

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katka POHAR

**DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA
PROTI CITOMEGALOVIRUSU PRI BOLNIKIH PO
PRESADITVI ORGANOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katka POHAR

**DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI
CITOMEGALOVIRUSU PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI
ORGANOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**ASSESMENT OF T-CELL IMMUNE RESPONSE TO
CYTOMEGALOVIRUS IN SOLID ORGAN TRANSPLANT
RECIPIENTS**

M. Sc. THESIS
Mater Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za humoralno imunologijo (HUM) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihanja in za recenzentko prof. dr. Mojco Narat.

Mentor: prof. dr. Alojz Ihan

Recenzentka: prof. dr. Mojca Narat

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Miroslav PETROVEC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katka Pohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 578.083.3:577.27:616.61-089.843(043)=163.6
KG	virusi/citomegalovirus/interferon- γ /T-celični imunski odziv/QuantiFERON/presaditev čvrstih organov/ledvice
AV	POHAR, Katka, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	IHAN, Alojz (mentor)/NARAT, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2016
IN	DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI CITOMEGALOVIRUSU PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI ORGANOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 74 str., 13 pregl., 8 sl., 181 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Spremljanje specifičnega T-celičnega imunskega odziva proti citomegalovirusu (CMV) je pomembno po presaditvi čvrstih organov za prepoznavanje bolnikov, ki imajo povečano tveganje za pojav viremije, CMV-bolezni ali pozne CMV-bolezni. Ena izmed metod za spremeljanje CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva je test QuantiFERON-CMV®. Namen naše raziskave je bila uvedba testa QuantiFERON-CMV in spremeljanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov. V študijo je bilo vključenih osemajst bolnikov iz Centra za transplantacijo ledvic Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana ter deset zdravih oseb. V okviru uvajanja testa smo preverili znotrajtestno in medtestno ponovljivost. V krvi bolnikov in zdravih oseb smo določili koncentracijo protiteles IgG in IgM proti CMV in izvedli test QuantiFERON-CMV. V krvi devetih bolnikov smo določili tudi koncentracijo CMV DNA s PCR v realnem času. Ugotovili smo, da % koeficiente variacije pri znotrajtestni ponovljivosti znaša 3,8 %, pri medtestni pa 11,9 % oz. pri komercialno dostopnih kontrolah 5,4 %. Pri določevanju CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pri zdravih posameznikih smo ugotovili, da pride pri CMV-seronegativnih zdravih posameznikih do 100-odstotnega ujemanja rezultatov testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja ter do 67-odstotnega ujemanja pri CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih. Pri šestih CMV-seropozitivnih bolnikih po presaditvi ledvic, ki smo jih spremeljali pred in do tri mesece po presaditvi, smo ugotovili, da se je v času spremeljanja pri vseh bolnikih ohranil CMV-specifični odziv IFN- γ . Ob sočasnem merjenju koncentracije CMV DNA in CMV-specifičnega CD8+ T-celičnega imunskega odziva s testom QuantiFERON-CMV smo ugotovili, da med spremenljivkama ni bilo statistično značilne povezanosti, nakazana pa je bila negativna povezanost. Test smo uspešno uvedli v redno laboratorijsko prakso in ugotovili, da je test pomemben za spremeljanje T-celičnega odziva proti CMV pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov, saj lahko pomaga pri napovedovanju tveganja za okužbo s CMV ali za pojav CMV-bolezni ter pomaga pri odločitvah o zdravljenju bolnikov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 578.083.3:577.27:616.61-089.843(043)=163.6
CX viruses/cytomegalovirus/interferon- γ /T-cell immune response/QuantiFERON/solid organ transplantation/kidney
AU POHAR, Katka
AA IHAN, Alojz (supervisor)/NARAT, Mojca (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TY ASSESSMENT OF T-CELL IMMUNE RESPONSE TO CYTOMEGALOVIRUS IN SOLID ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 74 p., 13 tab., 8 fig., 181 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Assessing the cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell immune response is important for identification of solid organ transplant recipients with increased risk of developing CMV viraemia, CMV disease or late-onset CMV disease. One of the methods used for monitoring CMV-specific T-cell immune response is the QuantiFERON-CMV® assay. The aim of our study was to introduce the QuantiFERON-CMV assay in routine diagnostics and to monitor CMV-specific T-cell immune response in patients before and after solid organ transplantation. Eighteen patients from the Kidney transplant centre of University medical centre Ljubljana and ten healthy individuals were included in our study. In the context of the assay validation for routine diagnostics we determined intra- and inter-assay imprecision (% coefficient of variation). In blood samples of patients and healthy individuals we determined titers of IgG and IgM antibodies against CMV and performed the QuantiFERON-CMV assay. Furthermore, we have determined the viral load by measuring the concentration of CMV DNA by real-time PCR in the blood of nine patients. We have found that the % CV for the intra-assay imprecision was 3.8%, for the inter-assay 11.9% and for commercially available controls 5.4%. When determining the CMV-specific T-cell immune response in healthy individuals with CMV specific antibodies (CMV-seropositive) and without antibodies (CMV-seronegative), QuantiFERON-CMV assay showed 100% agreement with the serological testing in seronegative and 67% in seropositive healthy individuals. In six CMV-seropositive renal transplant recipients, who were monitored before and up to three months after transplantation, the CMV-specific IFN- γ response was preserved. We found no significant correlation between the CMV viral load and CMV-specific CD8 + T-cell immune response with QuantiFERON-CMV assay. However, a negative correlation was implied. The assay was successfully introduced into routine diagnostics. This study shows that the assay is essential for monitoring of CMV-specific T-cell immune response in patients after solid organ transplantation. It can help to predict the risk of CMV infection or CMV disease and guide potential therapeutic approaches.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HUMANI CITOMEGALOVIRUS	3
2.2 STRUKTURA VIRUSA	4
2.3 ŽIVLJENJSKI CIKEL	6
2.3.1 Vstop virusa v gostiteljsko celico	6
2.3.2 Izražanje genov	7
2.3.3 Sestavljanje vironov in izstop	7
2.3.4 Latentna okužba	8
2.4 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA CMV	9
2.4.1 Bolniki po presaditvah čvrstih organov	10
2.4.1.1 Dejavniki tveganja	10
2.4.1.2 Klinične značilnosti	11
2.5 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO S CMV	12
2.5.1 Prirojeni imunski odziv	12
2.5.1.1 Receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev	12
2.5.1.2 Antigen predstavitevne celice (APC)	13
2.5.1.3 Naravne celice ubijalke	14
2.5.2 Pridobljeni imunski odziv	14
2.5.2.1 Celična imunost	15
2.5.2.2 CD8 ⁺ celice T	16
2.5.2.3 CD4 ⁺ celice T	17
2.5.2.4 Gama delta celice T	18
2.5.3 Humoralni odziv	19
2.6 DIAGNOSTIKA CMV	20
2.6.1 Serološko testiranje na protitelesa proti CMV	20
2.6.2 Kultivacija CMV	20
2.6.3 Histopatologija	21
2.6.4 Testiranje CMV virusnega bremena	21
2.6.4.1 CMV antigenemija	21
2.6.4.2 Kvantitativna določitev CMV nukleinskih kislin	21
2.6.5 Imunski monitoring	22
2.6.5.1 Test ELISpot	22
2.6.5.2 Test označevanja z MHC-tetrameri	23
2.6.5.3 Znotrajcelično označevanje citokinov	23

2.6.5.4	Test QuantiFERON-CMV.....	24
2.7	ZDRAVLJENJE CMV OKUŽB PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI ČVRSTIH ORGANOV	28
2.7.1	Preventivno zdravljenje.....	28
2.7.2	Univerzalna profilaksa.....	29
2.7.3	Predbolezensko zdravljenje.....	29
2.7.4	Hibridni pristop.....	29
2.7.5	Zdravljenje CMV-bolezni.....	29
2.7.6	Cepljenje	30
3	MATERIAL IN METODE.....	31
3.1	MATERIAL	31
3.1.1	Bolniki	31
3.1.2	Test QuantiFERON-CMV.....	31
3.1.3	Serologija.....	32
3.1.3.1	Določanje protiteles IgG proti CMV	32
3.1.3.2	Določanje protiteles IgM proti CMV	33
3.2	METODE	34
3.2.1	Test QuantiFERON-CMV.....	34
3.2.1.1	Odvzem krvi	34
3.2.1.2	Izvedba testa ELISA.....	34
3.2.2	Serologija.....	36
3.2.2.1	Določanje protiteles IgG proti CMV	36
3.2.2.1.1	Princip metode.....	36
3.2.2.1.2	Interpretacija rezultatov.....	37
3.2.2.2	Določanje protiteles IgM proti CMV	37
3.2.2.2.1	Princip metode.....	38
3.2.2.2.2	Interpretacija rezultatov.....	38
3.2.3	Test za določanje koncentracije CMV DNA.....	38
3.2.4	Statistična analiza rezultatov	39
4	REZULTATI	40
4.1	VALIDACIJA TESTA.....	40
4.1.1	Temeljno testiranje	40
4.1.2	Prag testa.....	40
4.1.3	Specifičnost in občutljivost testa	40
4.1.4	Podani znotrajtestna in medtestna ponovljivost	41
4.1.5	Testirana znotrajtestna ponovljivost.....	41
4.1.6	Testirana medtestna ponovljivost.....	42
4.1.7	Določanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri seronegativnih in seropozitivnih zdravih osebah.....	43
4.1.8	T-celični imunski odziv pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov.....	44
4.1.9	Določanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih z visokim CMV virusnim bremenom.....	46
5	RAZPRAVA	50
5.1	VALIDACIJA TESTA.....	50

5.2	DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI CMV PRI SERONEGATIVNIH IN SEROPOZITIVNIH ZDRAVIH OSEBAH.....	51
5.3	T-CELIČNI IMUNSKI ODZIV PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI ČVRSTIH ORGANOV	52
5.4	DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI CMV PRI BOLNIKIH Z VISOKIM CMV VIRUSNIM BREMENOM	55
6	SKLEPI	57
7	POVZETEK.....	58
8	VIRI.....	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mešanica 22 peptidov iz različnih CMV proteinov, uporabljenih pri testu QuantiFERON-CMV (QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) ..., 2013: 15)	26
Preglednica 2: Primerjava različnih testov za spremljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Kotton in sod., 2013: 339).....	28
Preglednica 3: Interpretacija rezultatov testa QuantifERON-CMV	35
Preglednica 4: Znotrajtestna ponovljivost rezultatov testa QuantifERON-CMV pri treh naključno izbranih vzorcih in komercialno dostopni kontroli	42
Preglednica 5: Medtestna ponovljivost rezultatov testa QuantifERON-CMV pri treh naključno izbranih vzorcih.....	42
Preglednica 6: Medtestna ponovljivost rezultatov testa QuantifERON-CMV pri komercialno dostopnih kontrolah.....	42
Preglednica 7: Primerjava serološkega testiranja proti CMV in koncentracije sproščenega IFN- γ , merjene s testom QuantifERON-CMV pri seronegativnih zdravih posameznikih.....	43
Preglednica 8: Primerjava serološkega testiranja proti CMV in koncentracije sproščenega IFN- γ , merjene s testom QuantifERON-CMV pri seropozitivnih zdravih posameznikih.....	43
Preglednica 9: Spremljanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri CMV-seropozitivnih bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov s testom QuantifERON-CMV.....	45
Preglednica 10: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantifERON-CMV pri bolnikih z nizko koncentracijo CMV DNA v plazmi	47
Preglednica 11: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantifERON-CMV pri bolnikih s koncentracijo CMV DNA v plazmi med 137 in 1000 kopij/mL	47
Preglednica 12: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantifERON-CMV pri bolnikih s koncentracijo CMV DNA v plazmi nad 1000 kopij/mL	47
Preglednica 13: Spearmanov korelacijski koeficient povezave med spremenljivkama QuantifERON-CMV in CMV DNA v plazmi	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematska struktura CMV viriona (Tomtishen, 2012: 2)	4
Slika 2: Življenjski cikel CMV v človeški celici (Crough in Khanna, 2009: 78)	8
Slika 3: Princip testa QuantiFERON-CMV (CMV-specific immune monitoring ..., 2013: 4)	24
Slika 4: Primerjava različnih testov za ugotavljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Crough in Khanna, 2009: 87)	27
Slika 5: Postopek izvedbe testa QuantiFERON-CMV (QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) ..., 2013: 19)	36
Slika 6: Primerjava CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva med CMV- seropozitivnimi in CMV-seronegativnimi zdravimi posamezniki	44
Slika 7: CMV-specifični T-celični imunski odziv, merjen s testom QuantiFERON-CMV pri CMV-seropozitivnih bolnikih pred in po presaditvi ledvic	46
Slika 8: Koncentracija CMV DNA v plazmi [kopij/mL] in sproščen IFN- γ , merjen s testom QuantiFERON-CMV [IE/mL]	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
APC	antigen predstavitevne celice
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
cAMP	ciklični adenozin-monofosfat
CE	evropska skladnost (angl. European Conformat)
Celice NK	naravne celice ubijalke (angl. natural killer cells)
CLIA	kemiluminiscenčni imunski test (angl. chemiluminescence immunoassay)
CMV	humani citomegalovirus
CV	koeficient variacije
DAI	od DNA-odvisen aktivator IFN-regulatornega dejavnika (angl. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors)
DC	dendritične celice
E	zgodnji (angl. early)
EBER	RNA, ki jo kodira Epstein–Barr virus (angl. Epstein–Barr virus-encoded small RNA)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISpot	angl. enzyme-linked immunosorbent spot assay
ERGIC	kompartiment med endoplazmatskim retikulumom in Golgijevim aparatom (angl. endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment)
GMC-SF	granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
gp	glikoprotein
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
HLA	humani levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)
ICS	znotrajcelično označevanje citokinov (angl. intracellular cytokine staining)
IE	takojšnji zgodnji (angl. immediate-early)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interlevkin
IRF	interferon regulatorni faktor (angl. interferon regulatory factor)
IRL	notranje dolge ponovitve (angl. internal repeat long)
IRS	notranje kratke ponovitve (angl. internal repeat short)
IVD	<i>in vitro</i> diagnostični medicinski pripomočki (angl. <i>in vitro</i> diagnostic devices)
L	pozni (angl. late)

LAT	z latenco povezani transkripti (angl. latency-associated transcript)
MCMV	mišji citomegalovirus
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. major histocompatibility complex)
mTOR	tarče rapamicina pri sesalcih (angl. mammalian target of rapamycin) inhibitorji tarče rapamicina pri sesalcih
NF-κB	jedrni faktor kapa B (angl. nuclear factor kappa B)
NIEPS	neinfektivni virusni delci (angl. noninfectious enveloped particles)
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
PAMP	patogenom pridruženi molekulski vzorci (angl. pathogen associated molecular pattern)
PBMC	mononuklearne celice periferne krvi
PD-1	protein programirane celične smrti 1 (angl. programmed cell death protein 1)
pp	fosfoprotein
PRR	receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (angl. pattern-recognition receptors)
RLU	relativne svetlobne enote (angl. relative light unit)
ROC	angl. Receiver Operating Characteristic
SPSS	angl. Statistical Package for the Social Sciences
TLR	receptorji podobni Toll-u (angl. Toll-like receptors)
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa
TRL	terminalne dolge ponovitve (angl. terminal repeat long)
TRS	terminalne kratke ponovitve (angl. terminal repeat short)
UL	edinstveni dolgi odseki (angl. unique long)
US	edinstveni kratki odseki (angl. unique short)

1 UVOD

Humani citomegalovirus (CMV) spada v družino *Herpesviridae*, poddružino *Betaherpesvirinae*, rod *Cytomegalovirus*. Lahko se prenaša preko sline, urina, blata, s spolnimi stiki, transplacentalno, transmamarno, s transfuzijo okužene krvi, presaditvijo čvrstih organov ali presaditvijo krvotvornih matičnih celic. Prekuženost s CMV variira glede na socialno-ekonomski status prebivalcev od 30 pa tudi do 90 % (Pass, 1985; Sohn in sod., 1991).

