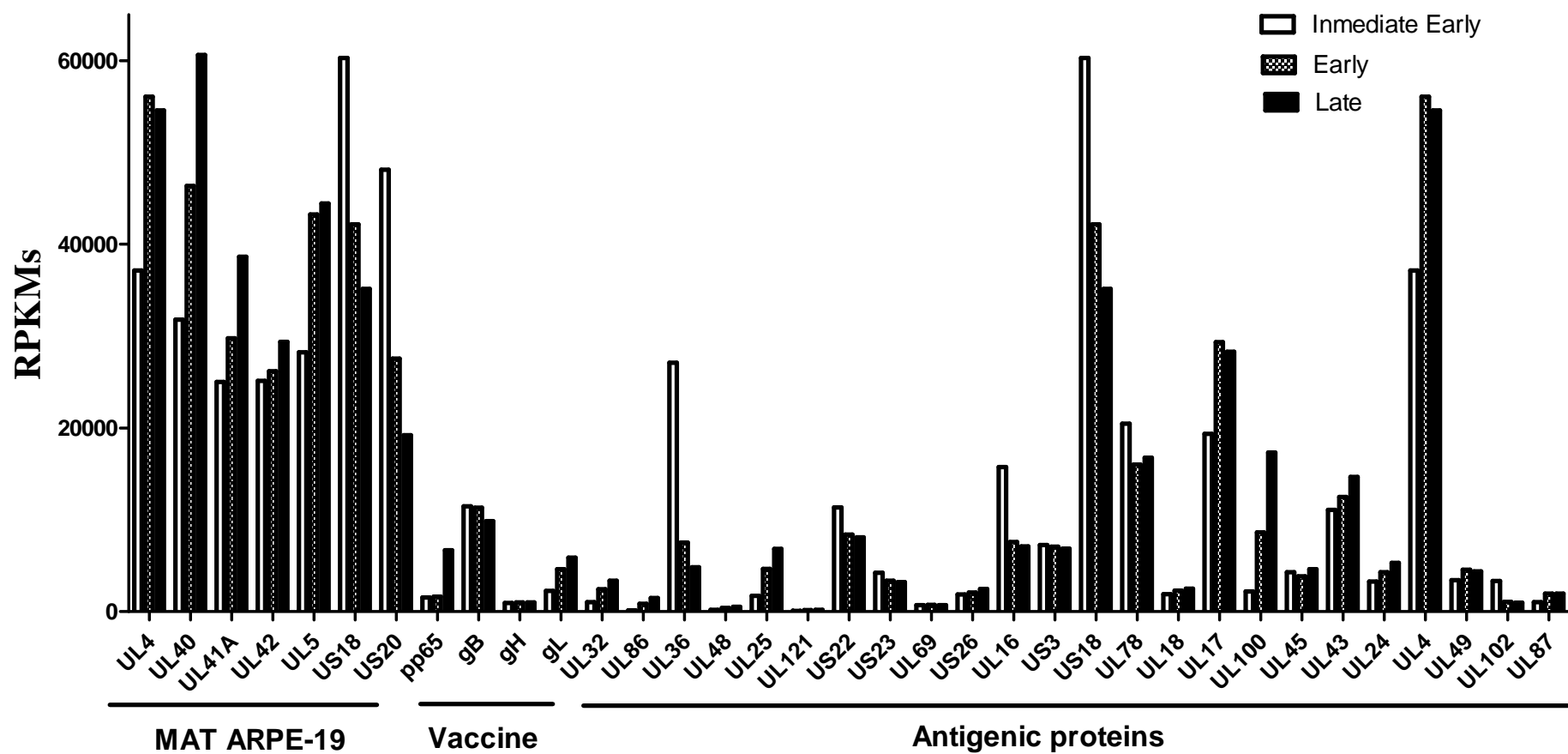


C





D



---

**Figure Legends**

**Figure 1. Timing identification of the immediate-early (IE), early (E) and late (L) phases of infection by Western blot.** Proteins from mock and infected MRC-5 (A) or ARPE-19 (B) cells at the indicated time post-infection were subjected to western blot to analyze the level of expression of three proteins: IE-1, ICP36 and pp65, known to be expressed at immediate early, early and late phases of infection, respectively.

**Figure 2. Viral transcriptome analysis overview.** Pie chart showing the proportion of reads obtained from RNA-seq that were assigned to CMV annotated CDS (pink), intergenic region (green) and non-coding gene (blue) during the infection of MRC5 (A) and ARPE19 (B) in the duplicate experiments (II).

**Figure 3. Reproducibility of RNA-sequencing.** The correlation of reads per kilobase per million (RPKM) values from the viral RNA measurements of the duplicated experiments was analyzed for both MRC5 (A, B, C) and ARPE19 (D, E, F) infection. The variability of the regression model is represented by the R square value.

**Figure 4. Most abundant transcripts (MAT) after HCMV infection.** The 10 % most abundant transcripts at immediate early (A), early (B) and late (C) phases during infection were selected. The RPKMs (*y axis*) obtained for each gene (*x axis*) are represented for the infection of MRC5 (blue line) and ARPE-19 (red line).

**Figure 5. Identification of MAT levels of proteins known to induce an CMV-specific immune response.** MAT levels were compared with those antigens traditionally used in the formulation of CMV vaccine and other antigens identified as antigenic in the bibliography. A, B) Transcription levels expressed as reads per kilobase per million (RPKM; *y axis*) for MAT (UL113, UL17, UL4 and UL48a),

antigens that have previously been used for CMV vaccine formulation (pp65, gB, gH, gL, and IE-1) and other open reading frames (ORFs) recognized by CD8<sup>+</sup> T-cells (A) and CD4<sup>+</sup> T-cells (B) during infection of fibroblast cells (MRC5). C, D) Transcription levels expressed as RPKMs (*y axis*) for MAT (UL4, UL40, UL41A, UL42, UL5, US18, US20) traditional CMV antigens (UL83, UL123, UL55, UL75,) and other ORFs recognized by CD8<sup>+</sup> T-cells (C) and CD4<sup>+</sup> T-cells (D) during infection of epithelial cells (ARPE19).

## ***V. Resumen de resultados***

A continuación, se presentan los resúmenes de los dos artículos incluidos en esta tesis doctoral.

## **Artículo 1**

### **Título**

**Use of Antibodies Neutralizing Epithelial Cell Infection to Diagnose Patients at Risk for CMV-Disease After Transplantation.** *Blanco-Lobo P, Cordero E, Martín-Gandul C, Gentil MA, Suárez-Artacho G, Sobrino M, Aznar J, Pérez-Romero P.*

### **Introducción**

La infección por CMV continúa siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad tras el trasplante de órgano sólido (TOS) [246]. Aunque la utilidad de la monitorización de la respuesta celular T específica de CMV ha sido investigada en varios escenarios tras el trasplante, es necesario establecer puntos de corte de parámetros inmunológicos que puedan ser usados para determinar el riesgo de infección por CMV para su utilidad clínica [133, 134, 247]. En este sentido, el papel que juegan otros componentes del sistema inmune, como la respuesta humoral, se ha caracterizado poco [175-177] y la mayoría de datos relacionados con la capacidad de los anticuerpos neutralizantes de controlar la infección por CMV provienen de estudios de infección congénita [176]. Aunque la detección pre-trasplante de IgG específicas de CMV se utiliza para establecer el riesgo de los pacientes que reciben un trasplante de desarrollar infección por CMV postrasplante, la relación entre la seroconversión y los niveles de IgG tras el trasplante y el riesgo de desarrollar infección no se ha estudiado en profundidad. En un meta-análisis, en el que se analizaron 698 receptores de TOS, se relacionó el aumento de la supervivencia global y la reducción de la enfermedad por CMV tras la administración de inmunoglobulinas [178]. La mayoría de estudios de anticuerpos neutralizantes se han realizado *in vitro* en modelos celulares de infección por CMV utilizando fibroblastos, aunque las células epiteliales y endoteliales constituyen la primera barrera durante la infección natural de CMV. Por este motivo el uso de fibroblastos como modelo de infección podría estar proporcionando resultados parciales de la respuesta de anticuerpos específicos de CMV, y sería de interés evaluar la producción de anticuerpos que neutralizan la infección de CMV en células epiteliales y su relación con la evolución clínica de los pacientes durante el primer año pos-trasplante [187-190]. De hecho, Gerna *et*

*al.* en un estudio con 18 mujeres embarazadas con infección primaria por CMV y 5 receptores de trasplante de órgano sólido mostró que la actividad neutralizante de la infección por CMV era 128 veces más elevada cuando se testaba en células epiteliales comparado con fibroblastos [190].

La infección por CMV en receptores de TOS de alto riesgo de infección por CMV (pacientes seronegativos que reciben un órgano de un paciente seropositivo (D+/R-), es un contexto ideal para la caracterización de la respuesta inmune específica de CMV por un número de razones. En primer lugar, los pacientes no han tenido infección previa por CMV y aproximadamente un 50% de ellos desarrollan infección primaria tras la discontinuación de la profilaxis [130]. Por tanto, la respuesta específica de CMV puede ser caracterizada *de novo*. Además, en un estudio previo se ha demostrado que los pacientes TOS de alto riesgo de infección por CMV que reciben tratamiento anticipado son capaces de controlar la infección tras la adquisición de una respuesta inmune celular T específica de CMV [133, 167, 177, 194, 248], por tanto sería ideal estudiar los parámetros de la respuesta inmune que se relacionan con la protección frente a la infección.

### **Objetivo**

El objetivo de este estudio fue definir parámetros de la respuesta humoral y celular específica de CMV relacionados con el control de la infección por CMV y enfermedad en una cohorte de pacientes TOS de alto riesgo de infección por CMV (D+/R-).

### **Metodología**

Se llevó a cabo un estudio prospectivo observacional en el que se incluyeron pacientes de alto riesgo (D+/R-) de infección por CMV desde Abril del 2007 a Diciembre del 2014. El seguimiento de los pacientes se realizó mediante extracción de muestras de sangre de forma semanal durante los 3 primeros meses tras el trasplante, cada dos semanas entre los meses 3 y 6, y mensualmente hasta finalizar el primer año pos-trasplante. Todos los pacientes recibieron terapia anticipada, que consistía en valganciclovir (900 mg/12hr) cuando el resultado de la monitorización virológica por PCR a tiempo real era superior al límite de detección de la técnica. El tratamiento continuaba durante dos semanas o hasta finalizar el episodio de replicación, definido como el periodo de tiempo con viremia detectable (por encima del límite de detección). Los episodios de replicación que ocurrían tras la detección de una respuesta celular específica no fueron tratados y pacientes fueron

monitorizados [133]. Sin embargo, si se producía un incremento significativo de la carga viral (duplicada en un periodo de 24 horas) los pacientes fueron tratados para evitar un aumento incontrolado de la misma.

La monitorización de la respuesta celular T se realizó mediante la cuantificación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos de CMV productores de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo. Los porcentajes de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados fueron normalizados al control negativo y se consideraron positivos aquellas muestras cuyo porcentaje de CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> que expresaban IFN- $\gamma$  superaba el 0,25%.

El título de anticuerpos neutralizantes se determinó 2 semanas después del trasplante, 5 semanas después de cada episodio de replicación y al final del seguimiento por ensayo de microneutralización [249]. El título de anticuerpos neutralizantes fue definido como el título del suero del paciente que reducía en un 50% la infección comparado con un control infectado. De esta forma, los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinaron usando la siguiente fórmula: [(media DO de células VC)-(media DO de células CC)]/2.

Finalmente, los anticuerpos IgG fueron cuantificados usando Elecsys 2010 (Roche) y las muestras fueron consideradas positivas cuando eran mayores de 1 IU/ml.

La significación estadística de las diferentes medianas se realizó aplicando el test de Mann-Whitney y Wilcoxon. Para el análisis de variables categóricas se realizaron el test de Chi-cuadrado o test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de *p* menor de 0.05. Para determinar el punto de corte de anticuerpos neutralizantes que correlacionaba con protección frente a CMV se realizó una curva ROC. La sensibilidad, especificidad, PPV y NPV se obtuvieron mediante el software G-Stat (version 2.0). Finalmente la correlación entre variables se analizó mediante el test de correlación de Pearson y modelos de regresión logística se usaron para estudiar el efecto de la respuesta inmune en la protección frente a CMV. Todos los análisis estadísticos se realizaron con ayuda de la versión 15.0 del SPSS.

## **Resultados y discusión**

Aunque varios estudios han demostrado que la respuesta celular T específica de CMV se asocia con la aclaración espontánea de la viremia de CMV, un pequeño porcentaje de pacientes con una respuesta celular T positiva están aún en riesgo de desarrollar

enfermedad tardía por CMV. Por ello en este estudio analizamos parámetros de la respuesta inmune humoral específica de CMV como los anticuerpos IgG o anticuerpos neutralizantes tras el trasplante. En concordancia con estudios previos, encontramos un perfil de seroconversión muy heterogéneo en el tiempo y con niveles de IgG altamente variables tras el trasplante que no se relacionó con el número de eventos de replicación y con la carga viral. Por tanto, concluimos que la serología tiene una escasa utilidad clínica como predictor de desarrollo de enfermedad por CMV tras el trasplante.

Una de las principales novedades de nuestro estudio es que demostramos que los pacientes con serología pretrasplante negativa para CMV desarrollan *de novo* una inmunidad humoral mediada por un amplio rango de anticuerpos neutralizantes. Nuestros resultados corroboran una asimetría en la cinética de producción de anticuerpos neutralizantes, con 64 veces más anticuerpos neutralizantes de la infección de células epiteliales en comparación con anticuerpos neutralizantes que bloquean infección de fibroblastos en estos pacientes al final del seguimiento. Aunque no encontramos relación entre los títulos de anticuerpos capaces de bloquear la infección de fibroblastos y la protección frente a la infección o la progresión clínica del paciente tras el trasplante, sí fuimos capaces de definir un punto de corte de títulos de anticuerpos neutralizantes de infección de epitelio ( $\geq 480$ ) que se correlaciona con la disminución de la infección y la protección frente a la enfermedad por CMV.