Primarna okužba s CMV je pogosto pri zdravih in imunsko kompetentnih posameznikih asimptomatska. Redkeje lahko povzroči mononukleozi podobno bolezen (Sissons in Carmichael, 2002). Po primarni okužbi CMV preide v latentno obliko v perifernih monocitih in CD34⁺ matičnih celicah mieloične vrste (Sinclair, 2008), kjer tekom življenja prihaja do asimptomatskih reaktivacij (Sinclair in Sissons, 2006). Kljub izboljšanemu zdravljenju in nadzoru pa je CMV še vedno najpomembnejši infekcijski patogen pri prejemnikih organov in lahko, preko številnih posrednih in neposrednih učinkov, vpliva na delovanje presajenega organa ter povzroči visoko obolenost in umrljivost po presaditvah. Bolniki lahko razvijejo asimptomatsko CMV viremijo, CMV-sindrom ali tkivno invazivno bolezen. Pozna CMV-bolezen je še vedno velik problem pri bolnikih z visokim tveganjem po zaključku protivirusne profilakse in je povezana z odpovedjo organa in umrljivostjo (Ramanan in Razonable, 2013).

Napovedovanje CMV-bolezni pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov je težavno. Hitri in natančni diagnostični testi so ključnega pomena za ustrezno diagnozo in zdravljenje CMV-bolezni po presaditvi. Diagnoza CMV-bolezni temelji na prepoznavanju kliničnih znakov in simptomov v povezavi z laboratorijskim odkrivanjem CMV v krvi ali bioptičnem vzorcu (Humar in Michaels, 2006). Za odkrivanje okužb s CMV so na voljo različne diagnostične metode, ki jih lahko razdelimo na neposredne in posredne. Neposredne metode so: (i) kultivacija virusa na celični kulturi, (ii) histopatologija, (iii) detekcija virusnih antigenov, in (iv) zaznavanje virusnih nukleinskih kislin. Med posredne metode testiranja pa spadajo: (i) dokazovanje CMV-specifičnih protiteles IgM in IgG in (ii) določanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Schottstedt in sod., 2010).

Z imunskim monitoringom (angl. immune monitoring) CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva lahko (i) identificiramo bolnike z visokim tveganjem za nastanek pozne CMV-bolezni ali viremije po končanem profilaktičnem zdravljenju, (ii) razlikujemo med bolniki, ki imajo povečano tveganje za napredovanje CMV-bolezni v primerjavi z bolniki, pri katerih pride do spontane ozdravitve virusne okužbe, in (iii) identificiramo bolnike, ki imajo večje tveganje za ponavlajoče virusne reaktivacije in bolezen po končani protivirusni terapiji (Khanna in Smith, 2013), ter (vi) umestimo bolnike glede na stopnjo tveganja za CMV-bolezen pred presaditvijo. Prav tako nam lahko pomaga pri usmerjanju profilakse in predbolezenskega zdravljenja (Ritter in sod., 2013).

Obstajajo različni testi za ugotavljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva. Eden izmed teh je test QuantiFERON-CMV® (Qiagen, Nemčija). Je encimskoimunski test, ki omogoča spremeljanje specifičnega CD8⁺ T-celičnega odziva proti CMV. Temelji na merjenju sproščenega interferona-γ (IFN-γ) iz CMV-specifičnih CD8⁺ T-celic po *in vitro* stimulaciji polne krvi z 22 imunogenimi virusnimi peptidi in s tem omogoča oceno celične imunosti proti CMV. Njihova predstavitev je specifična za široko paleto človeških levkocitnih antigenov (angl. human leukocyte antigen - HLA) razreda I, ki obsegajo najpogostejše vrste HLA, prisotne v splošni populaciji (Giulieri in Manuel, 2011; Walker in sod., 2007). Test je uporaben za oceno tveganja za pojav CMV-bolezni pri seropozitivnih prejemnikih pred presaditvijo (Cantisán in sod., 2013), napoved pozne CMV-bolezni po prenehanju profilaktičnega zdravljenja (Kumar in sod., 2009), spontane izzvenitve asimptomatske CMV-viremije (Lisboa in sod., 2012) in je koristen za spremeljanje bolnikov s predbolezenskim zdravljenjem in lahko pripomore k usmerjanju kliničnih odločitev (Weseslindtner in sod., 2012; Manuel, 2013). V okviru magistrske naloge smo žeeli uvesti test QuantiFERON-CMV v rutinsko diagnostiko in določiti CMV-specifični T-celični imunski odziv pri bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE

Cilj magistrske naloge je uvedba komercialnega testa QuantiFERON-CMV in določitev T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov.

Hipoteze magistrske naloge:

- Domnevamo, da imajo CMV-seronegativne zdrave osebe odsoten T-celični imunski odziv proti virusu CMV.
- Pričakujemo, da imajo CMV-seropozitivne zdrave osebe prisoten močan T-celični imunski odziv proti virusu CMV.
- Domnevamo, da CMV-seropozitivni bolniki ohranijo močan T-celični imunski odziv tudi po presaditvi čvrstih organov.
- Pričakujemo, da imajo bolniki z večjim CMV virusnim bremenom prisoten močnejši T-celični imunski odziv.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HUMANI CITOMEGALOVIRUS

Humani citomegalovirus (CMV) spada v družino *Herpesviridae*, poddružino *Betaherpesvirinae*, rod *Cytomegalovirus*. Njegovo ime izhaja iz dejstva, da povzroča povečanje okuženih celic (citomegalijo) in nastanek značilnih inkluzijskih teles (Schottstedt in sod., 2010). CMV se je najverjetneje razvijal skupaj s človekom in verjetno obstaja od samega začetka obstoja človeške vrste, zato je dobro prilagojen na svojega gostitelja (Ohlin in Söderberg-Nauclér, 2015).

CMV do sredine 60. let 20. stoletja ni veljal za virus, ki povzroča hudo, klinično zaznavno patologijo, razen v redkih primerih, ko se manifestira s hudo kongenitalno boleznijo, ki so jo prvič opisali leta 1890. V 60. letih so opazili, da CMV povzroča zvišanje telesne temperature pri bolnikih po transfuziji krvi po operacijah na odprttem srcu. Prav tako so ugotovili, da lahko pri zdravih posameznikih pride do mononukleoze. Kasneje se je z razvojem presaditev zarodnih matičnih celic in čvrstih organov ter epidemije virusa humane imunske pomanjkljivosti (HIV) povečala populacija imunsko oslabljenih bolnikov. Pri njih pogosto pride do reaktivacije virusa, zato je CMV hitro postal pomemben vzrok obolenosti in smrtnosti med transplantiranci in bolniki s sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS) (Ohlin in Söderberg-Nauclér, 2015).

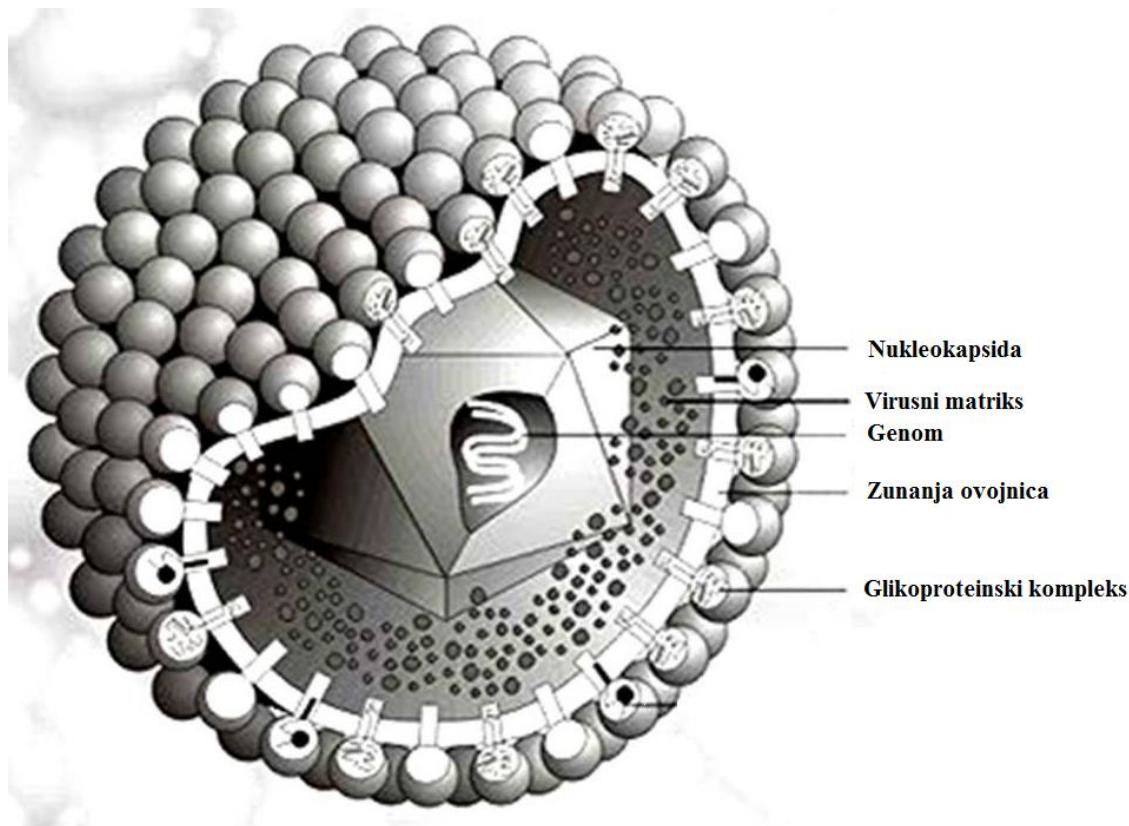
CMV se lahko prenaša preko sline, urina, blata, s spolnimi stiki, transplacentalno, transmamarno, s transfuzijo okužene krvi, presaditvijo čvrstih organov ali presaditvijo krvotvornih matičnih celic. Prekuženost s CMV variira glede na socialno-ekonomski status prebivalcev. V ekonomsko bolj razvitih regijah (npr. Amerika, Zahodna Evropa in Avstralija) je razširjenost med 30 in 70 % (Pass, 1985), pri istospolno usmerjenih moških, nižjih socialno-ekonomskih skupinah in prebivalcih držav v razvoju pa lahko presega 90 % in se s starostjo povečuje (Sohn in sod., 1991). Okužbe s CMV se v ekonomsko bolj razvitih državah pojavljajo v dveh fazah: prvi vrh predstavlja populacija otrok v prvih 2–3 letih življenja (Staras in sod., 2008) in je posledica vertikalnega in horizontalnega prenosa virusa preko urina in izločkov dihal (Sissons in Carmichael, 2002), drugi vrh pa predstavlja populacija mladostnikov in mladih odraslih (v starosti med 16 in 30 let) in je posledica spolnih stikov (Staras in sod., 2008).

Primarna okužba s CMV je pogosto pri zdravih in imunsko kompetentnih posameznikih asimptomatska. Redkeje lahko povzroči mononukleozi podobno bolezen (Sissons in Carmichael, 2002) ali milo okužbo zgornjih dihal (Sinclair in Sissons, 2006). Po primarni okužbi CMV preide v latentno obliko v perifernih monocitih in CD34⁺ matičnih celicah mieloične vrste (Sinclair, 2008), kjer tekom življenja prihaja do asimptomatskih reaktivacij (Sinclair in Sissons, 2006). V določenih okoliščinah pa okužba zaradi sistemskega

razširjanja preko krvi in zelo širokoga tkivnega tropizma preide v hudo, nevarno in smrtno bolezen s široko paleto možnih kliničnih manifestacij (Sinzger in sod., 2008). Značilno je, da se huda CMV-bolezen pojavi zaradi nezrelega, zavrtega ali kompromitiranega imunskega sistema, kar lahko privede do smrti ali trajnejših posledic (Griffi, 2012).

2.2 STRUKTURA VIRUSA

Virion CMV je sestavljen iz: (i) proteinske ikozaedrične kapside, ki vsebuje DNA, (ii) virusnega matriksa, ki je sestavljen iz virusnih fosfoproteinov, in (iii) zunanje ovojnice, ki vsebuje številne virusne glikoproteinske komplekse (Gibson, 2008). Premer zrelega viriona CMV je 150–200 nm (Schottstedt in sod., 2010).



Slika 1: Shematska struktura CMV viriona (Tomtishen, 2012: 2)

Genom CMV je sestavljen iz linearne dvostranske DNA, dolge približno 230 kbp (Gibson, 2008). Nedavne ugotovitve so pokazale, da v celicah, okuženih s CMV, pride do translacije več kot 200 proteinov (Motta in Martins, 2008), kar kaže na izredno kompleksnost virusa. Večina teh proteinov je neesencialnih za pomnoževanje virusa. Ocenuje se, da je za izgradnjo novih virusnih delcev potrebnih 71 proteinov (Varnum in sod., 2004). Velika večina virusnih proteinov je odgovornih za kontrolu pomembnih gostiteljskih funkcij in za koeksistenco virusa in njegovega gostitelja (Ohlin in Söderberg-Nauclér, 2015).

Genom CMV je sestavljen iz edinstvenih dolgih (angl. unique long - UL) in edinstvenih kratkih (angl. unique short - US) odsekov, ki so obdani z obrnjenimi dolgimi in kratkimi ponovitvami TRL / IRL in IRS / TRS (angl. terminal repeat long - TRL; internal repeat long - IRL; internal repeat short - IRS; terminal repeat short - TRS) (Murphy in Shenk, 2008). V regiji UL najdemo zapise za gene, katerih homologe najdemo tudi pri drugih herpesvirusih, kot so npr. geni za proteine, ki so vključeni v sintezo nukleinskih kislin (npr. virusna DNA polimeraza), in geni za strukturne proteine (glavni kapsidni protein in glikoproteini B, H in L) (Walker in sod., 2001), medtem ko preostali del genoma vsebuje gene, ki so značilni le za β-herpesviruse ali pa so značilni le za humani CMV (McGeoch in sod., 2006). Po dogovoru se CMV proteini poimenujejo glede na njihov položaj v genomu, ki mu sledi opisno ime. Tako je fosfoprotein z molekulsko maso 65, ki ima zapis na 83. odprttem branem okvirju v regiji UL, označen kot pp65 (*UL83*) (Tselis, 2013).

Poznamo latentne in litične gene. Latentni geni niso tako dobro opredeljeni kot pri drugih herpesvirusih, vendar ustvarjajo RNA transkripte, ki spominjajo na z latenco povezane transkripte (angl. latency-associated transcript - LAT) pri okužbah z virusom herpes simplex ali RNA, ki jo kodira Epstein–Barr virus (angl. Epstein–Barr virus-encoded small RNA - EBER) pri okužbah z Epstein–Barr virusom (Tselis, 2013).

Izražanje litičnih genov je razdeljeno v tri časovne razrede: (i) prvi, ki se izražajo, so takojšnji zgodnji (alfa) geni (angl. immediate-early (IE) genes), (ii) sledi izražanje zgodnjih (beta) genov (angl. early (E) genes) in (iii) poznih (gama) genov (angl. late (L) genes) (Tselis, 2013). Geni IE kodirajo zapis za ključne regulatorje, ki omogočajo izražanje genov E. Proteini E so vključeni v podvajanje virusne DNA, geni L pa kodirajo strukturne proteine kapside, matriksa in glikoproteine (Vandevenne in sod., 2010).

Kapsido sestavlja pet virusnih proteinov: (i) glavni kapsidni protein (pUL86) (angl. major capsid protein), (ii) manjši kapsidni protein (pUL85) (angl. minor capsid protein), (iii) prekurzor sestavljanja (pUL80) (angl. assembly precursor), (iv) najmanjši kapsidni protein (pUL48.5) (angl. smallest capsid protein) in (v) manjši vezavni kapsidni protein (pUL46) (angl. minor capsid binding protein). Sestavljena je iz 162 kapsomer (heksoni in pentoni razporejeni v T = 16 ikozaedrsko mrežno strukturo) (Caposio in sod., 2013).

Proteini matriksa se nahajajo med zunanjim lipidno ovojnico in nukleokapsido in predstavljajo več kot polovico vseh proteinov, ki jih najdemo v kužnem virionu (Varnum in sod., 2004). Proteini matriksa so fosforilirani (in so zato poimenovani s predpono pp za fosfoprotein), vendar pomen fosforilacije ostaja neznan (Kalejta, 2008).

Po sprostitvi proteinov matriksa v citoplazmo postanejo ti proteini aktivni in igrajo pomembno vlogo v vseh fazah virusnega življenskega cikla, vključno z vstopom virusa v gostiteljsko celico, izražanjem genov, izmikanjem imunski obrambi, s sestavljanjem in z izstopom virusa (Kalejta, 2008).

Najpomembnejši protein matriksa je fosfoprotein 65 (pp65), ki predstavlja največji del matriksa, drugi najpomembnejši je virusni transaktivator pp71 sledita pp150 in pp28 (Varnum in sod., 2004). Poleg omenjenih so v manjših količinah prisotni tudi drugi proteini in nekatere celične in virusne RNA (Mocarski in sod., 2007).

Virusna ovojnica CMV, ki ovija proteine matriksa, je izredno kompleksna in trenutno nepopolno definirana (Feire in Compton, 2013). Izvira iz kompartimenta med endoplazmatskim retikulumom in Golgijem (ERGIC, angl. endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) (Mocarski in sod., 2007). Virusni glikoproteini so pomembni za vezavo in vstop virusa in so tarče virusnih nevtralizirajočih protiteles (Ishibashi in sod., 2011). Med glikoproteini najdemo skupino homolognih z drugimi herpesvirusi, zato se predvideva, da imajo funkcijo pri vstopu virusa v gostiteljsko celico. Ti vključujejo glikoproteine B (gB), H (gH), L (gL), O (gO), M (gM) in N (gN). Drugi glikoproteini (gpTRL10, gpTRL11, gpTRL12 in gpUL132) pa so za CMV specifični (Feire in Compton, 2013).

2.3 ŽIVLJENJSKI CIKEL

CMV lahko okuži zelo širok spekter gostiteljskih celic – fibroblaste, endotelijalne celice, epitelijalne celice, monocite/makrofage, celice gladkega mišičja, stromalne celice, nevronske celice, nevtrofilce in hepatocite (Sinzger in sod., 2000). Za vstop virusa v celico mora biti ta dovzetna za okužbo – pomembni so tip celice, diferenciacija, faza celičnega cikla in metabolna faza (Seckert in sod., 2012). Pri zdravih posameznikih se primarna okužba s CMV začne s pomnoževanjem virusa v epiteliju sluznice, pozneje se virus razširi po telesu in preide v monocite in CD34⁺ celice mieloične vrste, kjer vzpostavi latentno okužbo (Cheung in sod., 2006).

2.3.1 Vstop virusa v gostiteljsko celico

Zaradi izjemno širokega celičnega tropizma se vstopna pot, celični receptorji in virusni glikoproteini, ki so vključeni v začetnih interakcijah povezave, razlikujejo glede na vrsto celic (Isaacson in sod., 2008). CMV se z gM, gN ali gB veže na heparan-sulfatne proteoglikane (angl. heparan sulfate proteoglycan) gostiteljske celice. Glikoprotein B se nato veže na receptor epidermalnega rastnega faktorja (angl. epidermal growth factor receptor), ki je prisoten na mnogih za CMV permisivnih celicah (Feire in Compton, 2013). CMV ima na svoji površini tudi glikoproteinske komplekse gH-gL-gO, gH-gL-pUL128-pUL130 in gM-gN, ki so potrebni za vstop v epitelijalne in endotelijalne celice, levkocite in monocite (Wang in Shenk, 2005). CMV virioni se lahko vežejo tudi na druge molekule – β2-mikroglobulin (Grundy in sod., 1988), aneksin II in celične integrine, ki služijo kot koreceptorji (Feire in sod., 2004).

Ob interakciji glikoproteinov virusne ovojnice s celičnimi receptorji pride do fuzije viriona s celično membrano gostiteljske celice (Compton in sod., 1992). Ob tem se nukleokapsida in proteini matriksa sprostijo v citoplazmo. V epitelijske in endotelijalne celice pa CMV vstopa z endocitozo (Ryckman in sod., 2006). Po fuziji nekateri proteini matriksa ostanejo v citoplazmi, drugi (pUL47, pUL48 in pp150) so močno vezani na kapsido in so odgovorni za njen transport vzdolž mikrotubulov do kompleksa jedrnih por, skozi katere nato virusna genomska DNA vstopi v jedro, tretji (npr. pp65 in pp71) pa neodvisno od kapside migrirajo v jedro. Kapsida se nato odcepi iz mikrotubulov, ostane v jedrni pori in sprosti DNA v jedru (Kalejta, 2008).

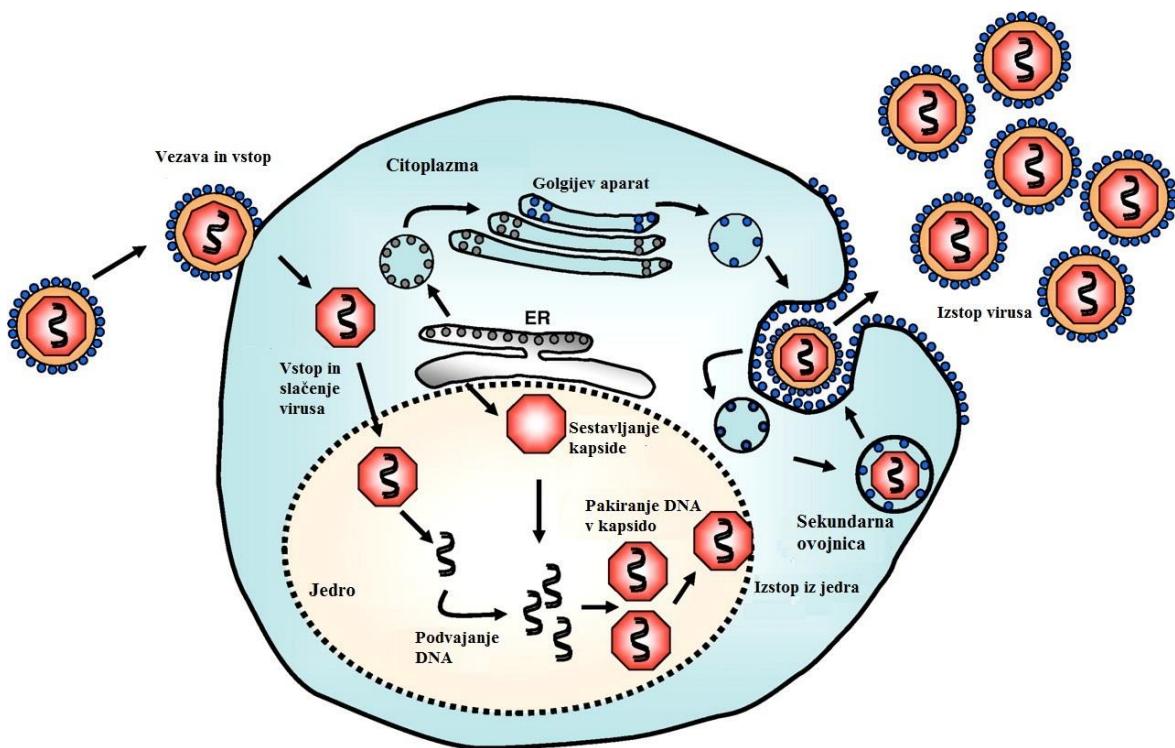
2.3.2 Izražanje genov

Do izražanja virusnih takojšnjih zgodnjih genov pride v roku dveh ur po okužbi. Njihova translacija ne zahteva *de novo* sinteze virusnih proteinov (Sissons in sod., 2002). Virusni takojšnji zgodnji proteini uravnavajo okolje v gostiteljski celici in kodirajo zapis za ključne regulatorje, ki omogočajo izražanje virusnih zgodnjih genov. Virusni zgodnji proteini so pomembni pri podvajaju virusne DNA, začnejo se izražati 4–24 ur po okužbi. Po podvajaju DNA pride do izražanja poznih virusnih genov. Pozni proteini so večinoma strukturne komponente viriona in omogočajo sestavljanje in izstop novonastalih virusnih delcev. V nekaterih vrstah celic pa po okužbi pride do utišanja takojšnjih zgodnjih genov, kar vodi v latentno okužbo (Sinclair in Sissons, 2006).

2.3.3 Sestavljanje vironov in izstop

Ko se virusna DNA podvoji in pride do izražanja genov L, v jedru pride do sestavljanja kapside in pakiranja virusne DNA (Metteneiter in sod., 2006). Kapsida nato z brstenjem preko notranje jedrne membrane v perinuklearni prostor pridobi primarno ovojnicico, ki jo ob prehodu preko zunanje jedrne membrane v citoplazmo, izgubi. Končno ovojnicico virus dobi z brstenjem preko membrane veziklov Golgijskega aparata. Ko pride do zlitja veziklov in zunanje celične membrane, se v okolje sprostijo zreli virusni delci (Kalejta, 2008).

Poleg infekcijskih vironov lahko tekom litične okužbe pride do nastanka dveh različnih neinfektivnih oblik – neinfektivnih virusnih delcev (angl. noninfectious enveloped particles - NIEPS) in gostih teles (angl. dense bodies) (Irmiere in Gibson, 1983). NIEPS so zelo podobni infektivnim virionom, saj so sestavljeni iz lipidne ovojnica, matriksa in proteinske kapside, vendar znotraj kapside ne vsebujejo virusne DNA. Gosto telesce sestavljata lipidna ovojnica in matriks, nukleokapsida pa ni prisotna. Pomen teh dveh oblik ni dobro razumljen (Kalejta, 2008).



Slika 2: Življenjski cikel CMV v človeški celici (Crough in Khanna, 2009: 78). Ob interakciji glikoproteinov virusne ovojnice s celičnimi receptorji virus vstopi v gostiteljsko celico s fuzijo ali z endocitozo. Ob tem se nukleokapsida in proteini matriksa sprostijo v citoplazmo. Po fuziji nukleokapsida migrira do jedra, kjer se sprosti virusna DNA. pride do izražanja in prepisovanja virusnih genov. V jedru pride do sestavljanja kapside in pakiranja virusne DNA. Kapsida nato z brstenjem preko notranje jedrne membrane v perinuklearni prostor pridobi primarno ovojnico, ki jo ob prehodu preko zunanje jedrne membrane v citoplazmo, zgubi. Končno ovojnico virus dobi z brstenjem preko membrane veziklov Golgijevega aparata. Ko pride do zlitja veziklov in zunanje celične membrane, se v okolje sprostijo zreli virusni delci.

2.3.4 Latentna okužba

V nekaterih celicah lahko pride do utišanja CMV genov IE, kar kaže na latentno okužbo (Sinclair in Sissons, 2006). Za latentno okužbo sta značilna zmanjševanje virusne genske ekspresije ter inhibicija sestavljanja in izstopa novih virusnih delcev (Reeves in Sinclair, 2008). S tem se virus izogne prepoznavanju s strani imunskega sistema (Kalejta, 2008). Mehanizmi, s katerimi CMV vzpostavi in vzdržuje latenco, še niso povsem poznani (Crough in Khanna, 2009).

Predlagane so bile tri možne poti, preko katerih CMV vzpostavi latenco: (i) po vezavi in vstopu CMV neposredno vstopi v latenco brez *de novo* izražanja virusnih genov, (ii) virus po vstopu v celico začne s produktivno okužbo, ki se predčasno prekine, kar vodi v latenco, in (iii) po vstopu virus začne z izražanjem skupine virusnih genov, ki niso povezani z litično okužbo, vendar so potrebni za uspešno vzpostavitev latence (Cheung in sod., 2006). Celice, v katerih pride do vzpostavitve latence CMV pri človeku, še niso popolnoma znane. Predvideva se, da je latenten virus prisoten v CD34⁺ matičnih celicah mieloične vrste

(Sinclair, 2008), CD14⁺ monocitih, dendritičnih celicah, megakariocitih (Taylor-Wiedeman in sod., 1991; Mendelson in sod., 1996; Crapnell in sod., 2000) in v parenhimskih celicah, saj lahko pri presaditvah čvrstih organov pride do prenosa virusa iz seropozitivnega donorja na seronegativnega prejemnika in posledično do premika iz latentne faze v presajenem organu (Boeckh in Geballe, 2011).

Genom CMV je v celicah, kjer vzpostavi latentno okužbo, epigenetsko utišan zaradi organizacije v kromatinu podobnih episomalnih strukturah (virusni kromatin). Vedno bolj pa je jasno, da virusna latenca ne pomeni transkripcijskega utišanja celotnega virusnega genoma (Reeves in Sinclair, 2013).

Reaktivacija CMV iz latence je ključni korak v patogenezi okužbe s CMV. Reaktivacija CMV je lahko posledica imunosupresije, vnetja, okužbe ali stresa. Natančni mehanizmi, ki povzročijo reaktivacijo, še niso povsem pojasnjeni. Ugotovili so, da je v reaktivaciji vpletен dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α). Z vezavo TNF- α na TNF receptor latentno okuženih celic se aktivirata protein kinaza C in jedrni faktor kappa B (angl. nuclear factor kappa B - NF- κ B), kar privede do transkripcije CMV genov IE. Izražanje genov IE lahko spodbudijo tudi stresni kateholamini, adrenalin/noradrenalin, provnetni prostaglandini in naraščanje koncentracije cikličnega adenozin-monofosfata (cAMP) (Crough in Khanna, 2009). Aktivacijo genov IE lahko inducirajo tudi vnetni citokini, kot sta granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GMC-SF) in TNF- α , ki povzročijo diferenciacijo monocitov v makrofage ali dendritične celice (Gerna in sod., 2005).