Nuestros resultados sugieren que la cuantificación de los títulos de anticuerpos neutralizantes de la infección de células epiteliales (título  $\geq 480$ ), además de la respuesta celular T ( $CD8^+$   $IFN-\gamma^+ \geq 0,25\%$ ), podría ser útil para distinguir entre pacientes que requieren una monitorización más cercana y aquello que presentan un menor riesgo de desarrollar enfermedad por CMV. De esta forma, la combinación de la monitorización virológica e inmunológica de los pacientes podría optimizar la administración de la terapia anticipada en pacientes de alto riesgo de infección por CMV. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios prospectivos con cohortes de pacientes más numerosas para confirmar los resultados presentados.



---

### Artículo 3

#### Título

**Using Transcriptional Profile During Cytomegalovirus Infection of Human Fibroblast and Epithelial Cells for Antigen Identification** . Blanco-Lobo P, Rueda A, López FJ, Vela-Boza A, Pérez-Romero P

#### Introducción

La infección por CMV es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeprimidos como son los pacientes trasplantados de órgano sólido [246] además de estar asociada a daños neurológicos en el feto cuando se produce una infección primaria durante el embarazo [250]. Por ello, el instituto de medicina americano (IOM) el ha identificado el desarrollo de una vacuna frente a CMV como una prioridad de salud pública. Desde los años 70, se han desarrollado varios candidatos de vacunas incluyendo vacunas de virus atenuados, péptidos o proteínas recombinantes, plásmidos de ADN, partículas víricas no infectivas (término en inglés *virus like particle*), y vectores con proteínas de la envuelta [149]. El número de antígenos de CMV evaluados como candidatos de vacuna en ensayos preclínicos y clínicos ha sido relativamente bajo. La mayoría de estas vacunas, excepto la vacuna basada en virus atenuados, se han formulado usando la glicoproteína gB [230] para promover una respuesta humoral y las proteínas IE-1 y pp65 para promover una respuesta celular, especialmente de linfocitos T [231]. Sin embargo, ninguna de ellas ha llegado a ser licenciada hasta la fecha para su uso en humanos, por lo que sigue existiendo la necesidad de evaluar nuevos antígenos virales como candidatos de vacuna frente a CMV que puedan inducir una respuesta inmune más robusta aumentando los efectos protectores de la vacunación.

Debido a la gran cantidad de ORFs del genoma de CMV, la caracterización de la respuesta inmune inducida por cada una de las proteínas de forma individual requeriría mucho tiempo y un coste elevado. En este contexto, el uso de las nuevas tecnologías emergentes, genómica, transcriptómica y proteómica, podrían ser útiles para identificar antígenos virales con las características deseables para el diseño de una vacuna. Las técnicas basadas en el análisis de transcriptoma, pueden identificar genes virales altamente expresados durante la infección de diferentes tipos celulares, como han sugerido estudios recientes en los que se empleaba el RNA-Seq para caracterizar el transcriptoma de CMV humano y

murino durante la infección [232, 233]. Los productos de estos genes podrían ser interesantes para el desarrollo de vacunas como antígenos capaces de estimular la respuesta celular dirigida a células infectadas. El hecho de que estudios de transcriptómica basados en *microarray* demuestren que los genes que codifican para IE-1 y pp65, que inducen una respuesta celular que correlacionada con el control de la replicación viral [251-253] están altamente expresados durante la infección [254] apoyan esta hipótesis.

La introducción de la tecnología de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) para la secuenciación de ADN y ARN ha revolucionado el estudio de la biología molecular y genómica y ha permitido la identificación de nuevas ORFs o no anotadas [255]. El análisis del transcriptoma de fibroblastos infectados con la estirpe Merlin (a las 72 horas pos-infección) utilizando RNA-Seq demostró que la transcripción del genoma de CMV es más compleja y multifacética que lo que se había descrito hasta la fecha con un gran número de regiones codificantes de proteínas, eventos de *splicing* alternativo y ARNs no codificante como transcritos solapados y antisentido [232].

Aunque los estudios transcripcionales realizados en CMV se han centrado en la caracterización de la expresión de genes virales durante la infección y han proporcionado información importante aunque parcial. Por ejemplo, en estudios en los que utilizan *microarray* se ha determinado la abundancia relativa sólo de los transcritos incluidos en el diseño del *array*. Por su parte, los estudios de transcriptoma de CMV utilizando RNA-Seq se realizaron utilizando únicamente el modelo de fibroblasto. Aunque el modelo de infección por CMV de fibroblastos ha sido el más utilizado, CMV es capaz de infectar un gran número de tipos celulares estableciendo una interacción compleja con el hospedador. Por ejemplo, las células epiteliales juegan un papel importante durante la transmisión inter-hospedador de la infección por CMV ya que constituye la principal barrera de entrada durante la infección natural. Además, nuestros datos y otros de estudios previos han demostrado que los anticuerpos neutralizantes específicos de CMV que bloquean la infección de fibroblastos están presentes a bajos niveles en el suero de pacientes durante el curso de la infección, mientras que la mayoría de anticuerpos neutralizantes detectados están principalmente dirigidos a bloquear la infección de células epiteliales. En conjunto estos resultados podría indicar que las células epiteliales pueden jugar un papel esencial durante la infección y diseminación de la infección por CMV *in vivo*.

## Objetivo

Analizar y comparar mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS) el perfil de expresión de los genes de CMV durante la infección de fibroblastos y células epiteliales para identificar los transcritos virales más y diferencialmente expresados durante la infección de ambos tipos celulares, para identificar antígenos potenciales para el diseño de una vacuna.

## Metodología

La identificación del mejor tiempo pos-infección que representara las tres fases temporales de expresión de los genes de CMV (inmediatamente temprana IE, temprana E y tardía L) tanto en fibroblastos MRC-5 como en epitelio ARPE-19 se realizó detectando el pico de expresión de proteínas expresada en las fases IE (proteína IE-1), E (ICP36), y L (pp56) en ambos tipos celulares por western blot.

Para preparar el ARN de células infectadas y no infectadas por CMV para el análisis por RNA-Seq, las células MRC-5 y ARPE-19 en frasco de cultivo de 75cm<sup>2</sup> fueron infectadas a 3 M.O.I con las estirpes AD169 y BADrUL131-Y4, respectivamente y el ARN fue extraído a las 8, 24, y 48 horas pos-infección para las MRC-5 y a las 16, 36 y 48 horas para ARPE-19, todas ellas por duplicado. La calidad y pureza de las preparaciones de ARN fue determinada por absorbancia y la integridad del ARN fue comprobada por electroforesis previamente a la construcción de las librerías para su análisis por RNA-Seq.

Para realizar los análisis bioinformáticos, las lecturas o *reads* únicas se mapearon frente a una secuencia de referencia formada por el Genoma Humano (build GRCh37, hg19) y el Genoma del virus (HCMV AD169 strain, GenBank accession no. X17403). Se realizaron dos rondas de mapeo: el primer paso de mapeo se llevó a cabo usando TopHat v1.4.1 [256]. A continuación, las *reads* que no mapearon fueron re-mapeadas usando SHRIMP v2.2.3 [257]. Los resultados obtenidos de ambos mapeos fueron fusionados y el conteo de las *reads* para cada gen se obtuvo usando el paquete HTSeq-count (intersection non-empty mode) con las anotaciones de humano (ENSEMBL) y del genoma del virus. A continuación, se identificaron los transcritos más abundantes (MAT). Para ello, los valores de RPKM fueron calculados desde los conteos de cada gen [258]. La lista de MAT fue

---

calculada basándonos en el 10% de transcritos más abundantes para cada tipo de muestra (MRC-5 o ARPE-19) en cada tiempo (IE, E, L).

## Resultados y discusión

Determinamos los tiempos a los que los niveles de proteínas fueron similares para ambos tipos celulares siguientes: 8hpi (IE-1), 24 hpi (ICP36) y 48hpi (pp65) para MRC-5; y 16 hpi (IE-1), 36 hpi (ICP36) y 48hpi (pp65) para ARPE-19.

Los resultados de las réplicas biológicas de RNA-Seq para cada uno de los tiempos durante la infección de ambos tipos celulares fue altamente reproducible. Nuestros resultados demuestran que una gran cantidad de transcritos virales diferían entre ambos tipos celulares infectados por CMV, fibroblastos vs. células epiteliales. Los niveles de los MAT expresados en *reads per kilobase of transcript per million mapped reads* (RPKM) eran en general siempre mayores comparados con los RPKM de las proteínas utilizadas en estudios previos como vacunas. Además, observamos que los MAT UL4, UL17 y US18 son inductores de una respuesta de células T CD4<sup>+</sup>, mientras que UL44, UL36 y US3 inducen una respuesta de células T CD8<sup>+</sup>. Postulamos que los genes más expresados durante la infección por CMV si además tienen un papel importante en la estimulación de una respuesta inmune específica frente a CMV podrían ser buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna frente a CMV. En base a esta hipótesis, UL36 y US3 transcritos altamente expresados podrían ser de especial interés por su capacidad de activar tanto una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, activando tanto una respuesta citotóxica, como de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV. Además, debido a que las células epiteliales son la primera barrera biológica encontrada por CMV y que la respuesta humoral específica de CMV tras la infección natural está dirigida especialmente a bloquear la infección de células epiteliales, US18, detectado en nuestro estudio como el mayor MAT durante las tres fases de infección por CMV de células epiteliales, podría ser un buen candidato a vacuna ya que además presenta la capacidad de activar la respuesta celular mediada por células T CD4<sup>+</sup>.



## ***VI. Discusión***

A pesar del desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y las ventajas aportadas por las diferentes estrategias de tratamiento, la infección por CMV continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tras el trasplante. Los receptores de trasplante seronegativos (R-) que reciben un órgano de un paciente seropositivo (D+) presentan un mayor riesgo de desarrollo de infección y enfermedad por CMV en comparación con los trasplantes realizados en el contexto de otras combinaciones serológicas. Los pacientes D+/R- pueden considerarse un contexto ideal para el estudio de la infección y de la inmunidad específica frente a CMV por varias razones. En primer lugar, estos pacientes no han desarrollado infección previa por CMV y aproximadamente el 50% de ellos desarrollan infección primaria durante el primer año pretrasplante tras la discontinuación de la profilaxis [130], por tanto la inmunidad específica frente a CMV puede ser caracterizada *de novo*. Además, estudios previos en estos pacientes de alto riesgo que reciben tratamiento anticipado han demostrado que tras la adquisición de una respuesta de células T específicas de CMV son capaces de controlar la infección por CMV sin necesidad de tratamiento lo que supone un marco ideal de estudio de la capacidad protectora de la inmunidad [133, 167, 177, 194, 248]

Una limitación sin embargo es la baja incidencia del trasplante de alto riesgo (D+/R-), que dificulta considerablemente la inclusión de los pacientes en este tipo de estudios. En general, de las estrategias empleadas para prevenir la enfermedad por CMV la profilaxis universal es la recomendada por las guías de tratamiento actuales para prevenir la infección por CMV en receptores TOS de alto riesgo de infección por CMV (R-/D+) [80, 259-261]. Por este motivo la mayoría de estudios publicados en pacientes de alto riesgo utilizan profilaxis universal para prevenir la infección por CMV. Se han realizado un número relativamente bajo de estudios en el contexto de terapia anticipada, probablemente también debido a la complejidad de implementar esta estrategia en la rutina clínica. En estudios previos realizados en nuestro grupo demostramos que la estrategia de tratamiento anticipado es segura y efectiva para la prevención de enfermedad por CMV en pacientes TOS de alto riesgo [138, 262-265]. Además en estos pacientes, la adquisición de la inmunidad específica de células T frente a CMV ocurre de forma temprana tras el trasplante probablemente como resultado de la interacción entre el sistema inmune del paciente y el virus durante los periodos de viremia monitorizadas [133, 134, 266]. Esta respuesta se relacionó con una menor incidencia de replicación por CMV, un aumento de

los casos de aclaración espontánea de la viremia y una menor incidencia de enfermedad por CMV postrasplante [133]. En este contexto, se ha debatido ampliamente la posibilidad de utilizar la determinación de la respuesta de células T ( $CD8^+IFN-\gamma^+$ ) específica frente a CMV para la monitorización tras el trasplante e incluso en el periodo pretrasplante para predecir el riesgo de infección por CMV y de enfermedad tardía postrasplante [167, 169, 170, 194, 247]. A pesar del efecto terapéutico que presenta la inmunidad celular frente a CMV, una minoría de pacientes de hasta el 10% continúa desarrollando enfermedad tardía por CMV a pesar de contar con inmunidad específica frente a CMV [167, 247]. Este hecho podría sugerir que el punto de corte para definir la respuesta celular específica de CMV positiva debe ser incrementado, o bien, que deberían considerarse además otros marcadores del sistema inmune adaptativo, como por ejemplo el nivel de anticuerpos neutralizantes, para monitorizar a los pacientes trasplantados.

Las principales novedades este trabajo son:

1) Se trata de un estudio en el que los pacientes con inmunidad celular no reciben tratamiento anticipado para promover el aclaramiento espontáneo siendo monitorizados para evitar eventos incontrolados de replicación.

2) Es el primer estudio en el que se caracteriza tras el trasplante la cinética de la adquisición de la respuesta inmunidad humoral de anticuerpos neutralizantes, de la seroconversión y la inmunidad celular en una cohorte de receptores de trasplante de órgano sólido de alto riesgo de infección por CMV (D+/R-).

3) Es el primer estudio en caracterizar la relación de la respuesta inmune celular y humoral y su relación con la protección frente a la infección postrasplante y proponer puntos de corte de protección frente a la enfermedad por CMV.

En el estudio desarrollado en esta tesis en una cohorte de receptores de TOS D+/R- confirmamos que el tratamiento anticipado es seguro y eficaz ayudando al desarrollo *de novo* de una respuesta inmune de linfocitos  $CD8^+IFN-\gamma^+$  específica de CMV. Además, en concordancia con los datos publicados anteriormente en nuestro laboratorio encontramos una correlación inversa entre la cinética de adquisición *de novo* de una respuesta celular específica de CMV y la incidencia de episodio de replicación, con un menor número de



episodios, de menor duración y por tanto una disminución en la administración de tratamiento antiviral. Adicionalmente, para ampliar el estudio de la inmunidad específica y como principal novedad de este estudio se analizó la cinética de adquisición de la respuesta humoral mediada por anticuerpos neutralizantes. Observamos que la adquisición de anticuerpos neutralizantes frente a la infección por CMV es más tardía comparada con la respuesta de células T, y se relaciona con la protección frente a la infección y especialmente frente a enfermedad por CMV. Asimismo, logramos establecer un punto de corte de títulos de anticuerpos que neutralizan la infección de células epiteliales ( $AbNEI \geq 480$ ) que se asoció con la protección frente a la infección por CMV y frente al desarrollo de enfermedad. En la cohorte estudiada, ninguno de los pacientes con respuesta inmune de linfocitos  $CD8^+$   $IFN-\gamma^+$  específica de CMV y con títulos de anticuerpos neutralizantes de infección de células epiteliales superior al punto de corte establecido desarrolló enfermedad por CMV.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral serán discutidos en detalle a continuación.

### **Infección y enfermedad por CMV en el paciente trasplantado de alto riesgo (D+/R-) que recibe tratamiento anticipado.**

Como se ha introducido previamente los receptores de órgano sólido seronegativos, sin inmunidad específica frente a CMV, que reciben un órgano de un donante seropositivo para CMV son especialmente vulnerables a la infección por CMV. Concretamente, los pacientes trasplantados de riñón, corazón o hígado de alto riesgo (D+/R-) presentan una probabilidad de entre un 30-75% de desarrollar una infección por CMV tras discontinuar la profilaxis [130, 267]. En el presente estudio el 93,6 % de los pacientes de alto riesgo que recibieron tratamiento anticipado desarrollaron al menos un episodio de replicación, una incidencia similar a la publicada por otros estudios en los que se describe la prevalencia de infección en torno al 80% en estos pacientes [37, 268]. El análisis de la cinética de replicación de CMV en la cohorte estudiada demostró que la infección primaria se producía con una mediana de 4 semanas postrasplante coincidiendo con otros resultados publicados por otros autores [133, 268, 269]. De acuerdo a la bibliografía [37, 138, 270], estos episodios de infección primaria se caracterizaron por desarrollar picos de cargas virales más elevados y por tanto, una mayor duración de tratamiento comparado con los episodios de recurrencia. Por otro lado, un 38% de los episodios de recurrencia no

necesitaron tratamiento, probablemente debido a la adquisición previa de una inmunidad específica frente a CMV. Aquellos episodios recurrentes en los que se necesitó tratamiento, se caracterizaron por cargas virales inferiores que los episodios de infección primaria, lo que explica la menor duración de los tratamientos administrados.

Respecto a la enfermedad por CMV, se ha estimado que en pacientes de alto riesgo la incidencia de enfermedad tardía tras discontinuar la profilaxis puede ser incluso de entre el 30% y el 40% [130]. En la cohorte estudiada en este trabajo identificamos 4 (8.5 %) casos de enfermedad, uno de los cuales podría ser explicado por el incumplimiento del protocolo de monitorización por parte del paciente. Todos los casos identificados tuvieron una evolución favorable. La incidencia de enfermedad es variable, y depende de la estrategia de tratamiento utilizada así como de la serología del receptor [129, 167]. La baja tasa de enfermedad encontrada en nuestro estudio confirma que la monitorización de los receptores de TOS de alto riesgo (que reciben tratamiento anticipado), mediante la determinación de la inmunidad específica en paralelo a la monitorización de la infección como guía de administración del tratamiento es una estrategia segura y efectiva en la prevención de enfermedad por CMV y que promueve el desarrollo de una inmunidad con efecto terapéutico.

### **Papel de la inmunidad celular específica de células T en el control de la infección y enfermedad por CMV.**

Los resultados obtenidos demuestran que la administración del tratamiento anticipado en una cohorte de pacientes de alto riesgo de infección por CMV promueve la adquisición de una respuesta celular específica de células T protectora frente a la infección. Tomando como punto de corte un porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados que expresan IFN- $\gamma$  de 0,25 %, el 89,3% de los pacientes desarrollaron una respuesta celular positiva a lo largo del seguimiento. Tratando de profundizar en el papel de la respuesta celular específica de células T frente a la infección de CMV, numerosos trabajos han revelado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> tienen un papel fundamental en la respuesta adaptativa frente a CMV [266, 271-273]. Recientemente, Oriol *et al.* [167] demostraron que los niveles de IFN- $\gamma$  medidos tras la estimulación *in vitro* en pacientes de alto riesgo D+/R- (que recibieron la estrategia profiláctica frente a la infección por CMV) se correlacionaba

con el riesgo de desarrollar enfermedad por CMV una vez finalizado el periodo profiláctico. Los pacientes con un test positivo de inmunidad presentaban una menor incidencia de enfermedad por CMV cuando lo comparaban con pacientes cuyas determinaciones eran negativas o indeterminadas (6,4 % vs 22,2 % vs 58,3%, respectivamente;  $p < 0.001$ ). Sin embargo, este tema es controvertido ya que otros estudios no han encontrado asociación entre la producción de IFN- $\gamma$  por células CD4+ y CD8+ específicas de CMV y la protección frente a la infección o enfermedad por CMV [171, 274]. A pesar de ello, numerosas evidencias apoyan la monitorización de la respuesta inmune celular como estrategia de control del riesgo de infección y enfermedad en el periodo postrasplante [275, 276]. Sin embargo, existen pocos estudios de intervención en los que se demuestre que efectivamente la adquisición de la inmunidad específica frente a CMV es protectora frente a subsiguientes eventos de replicación. En el presente estudio de intervención confirmamos que la adquisición de la respuesta inmune específica de linfocitos T CD4+ y CD8+ tiene un efecto terapéutico frente a la infección por CMV ya que se relaciona con un número elevado de eventos de replicación que aclaran espontáneamente, además de una menor incidencia de replicación postrasplante, y con cargas virales pico menores. Como consecuencia, el número de pacientes tratados tras la adquisición de la respuesta inmune es menor, y en los casos en los que los pacientes reciben tratamiento, el periodo de administración es de menor duración.

A pesar del efecto terapéutico observado, Kumar *et al.* [247] y Oriol *et al.* [167] han descrito desarrollo de enfermedad en el 10 % y 6,4%, respectivamente de los pacientes trasplantados de alto riesgo estudiados, a pesar de contar con una inmunidad de células T CD8+IFN- $\gamma^+$  específica frente a CMV, y en el presente estudio del 4,2 %. En nuestra cohorte, dos de los cuatro pacientes que desarrollaron enfermedad presentaban una inmunidad específica de células T CD8+IFN- $\gamma^+$  positiva con niveles superiores al 0,25%. Es probable, por tanto, que en base a los diferentes puntos de corte de células reactivas a antígenos de CMV establecidos hasta la fecha para predecir protección frente a CMV, entre un 4-10 % de los pacientes D+/R- continúen en riesgo de desarrollar enfermedad por CMV. Estos resultados invitan a la reconsideración de dos aspectos no planteados hasta el momento: la posibilidad de incrementar el punto de corte de linfocitos T CD8+IFN- $\gamma^+$  para asegurar la protección del 100% de los pacientes frente a enfermedad por CMV o bien la consideración de otro tipo de respuesta adaptativa o marcadores inmunológicos

alternativos que puedan estar actuando de forma paralela como mediadores importantes en la protección frente a la infección y enfermedad por CMV. En este sentido, un incremento del punto de corte de adquisición de una respuesta T específica podría no ser la opción más eficaz, dado que en los pacientes que desarrollan enfermedad con inmunidad específica de células T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> positiva tuvieron niveles altos de IFN- $\gamma$ , 0,3% y 0,9 %, respectivamente. Para establecer un punto de corte de linfocitos T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> de protección frente a la enfermedad por CMV mayor de 0,25% sería necesario considerar dos aspectos: que el punto de corte sea lo suficientemente restrictivo que asegurara que la inmunidad protege de enfermedad, pero que a su vez, no sea demasiado elevado para evitar que pacientes que no están en riesgo de enfermedad o son capaces de controlar la infección por sí mismos recibieran tratamiento por no haber adquirido el punto de corte de linfocitos T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> establecido.

En el siguiente apartado se analiza la consideración de otro tipo de respuesta adaptativa o marcadores inmunológicos alternativos.

### **Papel de la inmunidad humoral en el control de la infección y enfermedad por CMV.**

El estado serológico del donante y del receptor a través de la cuantificación de anticuerpos IgG específicos de CMV es utilizado en la actualidad como marcador para predecir el riesgo de enfermedad por CMV tras el trasplante como indicador de infección previa y desarrollo de inmunidad frente a CMV. En este contexto, Humar *et al.* defendieron la utilidad de la medición de IgG específicas de CMV a los 6 meses postrasplante en pacientes de alto riesgo de infección por CMV, en los que la seroconversión se relacionó con un menor riesgo de enfermedad [106]. No obstante, la relevancia clínica de la monitorización de la serología tras el trasplante ha sido cuestionada por diversos estudios que describen una respuesta de anticuerpos IgG semejante entre pacientes sintomáticos y asintomáticos [277-279]. En nuestro estudio investigamos la seroconversión y los niveles de IgG específicas de CMV tras el trasplante y su relación con la protección frente a la infección por CMV en pacientes TOS de alto riesgo. En concordancia con estudios previos, encontramos un perfil de seroconversión muy heterogéneo en el tiempo y con niveles de IgG altamente variables tras el trasplante que no se relacionó con el número de eventos de replicación y con la carga viral [106]. Además,

un 42,6% de los pacientes tuvieron una seroconversión muy temprana tras el trasplante en alguno de los casos incluso anterior a eventos detectados de replicación lo que evidencia la falta de relación entre la seroconversión y la replicación por CMV. No encontramos diferencias en la incidencia de infección entre los pacientes con seroconversión temprana respecto a los que seroconvirtieron de forma más tardía, ni en el número de episodios de replicación totales durante el seguimiento, o en las cargas virales pico. En este sentido, no se encontró relación entre los títulos de IgG y el desarrollo de enfermedad, ya que tres de los cuatro pacientes que desarrollaron enfermedad presentaban serología positiva para anticuerpos IgG con niveles entre 3,7 UI/ml -15,4 UI/ml. Por tanto, concluimos que la serología tiene una escasa utilidad clínica como predictor de desarrollo de enfermedad por CMV tras el trasplante.

El conjunto de resultados expuestos hasta el momento indican que sería de utilidad definir nuevos marcadores de protección frente a CMV para identificar pacientes con menor riesgo de desarrollo de enfermedad por CMV y los que requieren un seguimiento más estrecho tras el trasplante.

Los anticuerpos neutralizantes y su relación con la protección frente a la infección por CMV ha sido estudiado de forma más secundaria. En la mayoría de trabajos en los que se estudia los anticuerpos neutralizantes frente a CMV se han utilizado estirpes de laboratorio en el contexto de fibroblastos [280]. Sin embargo, CMV establece una interacción compleja con el hospedador, infectando un gran número de tipos celulares distintos *in vivo*, entre ellos no sólo fibroblastos, sino también células epiteliales, endoteliales, células del músculo liso y macrófagos [187]. De ellas, las células epiteliales juegan un papel central por ser la primera barrera de infección a partir de la cual la infección se disemina a otras células adyacentes [187, 281]. Estudios recientes han demostrado que el mecanismo de entrada de CMV varía en función de la célula hospedadora. Durante la entrada en fibroblastos la glicoproteína gB y los complejos gH/gL/gO y gM/gN del virus participan en el reconocimiento y unión a los receptores celulares [14, 183, 282], mientras que en las células epiteliales el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a es indispensable para la infección [184-186, 283]. Sin embargo, en las estirpes de laboratorio como AD169 usada comúnmente para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes este complejo no es funcional, ya que contiene una mutación que implica un cambio en la pauta abierta de lectura del locus UL128-131, y le impide la

correcta formación del complejo y por consiguiente la infección de células epiteliales [12, 284]. Por este motivo, los estudios previos, en los que se han utilizado suero de pacientes para determinar los anticuerpos neutralizantes presentes, han utilizado un modelo de fibroblastos para la infección por CMV. Por tanto, hasta la fecha existe pocas evidencias sobre el espectro de anticuerpos presentes en el suero de pacientes tras la infección capaces de reconocer las proteínas pUL128, pUL130 y pUL131A que participan en la infección del epitelio. En el presente estudio además del modelo de infección de fibroblastos utilizado como referencia, hemos utilizado un modelo de infección de células epiteliales para estudiar la cinética de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de los pacientes tras el trasplante.

Una de las principales novedades de nuestro estudio es que demostramos que los pacientes con serología pretrasplante negativa para CMV desarrollan *de novo* una inmunidad humoral mediada por un amplio rango de anticuerpos neutralizantes. Como se ha apuntado previamente los datos previos disponibles demuestran que el título de anticuerpos neutralizantes en un grupo de mujeres embarazadas y de receptores de trasplante de órgano sólido era 128 veces más elevado frente a células epiteliales que frente a fibroblastos [190]. En esta línea, el estudio realizado por Cui *et al.* demostró que la vacunación de individuos seronegativos con la cepa Towne atenuada (carente del complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a requerido para la infección de células epiteliales) y la gB adyuvantada con MF59 inducía un título de anticuerpos capaces de neutralizar la infección de células epiteliales entre 28 y 15 veces más bajo que la infección natural, en la que sí estaría presente el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a [249].