2.4 BOLEZNI, KI JIH POVZROČA CMV

Primarna okužba s CMV je pogosto, pri zdravih in imunsko kompetentnih posameznikih, asimptomatska. Redkeje lahko povzroči mononukleozi podobno bolezen (povišana telesna temperatura, bolečine v mišicah, faringitis, otekanje vratnih bezgavk, blag hepatitis, povečanje vranice) (Sissons in Carmichael, 2002) ali milo okužbo zgornjih dihal (Sinclair in Sissons, 2006). V določenih okoliščinah pa lahko okužba zaradi sistemskega razširjanja preko krvi in zelo širokega tkivnega tropizma preide v hudo, nevarno in smrtno bolezen s široko paleto možnih kliničnih manifestacij (Sinzger in sod., 2008). Značilno je, da se huda CMV-bolezen pojavi zaradi nezrelega, zavrtega ali kompromitiranega imunskega sistema, kar lahko privede do smrti ali trajnejših posledic (Griffi, 2012). CMV je glavni virusni vzrok za nastanek prirojenih napak, saj okužba novorojenčkov lahko povzroči gluhost in duševno zaostalost, in je glavni vzrok retinitisa in slepote pri bolnikih z AIDS-om (Grosse in sod., 2008). CMV je prav tako lahko vzrok zavrnitvenih reakcij pri prejemnikih kostnega mozga in čvrstih organov, povzroča bolezni pri bolnikih z rakom, ki prejemajo kemoterapijo, in verjetno prispeva k s starostjo povezani imunosenescenci (Streblow in sod., 2007). Okužba s CMV je povezana tudi z vnetnimi in s proliferativnimi boleznimi, kot so določene bolezni srca in ožilja in nekateri tipi raka (Söderberg-Nauclér, 2006). Problem reaktivacije virusa pa

so opazili tudi pri skupini imunokompetentnih bolnikov, ki so sprejeti v enote intenzivne nege zaradi miokardnega infarkta, opeklina ali septičnega šoka. Pri približno tretjini seropozitivnih bolnikov se CMV reaktivira. Pri teh bolnikih se podaljša hospitalizacija in poveča umrljivost (Limaye in Boeckh, 2010).

2.4.1 Bolniki po presaditvah čvrstih organov

Kljub izboljšanemu zdravljenju in nadzoru, je CMV še vedno najpomembnejši infekcijski patogen pri prejemnikih organa in lahko, preko številnih posrednih in neposrednih učinkov, vpliva na delovanje presajenega organa ter povzroči visoko obolenost in umrljivost po presaditvah. Bolniki lahko razvijejo asimptomatsko CMV viremijo, CMV-sindrom ali tkivno invazivno bolezen. Pozna CMV-okužba je še vedno velik problem pri bolnikih z visokim tveganjem po zaključku protivirusne profilakse (Ramanan in Razonable, 2013).

2.4.1.1 Dejavniki tveganja

Incidenca okužbe s CMV in CMV-bolezni je odvisna od: (i) serostatusa darovalca in prejemnika organa, (ii) vrste presajenega organa, (iii) koinfekcije s človeškim herpesvirusom tipov 6 in 7, (vi) virusne obremenitve v presajenem organu donorja (več, kot je celic, v katerih je latentna oblika virusa, ali več, kot je celic, kjer prihaja do aktivnega pomnoževanja CMV, večje je tveganje za nastanek CMV-bolezni) ter (v) vrste in intenzivnosti imunosupresivne terapije (Crough in Khanna, 2009).

CMV-seronegativni prejemniki organa seropozitivnega darovalca (D+/P-) imajo največje tveganje za nastanek primarne CMV-bolezni zaradi reaktivacije latentnega virusa v presadku. Hkrati zaradi imunosupresije niso sposobni razviti učinkovitega imunskega odziva (Ramanan in Razonable, 2013). Srednje tveganje za nastanek bolezni imajo seropozitivni prejemniki organa seropozitivnega darovalca (D+/P+) in seropozitivni prejemniki organa seronegativnega darovalca (D-/P+). Pri teh dveh skupinah lahko pride do reaktivacije virusa v seropozitivnem prejemniku, pri D+/P+ skupini pa lahko pride tudi do okužbe z drugim sevom virusa seropozitivnega darovalca. Najnižje tveganje imajo seronegativni prejemniki organa seronegativnega darovalca (D-/P-) (Pedersen in Seetharam, 2014). Incidenca CMV-bolezni je po presaditvi ledvic najnižja, višja je pri presaditvi jeter in srca, nekoliko višja je po presaditvi trebušne slinavke ali kombinirani presaditvi ledvice in trebušne slinavke, najvišja pa po presaditvi pljuč ali kombinirani presaditvi srca in pljuč (Rowshani in sod., 2005).

Neto stanje imunosupresije je dinamično in je odvisno od številnih dejavnikov, kot so odmerek zdravila, trajanje in vrsta imunosupresivnega zdravljenja, prirojene in pridobljene imunske okvare gostitelja, starost in druga obolenja (Ramanan in Razonable, 2013). Uporaba imunosupresivnih zdravil, ki delujejo na zmanjšanje števila limfocitov (npr. anti-limfocitni globulin, anti-timocitni globulin, anti-CD3 monoklonska protitelesa, anti-CD52 protitelesa),

zaviralci kalcinevrina in mofetilmikofenolat zavirajo vzpostavitev CMV-specifičnega imunskega odziva in povečajo tveganje za razvoj CMV-bolezni (Rowshani in sod., 2005; Luan, 2013). Nekatera novejša imunosupresivna zdravila so povezana z manjšim tveganjem za nastanek CMV okužbe. To so na primer inhibitorji tarče rapamicina pri sesalcih mTOR (angl. mammalian target of rapamycin), kot je everolimus (Brennan in sod., 2011).

Napake v prirozenem imunskem odzivu so povezane s povečanim tveganjem za nastanek okužbe s CMV in CMV-bolezni pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov, saj je njihov pridobljeni imunski odziv neučinkovit zaradi delovanja imunosupresivnih zdravil. Okvare CMV-specifičnega imunskega odziva so genski polimorfizem genov za receptorje podobne Toll-u (angl. Toll-like receptors - TLR), okvara ali polimorfizem manan-vezavnega lektina (Kwakkelen Erp in sod., 2011), napake v kemokinskem in citokinskem izražanju, vključno s povečanim izražanjem interlevkina-10 (IL-10) (Krishnan in sod., 2010), pomanjkljivosti v CMV-specifičnih CD4⁺ in CD8⁺ celicah T (Weselzlindner in sod., 2012) in pri izražanju genov programirane celične smrti 1 (Krishnan in sod., 2010).

2.4.1.2 Klinične značilnosti

Neposredni učinki okužbe s CMV so klinične manifestacije, ki se pojavijo kot posledica razmnoževanja in razširjanja CMV ter tkivne invazije v organih (Razonable in Humar, 2013). Klinično se akutna okužba s CMV pri imunokompromitiranih prejemnikih organa kaže kot CMV-sindrom, ki se kaže kot gripi podobna bolezen s povisano telesno temperaturo, slabim počutjem, z levkopenijo ali s trombocitopenijo (Ramanan in Razonable, 2013), z zvišano vrednostjo aminotransferaz (Rowshani in sod., 2005), bolečinami v sklepih, z makularnimi izpuščaji ali kot tkivno invazivna bolezen, ki se kaže kot hepatitis, pnevmonitis, enterokolitis, encefalitis, horioretinitis, nefritis, cistitis, miokarditis ali pankreatitis, gastritis, enterokolitis, ezofagitis (Humar in Michaels, 2006). Študije so pokazale, da je okužba s CMV sprva lokalizirana v presajenem organu, kasneje pa se sistemsko razširi (Tolkoff-Rubin in Rubin, 1994).

Pred uvedbo protivirusnega profilaktičnega zdravljenja pri prejemnikih organa se je CMV-bolezen običajno pojavila v prvih treh mesecih po presaditvi. Epidemiologija se je z uvedbo zdravljenja spremenila in se sedaj pri visokorizični skupini (D+/P-) pojavi po zaključku profilaktičnega zdravljenja, zato ji rečemo tudi pozna CMV-bolezen. Pozna CMV-bolezen je povezana z odpovedjo organa in umrljivostjo (Ramanan in Razonable, 2013). Nedavne raziskave so pokazale, da je incidenca CMV-bolezni v prvem letu po presaditvi pri prejemnikih organov iz D+/P- skupine, ki so prejemali profilaktično zdravljenje, 19 % po presaditvi ledvic, 31 % po presaditvi jeter (Harvala in sod., 2013), 47 % po presaditvi srca (Mendez-Eirin in sod., 2012) in 27 % po presaditvi pljuč (Hammond in sod., 2013). Zakaj do nastopa pozne bolezni pride, ni popolnoma znano, vendar je najverjetnejše pojav povezan s stalno imunosupresijo, ki jo spremljajo pomanjkanje razvoja CMV-specifične T-celične imunosti, D+/P- serostatus in krajše profilaktično zdravljenje (Humar in sod., 2010).

Poleg CMV-sindroma in tkivno-invazivne bolezni lahko CMV zaradi svojih imunomodulatornih lastnosti povzroča tudi posredne učinke. Lahko poveča tveganje za nastanek bakteriemije, invazivnih glivičnih okužb, ponovitev okužbe s hepatitisom C po presaditvi jeter in za maligne bolezni, kot je z Epstein–Barr virusom povezana limfoproliferativna motnja. CMV je povezan s povečano vaskularno trombozo, kar je verjetno povezano z okužbo endotelijskih celic ter z akutno in s kronično zavrnitvijo presadka, kar vodi v zmanjšano preživetje presadka in prejemnika organa (Ramanan in Razonable, 2013). CMV v presadku sproži vnetje z uravnavanjem citokinov, molekul poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) in adhezijskih molekul, spodbuja izločanje različnih kemokinov in rastnih faktorjev in s tem poveča aktivacijo celic T (Roman in sod., 2014). Posredni učinki CMV po presaditvi vključujejo tudi kronično nefropatijo (Ramanan in Razonable, 2013) in stenozo ledvične arterije po presaditvi ledvic (Audard in sod., 2006), arterijsko trombozo jeter (Ramanan in Razonable, 2013) in sindrom izginjanja žolčnih vodov (Hindupur in sod., 2007) po presaditvi jeter, koronarno vaskulopatijo (Ramanan in Razonable, 2013) in pospešeno stenozo koronarnih arterij po presaditvi srca (Koskinen in sod., 1993), bronhiolitis obliterans po presaditvi pljuč (Ramanan in Razonable, 2013), pospešeno aterosklerozo (Ljungman in sod., 2002) in pojav rakavih obolenj (Freeman, 2009). V zadnjem času CMV povezujejo tudi s pojavom sladkorne bolezni po presaditvah (Ramanan in Razonable, 2013).

2.5 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO S CMV

Po začetni okužbi s CMV pri imunokompetentnih posameznikih virus izzove širok spekter imunskega odziva. Obramba vključuje sodelovanje med prirojenimi mehanizmi, ki vključujejo aktivacijo primarnega interferonskega odziva, profesionalnih antigen predstavitevnih celic (APC) in naravnih celic ubijalk (celic NK), ki nato izzovejo mehanizme pridobljene imunske obrambe, vključno s tvorbo protiteles in z odzivom celic T CD4⁺ in CD8⁺ (Jackson in sod., 2011). Prirojeni in pridobljeni imunski odziv sta pomembna pri zaščiti gostitelja pred okužbo, vendar imunost na CMV ne zagotavlja zaščite pred ponovnimi okužbami, ampak le zameji raven viremije in resnost bolezni (Ohlin in Söderberg-Nauclér, 2015).

2.5.1 Prirojeni imunski odziv

2.5.1.1 Receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev

Receptorji za prepoznavo molekulskih vzorcev (angl. pattern-recognition receptors - PRR) tvorijo osnovo prirojenega imunskega odziva na patogenom pridružene molekulske vzorce (angl. pathogen associated molecular pattern - PAMP) (Janeway in Medzhitov, 2002). CMV *in vivo* okuži različne imunske in neimunske celice, od katerih vsaka izraža edinstveno podmnožico TLR in drugih receptorjev, ki jim omogočajo, da se specifično odzivajo na okužbo s CMV in prispevajo k zgodnji protivirusni obrambi (Rossini in sod., 2012).

Aktivacija TLR povzroči izločanje vnetnih citokinov, izražanje imunskih kostimulatornih molekul, zorenje dendritičnih celic in sinteze IFN tipa I (Takeuchi in Akira, 2001). Vsi ti dejavniki omejujejo virusno pomnoževanje, izzovejo migriranje imunskih celic na mesto okužbe in sprožijo pridobljeni imunski odziv s strani celic B in T (Feire in Compton, 2013).

TLR igrajo pomembno vlogo pri prepoznavanju patogenov (Compton in sod., 2003). Virusne nukleinske kisline in virusni proteini so PAMP-i, ki jih prepoznajo nekateri TLR (Vandevenne in sod., 2010). Mehanizmi zaznave CMV in začetka interferonskega odziva še niso popolnoma znani, vendar pa je eden od načinov, s katerim lahko celice aktivirajo odziv IFN tipa 1, preko TLR (TLR2, 3, 4, 7, 8 in 9) (Feire in Compton, 2013).

TLR so vključeni v prepoznavanje zunajceličnih ali endosomalnih CMV komponent, medtem ko drugi razredi PRR-jev sodelujejo pri prepoznavanju virusa v citosolu (Vandevenne in sod., 2010). DNA-odvisen aktivator IFN-regulatornega dejavnika (angl. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors - DAI) aktivira interferon regulatorni faktor 3 (IRF3) in poveča izražanje IFN tipa 1 (DeFilippis in sod., 2010) in provnetnih citokinov, ki so pomembni za okrepitev in aktivacijo efektorskih imunskih celic, kot so nevtrofilci, limfociti B in limfociti T (Vandevenne in sod., 2010). Prav tako lahko tudi drugi CMV vezavni receptorji oz. receptorji za vstop posredujejo razvoj prirojenih odzivov. Površinski integrini olajšajo interakcije med gB in gH s TLR2 (Boehme in sod., 2006). Vezava gB na β 1 integrin stimulira IFN signalizacijo, ki ni posredovana z NF- κ B, kar kaže, da ta interakcija inducira od TLR neodvisno protivirusno stanje pred vstopom virusa (Juckem in sod., 2008).

2.5.1.2 Antigen predstavitevne celice (APC)

Za začetek učinkovitega imunskega odziva na CMV je potrebna predstavitev virusnih proteinov s strani molekul MHC razreda I in II na površini okuženih celic ali APC, uničenje okuženih celic in začetek specifičnega imunskega odziva (Lučin in sod., 2015). APC zajamejo, predelajo in predstavijo antigen limfocitom, izločajo citokine in se odzivajo na dražljaje limfocitov (Gredmark-Russ in Söderberg-Nauclér, 2012). Izločanje citokinov s strani prirojene imunosti (npr. IFN- α /- β) poveča izražanje molekul MHC na APC. To predstavlja povezavo med prirojeno in pridobljeno imunostjo (Hoebe in sod., 2004). Dendritične celice (DC) in makrofagi so specializirane APC in so pomembni mediatorji imunosti (Gredmark-Russ in Söderberg-Nauclér, 2012).

MHC I so izražene na plazemski membrani celic in predstavljajo peptide znotrajceličnih proteinov CD8 $^{+}$ limfocitom T (Dugan in Hewitt, 2008). CD8 $^{+}$ limfociti T spremljajo MHC I, če imajo vezane peptide, ki izhajajo iz virusnih proteinov ali liziranih okuženih celic (Dugan in Hewitt, 2008).

2.5.1.3 Naravne celice ubijalke

Med virusno okužbo so naravne celice ubijalke (celice NK) prva obrambna linija, ki omejuje širjenje virusa, ko specifična imunost še ni popolnoma razvita (Revilleza in sod., 2011). Aktivacija celic NK je odvisna od ravnotežja signalov, ki se prenašajo preko aktivacijskih in inhibitornih receptorjev na njihovi površini, ki nadzorujejo aktivacijo, proliferacijo in efektorske funkcije celic NK (Dalod in sod., 2002).