Nuestros resultados del análisis comparativo de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales y fibroblastos, corroboran una asimetría en la cinética de producción de anticuerpos neutralizantes. De hecho, al final del seguimiento, los pacientes de alto riesgo tenían 64 veces más anticuerpos neutralizantes de la infección de células epiteliales en comparación con anticuerpos neutralizantes que bloquean infección de fibroblastos.

Aunque no encontramos relación entre los títulos de anticuerpos capaces de bloquear la infección de fibroblastos y la protección frente a la infección o la progresión clínica del paciente tras el trasplante, definimos un punto de corte de títulos de anticuerpos

neutralizantes de infección de epitelio ( $\geq 480$ ) que se correlaciona con la disminución de la infección y la protección frente a la enfermedad por CMV.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que durante la infección natural por CMV la respuesta de anticuerpos neutralizantes está principalmente dirigida a los receptores virales involucrados en la infección de células epiteliales y en menor medida de fibroblastos.

Estudios previos en individuos inmunocompetentes demostraron que los anticuerpos cuya diana era el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-131a estaban directamente relacionados con el control de la infección en un grupo de 44 individuos sanos (13 seronegativos, 20 seropositivos y 11 mujeres embarazadas con infección primaria) [285]. Además, se demostró que el pool de inmunoglobulinas (CMV-IG Cytogam), cuya administración a pacientes trasplantados de órgano sólido se asoció con una menor incidencia de enfermedad [286], estaba principalmente formado por anticuerpos dirigidos al complejo gH/gL/pUL128-131a y no a la glicoproteína B [178, 287]. Finalmente, en el contexto de la infección congénita también se ha valorado la contribución de los anticuerpos que neutralizan infección de células epiteliales *in vitro* en la protección frente a infección congénita. Siguiendo en este contexto, Gernini *et al.* usando suero de 23 mujeres embarazadas observaron una asociación entre altos niveles de anticuerpos que bloqueaban la infección *in vitro* de células epiteliales y un menor riesgo de infección congénita por CMV sugiriendo de nuevo que el complejo pentamérico es una de las dianas principales de la inmunidad maternal mediada por anticuerpos [188].

Nuestros resultados han demostrado por primera vez que durante la infección primaria del receptor de órgano sólido de alto riesgo la interacción entre virus y hospedador durante la estrategia de tratamiento anticipado no sólo promueve una respuesta celular temprana (con una mediana de 15 semanas) sino también una respuesta de anticuerpos neutralizantes un poco más tardía (con una mediana de 31 semanas). La incidencia de infección por CMV tuvo una relación inversa con la adquisición de un título de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales  $\geq 480$ . Sólo un 22,9 % de pacientes desarrollaron episodios de replicación posteriores a la adquisición de un título igual o superior a 480 que se caracterizaron por tener menor carga viral pico y menor duración del tratamiento. Este punto de corte se relacionó además con ausencia de enfermedad por

CMV, aunque es cierto que en nuestra cohorte hubo pocos casos de enfermedad. Por tanto serían necesarios ampliar el estudio con series de pacientes mayores o con mayor incidencia de enfermedad para corroborar la relación entre el punto de corte definido y la ausencia de enfermedad por CMV.

En conclusión, este es el primer estudio que demuestra la escasez de utilidad clínica de los anticuerpos que neutralizan infección de fibroblastos y al mismo tiempo demuestra la importancia que los anticuerpos neutralizantes de la infección de células epiteliales podrían estar teniendo en el control de la infección y enfermedad por CMV.

Nuestros resultados indican que la cuantificación de los niveles de anticuerpos neutralizantes de células epiteliales, además de la determinación de la respuesta inmune de células T, puede ser útiles como marcadores para discriminar entre aquellos pacientes que requirieren una monitorización más cercana y los que están en menor riesgo de enfermedad por CMV. La combinación de la monitorización virológica e inmunológica de los pacientes podría permitir además una administración más eficiente del tratamiento anticipado en receptores de TOS de alto riesgo para la infección por CMV.

### **Cómo aplicar lo aprendido sobre infección por CMV en pacientes trasplantados en el diseño de una vacuna**

Debido a que la infección por CMV continúa siendo una de las principales causas de morbilidad en recién nacidos y trasplantados de órgano sólido y células hematopoyéticas, el Instituto de Medicina (IOM) ha propuesto como prioridad el desarrollo de una vacuna para CMV [288]. Aunque se han desarrollado diversos ensayos clínicos algunos con resultados prometedores, hasta el momento ninguna vacuna ha sido licenciada para su uso en humanos [230, 231]. Los ensayos preclínicos y clínicos realizados hasta el momento se han visto obstaculizados por varios factores, incluyendo la carencia de modelos animales que mimeticen la infección y enfermedad producida por CMV en humanos; la falta de correlación entre el nivel de inmunidad considerado protector en animales y humanos, y la falta de consenso respecto a los *endpoints* de los ensayos clínicos. En este contexto, los datos obtenidos en estudios recientes que caracterizaban la infección por CMV en pacientes trasplantados han ampliado el conocimiento sobre la respuesta celular durante la infección activa por CMV y su papel en el control de la



infección, lo que podría ser aplicado en el desarrollo de vacunas. En la pasada década, varios estudios han caracterizado variables inmunológicas que se correlacionan con la prevención de la enfermedad por CMV en pacientes inmunodeprimidos. En general, han identificado la respuesta celular y humoral efectoras como los principales brazos del sistema inmune que contribuyen al control de la replicación vírica, por lo que han sido herramientas utilizadas para guiar la administración de terapia antiviral en el periodo post-trasplante[133]. Estos estudios podrían ser aplicados en los esfuerzos actuales y futuros dirigidos hacia el diseño y desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedad por CMV.

### **Ensayos clínicos de vacunas de CMV en pacientes trasplantados**

El conjunto de resultados de los tres ensayos clínicos de fase 2 en la población trasplantada mencionados sugieren que la vacunación frente a CMV puede proporcionar efectos protectores en pacientes trasplantados con serología positiva y negativa. Estos estudios destacan las dificultades asociadas con la evaluación clínica de las vacunas de CMV con respecto a la selección de los *endpoints* de los ensayos clínicos y la necesidad de identificar aspectos del sistema inmune que se correlacionen con protección y puedan ser medidos para cuantificar la eficacia de la vacuna en ensayos clínicos. Además, los resultados de estos ensayos también podrían sugerir que la evaluación de vacunas formuladas con nuevos antígenos virales podría facilitar la inducción de una respuesta inmune que incrementara los efectos de protección frente a la infección por CMV tras la vacunación.

### **Implicaciones para el diseño de vacunas**

La información obtenida a través de los estudios de caracterización de la respuesta inmune frente a la infección por CMV en pacientes trasplantados puede ser útil como guía para el diseño y desarrollo de una vacuna por un número de razones. El primer aspecto más importante es el conocimiento generado sobre la respuesta inmune a la infección de CMV en humanos. El desarrollo de vacunas requiere el uso de datos generados en modelos animales para identificar antígenos candidatos y evaluar su habilidad de promover una respuesta inmune protectora. Posteriormente, para verificar si estos antígenos se comportan de forma similar en humanos se necesitan ensayos clínicos de fases tempranas. Además,

debido a que la población diana de la vacunación para CMV son los pacientes trasplantados, los datos que describen los componentes del sistema inmune relacionados con el control de la infección en esta población puede tener un valor especial. Sin embargo, es importante mencionar que estos estudios tienen limitaciones. En primer lugar, la mayoría de ellos son observacionales, en muchos casos describen correlaciones entre variables del sistema inmune y la replicación vírica, pero no proporcionan información sobre el funcionamiento del control inmune en la replicación vírica. Una segunda consideración importante es que los pacientes incluidos en estos estudios están sometidos a terapias de inmunosupresión, por lo que los resultados obtenidos podrían no ser directamente extrapolables a individuos sanos e inmunocompetentes.

Hasta el momento, los componentes del sistema inmune que deben ser estimulados para conseguir una inmunidad protectora frente a CMV y los antígenos a los que va dirigida dicha respuesta no han sido bien definidos. El tipo de respuesta inmune requerida para la prevención de enfermedad puede depender del tipo de enfermedad y de la población diana, de forma que los anticuerpos podrían ser más efectivos previniendo infección primaria, mientras que la respuesta celular podría ser más efectiva en suprimir la replicación viral en individuos previamente infectados[289]. Los estudios que caracterizan el control inmunológico de la replicación de CMV en pacientes trasplantados seropositivos durante el periodo postrasplante apoyan esta idea, demostrando que la adquisición de una inmunidad específica de células T tiene efecto protector en la infección por CMV [201-203, 205, 249]. Es importante destacar que la mayoría de estudios que identifican una correlación entre la inmunidad celular y la supresión de replicación viral cuantifican las frecuencias de células T específicas de IE-1 y pp65 en sangre periférica. Esto no debería significar que los antígenos IE-1 y pp65 son los más adecuados para el diseño de una vacuna, aunque es cierto que podrían contribuir a una respuesta protectora. En estos estudios la caracterización de la respuesta celular siempre se ha basado en la determinación de de células T circulantes específicas para IE-1 y pp65, mientras que la respuesta a otros antígenos no ha sido analizada. Por consiguiente, mientras estos datos sugieren que una vacuna que estimule la inmunidad mediada por células T podría ser adecuada para el uso en pacientes trasplantados, aún deben de ser identificados aquellos antígenos virales que puedan inducir una respuesta celular más efectiva.

Por otro lado, el papel potencial de los anticuerpos inducidos por las vacunas en prevenir la infección por CMV ha sido un aspecto mucho menos estudiado. El ensayo clínico de fase 2 con la vacuna formulada con la glicoproteína B adyuvantada con MF59 demostró una correlación entre el título de anticuerpos dirigidos a la glicoproteína B y la reducción de la duración de los episodios de replicación viral sugiriendo que los anticuerpos específicos del virus podrían contribuir a la inmunidad protectora. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la presencia de anticuerpos neutralizantes de la infección de fibroblasto no se correlaciona con una reducción en la infección ni supervivencia en pacientes trasplantados con células hematopoyéticas [175], lo que podría sugerir que la respuesta celular podría proporcionar algún efecto protector de forma individual. Al igual que para la respuesta celular, un número relativamente bajo de antígenos han sido caracterizados con respecto a su habilidad para inducir anticuerpos capaces de bloquear la infección de CMV. Es posible, por tanto, que los anticuerpos dirigidos a otros antígenos o complejos antigénicos puedan prevenir de forma más eficiente la infección y/o suprimir la replicación viral. Esta idea ha sido corroborada por recientes estudios experimentales y clínicos en los que se demostraban que los anticuerpos dirigidos contra el complejo pentamérico gH/gL/pUL128-130-131 presentaban una gran actividad en la neutralización de la infección por CMV [185, 186, 252, 290].

En general, los ensayos clínicos que evalúan la eficacia de las vacunas de CMV emplean *endpoints* que pueden ser difíciles de medir por diversas razones. Los *endpoints* basados en enfermedad como enfermedad de órgano en el paciente trasplantado o pérdida auditiva neuro-sensorial en niños, pueden ser difíciles de medir debido a la baja incidencia de enfermedad o a la necesidad de periodos más largos de seguimiento [289]. Los *endpoints* basados en infección, como la carga viral de CMV, pueden ser más fácilmente analizados, pero requieren que un número considerable de muestras sean analizadas para detectar la presencia de ADN viral. En este contexto, sería necesaria la identificación de variables inmunológicas que se correlacionaran con la protección que una vacuna debe conseguir para ser considerada efectiva. Varios estudios han caracterizado la replicación viral y la adquisición de inmunidad de células T durante el periodo postrasplante, identificando valores de puntos de corte para la frecuencia de células T específicas de CMV que se correlacionan con la habilidad de suprimir la replicación del virus en ausencia de terapia antiviral. Un estudio realizado por Gerna *et al.* describió que una frecuencia de

células T específicas de CMV mayor de 0,4 células/ $\mu$ l confería protección para enfermedad por CMV en pacientes TOS de bajo riesgo de infección por CMV, mientras que Benmarzouk-Hidalgo *et al.* definieron un punto de corte de 0,25% de células T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> que se correlacionaba con el aclaramiento espontáneo de la infección [133, 252]. Todos estos estudios podrían, por tanto, proporcionar información útil para la identificación de variables inmunológicas que se correlacionen con protección y puedan servir como *endpoints* en estudios clínicos.

### **Proteínas altamente expresadas durante la infección por CMV como antígenos de CMV para el diseño de una vacuna.**

El número de antígenos de CMV evaluados como candidatos de vacuna en ensayos preclínicos y clínicos ha sido relativamente bajo, sugiriendo que existen antígenos que aunque no han sido caracterizados, podrían tener la capacidad de estimular una respuesta celular y/o humoral. Debido a la gran cantidad de ORFs presentes en el genoma de CMV, una caracterización más detallada de la respuesta inmune inducida por todas las proteínas antigénicas de forma individual requeriría mucho tiempo y un coste elevado. En este contexto, el uso de las tecnologías de genómica, transcriptómica y proteómica emergentes podrían ser útiles para identificar antígenos virales que tengan características deseables para el diseño de una vacuna. Las técnicas basadas en el análisis de transcriptoma, pueden ser usadas para identificar genes virales que están altamente expresados durante la infección de diferentes tipos celulares, como han sugerido estudios recientes en los que se empleaba el RNA-Seq para caracterizar el transcriptoma de CMV humano y murino durante la infección [232, 233]. Los productos de los genes altamente expresados podrían ser interesantes en el desarrollo de vacunas como antígenos capaces de estimular la respuesta celular dirigida a células infectadas. Esta idea es apoyada por estudios de transcriptómica basados en *microarray* que demuestran que los genes que codifican para IE-1 y pp65, que inducen una respuesta celular correlacionada con la habilidad de controlar la replicación viral [251-253] son altamente expresados durante la infección [254]. Por otro lado, los estudios proteómicos también presentan el potencial de identificar antígenos de interés para el desarrollo de una vacuna. El análisis basado en espectrometría de masa de las partículas víricas no sólo identifica las proteínas estructurales del virus, sino que también permite la cuantificación respecto a la abundancia relativa de cada proteína en

el virión [34]. Estos resultados podrían facilitar la identificación de antígenos que producen una respuesta de anticuerpos dirigida a neutralizar la infección por CMV. En conjunto, estos ejemplos demuestran que las tecnologías -ómicas podrían tener un papel importante en la identificación de antígenos para el diseño de una vacuna.

Tradicionalmente, la identificación de antígenos para el diseño de vacunas se ha basado en el nivel de conservación de los antígenos, de forma que aquellos altamente conservados se han considerado más apropiados para la inducción de una respuesta inmune específica frente a la todas las estirpes circulantes de un patógeno. Sin embargo, el uso de técnicas transcriptómicas como RNA-seq [291] o *microarray* de ADN [292] han facilitado el conocimiento del perfil transcripcional de las proteínas en condiciones que mimetizan la infección en diferentes condiciones o tejidos. De esta forma, aquellos más expresados durante la infección que además tienen un papel importante en la patogénesis podrían considerarse candidatos potenciales de vacunas[293]. El presente estudio es el primero en utilizar esta estrategia de búsqueda de antígenos candidatos para una vacuna frente al virus, en concreto la utilización de ARN-Seq para determinar los transcritos más abundantes de CMV en diferentes líneas celulares a tiempos diferentes tras la infección. Aunque la mayoría de los datos de transcriptoma de CMV disponibles provienen de estudios basados en modelo de infección de fibroblastos [232, 294], el estudio de células epiteliales podría ser de gran relevancia por ser la primera barrera y principal diana de infección durante la infección natural de CMV. Además, varios estudios han sugerido que la cinética de expresión de los genes virales pueden ser influenciados por factores celulares, de forma que dependiendo del tipo de célula infectada los niveles transcripcionales de genes de CMV pueden verse alterados.

Partiendo de estas evidencias, en este estudio analizamos diferentes perfiles transcripcionales durante la infección de fibroblastos y células epiteliales durante las tres fases de infección características de CMV (inmediatamente temprana, temprana y tardía). Nuestros resultados confirman la influencia de factores celulares en la expresión de genes virales ya que el nivel de transcripción de un gran número de genes de CMV es diferente en función del tipo celular infectado. Este hallazgo está, por tanto, en concordancia con los publicados por Towler *et al.*, en el que de los 165 genes codificantes de proteínas de CMV, 41 y 48 estaban diferencialmente expresados de forma exclusiva en epitelio y astrocitos,

respectivamente, comparados con fibroblastos, mientras que 22 de ellos coincidían tanto en epitelio como en astrocitos [240].

En los últimos años se han realizado avances importantes en la caracterización de la respuesta humoral [285] y especialmente la respuesta celular específica frente a CMV protectora frente a la infección por CMV [133, 295]. Además, los esfuerzos dirigidos a la caracterización de antígenos capaces de inducir ambos tipos de respuestas han ayudado a la identificación de nuevos antígenos potenciales que puedan ser dianas de una vacuna frente a CMV. En un estudio realizado por Sylwester *et al.* se identificaron un gran número de proteínas de CMV con capacidad de inducir una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en adultos sanos seropositivos para CMV [157]. Del mismo modo, varios estudios han identificado un gran número de proteínas que son reconocidas por anticuerpos específicos de CMV presentes en el suero de los sujetos estudiados provenientes de distintos contextos clínicos [207, 210]. Sin embargo, hasta la fecha sólo se han tenido en cuenta un número muy reducido de todos estos antígenos para el desarrollo de una vacuna frente a CMV. En concreto, se han utilizado IE-1 y pp65 que inducen principalmente una respuesta celular [296, 297], y la glicoproteína B (implicada en la entrada de fibroblastos durante la infección) que induce principalmente una respuesta mediada por anticuerpos [230]. Además, el complejo pentamérico implicado en la entrada de células epiteliales y endoteliales se ha propuesto recientemente como potencial diana para mejorar la eficacia clínica de futuras vacunas frente a CMV [298]. Estos antígenos, además de ser una de las principales dianas de la respuesta celular y humoral, han sido considerados para el diseño de una vacuna por ser abundantes en el virión (a excepción de IE-1), por su alto grado de transcripción durante la infección de CMV y por ser proteínas altamente acumuladas en la célula hospedadora durante la infección, lo que aumenta la probabilidad de ser presentada por los MHC I y II y dar lugar a una respuesta inmune robusta. Esta iniciativa está en la misma línea de que los genes altamente expresados durante la infección, si además poseen un papel importante en la estimulación de sistema inmune del hospedador podrían ser buenos candidatos en el desarrollo de una vacuna.

En el presente trabajo, identificamos los transcritos más abundantes (MAT) en cada fase de replicación y entre ellos seleccionamos diferentes proteínas basándonos en sus altos niveles de transcripción y en su capacidad de inducir una respuesta inmune mediada por linfocitos T a CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> [157]. Entre ellas hemos seleccionados los siguientes

candidatos: UL4, UL17, UL36, US3 y US18 capaces de inducir una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> y UL44, US3 y UL36 capaces de inducir una respuesta mediada por células T CD8<sup>+</sup>.

Además, debido a que las células epiteliales son la primera barrera biológica encontrada por CMV y que la respuesta humoral específica de CMV tras la infección natural está dirigida especialmente a bloquear la infección de células epiteliales, US18, involucrada en la evasión de las células NK [299], detectado en nuestro estudio como el mayor MAT durante las tres fases de infección por CMV de células epiteliales, podría ser un buen candidato a vacuna ya que además presenta la capacidad de activar la respuesta celular mediada por células T CD4<sup>+</sup>.

Además y en base a la hipótesis de que los genes más expresados durante la infección por CMV si además tienen un papel importante en la estimulación de una respuesta inmune específica frente a CMV podrían ser buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna frente a CMV, UL36 y US3 transcritos altamente expresados podrían ser de especial interés por su capacidad de activar tanto una respuesta de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, activando tanto una respuesta citotóxica, como de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV. El gen UL36, codifica la proteína viral de inhibición de la caspasa-8 relacionada con la activación de procesos apoptóticos [300] mientras que la US3 es una glicoproteína residente en el retículo endoplasmático que modula la expresión de MHC I en la superficie celular y se relaciona con la degradación de este complejo durante etapas tempranas de infección[301]. Aunque puede parecer paradójico el uso de una proteína responsable de la evasión del sistema inmune como inductor del mismo, otros estudios han propuesto este tipo de proteínas para la activación de una respuesta inmune de células T [302]. Uno de los mejores ejemplos es la proteína del tegumento pp65 que a pesar de prevenir el reconocimiento de las proteínas inmediatamente tempranas por los componentes del sistema inmune y además de inhibir la síntesis de varios componentes involucrados en la respuesta inmune del receptor[303], es una de las proteínas más utilizadas hasta el momento en el diseño de vacunas frente a CMV por su capacidad de inducir una respuesta específica de células T [206].

## ***VII. Limitaciones***



Los resultados mostrados en esta tesis presentan las limitaciones que se describen a continuación.

### **Limitaciones del Artículo 1**

a) La cohorte de pacientes estudiada de receptores de TOS de alto riesgo tiene un tamaño muestral relativamente bajo (n=47) esto se ha debido principalmente a distintos factores: i) La dificultad de reclutar receptores de trasplante con serología negativa por su baja incidencia. ii) Además, dado que según las guías de práctica clínica el tratamiento anticipado no es la estrategia de tratamiento estándar para el control de la infección por CMV en el paciente de trasplante de órgano sólido, esto ha limitado la ampliación también del tamaño muestral a través de la colaboración con otros hospitales en los que la estrategia de tratamiento utilizada es la profilaxis universal. iii) Por otra parte, también ha dificultado la colaboración a nivel logístico, ya que el protocolo de medición de repuesta de células T por citometría de flujo implica el procesamiento de la muestra en las siguientes 24 horas. Por tanto, este hecho dificulta la inclusión de pacientes de regiones lejanas a nuestro hospital.

b) Otras de la limitaciones que presentan los resultados obtenidos del punto de corte en la cohorte de pacientes de alto riesgo, es que estos resultados podrían no ser extrapolables a pacientes con profilaxis universal o con regímenes diferentes de inmunosupresión o pacientes que reciben timoglobulina como tratamiento de inducción.

c) Probablemente debido a la monitorización estrecha de estos pacientes y a la pronta administración de tratamiento antiviral de estos pacientes, en nuestra cohorte hemos tenido una baja ocurrencia de enfermedad. Este limitado número de casos de enfermedad dificulta el establecimiento de una relación inversa entre la existencia de una inmunidad celular y anticuerpos neutralizantes y el riesgo de enfermedad. Por tanto sería necesario ampliar el estudio con series de pacientes mayores o con una mayor incidencia de enfermedad para corroborar la relación entre el punto de corte definido y la ausencia de enfermedad por CMV.

d) Finalmente, debido a que no existe un punto de corte de carga viral para CMV para el inicio del tratamiento anticipado de los episodios de replicación detectados, el personal clínico es el responsable de instaurar el tratamiento según su propia experiencia y criterio.

En este contexto, es posible que en algunos pacientes se haya administrado tratamiento con cargas virales no muy elevadas que podrían haber aclarado espontáneamente una vez detectada la respuesta inmune específica frente a CMV.

### **Limitaciones del Artículo 3**

a) En este estudio se ha realizado el análisis del transcriptoma de CMV durante la infección de fibroblastos y células epiteliales y se ha observado que el nivel de expresión de los genes virales es altamente influenciado por el tipo de célula hospedadora. Por ello, el perfil de expresión de los genes virales descritos para estos tipos celulares puede no ser extrapolable a otros tipos celulares.

b) Además, es probable que la expresión de algunos genes de CMV varíen su expresión *in vivo*.

c) El hecho de que se haya detectado una alta expresión de ciertos genes durante la infección *in vitro* no necesariamente implica una alta producción de la proteína. Por ello, futuros estudios de proteómica serían necesarios para verificar los niveles de las proteínas.

d) En este estudio sugerimos que los genes altamente expresados durante la infección de CMV podrían ser buenos candidatos para la formulación de una vacuna. Sin embargo, no hemos incluido aquellos genes que aún siendo poco expresados podrían ser altamente antigénicos suficientes para promover una respuesta inmune robusta.



## ***VIII. Conclusiones***

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- I. El tratamiento anticipado de la infección por CMV guiado por los resultados de la QRT-PCR es una estrategia segura y eficaz en el manejo de los pacientes receptores de TOS de alto riesgo para la infección por CMV.
- II. El contacto entre el CMV y el sistema inmune del hospedador favorecido por la administración de tratamiento anticipado facilita el desarrollo temprano de una respuesta inmune específica frente a CMV en pacientes receptores de TOS de alto riesgo de infección.
- III. El desarrollo de una respuesta inmune celular T específica frente a CMV aunque se relaciona con una disminución de la incidencia de replicación y con un efecto terapéutico, no elimina la incidencia de enfermedad.
- IV. El desarrollo de una respuesta inmune celular T específica frente a CMV se relaciona con la adquisición de anticuerpos neutralizantes específicos de CMV.
- V. Los niveles de IgG específicos de CMV o los anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección en fibroblastos medidos después del trasplante no son buenos indicadores de protección frente a la infección por CMV en la población con trasplante de órgano sólido.
- VI. El desarrollo de títulos de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de células epiteliales superior a 480 se relaciona con una disminución de la infección y es un marcador protector de enfermedad por CMV en la población estudiada.
- VII. El desarrollo de la respuesta inmune específica de CMV de células T junto con anticuerpos neutralizantes de células epiteliales con títulos superiores a 480 se relaciona con la protección frente a la enfermedad por CMV en los receptores de TOS de alto riesgo para la infección por CMV.

- VIII. La monitorización conjunta de la respuesta inmune específica de CMV de células T y de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la infección de células epiteliales es una estrategia útil para diferenciar pacientes con un menor riesgo de enfermedad y aquellos a los que puede realizarse un menor seguimiento tras el trasplante.
- IX. Una respuesta específica celular T de  $CD8^+IFN^+$  superior al 0,25% y un título de anticuerpos neutralizantes de infección de epitelio de 480 podrían ser objetivos a cumplir por una vacuna efectiva.
- X. Los niveles transcripcionales de genes de  $CMV$  durante la infección difieren altamente entre células epiteliales y fibroblastos infectados por CMV.
- XI. Los genes US18 altamente transcrito en células epiteliales con capacidad de inducir una respuesta  $CD4^+$  y UL36 y US3 con capacidad de inducir una respuesta de células T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  podrían ser nuevos candidatos potenciales para el diseño de una vacuna de CMV.

---

**Referencias**

- 1 Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: Clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet Infectious diseases*. 2004; **4**: 725-738.
- 2 Hanley PJ, Bollard CM. Controlling cytomegalovirus: Helping the immune system take the lead. *Viruses*. 2014; **6**: 2242-2258.
- 3 Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou ZH. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*. 1999; **260**: 10-16.
- 4 Kinzler ER, Compton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *Journal of virology*. 2005; **79**: 7827-7837.
- 5 Varnum SM, Streblov DN, Monroe ME, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (hcmv) particles: The hcmv proteome. *Journal of virology*. 2004; **78**: 10960-10966.
- 6 Baldick CJ, Jr., Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *Journal of virology*. 1996; **70**: 6097-6105.
- 7 Chee MS, Bankier AT, Beck S, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain ad169. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990; **154**: 125-169.
- 8 Davison AJ, Dolan A, Akter P, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *The Journal of general virology*. 2003; **84**: 17-28.
- 9 Dunn W, Chou C, Li H, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 14223-14228.
- 10 Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 13585-13590.
- 11 Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus ad169 defined by global mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 12396-12401.
- 12 Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of virology*. 1996; **70**: 78-83.
- 13 Dolan A, Cunningham C, Hector RD, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *The Journal of general virology*. 2004; **85**: 1301-1312.