Pri okužbah s CMV je aktivacija celic NK inducirana tudi z vnetnimi citokini, ki jih izločajo DC (Dalod in sod., 2002). Zaradi sposobnosti, da zagotovijo hiter citotoksični odziv, podoben tistemu, ki ga sprožijo makrofagi in granulociti pri prirojeni imunosti, in zaradi citotoksične funkcije, podobne tisti, ki jo zagotovijo limfociti T (izločanje IFN- γ , grancima in perforina), so pomemben vezni člen med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom. Celice NK izločajo citokine, ki vzpodbujujo naknadno zorenje pridobljenega imunskega odziva, zlasti limfocitov T (npr. IFN) (La Rosa in Diamond, 2012). Medtem ko je funkcija celic NK pri okužbah z mišjim citomegalovirusom (MCMV) dobro poznana in je zelo pomembna pri obrambni vlogi proti MCMV, je manj znanega o vlogi celic NK pri imunski obrambi pred humanim CMV (Crough in Khanna, 2009; La Rosa in Diamond, 2012).

Na mišjem modelu so ugotovili, da igrajo celice NK pomembno vlogo pri ozdravitvi okužbe z MCMV (Polić in sod., 1998). Mišji mladiči postanejo dovzetni za okužbo, če se jim odstranijo celice NK (Brown in sod., 2001). Rezultat odstranitve celic NK so višji titri MCMV v tkivih in povečana smrtnost (Scalzo in Yokoyama, 2008). Ugotovili so, da se lahko zaščita pred okužbo z MCMV obnovi s prenosom celic NK iz normalnih miši (Shellam in sod., 1981).

Podobnih študij o vlogi celic NK pri okužbah s CMV pri človeku primanjkuje (Hanley in Bolland, 2014). V študiji, kjer so po presaditvi matičnih celic spremljali reaktivacijo CMV, so ugotovili, da je ozdravitev okužbe povezana s sposobnostjo bolnika, da razvije NK celični citotoksični odziv (Quinnan in sod., 1982). Po presaditvi ledvic so pokazali, da se aktivnost celic NK poveča med primarno okužbo in reaktivacijo CMV, kar kaže, da so celice NK pomembne pri ozdravitvi okužbe s CMV (Venema in sod., 1994). Nedelovanje celic NK je povezano s hudimi primarnimi herpesvirusnimi okužbami, vključno s CMV-boleznijo (Biron in sod., 1989). Stopnja NK celične citotoksičnosti korelira z bolnikovo sposobnostjo, da si opomore od okužbe (Quinnan in sod., 1982).

2.5.2 Pridobljeni imunski odziv

Okužba s CMV izzove enega najmočnejših pridobljenih imunskih odzivov pri ljudeh, kjer sodelujeta celična in humorala imunost. Razvoj pridobljene imunosti je potreben za nadzor primarne okužbe s CMV, ohranjanje latence CMV in preprečevanje njegove reaktivacije (La Rosa in Diamond, 2012).

2.5.2.1 Celična imunost

Koncentracija CMV-specifičnih celic T pri zdravih posameznikih je precej višja od opaženih pri drugih virusih in je podobna HIV-specifičnemu T-celičnemu odzivu v aktivni fazi okužbe (Sylwester in sod., 2005). Lastnosti CMV, ki določajo tako obseg in trajanje T-celičnega odziva v odsotnosti zaznavne viremije, še niso povsem jasne (La Rosa in Diamond, 2012). Verjetno obstaja mesto, kjer prihaja do reaktivacije CMV ali kronične persistence, ki deluje kot vir antigenov in spodbuja širitev CMV-specifičnih celic T (Loewendorf in Benedict, 2010). Celice T so ključnega pomena za zaustavitev razmnoževanja CMV in preprečevanje bolezni, vendar pa virusa ne odstranijo popolnoma in ne preprečijo virusnega prenosa (La Rosa in Diamond, 2012).

Spominske celice T pri seropozitivnih zdravih posameznikih v povprečju predstavljajo približno 10 % CD4⁺ in CD8⁺ spominskega celičnega bazena v periferni krvi (Sylwester in sod., 2005). Število CMV-specifičnih celic T se skozi vse življenje povečuje (La Rosa in Diamond, 2012). Narava spominskega CMV-specifičnega T-celičnega bazena je požela veliko pozornosti, saj okužba s CMV sovpada z vsakim znanim primerom resne imunosenescence pri starejših posameznikih. Imunosenescenca se razvije pri osebah, starejših od 80 let, kjer se razmerje CD4 : CD8 celic T obrne (tj. CD4 : CD8 < 1), za kar sta značilna zmanjšanje delovanja imunskega sistema in slabše preživetje bolnikov (Pawelec in sod., 2009). Postopno povečanje števila CMV-specifičnih spominskih celic T tekomp desetletij persistentne okužbe je značilnost CMV, označena z izrazom »spominska inflacija« (angl. »memory inflation«) (Karrer in sod., 2003). Domneva se, da igra vlogo pri spodbujanju imunosenescence. CMV-specifične celice T pri starejših posameznikih lahko dosežejo presenetljivo visoke koncentracije (tudi > 45 %) (Sylwester in sod., 2005). Zakaj je tako močen T-celični odziv pomemben za virusno kontrolu, še ni jasno (Sylwester in sod., 2005).

V najbolj celoviti študiji, kjer so ugotavljali odziv IFN-γ CD4⁺ in CD8⁺ celic T na 213 odprtih bralnih okvirjih (angl. open reading frame - ORF) z uporabo 13.687 peptidov na 33 seropozitivnih darovalcih z različnimi tipi MHC I, so pokazali, da pri CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih od 231 proteinov celice T prepozna vsaj 151 CMV proteinov. CD4⁺ celice T prepozna 125 proteinov, CD8⁺ celice T prepozna 107 proteinov, 81 proteinov pa prepozna obe vrsti celic (Sylwester in sod., 2005). Celično posredovan imunski odziv je usmerjen na proteine vseh treh faz cikla virusnega pomnoževanja – IE, E in L. Z delovanjem na proteine IE in E celice T ščitijo pred reaktivacijo latentnega virusa (Sylwester in sod., 2005; Hanleyin sod., 2011). Načeloma velja, da CD4⁺ celice T prepozna predvsem strukturne proteine (viriona), CD8⁺ celice T pa nestruktурne proteine, čeprav obstajajo tudi izjeme (Terrazzini in Kern, 2014). Celični odziv se med posamezniki precej razlikuje. Pri nekaterih odziv izzove le en ORF, pri drugih tudi več kot 39. Kljub velikemu številu tarč CMV-specifičnega T-celičnega odziva, je najbolj raziskan specifični odziv na pp65 in protein IE (Sylwester in sod., 2005).

Časovni potek pojava CMV-specifičnega pridobljenega imunskega odziva je pri zdravih osebah težko sledljiv, saj bolezen poteka asimptomatsko, torej je primarna okužba običajno neopažena. Tako se večina raziskav o dinamiki CMV okužbe opira na seronegativne prejemnike ledvic seropozitivnih donorjev (van de Berg in sod., 2008). Na splošno se 7–10 dni po vrhuncu pomnoževanja CMV pojavijo CMV-specifične CD4⁺ celice T, ki izločajo citokine Th1 (npr. IFN-γ, TNF-α) (van Leeuwen in sod., 2004; Rentenaar in sod., 2000). Kasneje, približno 20 dni po viremiji, pride do pojava CMV-specifičnih CD8⁺ celic T v periferni krvi (Gamadia in sod., 2003). Vrhuncu T-celičnega odziva sledi padec virusnega bremena v periferni krvi (Lilleri in sod., 2008).

2.5.2.2 CD8⁺ celice T

CD8⁺ celice T so pomembne za oslabitev primarne okužbe in vzdrževanje virusne latenze (Mitrović in sod., 2012). Po prepoznavanju antiga, vezanega na MHC I s strani CD8⁺ celic T, se lahko diferencirajo v efektorske ali spominske celice, ki so sposobne izločati IFN-γ (La Rosa in Diamond, 2012). Prve CD8⁺ celice T, ki jih je mogoče zaznati, izražajo perforin in grancim B in imajo sposobnost liziranja tarčnih celic, ki predstavijo CMV peptide in s tem nadzorujejo virusno okužbo. Pomembno je, da pri zgodnjih in poznih (tiste, ki se akumulirajo tekom latenze) CMV-specifičnih CD8⁺ celicah T pride do izražanja citokinov (prevladujejo IFN-γ, TNF-α in IL-2). Vztrajno povečevanje izražanja številnih genov IFN-γ se regulira s kombinacijo več transkripcijskih faktorjev. Ti zagotavljajo, da je efektorski tip CD8⁺ celic T v skoraj vsakem trenutku sposoben izločati citokine po vezavi na T-celični receptor (Hertoghs in sod., 2010).

Študije, pri katerih so preučevali specifične virusno kodirane tarče CD8⁺ celic T, so pokazale, da obstaja širok in raznolik repertoar odzivov na mnoge virusne peptide (Elkington in sod., 2003; Sylwester in sod., 2005). Znaten del CMV-specifičnega citotoksičnega odziva limfocitov T ima, v večini zdravih nosilcev virusa, T-celično reaktivnost proti pp65, pp50, IE1, gB in IE2, manjši del CMV-specifičnega T-celičnega odziva pa je usmerjen proti gH, pp28, pp150, pp71 in US proteinom. Odziv na pp65 in IE1 predstavlja 40 % vseh odzivov celic T, medtem ko je 60 % odziva CD8⁺ celic T usmerjenega proti drugim antigenom. CD8⁺ T-celična reaktivnost je omejena na omejen nabor HLA alelov razreda I, kot so HLA A1, HLA A2, HLA A23 / A24, HLA B7, HLA B8, HLA B35, HLA B40 in HLA B57 / B58 (Gandhi in Khanna, 2004).

Z analizami CMV-specifičnega T-celičnega odziva tekom primarne okužbe so ugotovili, da imajo *in vivo* CMV-specifične CD8⁺ celice T pomembno vlogo pri omejevanju z virusom okuženih celic (Sester in sod., 2002). Vlogo T-celične imunosti so najprej raziskovali na mišjem modelu, kjer so ugotovili, da odsotnost limfocitovsov pada s pogostejšimi reaktivacijami in širjenjem MCMV okužbe. Po adoptivnem prenosu CMV-specifičnih citotoksičnih CD8⁺ limfocitov T pride do zaščite pred virusom (Mutter in sod., 1988; Reddehase in sod., 1988). Selektivno izčrpavanje limfocitnih populacij je pokazalo, da so

CD8⁺ celice T najbolj pomembna komponenta pri imunskega nadzoru MCMV (Polić in sod., 1998).

Pri bolnikih po presaditvi kostnega mozga so pokazali, da obstaja močna korelacija med obnovitvijo CD8⁺ T-celične populacije in zaščito ter ozdravitvijo CMV-bolezni (Barron in sod., 2009; Tormo in sod., 2010a). V študijah, kjer so proučevali adoptivni prenos CMV-specifičnih celic T, so ugotovili, da so bolniki, ki so prejeli *ex vivo* ekspandirane CMV-specifične CD8⁺ celice T, zaščiteni pred primarno okužbo in reaktivacijo virusa (Einsele in sod., 2002; Peggs in sod., 2003). Prav tako je CD8⁺ T-celična imunost pomembna za bolnike po presaditvi čvrstega organa. Analize CMV-specifičnega T-celičnega odziva pri bolnikih po presaditvi ledvic so pokazale, da prisotnost močnega CD8⁺ T-celičnega odziva lahko omeji viremijo in ima zaščitno vlogo proti CMV-bolezni (Radha in sod., 2005). Pri prejemnikih pljuč je bil razvoj CMV-specifične CD8⁺ T-celične imunosti povezan z zaščito pred CMV-boleznijo in ohranitvijo funkcije presadka v primerjavi s tistimi, ki CMV-specifične celične imunosti niso razvili (Shlobin in sod., 2006).

2.5.2.3 CD4⁺ celice T

Obstaja vedno več dokazov, da igrajo tudi CD4⁺ celice T pomembno vlogo pri obvladovanju CMV okužb (Gandhi in Khanna, 2004). Človeške CD4⁺ celice T se pogosto odzivajo na enake ORF kot CD8⁺ celice T, prav tako se pp65 in IE-specifične CD4⁺ celice T pojavljajo v zelo visokem deležu testiranih posameznikov (Fuhrmann in sod., 2008; Kern in sod., 2002). Analiza CD4⁺ T celičnega odziva na celoten CMV proteom je pokazala, da je odziv zelo širok. Na modelu bolnikov po presaditvi ledvic so ugotovili, da je med primarno okužbo CMV-specifične CD4⁺ celice T mogoče zaznati 7 dni po zaznavi virusne DNA v periferni krvi (Rentenaar in sod., 2000). Te celice izločajo citokine Th1 (IFN-γ in TNF-α) (van Leeuwen in sod., 2006).

Obstajajo dokazi, da lahko CMV-specifične CD4⁺ celice T delujejo kot efektorske celice neposredno na okužene celice (Gamadia in sod., 2004). Pri posameznikih z višjimi koncentracijami CMV-specifičnih CD4⁺ celic T, ki izločajo IFN-γ, pride do hitrejše odstranitve virusa in imajo manj simptomov (Gamadia in sod., 2003). Medtem ko je T-celično posredovana citotoksičnost običajno povezana s CD8⁺ celicami T, številni CMV antigeni, vključno s pp65, IE, gB in gH, inducirajo antigen-specifične CD4⁺ celice T, ki so *in vitro* sposobne spodbuditi z MHC II povezano citotoksičnost (Elkington in sod., 2004; Weekes in sod., 2004). Večina CD4⁺ celic T, specifičnih za gB, *ex vivo* izraža grancim B, kar korelira s sposobnostjo številnih gB-specifičnih CD4⁺ celic T, da delujejo citotoksično proti tarčnim celicam (Hegde in sod., 2005).

Vedno več je tudi dokazov, da so CD4⁺ celice T bistvene za nadzor okužb s CMV (Sester in sod., 2005). Dokazi za njihovo zaščitno vlogo pri okužbah s CMV so podprtih s študijami na

miših, okuženih z MCMV, ki kažejo, da je dolgotrajno pomanjkanje CD4⁺ celic T *in vivo* povezano s persistentnim razmnoževanjem virusa (Polić in sod., 1998).

Pri sicer zdravih otrocih, okuženih s CMV, je dolgotrajna viremija povezana z dolgotrajno in s selektivno pomanjkljivostjo CMV-specifične CD4⁺ T celične imunosti (Tu in sod., 2004) in ne s pomanjkljivostjo CMV-specifičnega CD8⁺ T-celičnega odziva (Chen in sod., 2004). Pri bolnikih po presaditvi ledvic so pokazali, da pred pojavom kliničnih simptomov pride do zmanjšanja ravni CMV-specifičnih CD4⁺ celic T in povečanja virusnega bremena, kar kaže, da lahko raven CMV-specifičnih CD4⁺ celic T pomaga pri napovedi CMV-bolezni (Sester in sod., 2001). Prav tako se je pri tovrstnih bolnikih pokazalo, da pri simptomatskih posameznikih pride do poznega odziva CMV-specifičnih efektorskih spominskih CD4⁺ celic T, za razliko od asimptomatskih bolnikov, kar kaže, da so efektorske spominske CD4⁺ celice T potrebne za nadzor virusnega pomnoževanja in omejitve okužbe (Gamadia in sod., 2003). Nizka stopnja CMV-specifičnih celic CD4⁺ celic T korelira s povečanim tveganjem za zaplete pri posameznikih, okuženih s CMV po presaditvi pljuč (Sester in sod., 2005). Študije pri prejemnikih krvotvornih matičnih celic kažejo, da so CD4⁺ celice T povezane z zaščito pred boleznijo in so potrebne za obnovitev donorjevih CD8⁺ celic T (Einsele in sod., 2002). Zanimivo je, da je vztrajanje adoptivno prenesenih celic T odvisno od prisotnosti CD4⁺ celic T pomagalk. V študiji, kjer so adoptivno prenesli CMV-specifične celice T (pretežno CD8⁺ T), bolniki niso razvili CMV viremije, vendar pa so se le pri bolnikih z zaznavnim odzivom CD4⁺ celic T ohranile prenešene CD8⁺ celice T (Walter in sod., 1995). Prav tako adoptivni prenos CMV-specifičnih CD4⁺ celic T povzroči drastično zmanjšanje virusnega bremena pri teh bolnikih (Einsele in sod., 2002).