- 14 Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008; **325**: 85-100.
- 15 Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, et al. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *Journal of virology*. 2003; **77**: 8541-8547.
- 16 Stamminger T, Gstaiger M, Weinzierl K, Lorz K, Winkler M, Schaffner W. Open reading frame ul26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain. *Journal of virology*. 2002; **76**: 4836-4847.
- 17 Feng X, Schroer J, Yu D, Shenk T. Human cytomegalovirus pus24 is a virion protein that functions very early in the replication cycle. *Journal of virology*. 2006; **80**: 8371-8378.
- 18 Cristea IM, Moorman NJ, Terhune SS, et al. Human cytomegalovirus pul83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular ifi16 protein. *Journal of virology*. 2010; **84**: 7803-7814.
- 19 Kalejta RF. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008; **325**: 101-115.
- 20 Gibson W. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008; **325**: 187-204.
- 21 Isomura H, Stinski MF. The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection. *Journal of virology*. 2003; **77**: 3602-3614.
- 22 Meier JL, Keller MJ, McCoy JJ. Requirement of multiple cis-acting elements in the human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer for viral gene expression and replication. *Journal of virology*. 2002; **76**: 313-326.
- 23 Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of general virology*. 2006; **87**: 1763-1779.
- 24 Knipe H, E. S. and Courcelle, C. T. . Cytomegaloviruses and their replication. *In Fields Virology 4th edn, ed 2001*; **2**: 2629–2673.
- 25 Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late gene expression: Gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *Journal of virology*. 1986; **57**: 864-874.
- 26 Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late-gene expression: Differential use of three start sites in the transcriptional activation of icp36 gene expression. *Journal of virology*. 1989; **63**: 1783-1791.
- 27 McWatters BJ, Stenberg RM, Kerry JA. Characterization of the human cytomegalovirus ul75 (glycoprotein h) late gene promoter. *Virology*. 2002; **303**: 309-316.



- 28 Isomura H, Stinski MF, Murata T, et al. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. *Journal of virology*. 2011; **85**: 6629-6644.
- 29 Milbradt J, Auerochs S, Marschall M. Cytomegaloviral proteins pul50 and pul53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase c. *The Journal of general virology*. 2007; **88**: 2642-2650.
- 30 Hamirally S, Kamil JP, Ndassa-Colday YM, et al. Viral mimicry of cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS pathogens*. 2009; **5**: e1000275.
- 31 Milbradt J, Kraut A, Hutterer C, et al. Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014; **13**: 2132-2146.
- 32 Alwine JC. The human cytomegalovirus assembly compartment: A masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS pathogens*. 2012; **8**: e1002878.
- 33 Das S, VasANJI A, Pellett PE. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *Journal of virology*. 2007; **81**: 11861-11869.
- 34 Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: Lessons from proteomics. *Expert review of proteomics*. 2014; **11**: 697-711.
- 35 Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. 1983; **130**: 118-133.
- 36 Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw KT, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based european prospective investigation of cancer-norfolk cohort. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013; **56**: 1421-1427.
- 37 Atabani SF, Smith C, Atkinson C, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012; **12**: 2457-2464.
- 38 van der Bij W, Speich R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001; **33 Suppl 1**: S32-37.

- 39 Stagno S, Reynolds DW, Huang ES, Thames SD, Smith RJ, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*. 1977; **296**: 1254-1258.
- 40 Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*. 1980; **302**: 1073-1076.
- 41 Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (cmv) infection. *Reviews in medical virology*. 2007; **17**: 253-276.
- 42 Carlson A, Norwitz ER, Stiller RJ. Cytomegalovirus infection in pregnancy: Should all women be screened? *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2010; **3**: 172-179.
- 43 Huang ES, Alford CA, Reynolds DW, Stagno S, Pass RF. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants. *The New England journal of medicine*. 1980; **303**: 958-962.
- 44 Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England journal of medicine*. 2001; **344**: 1366-1371.
- 45 Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of pathology*. 2015; **235**: 288-297.
- 46 Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*. 1996; **39**: 302-319.
- 47 Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; **95**: 3937-3942.
- 48 Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. Impact of human cytomegalovirus latent infection on myeloid progenitor cell gene expression. *Journal of virology*. 2004; **78**: 4054-4062.
- 49 Sara Sanbonmatsu Gámez MPRyJMNM. Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014; **32**: 15-22.
- 50 Sara Sanbonmatsu Gámez MPRyJMNM. Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014; **32**: 15-22.
- 51 Swanson EC, Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: New prospects for prevention and therapy. *Pediatric clinics of North America*. 2013; **60**: 335-349.
- 52 Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The zidovudine epidemiology study group. *The Journal of infectious diseases*. 1992; **166**: 1223-1227.

- 53 Hodge WG, Boivin JF, Shapiro SH, et al. Laboratory-based risk factors for cytomegalovirus retinitis. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2004; **39**: 733-745.
- 54 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.
- 55 Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review. *Infection & chemotherapy*. 2013; **45**: 260-271.
- 56 Razonable RR. Strategies for managing cytomegalovirus in transplant recipients. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2010; **11**: 1983-1997.
- 57 Freeman RB, Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; **9**: 2453-2458.
- 58 Kotton CN. Cmv: Prevention, diagnosis and therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; **13 Suppl 3**: 24-40; quiz 40.
- 59 Madalosso C, de Souza NF, Jr., Ilstrup DM, Wiesner RH, Krom RA. Cytomegalovirus and its association with hepatic artery thrombosis after liver transplantation. *Transplantation*. 1998; **66**: 294-297.
- 60 Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002; **2**: 850-856.
- 61 Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Current opinion in immunology*. 2007; **19**: 577-582.
- 62 Potena L, Valentine HA. Cytomegalovirus-associated allograft rejection in heart transplant patients. *Current opinion in infectious diseases*. 2007; **20**: 425-431.
- 63 Thomas LD, Milstone AP, Miller GG, Loyd JE, Stephen Dummer J. Long-term outcomes of cytomegalovirus infection and disease after lung or heart-lung transplantation with a delayed ganciclovir regimen. *Clinical transplantation*. 2009; **23**: 476-483.
- 64 Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, Werner BG. Exposure to cytomegalovirus from the donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. Boston center for liver transplantation cmvig study group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996; **23**: 468-474.
- 65 George MJ, Snyderman DR, Werner BG, et al. The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston

- center for liver transplantation cmvig-study group. Cytogam, medimmune, inc. Gaithersburg, maryland. *The American journal of medicine*. 1997; **103**: 106-113.
- 66 Chopra KB, Demetris AJ, Blakolmer K, et al. Progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis c after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2003; **76**: 1487-1491.
- 67 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. *The Journal of infectious diseases*. 2001; **184**: 1461-1464.
- 68 Dmitrienko S, Balshaw R, Machnicki G, Shapiro RJ, Keown PA. Probabilistic modeling of cytomegalovirus infection under consensus clinical management guidelines. *Transplantation*. 2009; **87**: 570-577.
- 69 Hjelmesaeth J, Sagedal S, Hartmann A, et al. Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia*. 2004; **47**: 1550-1556.
- 70 Hagen M, Hjelmesaeth J, Jenssen T, Morkrid L, Hartmann A. A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003; **18**: 2154-2159.
- 71 Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 1998; **338**: 1741-1751.
- 72 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. *Journal of clinical microbiology*. 2002; **40**: 746-752.
- 73 Pillay D, Ali AA, Liu SF, Kops E, Sweny P, Griffiths PD. The prognostic significance of positive cmv cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation*. 1993; **56**: 103-108.
- 74 Lo CY, Ho KN, Yuen KY, et al. Diagnosing cytomegalovirus disease in cmv seropositive renal allograft recipients: A comparison between the detection of cmv dnaemia by polymerase chain reaction and antigenemia by cmv pp65 assay. *Clinical transplantation*. 1997; **11**: 286-293.
- 75 Niubo J, Perez JL, Martinez-Lacasa JT, et al. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1996; **24**: 19-24.

- 76 The TH, van der Ploeg M, van den Berg AP, Vlieger AM, van der Giessen M, van Son WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes--a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*. 1992; **54**: 193-198.
- 77 Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, et al. Human cytomegalovirus pp67 mrnaemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: A prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation*. 2003; **75**: 1012-1019.
- 78 Koetz AC, Delbruck R, Furtwangler A, et al. Cytomegalovirus pp65 antigen-guided preemptive therapy with ganciclovir in solid organ transplant recipients: A prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Transplantation*. 2001; **72**: 1325-1327.
- 79 Kusne S, Grossi P, Irish W, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia monitoring as a guide for preemptive therapy: A cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999; **68**: 1125-1131.
- 80 Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010; **89**: 779-795.
- 81 Lilleri D, Baldanti F, Gatti M, et al. Clinically-based determination of safe dnaemia cutoff levels for preemptive therapy or human cytomegalovirus infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of medical virology*. 2004; **73**: 412-418.
- 82 Caliendo AM, St George K, Allegra J, Bullotta AC, Gilbane L, Rinaldo CR. Distinguishing cytomegalovirus (cmv) infection and disease with cmv nucleic acid assays. *Journal of clinical microbiology*. 2002; **40**: 1581-1586.
- 83 Razonable RR, van Crujjsen H, Brown RA, et al. Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *The Journal of infectious diseases*. 2003; **187**: 1801-1808.
- 84 Rollag H, Sagedal S, Kristiansen KI, et al. Cytomegalovirus DNA concentration in plasma predicts development of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002; **8**: 431-434.
- 85 Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet*. 2000; **355**: 2032-2036.
- 86 Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999; **68**: 1305-1311.

- 87 Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (cmv) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with cmv disease. *The Journal of infectious diseases*. 2002; **186**: 829-833.
- 88 Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *The Journal of infectious diseases*. 1988; **158**: 1177-1184.
- 89 Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Alexander GJ. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of cmv related disease in liver transplant recipients. *Journal of clinical pathology*. 1998; **51**: 914-921.
- 90 Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and aids patients. *Journal of clinical microbiology*. 1994; **32**: 2709-2717.
- 91 Kidd IM, Fox JC, Pillay D, Charman H, Griffiths PD, Emery VC. Provision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation*. 1993; **56**: 867-871.
- 92 Manez R, Kusne S, Rinaldo C, et al. Time to detection of cytomegalovirus (cmv) DNA in blood leukocytes is a predictor for the development of cmv disease in cmv-seronegative recipients of allografts from cmv-seropositive donors following liver transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 1996; **173**: 1072-1076.
- 93 Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gb genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *Journal of medical virology*. 2003; **70**: 240-243.
- 94 Randhawa PS, Manez R, Frye B, Ehrlich GD. Circulating immediate-early mrna in patients with cytomegalovirus infections after solid organ transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 1994; **170**: 1264-1267.
- 95 Lam KM, Oldenburg N, Khan MA, et al. Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1998; **17**: 555-565.
- 96 The TH, van den Berg AP, Harmsen MC, van der Bij W, van Son WJ. The cytomegalovirus antigenemia assay: A plea for standardization. *Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum*. 1995; **99**: 25-29.
- 97 Meyer-Konig U, Serr A, von Laer D, et al. Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: Diagnostic value in renal transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 1995; **171**: 705-709.

- 98 Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clinical microbiology reviews*. 1997; **10**: 86-124.
- 99 Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; **9**: 258-268.
- 100 Clari MA, Bravo D, Costa E, et al. Comparison of the new abbot real time cmv assay and the abbot cmv pcr kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus dnaemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; **75**: 207-209.
- 101 Razonable RR, Brown RA, Wilson J, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (cmv) DNA quantitation in transplant recipients with cmv disease. *Transplantation*. 2002; **73**: 968-973.
- 102 Tang W, Elmore SH, Fan H, Thorne LB, Gulley ML. Cytomegalovirus DNA measurement in blood and plasma using roche lightcycler cmv quantification reagents. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2008; **17**: 166-173.
- 103 Hamprecht K, Steinmassl M, Einsele H, Jahn G. Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: Correlation to viremia and hcmv infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 1998; **11**: 125-136.
- 104 Koidl C, Bozic M, Marth E, Kessler HH. Detection of cmv DNA: Is edta whole blood superior to edta plasma? *Journal of virological methods*. 2008; **154**: 210-212.
- 105 Fryer JF WECobS. Collaborative study to evaluate the proposed first who international standard for human cytomegalovirus (hcmv) for nucleic acid amplification (nat)-based assays. *Publication No WHO/BS/102138*  
*Geneva: World Health Organization*. 2010.
- 106 Humar A, Mazzulli T, Moussa G, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (cmv) serology testing in high-risk cmv d+/r- transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005; **5**: 1065-1070.
- 107 Smith A, Weidman F. Infection of a stillborn infant by an amebiform protezoön. *Univ Penn Med Bull*. 1910; **23**: 285-298.

- 108 Hill RB, Jr., Rowlands DT, Jr., Rifkind D. Infectious pulmonary disease in patients receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. *The New England journal of medicine*. 1964; **271**: 1021-1027.
- 109 Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002; **34**: 1094-1097.
- 110 Lautenschlager I, Halme L, Hockerstedt K, Krogerus L, Taskinen E. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: Virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2006; **8**: 21-30.
- 111 Halme L, Lempinen M, Arola J, Sarkio S, Hockerstedt K, Lautenschlager I. High frequency of gastroduodenal cytomegalovirus infection in liver transplant patients. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2008; **116**: 99-106.
- 112 Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Castilla EA, et al. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry. *Journal of clinical microbiology*. 2004; **42**: 2168-2172.
- 113 Solans EP, Yong S, Husain AN, Eichorst M, Gattuso P. Bronchioloalveolar lavage in the diagnosis of cmv pneumonitis in lung transplant recipients: An immunocytochemical study. *Diagnostic cytopathology*. 1997; **16**: 350-352.
- 114 Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Clinical predictors of relapse after treatment of primary gastrointestinal cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; **10**: 157-161.
- 115 Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015; **70**: 515-523.
- 116 Jamal AJ, Husain S, Li Y, Famure O, Kim SJ. Risk factors for late-onset cytomegalovirus infection or disease in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2014; **97**: 569-575.
- 117 Harvala H, Stewart C, Muller K, et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *Journal of medical virology*. 2013; **85**: 893-898.
- 118 Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; **13 Suppl 4**: 93-106.



- 119 Ettinger NA, Bailey TC, Trulock EP, et al. Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington university lung transplant group. *The American review of respiratory disease*. 1993; **147**: 1017-1023.
- 120 Duncan AJ, Dummer JS, Paradis IL, et al. Cytomegalovirus infection and survival in lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1991; **10**: 638-644; discussion 645-636.
- 121 San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, et al. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; **47**: 875-882.
- 122 Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 2007; **357**: 2601-2614.
- 123 Asberg A, Jardine AG, Bignamini AA, et al. Effects of the intensity of immunosuppressive therapy on outcome of treatment for cmv disease in organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; **10**: 1881-1888.
- 124 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. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011; **11**: 2453-2462.
- 125 Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, Meylan PR. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation*. 2007; **83**: 359-362.
- 126 Kwakkel-van Erp JM, Paantjens AW, van Kessel DA, et al. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (cmv) reactivation and survival in lung transplantation. *Clinical and experimental immunology*. 2011; **165**: 410-416.
- 127 Krishnan A, Zhou W, Lacey SF, Limaye AP, Diamond DJ, La Rosa C. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2010; **12**: 363-370.
- 128 Cummins NW, Deziel PJ, Abraham RS, Razonable RR. Deficiency of cytomegalovirus (cmv)-specific cd8+ t cells in patients presenting with late-onset cmv disease several years after transplantation. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. 2009; **11**: 20-27.

- 129 Weseslindtner L, Kerschner H, Steinacher D, et al. Prospective analysis of human cytomegalovirus dnaemia and specific cd8+ t cell responses in lung transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012; **12**: 2172-2180.
- 130 Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; **10**: 1228-1237.
- 131 Opelz G, Dohler B, Ruhstroth A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: A collaborative transplant study report. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004; **4**: 928-936.
- 132 Abate D, Saldan A, Fiscon M, et al. Evaluation of cytomegalovirus (cmv)-specific t cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to cmv-specific t cell reconstitution in kidney transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 2010; **202**: 585-594.
- 133 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.
- 134 BenMarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Gomez-Cia T, et al. First face composite-tissue transplant recipient successfully treated for cytomegalovirus infection with preemptive valganciclovir treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011; **55**: 5949-5951.
- 135 Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. Meta-analysis: The efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Annals of internal medicine*. 2005; **143**: 870-880.
- 136 Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Sanchez M, et al. 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. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013; **56**: 13-18.
- 137 Owers DS, Webster AC, Strippoli GF, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013; **2**: CD005133.
- 138 Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients.

- American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006; **6**: 2134-2143.
- 139 Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to cmv prophylaxis with oral ganciclovir: Results of a randomized clinical trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; **8**: 975-983.
- 140 Small LN, Lau J, Snyderman DR. Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: A meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006; **43**: 869-880.
- 141 Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2002; **185**: 20-27.
- 142 Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: Therapeutic implications and outcomes. *Clinical transplantation*. 2008; **22**: 162-170.
- 143 Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboch J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; **8**: 69-77.
- 144 Kotton CN. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nature reviews Nephrology*. 2010; **6**: 711-721.
- 145 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. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004; **4**: 611-620.
- 146 Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2007; **13**: 1703-1709.
- 147 Shiley KT, Gasink LB, Barton TD, Pfeiffenberger P, Olthoff KM, Blumberg EA. Increased incidence of cytomegalovirus infection in high-risk liver transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis versus ganciclovir prophylaxis. *Liver transplantation : official*

- publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2009; **15**: 963-967.
- 148 Mylonakis E, Kallas WM, Fishman JA. Combination antiviral therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002; **34**: 1337-1341.
- 149 Pérez Romero P BP, GiménezE, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future virology*. 2015; **10 (2)**: 113-114.
- 150 Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins b and h are necessary for tlr2 activation in permissive cells. *J Immunol*. 2006; **177**: 7094-7102.
- 151 Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. Nk cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell death and differentiation*. 2008; **15**: 226-233.
- 152 Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine*. 1989; **320**: 1731-1735.
- 153 Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; **331**: 44-49.
- 154 Crough T, Burrows JM, Fazou C, Walker S, Davenport MP, Khanna R. Contemporaneous fluctuations in t cell responses to persistent herpes virus infections. *European journal of immunology*. 2005; **35**: 139-149.
- 155 Gillespie GM, Wills MR, Appay V, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific cd8(+) t lymphocytes in healthy seropositive donors. *Journal of virology*. 2000; **74**: 8140-8150.
- 156 Khan N, Hislop A, Gudgeon N, et al. Herpesvirus-specific cd8 t cell immunity in old age: Cytomegalovirus impairs the response to a coresident ebv infection. *J Immunol*. 2004; **173**: 7481-7489.
- 157 Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific cd4+ and cd8+ t cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine*. 2005; **202**: 673-685.
- 158 Quinnan GV, Jr., Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: Hla-restricted t-lymphocyte and non-t-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *The New England journal of medicine*. 1982; **307**: 7-13.

- 159 Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of t cell clones. *Science*. 1992; **257**: 238-241.
- 160 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.
- 161 Sandberg JK, Fast NM, Nixon DF. Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human cd8+ t lymphocytes. *J Immunol*. 2001; **167**: 181-187.
- 162 Ganepola S, Gentilini C, Hilbers U, et al. Patients at high risk for cmv infection and disease show delayed cd8+ t-cell immune recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2007; **39**: 293-299.
- 163 Lilleri D, Gerna G, Fornara C, Lozza L, Maccario R, Locatelli F. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific cd4+ and cd8+ t-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood*. 2006; **108**: 1406-1412.
- 164 Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, et al. Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 2008; **198**: 818-826.
- 165 Tormo N, Solano C, Benet I, et al. Kinetics of cytomegalovirus (cmv) pp65 and ie-1-specific ifngamma cd8+ and cd4+ t cells during episodes of viral dnaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: Potential implications for the management of active cmv infection. *Journal of medical virology*. 2010; **82**: 1208-1215.
- 166 Lucia M, Crespo E, Cruzado JM, Grinyo JM, Bestard O. Human cmv-specific t-cell responses in kidney transplantation; toward changing current risk-stratification paradigm. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014; **27**: 643-656.
- 167 Manuel O, Husain S, Kumar D, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: A multicenter cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013; **56**: 817-824.
- 168 Bestard O, Lucia M, Crespo E, et al. Pretransplant immediately early-1-specific t cell responses provide protection for cmv infection after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; **13**: 1793-1805.

- 169 Cantisan S, Lara R, Montejo M, et al. Pretransplant interferon-gamma secretion by cmv-specific cd8+ t cells informs the risk of cmv replication after transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013; **13**: 738-745.
- 170 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. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2010; **23**: 506-513.
- 171 La Rosa C, Limaye AP, Krishnan A, Longmate J, Diamond DJ. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (cmv)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late cmv disease. *The Journal of infectious diseases*. 2007; **195**: 633-644.
- 172 Hill GR, Tey SK, Beagley L, et al. Successful immunotherapy of hcmv disease using virus-specific t cells expanded from an allogeneic stem cell transplant recipient. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010; **10**: 173-179.
- 173 Kapp M, Tan SM, Einsele H, Grigoleit G. Adoptive immunotherapy of hcmv infection. *Cytotherapy*. 2007; **9**: 699-711.
- 174 Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, et al. Adoptive t-cell therapy of a lung transplanted patient with severe cmv disease and resistance to antiviral therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; **9**: 1679-1684.
- 175 Gimenez E B-LP, Munoz-Cobo B, et al. The role of cytomegalovirus (cmv)-specific polyfunctional cd8+ t cells and antibodies neutralizing virus epithelial infection in the control of cmv infection in the allogeneic stem cell transplantation setting. *J Gen Virol*. 2015; **96**: 2822-2831.
- 176 Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *The New England journal of medicine*. 2005; **353**: 1350-1362.
- 177 Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, et al. Fetal human cytomegalovirus transmission correlates with delayed maternal antibodies to gh/gl/pul128-130-131 complex during primary infection. *PloS one*. 2013; **8**: e59863.
- 178 Bonaros N, Mayer B, Schachner T, Laufer G, Kocher A. Cmv-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: A meta-analysis. *Clinical transplantation*. 2008; **22**: 89-97.
- 179 Ranganathan K, Worley S, Michaels MG, et al. Cytomegalovirus immunoglobulin decreases the risk of cytomegalovirus infection but not disease after pediatric lung

- transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2009; **28**: 1050-1056.
- 180 Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *The New England journal of medicine*. 2014; **370**: 1316-1326.
- 181 Munoz I, Gutierrez A, Gimeno C, et al. Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (hcmv) glycoprotein b (gb)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from hcmv active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant. *Journal of medical virology*. 2001; **65**: 77-84.
- 182 Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, Gonczol E, Weibel RE. Protective effects of townes cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *The Journal of infectious diseases*. 1989; **159**: 860-865.
- 183 Wille PT, Knoche AJ, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC. A human cytomegalovirus g0-null mutant fails to incorporate gh/gl into the virion envelope and is unable to enter fibroblasts and epithelial and endothelial cells. *Journal of virology*. 2010; **84**: 2585-2596.
- 184 Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus ul131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *Journal of virology*. 2005; **79**: 10330-10338.
- 185 Hahn G, Revello MG, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus ul131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *Journal of virology*. 2004; **78**: 10023-10033.
- 186 Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, et al. Characterization of the human cytomegalovirus gh/gl/ul128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *Journal of virology*. 2008; **82**: 60-70.
- 187 Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *The Journal of general virology*. 1995; **76 ( Pt 4)**: 741-750.
- 188 Genini E, Percivalle E, Sarasini A, Revello MG, Baldanti F, Gerna G. Serum antibody response to the gh/gl/pul128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (hcmv) in primary and reactivated hcmv infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011; **52**: 113-118.
- 189 Wang D, Li F, Freed DC, et al. Quantitative analysis of neutralizing antibody response to human cytomegalovirus in natural infection. *Vaccine*. 2011; **29**: 9075-9080.
- 190 Gerna G, Sarasini A, Patrone M, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *The Journal of general virology*. 2008; **89**: 853-865.

- 191 Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011; **17**: 1285-1293.
- 192 Cantisán Bohórquez S NOD. Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. Tratamientos de base inmunológica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2011; **29**: 28-32.
- 193 Hebart H, Dagninik S, Stevanovic S, et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic t-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002; **99**: 3830-3837.
- 194 Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation*. 2012; **93**: 195-200.
- 195 Giulieri S, Manuel O. Quantiferon(r)-cmv assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert review of molecular diagnostics*. 2011; **11**: 17-25.
- 196 Borchers S, Bremm M, Lehrnbecher T, et al. Sequential anti-cytomegalovirus response monitoring may allow prediction of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *PloS one*. 2012; **7**: e50248.
- 197 Gratama JW, Boeckh M, Nakamura R, et al. Immune monitoring with itag mhc tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: A prospective multicenter study. *Blood*. 2010; **116**: 1655-1662.
- 198 Koehl U, Dirkwinkel E, Koenig M, et al. Reconstitution of cytomegalovirus specific t cells after pediatric allogeneic stem cell transplantation: Results from a pilot study using a multi-allele cmv tetramer group. *Klinische Padiatrie*. 2008; **220**: 348-352.
- 199 Gratama JW, Cornelissen JJ. Clinical utility of tetramer-based immune monitoring in allogeneic stem cell transplantation. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2003; **17**: 325-338.
- 200 McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013; **57 Suppl 4**: S196-199.
- 201 Pipeling MR, John ER, Orens JB, Lechtzin N, McDyer JF. Primary cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific cd8+ t-cell responses and t-bet levels predict immune control during early chronic infection in lung transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 2011; **204**: 1663-1671.



- 202 Browne EP, Shenk T. Human cytomegalovirus ul83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 11439-11444.
- 203 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. *The Journal of infectious diseases*. 2002; **185**: 1709-1716.
- 204 Borysiewicz LK, Graham S, Hickling JK, Mason PD, Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic t cells: Their precursor frequency and stage specificity. *European journal of immunology*. 1988; **18**: 269-275.
- 205 Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, et al. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic t cells. Relative frequency of stage-specific ctl recognizing the 72-kd immediate early protein and glycoprotein b expressed by recombinant vaccinia viruses. *The Journal of experimental medicine*. 1988; **168**: 919-931.
- 206 McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for cd8+ virus-specific cytotoxic t lymphocytes. *Journal of medical virology*. 1994; **43**: 103-110.
- 207 Landini MP, Mirolo G, Coppolecchia P, Re MC, La Placa M. Serum antibodies to individual cytomegalovirus structural polypeptides in renal transplant recipients during viral infection. *Microbiology and immunology*. 1986; **30**: 683-695.
- 208 Landini MP, Guan MX, Jahn G, et al. Large-scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens. *Journal of clinical microbiology*. 1990; **28**: 1375-1379.
- 209 Landini MP, La Placa M. Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins: A brief review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 1991; **14**: 97-105.
- 210 Kropff B, Landini MP, Mach M. An elisa using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *Journal of medical virology*. 1993; **39**: 187-195.
- 211 Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *The Journal of infectious diseases*. 1997; **175**: 533-544.
- 212 van Zanten J, Harmsen MC, van der Giessen M, et al. Humoral immune response against human cytomegalovirus (hcmv)-specific proteins after hcmv infection in lung transplantation as detected with recombinant and naturally occurring proteins. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1995; **2**: 214-218.