2.5.2.4 Gama delta celice T

Podskupina gama delta ($\gamma\delta$) celic T predstavlja manj kot 6 % celic T v krvi zdravih ljudi. Bistven del limfatičnih celic pa predstavljajo v predelih telesa, ki so izpostavljeni zunanjemu okolju (npr. črevesna sluznica) (Crough in Khanna, 2009). Za aktivacijo $\gamma\delta$ celic T nista potrebni obdelava in predstavitev antiga z molekulami MHC, zato je njihova aktivacija zelo hitra (Schleiss, 2013). Trenutno še ni znano, kaj prepoznajo na površini s CMV okuženih celic (Jackson in sod., 2011). $\gamma\delta$ celice T izkazujejo značilnosti obeh – pridobljenih in prirojenih – celic in so opredeljene kot "most" med prirojeno in pridobljeno imunostjo (Schleiss, 2013). Od običajnih $\alpha\beta$ celic T se razlikujejo v strukturi T-celičnega receptorja (TCR). $\gamma\delta$ celice T so nadalje razvrščene v podskupine glede na strukturo δ verig. Večina (približno 70 %) $\gamma\delta$ celic T izraža V δ 2 verigo, preostale $\gamma\delta$ celice T pa izražajo V δ 1, V δ 3, V δ 4 ali V δ 5 verigo ($\gamma\delta$ V δ 2^{neg}) (Wistuba-Hamprecht in sod., 2013).

Med $\gamma\delta$ celicami T je pri okužbah s CMV posebnega pomena populacija V δ 2^{neg}, saj je njihova dolgoročna ekspanzija značilna za okužbo s CMV (Pitard in sod., 2008). V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ celice T v povprečju predstavljajo 0,5 % celic T pri CMV-seronegativnih posameznikih, pri CMV-seropozitivnih pa v povprečju lahko predstavljajo 5–10 %, pri nekaterih

bolnikih pa tudi do 50 % celic T. Ekspanzija V δ 2^{neg} γδ celic T v periferni krvi po okužbi s CMV se pojavlja pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov, krvotvornih matičnih celic, pri otrocih z imunodeficiti, pri novorojenčkih, pri nosečnicah in zdravih posameznikih. Ekspanzija V δ 2^{neg} γδ celic T še dodatno okrepi obseg imunskega odziva proti CMV (Couzi in sod., 2015). Medtem ko te celice niso strogo CMV-specifične, lahko učinkovito lizirajo s CMV okužene fibroblaste in endoteljske celice (Halary in sod., 2005).

2.5.3 Humoralni odziv

Humoralni odziv je ključnega pomena za vzpostavitev dolgotrajne imunosti, preprečevanje nenadzorovanega pomnoževanja ob reaktivaciji in pojav resne CMV-bolezni. (Crough in Khanna, 2009). Primarna okužba s CMV vodi do sinteze protiteles, specifične za vrsto CMV proteinov, vključno s strukturnimi proteini matriksa (pp65 in pp150), z glikoproteini (predvsem gB in gH), glikoproteinskimi kompleksi (gH-gL-pUL128-pUL130 in gM-gN) in nestrukturnimi proteini, kot je IE1 protein (Jackson in sod., 2011). Specifična protitelesa za virusne proteine, ki posredujejo okužbo, so pomembna pri njenem omejevanju, nevtralizacijska protitelesa, specifična za virusne proteine, ki sodelujejo pri vstopu virusa v celico, pa imajo vlogo pri preprečevanju okužb (Ohlin in Söderberg-Nauclér, 2015). Kljub dokazom, da so protitelesa pomemben element imunskega odziva proti CMV, je zelo malo znanega o odzivu limfocitov B na okužbo s CMV pri ljudeh. Primarna okužba s CMV je povezana s hitrim pridobivanjem protiteles, usmerjenih proti proteinom matriksa, protitelesa proti glikoproteinom ovojnici pa začnejo nastajati šele po nekaj mesecih (Huygens in sod., 2014).

Študije na mišjem modelu kažejo, da nevtralizacijska protitelesa ščitijo pred primarno okužbo in reaktivacijo, saj omejijo virusno širjenje v tkivih in krvi (Wirtz in sod., 2008). Protitelesa ščitijo žival pred doseganjem letalne infektivne doze, vendar ne preprečujejo okužbe, kar kaže na vlogo humoralnega imunskega odziva pri omejevanju resnosti bolezni z nadzorovanjem virusnega bremena (Bratcher in sod., 1995). Rezultati raziskav na živalih kažejo, da imunizacija z gB izzove protitelesni odziv, ki zmanjša smrtnost živali (Rapp in sod., 1992), imunizacija brejih živali z gB pa varuje pred prenosom virusa na zarodek (Schleiss in sod., 2004).

Pri ljudeh se je pokazalo, da pasiven prenos protiteles iz CMV-seropozitivnih mater na novorojenčka varuje plod pred prirojeno okužbo s CMV (Yeager in sod., 1981). Prav tako pri materah, ki se okužijo s CMV pred nosečnostjo, pride do prenosa okužbe v veliko nižjem odstotku kot pri materah s primarno okužbo tekom nosečnosti (Fowler in sod., 1992). Vloga CMV-specifičnih protiteles za nadzor reaktivacije in virusnega širjenja v imunokompromitiranih bolnikih je manj jasna (Jackson in sod., 2011). Pomembnost humoralnega odziva bi lahko podprli tudi z dokazi, ki kažejo, da so primarne okužbe v seronegativnih posameznikih bolj pogoste in imajo hujši klinični potek v primerjavi s seropozitivnimi prejemniki organov (Gandhi in Khanna, 2004). Prav tako imunizacija z

oslabljenim CMV sevom Towne ali pasiven prenos imunoglobulinov proti CMV zmanjšuje resnost bolezni pri pacientih po presaditvah (Plotkin in sod., 1994).

2.6 DIAGNOSTIKA CMV

Napovedovanje CMV-bolezni pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov je težavno. Hitri in natančni diagnostični testi so ključnega pomena za ustrezeno diagnozo in zdravljenje CMV-bolezni po presaditvi. Diagnoza CMV-bolezni temelji na prepoznavanju kliničnih znakov in simptomov v povezavi z laboratorijskim odkrivanjem CMV v krvi ali bioptičnem vzorcu (Humar in Michaels, 2006). Za odkrivanje okužb s CMV so na voljo različne diagnostične metode, ki jih lahko razdelimo na neposredne in posredne. Neposredne metode so: (i) kultivacija virusa na celični kulturi, (ii) histopatologija, (iii) detekcija virusnih antigenov, in (iv) zaznavanje virusnih nukleinskih kislin. Med posredne metode testiranja pa spadajo: (i) dokazovanje CMV-specifičnih protiteles IgM in IgG in (ii) določanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Schottstedt in sod., 2010). Trajanje in pogostost diagnostičnega spremljanja je potrebno prilagoditi posameznemu bolniku. Potrebno je upoštevati, kakšno je tveganje za pojav bolezni, vrsto protivirusne terapije, ali obstaja možnost za pojav pozne CMV-bolezni in vrsto imunosurpresivnega zdravljenja (Humar in Michaels, 2006).

2.6.1 Serološko testiranje na protitelesa proti CMV

S presejalnim serološkim testiranjem se določi prisotnost protiteles proti CMV (CMV-serostatus) prejemnikov in donorjev pred presaditvijo. Glede na serostatus obeh se prejemnike razvrsti v skupine glede na tveganje za pojav CMV-bolezni po presaditvi. Za določanje serostatusa je priporočeno, da se uporablajo testi za določanje CMV-specifičnih protiteles IgG, saj imajo ti testi boljšo specifičnost v primerjavi s testi za določanje protiteles IgM, ali kombinirani testi za določanje protiteles IgG in IgM. Slednja nista primerna za presejalno testiranje, saj se lahko zaradi lažno pozitivnih rezultatov tovrstnih testov bistveno zmanjša specifičnost presejalnega testiranja. Ker je določitev serostatusa darovalca in prejemnika ključna za napoved tveganja za pojav okužbe po presaditvi, je nujno, da se za te preiskave uporabi teste z visoko občutljivostjo in specifičnostjo (Kotton in sod., 2013).

Interpretacija seroloških rezultatov je pri posameznikih z nedavno transfuzijo krvi in otrocih, mlajših od 12 mesecev, težka, saj lahko pasivni prenos protiteles privede do prehodnih lažno pozitivnih rezultatov. V takih primerih so pri določitvi pravega sesrostatusa v pomoč testi za ugotavljanje celično posredovane imunosti (Ritter in sod., 2013).

2.6.2 Kultivacija CMV

Kultivacija virusa je zelo specifičen test za diagnozo okužbe s CMV, vendar pa je njegova uporaba omejena zaradi slabe občutljivosti in dolgotrajnosti testa (Razonable in Humar, 2013). Pri tej metodi se klinični vzorec nanese na človeške fibroblaste in inkubira od 2 do

21 dni. V kolikor je virus prisoten v vzorcu, se v celični kulturi kažejo tipični citopatski efekti (za CMV je značilno, da povzroči nastanek velikih ploščatih celic). Metoda je zelo zahtevna, počasna in zahteva vsaj 2–3 tedne, da se lahko izda negativen rezultat (Ross in sod., 2011). Kljub temu pa se virusna kultivacija še vedno uporablja za detekcijo CMV iz vzorcev tkiva (Razonable in Humar, 2013) in za diagnozo tkivno invazivne bolezni (Kotton, 2013).

2.6.3 Histopatologija

Histopatologija se uporablja za potrditev tkivno invazivne CMV-bolezni, vendar pa je zaradi invazivnega posega njena uporaba omejena le na nekatera klinična stanja. V nekaterih primerih pa je uporaba biopsije in histopatološkega pregleda smiselna: (i) kadar obstaja sum na zavrnitev presadka, (ii) ko se sumi na sočasno okužbo z drugimi patogeni, in (iii) kadar se sumi na tkivno invazivno CMV-bolezen z nezaznavno koncentracijo virusa v krvi (Ramanan in Razonable, 2013). Po pripravi histopatološkega preparata tkiva sledi označevanje z monoklonskimi ali s poliklonskimi protitelesi, da se poveča občutljivost testa. Obarvane preparate se nato pogleda pod mikroskopom (Ross in sod., 2011).

2.6.4 Testiranje CMV virusnega bremena

Virusno breme je po definiciji koncentracija virusa v določenem vzorcu. Testiranje virusnega bremena v vzorcu je temelj za diagnozo in spremljanje klinične bolezni, določevanje začetka predbolezenskega zdravljenja in spremljanje odziva na zdravljenje. Za te namene sta na voljo test antigenemije CMV pp65 in kvantitativna analiza nukleinskih kislin (Kotton in sod., 2013).

2.6.4.1 CMV antigenemija

Pri testu antigenemije CMV pp65 s pomočjo monoklonskih protiteles zaznamo virusni antigen pp65 v levkocitih periferne krvi. Antigenemija se meri s kvantifikacijo okuženih levkocitov z imunofluorescenčnim testom. Obarvana jedra levkocitov pomenijo pozitiven rezultat, ki se poda kot število pozitivnih celic na 200.000 levkocitov periferne krvi (Ross in sod., 2011). Glede na število okuženih celic je mogoče oceniti obseg virusnega pomnoževanja (Razonable in Humar, 2013). Test antigenemije ima 89-odstotno občutljivost in 100-odstotno specifičnost (Rowshani in sod., 2005).

2.6.4.2 Kvantitativna določitev CMV nukleinskih kislin

Preferenčni testi za diagnozo CMV pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov so molekularni testi, ki zaznavajo CMV DNA ali RNA. Na splošno detekcija CMV RNA kaže na aktivno pomnoževanje CMV, detekcija CMV DNA pa ne odraža vedno virusnega pomnoževanja, saj lahko z zelo občutljivimi molekularnimi testi zaznamo latentno okužbo (Razonable in

Humar, 2013). Primerni vzorci za spremljanje okužb s CMV za molekularne metode so kri, plazma, urin, vzorci tkiva, bronhoalveolarni izpirek in cerebrospinalna tekočina (Kotton, 2013). Tarčni geni so dobro ohranjene regije glavnih proteinov IE ali L (Ross in sod., 2011). Te metode so hitre (rezultate dobimo v roku 6–48 ur), avtomatizirane in imajo visoko občutljivost (95–100 %) (Rowshani in sod., 2005).

Višje virusno breme je običajno povezano s tkivno invazivno boleznijo, medtem ko so nižje vrednosti značilne za asimptomatsko okužbo s CMV, srednje vrednosti pa so značilne za CMV-sindrom (Humar in sod., 1999). Višje virusno breme se na splošno opazi pri CMV D+/P- skupini prejemnikov v primerjavi s D+/P+ in D-/P+ skupinama. Spremljanje kinetike virusnega bremena v daljšem časovnem obdobju je pri napovedovanju bolezni lahko bolj pomembno kot katera koli absolutna vrednost virusnega bremena – hitrejše je povišanje virusnega bremena, večje je tveganje za nastanek CMV-bolezni (Emery in sod., 2002).

2.6.5 Imunski monitoring

Z imunskim monitoringom (angl. immune monitoring) CMV-specifičnega T-celičnega odziva lahko (i) identificiramo bolnike z visokim tveganjem za nastanek pozne CMV-bolezni ali viremije po končanem profilaktičnem zdravljenju, (ii) razlikujemo med bolniki, ki imajo povečano tveganje za napredovanje CMV-bolezni v primerjavi z bolniki, pri katerih pride do spontane ozdravitve virusne okužbe, in (iii) identificiramo bolnike, ki imajo večje tveganje za ponavljajoče virusne reaktivacije in bolezni po končani protivirusni terapiji (Khanna in Smith, 2013), ter (vi) umestimo bolnike glede na stopnjo tveganja za CMV-bolezen pred presaditvijo. Prav tako nam lahko pomaga pri usmerjanju profilakse in predbolezenskega zdravljenja. Določitev CMV-specifičnega T-celičnega odziva je lahko alternativa za serološko določanje CMV imunskega statusa pri odraslih po transfuziji in otrocih, mlajših od 12 mesecev (Ritter in sod., 2013).

Obstajajo različni testi za ugotavljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva: (i) ELISpot, (ii) test označevanja z MHC-tetrameri, (iii) znotrajcelično označevanje citokinov (ICS), in (iv) QuantiFERON-CMV. Večina testov meri odziv IFN- γ po stimulaciji polne krvi ali mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC) s CMV-specifičnimi antigeni ali peptidi (Crough in Khanna, 2009). Poleg IFN- γ se lahko spremlja tudi druge citokine. Idealni test mora zagotoviti kvantitativne in funkcionalne informacije o CMV-specifičnih CD4 $^{+}$ in CD8 $^{+}$ celicah T. Za klinično uporabo je dobrodošlo, da je test enostaven za izvedbo, poceni, ima visoko ponovljivost in je široko dostopen (Kotton in sod., 2013).