- 213 Landini MP, Lazzarotto T, Ertl PF. Humoral immune response to human cytomegalovirus DNA polymerase. *Journal of clinical microbiology*. 1993; **31**: 724-726.
- 214 Vornhagen R, Hinderer W, Sonneborn HH, et al. The DNA-binding protein pul57 of human cytomegalovirus is a major target antigen for the immunoglobulin m antibody response during acute infection. *Journal of clinical microbiology*. 1995; **33**: 1927-1930.
- 215 Jahn G, Scholl BC, Traupe B, Fleckenstein B. The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *The Journal of general virology*. 1987; **68 ( Pt 5)**: 1327-1337.
- 216 Landini MP, Mach M. Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: Is it diagnostically useful? When and how. *Scandinavian journal of infectious diseases Supplementum*. 1995; **99**: 18-23.
- 217 Landini MP, Ripalti A, Sra K, Pouletty P. Human cytomegalovirus structural proteins: Immune reaction against pp150 synthetic peptides. *Journal of clinical microbiology*. 1991; **29**: 1868-1872.
- 218 Greijer AE, van de Crommert JM, Stevens SJ, Middeldorp JM. Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *Journal of clinical microbiology*. 1999; **37**: 179-188.
- 219 Weber B, Braun W, Cinatl J, Jr., Doerr HW. Humoral immune response to human cytomegalovirus infection: Diagnostic potential of immunoglobulin class and igg subclass antibody response to human cytomegalovirus early and late antigens. *The Clinical investigator*. 1993; **71**: 270-276.
- 220 Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (hcmv) gp55-116 (gb): Use of hcmv-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *Journal of virology*. 1990; **64**: 1079-1085.
- 221 Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurth E, Mach M. Glycoprotein h of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *The Journal of general virology*. 1996; **77 ( Pt 7)**: 1537-1547.
- 222 Shimamura M, Mach M, Britt WJ. Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein m (gm)/gn-specific virus-neutralizing antibody response. *Journal of virology*. 2006; **80**: 4591-4600.
- 223 Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins m (gp110) and n (gp115). *Journal of virology*. 2000; **74**: 11881-11892.
- 224 Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S, Rabinovich R. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: Report from the national vaccine advisory committee. *Clinical*

- infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2004; **39**: 233-239.
- 225 Schleiss MR, Heineman TC. Progress toward an elusive goal: Current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert review of vaccines.* 2005; **4**: 381-406.
- 226 Adler SP. Human cmv vaccine trials: What if cmv caused a rash? *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2008; **41**: 231-236.
- 227 Rieder F SC. Cytomegalovirus vaccine: Phase ii clinical trial results. *Clin Microbiol Infect.* 2013; **20**: 95-102.
- 228 Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM, et al. Effect of towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial. *Annals of internal medicine.* 1991; **114**: 525-531.
- 229 Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, et al. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *The Journal of infectious diseases.* 1995; **171**: 26-32.
- 230 Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, et al. Cytomegalovirus glycoprotein-b vaccine with mf59 adjuvant in transplant recipients: A phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011; **377**: 1256-1263.
- 231 Kharfan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, et al. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Infectious diseases.* 2012; **12**: 290-299.
- 232 Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, et al. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; **108**: 19755-19760.
- 233 Juranic Lisnic V, Babic Cac M, Lisnic B, et al. Dual analysis of the murine cytomegalovirus and host cell transcriptomes reveal new aspects of the virus-host cell interface. *PLoS pathogens.* 2013; **9**: e1003611.
- 234 Black DL. Protein diversity from alternative splicing: A challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell.* 2000; **103**: 367-370.
- 235 Sedano C. Rna-seq: Herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad.* 2012; **16 (2)**: 101-103.
- 236 Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics.* 2010; **11**: 31-46.
- 237 Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mrna sequencing. *Nature methods.* 2008; **5**: 613-619.

- 238 Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by rna-seq. *Nature methods*. 2008; **5**: 621-628.
- 239 Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (hcmv) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in escherichia coli: A new approach for construction of hcmv mutants. *Journal of virology*. 1999; **73**: 8320-8329.
- 240 Towler JC, Ebrahimi B, Lane B, Davison AJ, Dargan DJ. Human cytomegalovirus transcriptome activity differs during replication in human fibroblast, epithelial and astrocyte cell lines. *The Journal of general virology*. 2012; **93**: 1046-1058.
- 241 Lehner B, Williams G, Campbell RD, Sanderson CM. Antisense transcripts in the human genome. *Trends in genetics : TIG*. 2002; **18**: 63-65.
- 242 Zhang G, Raghavan B, Kotur M, et al. Antisense transcription in the human cytomegalovirus transcriptome. *Journal of virology*. 2007; **81**: 11267-11281.
- 243 Lurain NS, Fox AM, Lichy HM, et al. Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from ul146 through ul147a reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virology journal*. 2006; **3**: 4.
- 244 Wing BA, Huang ES. Analysis and mapping of a family of 3'-coterminal transcripts containing coding sequences for human cytomegalovirus open reading frames ul93 through ul99. *Journal of virology*. 1995; **69**: 1521-1531.
- 245 Adair R, Liebisch GW, Colberg-Poley AM. Complex alternative processing of human cytomegalovirus ul37 pre-mrna. *The Journal of general virology*. 2003; **84**: 3353-3358.
- 246 Razonable R. Direct and indirect effects of cytomegalovirus: Can we prevent them? *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2010; **28**: 1-5.
- 247 Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; **9**: 1214-1222.
- 248 Torre-Cisneros J. Toward the individualization of cytomegalovirus control after solid-organ transplantation: The importance of the "individual pathogenic balance". *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009; **49**: 1167-1168.
- 249 Cui X, Meza BP, Adler SP, McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*. 2008; **26**: 5760-5766.
- 250 Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology*. 2007; **17**: 355-363.

- 251 Espigado I, de la Cruz-Vicente F, BenMarzouk-Hidalgo OJ, et al. Timing of cmv-specific effector memory t cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014; **27**: 1253-1262.
- 252 Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011; **11**: 2463-2471.
- 253 Solano C, Benet I, Clari MA, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma cd8+ and cd4+ t cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008; **93**: 1434-1436.
- 254 Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: Profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *Journal of virology*. 1999; **73**: 5757-5766.
- 255 Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses*. 2014; **6**: 1049-1072.
- 256 Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*. 2009; **10**: R25.
- 257 David M, Dzamba M, Lister D, Ilie L, Brudno M. Shrimp2: Sensitive yet practical short read mapping. *Bioinformatics*. 2011; **27**: 1011-1012.
- 258 Dillies MA, Rau A, Aubert J, et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for illumina high-throughput rna sequencing data analysis. *Briefings in bioinformatics*. 2013; **14**: 671-683.
- 259 Pescovitz MD. Benefits of cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2006; **82**: S4-8.
- 260 Akalin E, Sehgal V, Ames S, et al. Cytomegalovirus disease in high-risk transplant recipients despite ganciclovir or valganciclovir prophylaxis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003; **3**: 731-735.
- 261 Winston DJ. Prevention of cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Lancet*. 1995; **346**: 1380-1381.
- 262 Lilleri D, Piccinini G, Genini E, et al. Monitoring of human cytomegalovirus (hcmv)-specific cd4+ t cell frequency by cytokine flow cytometry as a possible indicator for discontinuation of hcmv secondary prophylaxis in haart-treated aids patients. *Journal of*

- clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2004; **29**: 297-307.
- 263 Singh N, Yu VL. Preemptive therapy for cytomegalovirus. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006; **12**: 327.
- 264 Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. Pre-emptive therapy of cmvpp65 antigen positive renal transplant recipients with oral ganciclovir: A randomized, comparative study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003; **18**: 1899-1908.
- 265 Singh N. Optimal prevention of late-onset cytomegalovirus (cmv) disease and other sequelae of cmv infection in organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008; **47**: 296-297; author reply 297.
- 266 Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Blanco-Lobo P, et al. Viral load, cmv-specific t-cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014; **27**: 1060-1068.
- 267 Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R. Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: Incidence, clinical profile, and risk factors. *Transplantation proceedings*. 2012; **44**: 694-700.
- 268 Ghisetti V, Barbui A, Franchello A, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA by the polymerase chain reaction as a predictor of disease in solid organ transplantation. *Journal of medical virology*. 2004; **73**: 223-229.
- 269 Emery VC, Hassan-Walker AF, Burroughs AK, Griffiths PD. Human cytomegalovirus (hcmv) replication dynamics in hcmv-naive and -experienced immunocompromised hosts. *The Journal of infectious diseases*. 2002; **185**: 1723-1728.
- 270 Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific cd8 t cells predicts high-level replication after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008; **8**: 990-999.
- 271 Radha R, Jordan S, Puliyaanda D, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005; **5**: 110-117.

- 272 Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (cmv)-specific t cell immunity after renal transplantation mediates protection from cmv disease by limiting the systemic virus load. *The Journal of infectious diseases*. 1999; **180**: 247-253.
- 273 Sester M, Sester U, Gartner BC, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H. Dominance of virus-specific cd8 t cells in human primary cytomegalovirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002; **13**: 2577-2584.
- 274 Kim SH, Lee HJ, Kim SM, et al. Diagnostic usefulness of cytomegalovirus (cmv)-specific t cell immunity in predicting cmv infection after kidney transplantation: A pilot proof-of-concept study. *Infection & chemotherapy*. 2015; **47**: 105-110.
- 275 Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific cd8 t cells. *The Journal of experimental medicine*. 2005; **201**: 1031-1036.
- 276 Lilleri D, Zelini P, Fornara C, Comolli G, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific cd4+ and cd8+ t cell responses in primary infection of the immunocompetent and the immunocompromised host. *Clin Immunol*. 2009; **131**: 395-403.
- 277 Schmidt CA, Oettle H, Peng R, et al. Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy coat with antigen detection and occurrence of immunoglobulin m for the demonstration of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation*. 1995; **59**: 1133-1138.
- 278 Marsano L, Perrillo RP, Flye MW, et al. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 1990; **161**: 454-461.
- 279 Halling VW, Maine GT, Groettum CM, et al. Clinical evaluation of a new recombinant antigen-based cytomegalovirus immunoglobulin m immunoassay in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001; **71**: 395-397.
- 280 Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, et al. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *The Journal of general virology*. 1999; **80 ( Pt 11)**: 2867-2877.
- 281 Borisch B, Jahn G, Scholl BC, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA and viral antigens in tissues of different manifestations of cmv infection. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology*. 1988; **55**: 93-99.
- 282 Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein b after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *The Journal of infectious diseases*. 1992; **165**: 381-384.

- 283 Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; **102**: 18153-18158.
- 284 Murphy E, Yu D, Grimwood J, et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 14976-14981.
- 285 Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, Gerna G. Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gh/gl/pul128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *Journal of clinical immunology*. 2012; **32**: 1324-1331.
- 286 Snyderman DR et al. Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1049 –1054.
- 287 Fouts AE, Chan P, Stephan JP, Vandlen R, Feierbach B. Antibodies against the gh/gl/ul128/ul130/ul131 complex comprise the majority of the anti-cytomegalovirus (anti-cmv) neutralizing antibody response in cmv hyperimmune globulin. *Journal of virology*. 2012; **86**: 7444-7447.
- 288 Stratton K. R. DJS, Lawrence R. S. Vaccines for the 21st century: A tool for decisionmaking
- In: Stratton KR, Durch JS, Lawrence RS, eds. Washington (DC) 2000.
- 289 Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, et al. Priorities for cmv vaccine development. *Vaccine*. 2013; **32**: 4-10.
- 290 Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, et al. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional ul131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to cd8+ t cells. *The Journal of general virology*. 2005; **86**: 275-284.
- 291 Azhikina T, Skvortsov T, Radaeva T, et al. A new technique for obtaining whole pathogen transcriptomes from infected host tissues. *BioTechniques*. 2010; **48**: 139-144.
- 292 Grifantini R, Bartolini E, Muzzi A, et al. Previously unrecognized vaccine candidates against group b meningococcus identified by DNA microarrays. *Nature biotechnology*. 2002; **20**: 914-921.
- 293 Prachi P, Donati C, Masciopinto F, Rappuoli R, Bagnoli F. Deep sequencing in pre- and clinical vaccine research. *Public health genomics*. 2013; **16**: 62-68.
- 294 Tirosh O, Cohen Y, Shitrit A, et al. The transcription and translation landscapes during human cytomegalovirus infection reveal novel host-pathogen interactions. *PLoS pathogens*. 2015; **11**: e1005288.



- 
- 295 Zhou W, Longmate J, Lacey SF, et al. Impact of donor cmv status on viral infection and reconstitution of multifunction cmv-specific t cells in cmv-positive transplant recipients. *Blood*. 2009; **113**: 6465-6476.
- 296 Slezak SL, Bettinotti M, Selleri S, Adams S, Marincola FM, Stroncek DF. Cmv pp65 and ie-1 t cell epitopes recognized by healthy subjects. *Journal of translational medicine*. 2007; **5**: 17.
- 297 Sung H, Schleiss MR. Update on the current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert review of vaccines*. 2010; **9**: 1303-1314.
- 298 Hofmann I, Wen Y, Ciferri C, et al. Expression of the human cytomegalovirus pentamer complex for vaccine use in a cho system. *Biotechnology and bioengineering*. 2015; **112**: 2505-2515.
- 299 Fielding CA, Aicheler R, Stanton RJ, et al. Two novel human cytomegalovirus nk cell evasion functions target mica for lysosomal degradation. *PLoS pathogens*. 2014; **10**: e1004058.
- 300 McCormick AL, Roback L, Livingston-Rosanoff D, St Clair C. The human cytomegalovirus ul36 gene controls caspase-dependent and -independent cell death programs activated by infection of monocytes differentiating to macrophages. *Journal of virology*. 2010; **84**: 5108-5123.
- 301 Noriega VM, Hesse J, Gardner TJ, Besold K, Plachter B, Tortorella D. Human cytomegalovirus us3 modulates destruction of mhc class i molecules. *Molecular immunology*. 2012; **51**: 245-253.
- 302 Obar JJ, Donovan DC, Crist SG, Silvia O, Stewart JP, Usherwood EJ. T-cell responses to the m3 immune evasion protein of murid gammaherpesvirus 68 are partially protective and induced with lytic antigen kinetics. *Journal of virology*. 2004; **78**: 10829-10832.
- 303 Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*. 1996; **383**: 720-722.