2.6.5.1 Test ELISpot

ELISpot (angl. enzyme-linked immunosorbent spot assay) meri koncentracijo sproščenega IFN- γ iz CMV-specifičnih CD4 $^{+}$ in CD8 $^{+}$ celic T po stimulaciji PBMC. Za stimulacijo se lahko uporabijo peptidi virusnih proteinov ali virusni lizat (Fernández-Ruiz in sod., 2014).

Sproščen IFN- γ se lokalno ujeme na monoklonska protitelesa, nanešena na ploščico, barvno reakcijo pa dobimo po dodatku sekundarnih protiteles označenih s hrenovo peroksidazo (Crough in Khanna, 2009). Rezultat se izrazi kot »pegotvorne enote« (angl. spot forming units) na število PBMC (Fernández-Ruiz in sod., 2014). Pozitiven odziv se giblje med 5 in 50 »pegotvornih celic« (angl. spot forming cells) na 200.000 PBMC. Test ne omogoča razlikovanja med CD4 $^{+}$ in CD8 $^{+}$ celicami T. Analize testa so pokazale, da ima test napovedno vrednost za pojav bolezni in viremije (Abate in sod., 2012). Slabost te tehnike je pomanjkanje standardiziranih mejnih vrednosti za ustrezni T-celični odziv, hkrati pa je tudi zelo zamudna v primerjavi z nekaterimi drugimi testi (npr. QuantiFERON) (Manuel, 2013).

2.6.5.2 Test označevanja z MHC-tetrameri

Označevanje z MHC-tetrameri za ugotavljanje števila CMV-specifičnih CD8 $^{+}$ celic T je hitra in občutljiva metoda za ugotavljanje večjega tveganja za razvoj CMV-bolezni pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov. PBMC ali polno kri inkubiramo z MHC-peptidnimi tetrameri, ki so označeni s florokromom. Po inkubaciji vezavo tetramerov na specifične T-celičnine receptorje izmerimo s pretočnim citometrom. Višja koncentracija CMV-specifičnih CD8 $^{+}$ celic T od 10/ μ L pomeni zmanjšano tveganje za nastanek CMV-bolezni (Gratama in sod., 2001). Omejitev te metode je, da sta tako HLA in epitop specifična, zato je potreben velik nabor različnih tetramerov, da se tehnika lahko uporablja v diagnostične namene in da lahko zajamemo veliko večino prebivalstva. V nekaterih primerih primerni tetrameri niso na voljo (Crough in Khanna, 2009).

2.6.5.3 Znotrajcelično označevanje citokinov

Metoda ICS (angl. intracellular cytokine staining - ICS) temelji na detekciji sproščanja različnih citokinov (običajno IFN- γ ali TNF- α) po *in vitro* stimulaciji PBMC ali polne krvi s pomočjo pretočne citometrije (Manuel, 2013). Metoda omogoča štetje CMV-specifičnih celic T in njihovo fenotipsko karakterizacijo preko celičnih površinskih označevalcev, zato je ta pristop »zlati standard« za ocenjevanje CMV-specifične celično posredovane imunosti (Gerna in sod., 2011).

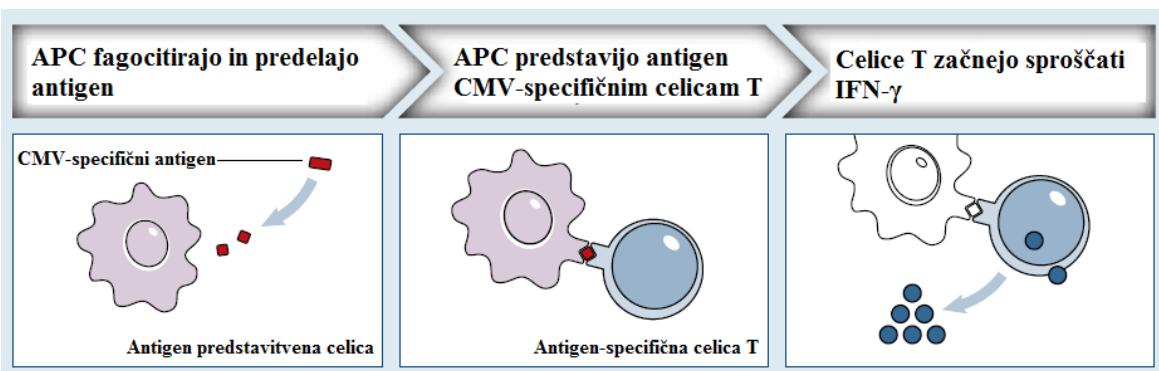
Ugotovili so, da koncentracija CMV-specifičnih CD4 $^{+}$ in CD8 $^{+}$ celic T, večja od 0,4 celic/ μ L, pri bolnikih po presaditvah pomeni zaščito pred nastankom CMV-bolezni (Gerna in sod., 2006), nižja stopnja specifične T-celične imunosti pa pomeni večje tveganje za CMV-bolezen (Gerna in sod., 2011). Prav tako stabilna raven CMV-specifičnih CD4 $^{+}$ T-celic pomeni manjše tveganje za pomnoževanje CMV (Egli in sod., 2008). Napovedna vrednost za viremijo se lahko izboljša, če se analiza IFN- γ kombinira z drugimi citokini (IL-2) in markerji (npr. z receptorjem programirane celične smrti 1 (angl. programmed cell death protein 1 - PD-1)) (Sester in sod., 2008).

Medtem ko je diagnostični potencial merjenja celično posredovanega imunskega odziva velik, je uporaba testov, kot so ELISpot, testi označevanja z MHC-tetrameri in ICS, omejena

zaradi različnih dejavnikov. Vsi ti testi so zelo kompleksni za uporabo, niso standardizirani in avtomatizirani. Za uporabo v bolnišničnem okolju so manj primerni, saj zahtevajo uporabo specializirane opreme in izurjeno osebje. Poleg tega virusni antigeni, ki se uporabljajo za antigensko stimulacijo, neposredno vplivajo na učinkovitost in občutljivost *in vitro* testov za odkrivanje odziva CMV-specifičnih T-celic (Lilleri in sod., 2007).

2.6.5.4 Test QuantiFERON-CMV

Test QuantiFERON-CMV® (Qiagen, Nemčija) je encimskoimunski test, ki omogoča spremjanje specifičnega CD8⁺ T-celičnega odziva proti CMV. Temelji na merjenju sproščenega IFN-γ iz CMV-specifičnih CD8⁺ T-celic po *in vitro* stimulaciji polne krvi z 22 imunogenimi virusnimi peptidi (iz pp65, pp50, pp28, IE1, IE2 in gB proteinov) in s tem omogoča oceno celične imunosti proti CMV (preglednica 1). Njihova predstavitev je specifična za široko paleto HLA razreda I, ki obsegajo najpogostejše vrste HLA, prisotnih v splošni populaciji (Giulieri in Manuel, 2011; Walker in sod., 2007). Test je enostaven za izvedbo. Polno kri se odvzame v tri epruvete: epruveta z antigenom, ki vsebuje mešanico 22 peptidov iz različnih CMV proteinov, druga epruveta (pozitivna kontrola) vsebuje fitohemaglutinin, tretja epruveta (negativna kontrola) pa ne vsebuje antiga. Sledi inkubacija preko noči pri 37 °C. Supernatant nato uporabimo za določanje ravni sproščenega IFN-γ z encimskoimunskim testom. Po navedbah proizvajalca se rezultati interpretirajo kot nereaktiv, reaktiv in nedoločljiv (Walker in sod., 2007). Interpretacija testa ni jasna, v kolikor se bolnik po presaditvi ne odzove na mitogen (Manuel in sod., 2013). Občutljivost testa se pri bolnikih z limfopenijo zmanjša, saj test zahteva zadostno število celic za sintezo IFN-γ (Kotton in sod., 2013). Test QuantiFERON-CMV je dovoljen za komercialno uporabo v Evropi in ima CE (angl. European Conformatit) in IVD (angl. *In vitro* diagnostic) certifikat (Fernández-Ruiz in sod., 2014).



Slika 3: Princip testa QuantiFERON-CMV (CMV-specific immune monitoring ..., 2013: 4). APC fagocitirajo, predelajo in predstavijo antigen CMV-specifičnim celicam T. Celice T nato začnejo sproščati IFN-γ.

Klinična uporabnost testa:

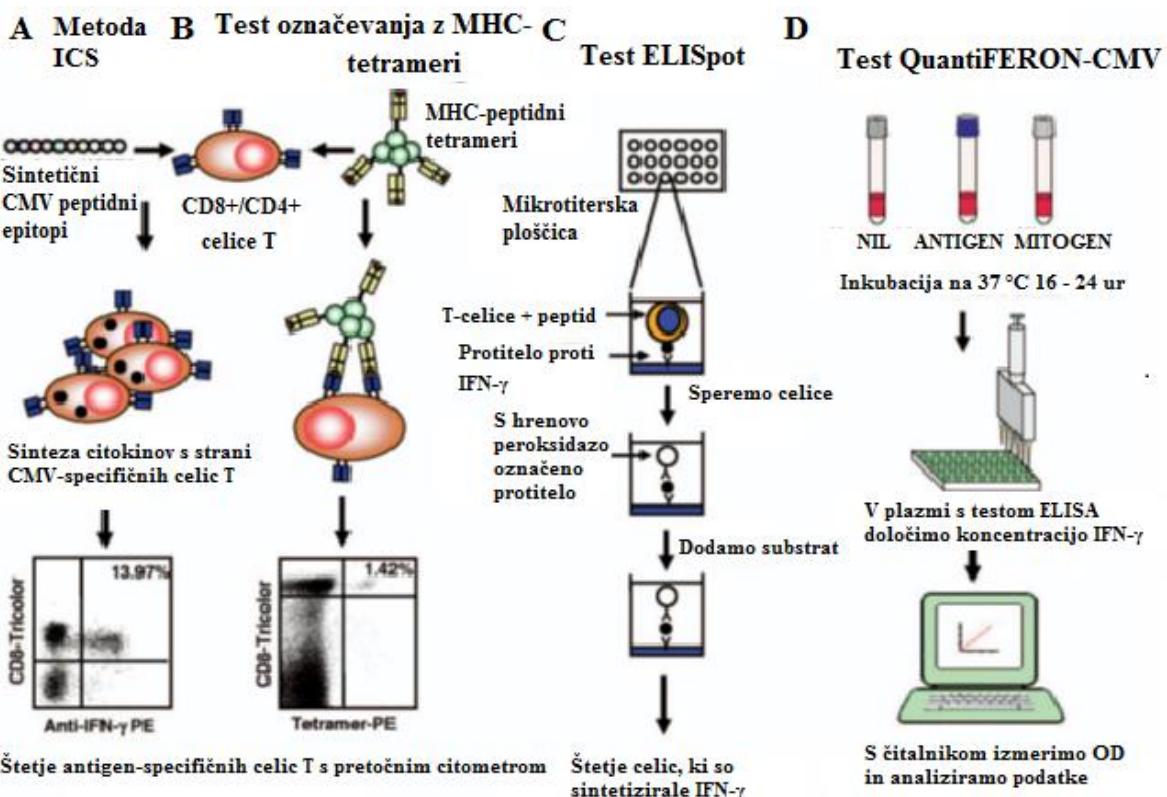
- i. **Ocena tveganja za pojav CMV-bolezni pri seropozitivnih prejemnikih pred presaditvijo** – Trenutno sloni ocena tveganja za CMV okužbo pred presaditvijo na

določevanju serostatusa prejemnika ob predpostavki, da imajo CMV-seropozitivni bolniki že razvit imunski odziv proti CMV. Kljub temu tretjina seropozitivnih prejemnikov nima ustreznega CMV-specifičnega T-celičnega odziva, kar so pokazali s testom QuantiFERON-CMV. Taki bolniki imajo po presaditvi večjo verjetnost za pojav pomnoževanja CMV kot tisti, ki imajo razvit CMV-specifični T-celični imunski odziv. Test QuantiFERON-CMV lahko pripomore k razvrščanju bolnikov v skupine z večjim tveganjem, kar se sicer izvaja samo na podlagi serostatusa, ki je trenutno merilo za razvrščanje v skupine z visokim tveganjem. Seropozitivne bolnike, ki nimajo ustreznega T-celičnega odziva, bi bilo potrebno uvrstiti v visoko rizično skupino (Cantisán in sod., 2013).

- ii. **Napoved pozne CMV-bolezni po prenehanju profilaktičnega zdravljenja** – Ugotovili so, da je pozna CMV-bolezen manj pogosta pri bolnikih z zaznavnim odzivom IFN- γ (nad 0,2 IE/mL) ob koncu profilakse v primerjavi s tistimi z nereaktivnim odzivom (Kumar in sod., 2009).
- iii. **Spontana izzvenitev asimptomatske CMV-viremije** – Ugotovili so, da pri bolnikih, ki imajo reaktivni odziv pri testu QuantiFERON-CMV, pogosteje pride do spontane izzvenitve viremije (Lisboa in sod., 2012).
- iv. Test QuantiFERON-CMV je koristen za spremljanje bolnikov s predbolezenskim zdravljenjem in lahko pripomore k usmerjanju kliničnih odločitev (Weseslindtner in sod., 2012; Manuel, 2013).

Preglednica 1: Mešanica 22 peptidov iz različnih CMV proteinov, uporabljenih pri testu QuantiFERON–CMV (QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) ..., 2013: 15)

	Sekvenca epitopa	Antigen	Tip HLA
1	VTEHDTLLY	pp50	A1
2	VLEETSVML	IE1	A2
3	NLVPVMVATV	pp65	A2
4	IMREFNSYK	gB	A3
5	AYAQKIFKIL	IE1	A23 & A24
6	QYDPVAALF	pp65	A24
7	DIYRIFAEL	pp65	A26
8	TPRVTGGGAM	pp65	B7
9	QIKVRVDMV	IE1	B8
10	ARVYEIKCR	pp28	B27
11	CPSQEPMSIYVY	pp65	B35
12	ELRRKMMYM	IE1	B8
13	FEQPTETPP	IE2	B41
14	QEFFFWDANDI	pp65	B44
15	QAIRETVEL	pp65	B57 & B58
16	QMVVQARLTW	pp65	B52
17	PTFTSQYRIQGKL	pp65	A24
18	GPISGHVLK	pp65	A11
19	DALPGPCI	pp65	B51
20	KMQVIGDQY	pp65	B40/B60
21	CEDVPSGKL	pp65	B40/B60
22	TRATKMQVI	PP65	A30/B13



Slika 4: Primerjava različnih testov za ugotavljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Crough in Khanna, 2009: 87). (A in B) PBMC ali polno kri inkubiramo s sintetičnimi CMV peptidnimi epitopi ali z MHC-peptidnimi tetrameri. Po inkubaciji te celice analiziramo s pomočjo pretočne citometrije za zaznavanje antigen-specifičnih celic T. (B) Pri testu ELISpot PBMC stimuliramo s sintetičnimi peptidi. Sproščen IFN- γ se lokalno ujame na monoklonska protitelesa, nanešena na ploščico, barvno reakcijo pa dobimo po dodatku sekundarnih protiteles, označenih s hrenovo peroksidazo, in substrata. S pomočjo programske opreme analiziramo sproščeni IFN- γ . (D) Pri testu QuantiFERON-CMV se polno kri odvzame v tri epruvete: NIL, ANTIGEN in MITOGEN. Po inkubaciji pri 37 °C v plazmi določimo raven sproščenega IFN- γ z encimskoimunskim testom ELISA.

Preglednica 2: Primerjava različnih testov za spremljanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva (Kotton in sod., 2013: 339)

Test	Prednosti	Omejitve	Napoved viremije	Napoved bolezni
ICS	<ul style="list-style-type: none"> - Za test se uporablja polna kri, potrebna je majhna količina krvi (1 mL) ali PBMC; - kratek inkubacijski čas; - rezultati so na voljo v roku 8 ur; - identifikacija CD4⁺ in CD8⁺ T-celic; - ni potrebno poznati HLA tipa; - kvantitativni in kvalitativni test. 	<ul style="list-style-type: none"> - Uporaba pretočnega citometra; - ni standardiziran. 	Da	Da
QuantiFERON-CMV (Qiagen)	<ul style="list-style-type: none"> - Za test se uporablja polna kri, potrebna majhna količina krvi (3 mL); - enostavna izvedba; - rezultati na voljo v 30–40 urah; - lahko se izvede v vsakem diagnostičnem centru. 	<ul style="list-style-type: none"> - Meri le odziv CD8⁺ T-celic; - občutljiv na limfopenijo; - nekateri tipi HLA niso zajeti v testu. 	Da	Da
ELISpot	<ul style="list-style-type: none"> - Identifikacija CD4⁺/CD8⁺ celic T; - ni nujno potrebno poznati HLA tipa; - rezultati so na voljo v 30–40 urah. 	<ul style="list-style-type: none"> - Potrebna izolacija PBMC iz velike količine krvi (vsaj 10 mL); - ne moremo razlikovati med CD4⁺ in CD8⁺ T-celicami; - ni standardiziran. 	Da	Da
Test označevanje z MHC tetrameri	<ul style="list-style-type: none"> - Hiter test (1–2 uri); - za test se uporablja polna kri, potrebna je majhna količina krvi (0.5–1 mL) ali PBMC. 	<ul style="list-style-type: none"> - Meri le odziv CD8⁺ T-celic; - uporaba pretočnega citometra; - je HLA in epitop specifičen; - ni standardiziran. 	Ne, le v kombinaciji s funkcionalnimi ali fenotipskimi označevalci.	Ne

2.7 ZDRAVLJENJE CMV OKUŽB PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI ČVRSTIH ORGANOV

2.7.1 Preventivno zdravljenje

Z uvedbo strategij za preprečevanje okužb in bolezni, ki jih povzroča CMV pri bolnikih po presaditvah, so se bistveno zmanjšali tako posredni kot tudi neposredni učinki okužb. Za preprečevanje CMV-okužb se običajno uporabljata dve glavni strategiji: (i) univerzalna profilaksa (angl. universal prophylaxis) in (ii) predbolezensko zdravljenje (angl. preemptive therapy) (Kotton in sod., 2013). Preventivni način zdravljenja je treba prilagoditi glede na obseg imunosupresije, tveganje za reaktivacijo latentnega CMV in primernost uporabljenega protivirusnega zdravila (Schottstedt in sod., 2010).

2.7.2 Univerzalna profilaksa

Pri presaditvah čvrstih organov je profilaktično zdravljenje vse bolj pogosto (Schottstedt in sod., 2010). Pri tem načinu zdravljenja se z aplikacijo protivirusnih zdravil običajno začne takoj oz. zelo zgodaj po presaditvi in traja od 3 do 6 mesecev. Za tak način zdravljenja se največkrat odločijo pri posameznikih, ki imajo največje tveganje za pojav CMV-okužb (Kotton in sod., 2013). Dolgotrajna profilaksa pa je povezana z razvojem rezistence na protivirusna zdravila, s pojavom zakasnjenega CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva in posledično s pozno CMV-boleznijo (Motta in Martins, 2008).

2.7.3 Predbolezensko zdravljenje

Predbolezensko zdravljenje pomeni aplikacijo protivirusnega zdravila v času povečanega tveganja za nastanek bolezni, vendar pred simptomatsko boleznijo (Gandhi in Khanna, 2004). Pri tem tipu zdravljenja je potrebno redno laboratorijsko spremeljanje CMV pp65 antigenemije ali CMV DNA v rednih časovnih presledkih za odkrivanje zgodnjega virusnega pomnoževanja (Tan, 2014). Ko virusno pomnoževanje doseže določeno mejo, se začne s protivirusnim zdravljenjem. S tem se prepreči napredovanje v klinično bolezen. Zaradi variabilnosti med diagnostičnimi testi, mejna vrednost, pri kateri se začne s protivirusnim zdravljenjem, ni določena. Pri D+/P- skupini bolnikov se z zdravljenjem prične že pri zelo nizkih vrednostih, saj je pri višjih mejnih vrednostih tveganje za pojav hujših oblik bolezni in rezistence večje (Kotton in sod., 2013).

Prednosti predbolezenskega zdravljenja so: (i) nižja pojavnost pozne CMV-bolezni, (ii) ciljno delovanje zdravil, (iii) zmanjšanje toksičnih učinkov zdravil in (iv) zmanjšanje stroškov zdravljenja. Glavna slabost tovrstnega zdravljenja pa je, da z njim ne preprečimo posrednih učinkov okužbe s CMV (Kotton in sod., 2013).

2.7.4 Hibridni pristop

Številni transplantacijski centri uporabljajo hibridni pristop, pri katerem se s predbolezenskim načinom spremeljanja začne po zaključku profilaktičnega zdravljenja. Pristop se uporablja pri bolnikih z visokim tveganjem za nastanek pozne CMV-bolezni (Kotton in sod., 2013).

2.7.5 Zdravljenje CMV-bolezni

Protivirusna zdravila, ki so trenutno na voljo za preprečevanje okužbe s CMV ali za zdravljenje CMV-bolezni, so ganciklovir, valganciklovir, aciklovir, valaciclovir, cidofovirov in foskarnet. Vsi zavirajo delovanje CMV DNA polimeraze in posledično pomnoževanje CMV. Aplikacija je običajno intravenska (Schottstedt in sod., 2010), valganciklovir pa je

mogoče aplicirati tudi peroralno, kar je preprosteje za bolnika in terapevta (Kotton in sod., 2013).

2.7.6 Cepljenje

Razvoj cepiva proti CMV ima visoko prioriteto (Schottstedt in sod., 2010). Trenutno se razvija več tipov cepiv, nobeno pa trenutno ni na voljo za rutinsko klinično uporabo (Griffiths in sod., 2013). Cepiva v raziskavah so: (i) živo oslabljeno (sev Towne) (Gandhi in Khanna, 2004), (ii) himerno živo cepivo, sestavljeno iz Towne seva (ovojnica), ki vsebuje segmente manj oslabljenega Toledo seva CMV (Heineman in sod., 2006), (iii) podenotno (CMV gB) (Schleiss, 2009), (iv) vektorsko cepivo (kot vektor se uporablja kanarčkov poxvirus ali alfavirus s CMV gB (Bernstein in sod., 2002) in/ali pp65 (Bernstein in sod., 2009)), in (v) pp65/ gB DNA cepivo (plazmidna DNA) (Kharfan-Dabaja in sod., 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bolniki

V raziskavo smo vključili devet bolnikov iz Centra za transplantacijo ledvic Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ki so prestali presaditev ledvice. Trije od devetih bolnikov so bili pred presaditvijo CMV-seronegativni, zato smo jih iz študije izključili. Šest bolnikov (pet moških in ena ženska, stari med 30 in 64 let, v povprečju 48 let) smo spremajali v obdobju od januarja do maja 2016 pred presaditvijo in nato enkrat mesečno do tri mesece po presaditvi. Skupaj smo v laboratorij prejeli 16 vzorcev krvi za spremeljanje CMV-specifičnega odziva CD8⁺ celic T s testom QuantiFERON-CMV. Vsi bolniki so v času spremeljanja prejemali imunosupresivno terapijo (takrolimus, mofetilmikofenolat) in protivirusno zdravljenje (valganciklovir). Vsi bolniki so prejeli organ CMV-seropozitivnega darovalca (D+/P+). Za primerjavo med preiskavama QuantiFERON-CMV in koncentracijo CMV DNA smo uporabili ostanke rutinskih diagnostičnih vzorcev devetih naključno izbranih bolnikov.

V raziskavo smo vključili tudi deset zdravih posameznikov, od tega dva moška in osem žensk, starih med 24 in 59 let (v povprečju 37 let), ki smo jim odvzeli vensko kri za določanje CMV-specifičnega T-celičnega odziva s testom QuantiFERON-CMV ter za določitev CMV-serostatusa.

Raziskava je bila iz etičnega vidika neoporečna, zato nam je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 14. 4. 2015 zanjo izdala soglasje št. 101/04/14. Za sodelovanje v raziskavi so preiskovanci privolili s podpisom.

3.1.2 Test QuantiFERON-CMV

Za določanje CMV-specifične celično posredovane imunosti pri bolnikih smo uporabili test QuantiFERON-CMV v skladu z navodili proizvajalca.

Primeren vzorec za določanje IFN-γ z encimskoimunskim testom (angl. enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) je polna kri pacienta, odvzeta v tri epruvete – NIL, CMV ANTIGEN in MITOGEN.

Za izvedbo testa smo potrebovali:

- QuantiFERON-CMV testni komplet za odvzem krvi (Qiagen, Nemčija), ki vsebuje tri epruvete:
 - NIL ali negativna kontrola (siv zamašek) vsebuje heparin in sterilni fosfatni

pufer,

- CMV ANTIGEN (moder zamašek) vsebuje mešanico 22 CMV peptidov iz različnih CMV proteinov,
- MITOGEN ali pozitivna kontrola (vijoličast zamašek) vsebuje fitohemaglutinin.

- Za izvedbo testa ELISA smo uporabili testni komplet QuantiFERON-TB Gold ELISA ali QuantiFERON-CMV ELISA (Qiagen, Nemčija), ki je vseboval:
 - 24 stripov z 8 vdolbinicami,
 - standardni humani IFN- γ (liofiliziran),
 - redčitveni pufer (zelena raztopina),
 - koncentrat konjugata (100-krat koncentriran, liofiliziran),
 - spiralni pufer (20-krat koncentriran),
 - raztopino encimskega substrata,
 - raztopino za blokiranje encimov.
- centrifugo,
- spiralec mikrotitrskih ploščic,
- inkubator s temperaturo 37 °C,
- hladilnik s temperaturo 2–8 °C ali zamrzovalnik s temperaturo -30 °C,
- vrtični mešalnik,
- čitalnik mikrotitrskih plošč s filtrom 450 nm in z referenčnim filtrom od 620 do 650 nm,
- računalnik z naloženo ustrezno programsko opremo QuantiFERON-CMV Analysis Software (Ver. 3.03).

3.1.3 Serologija

3.1.3.1 Določanje protiteles IgG proti CMV

Za določanje CMV-specifičnih protiteles IgG pri zdravih kontrolah in prejemnikih čvrstih organov smo uporabili test DiaSorin Liaison CMV IgG (Dia-Sorin, Italija) v skladu z navodili proizvajalca. Primeren vzorec za določanje CMV-specifičnih protiteles IgG je krvni serum ali krvna plazma.

Za izvedbo testa smo potrebovali:

- analizator LIAISON (Dia-Sorin, Italija),
- vrtični mešalnik,
- hladilnik s temperaturo 2–8 °C ali zamrzovalnik s temperaturo -30 °C
- integral, ki za 100 reakcij vsebuje:
 - magnetne delce – magnetni delci so obdani z inaktiviranim CMV antigenom (sev AD 169), dodani so tudi goveji serumski albumin (angl. bovine serum

- albumin – BSA), fosfatni pufer in natrijev azid,
- kalibrator 1 – vsebuje humani serum/plazmo z nizko koncentracijo CMV protiteles IgG, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno rumeno barvilo,
- kalibrator 2 – vsebuje humani serum/plazmo z visoko koncentracijo CMV protiteles IgG, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno modro barvilo,
- redčitveni pufer – vsebuje BSA, kazein, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno modro barvilo,
- konjugat – vsebuje mišja monoklonska protitelesa proti humanim protitelesom IgG, ki so konjugirana z derivatom izoluminola, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in konzervan,
- LIAISON® CMV IgG II kontrole (negativna in pozitivna kontrola),
- reagente za spiranje,
- vzbujevalne reagente.

3.1.3.2 Določanje protiteles IgM proti CMV

Za določanje CMV-specifičnih protiteles IgM pri zdravih kontrolah in prejemnikih čvrstih organov smo uporabili test DiaSorin Liaison CMV IgM (Dia-Sorin, Italija) v skladu z navodili proizvajalca. Primeren vzorec za določanje CMV-specifičnih protiteles IgM je krvni serum ali krvna plazma.

Za izvedbo testa smo potrebovali:

- analizator LIAISON (Dia-Sorin, Italija),
- vrtični mešalnik,
- hladilnik s temperaturo 2–8 °C ali zamrzovalnik s temperaturo -30 °C,
- integral, ki za 100 reakcij vsebuje:
 - magnetne delce – magnetni delci so obdani z inaktiviranim CMV antigenom (sev AD 169), dodani so tudi BSA, fosfatni pufer in natrijev azid,
 - kalibrator 1 – vsebuje humani serum/plazmo z nizko koncentracijo CMV protiteles IgM, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno rumeno barvilo,
 - kalibrator 2 – vsebuje humani serum/plazmo z visoko koncentracijo CMV protiteles IgM, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno modro barvilo,
 - pufer A – vsebuje kozja protitelesa IgG proti humanim protitelesom IgG, kozji serum, BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in inertno modro barvilo,
 - konjugat – vsebuje mišja monoklonska protitelesa proti humanim protitelesom IgM, ki so konjugirana z derivatom izoluminola, nespecifična

protitelesa IgG (mišja poliklonska protitelesa), BSA, fosfatni pufer, biocid ProClin® 300 in konzervanse,

- LIAISON® CMV IgM II kontrole (negativna in pozitivna kontrola),
- reagente za spiranje,
- vzbujevalne reagente.

3.2 METODE

3.2.1 Test QuantiFERON-CMV

3.2.1.1 Odvzem krvi

V vsako epruveto (NIL, ANTIGEN in MITOGEN) smo zbrali 0,8–1,2 mL venozne krvi – do črne indikatorske črte na stranskem robu etikete. Takoj po odvzemu krvi smo epruvete 10-krat stresli tako, da se je celotna notranja površina epruvete prekrila s krvjo. To omogoča razapljanje antigenov, ki so naneseni na steno epruvet. Epruvete je potrebno v najkrajšem možnem času, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi, prenesti v inkubator (37°C). Vzorcev se ne sme shranjevati v hladilniku ali zamrzovalniku.

Ko smo v laboratorij sprejeli komplet treh epruvet, smo jih še enkrat dobro premešali. Epruvete smo inkubirali v stoječem položaju preko noči oz. od 16 do 24 ur pri 37°C . Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 2500 RCF (angl. relative centrifugal force) (priporočeno s strani proizvajalca pri 2000–3000 RCF), s pomočjo pipete smo odvzeli krvno plazmo in izvedli test ELISA. V kolikor vzorcev nismo analizirali takoj, smo jih shranili v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8°C do največ 28 dni, za daljše shranjevanje pa smo jih shranili pri temperaturi, nižji od -20°C .

3.2.1.2 Izvedba testa ELISA

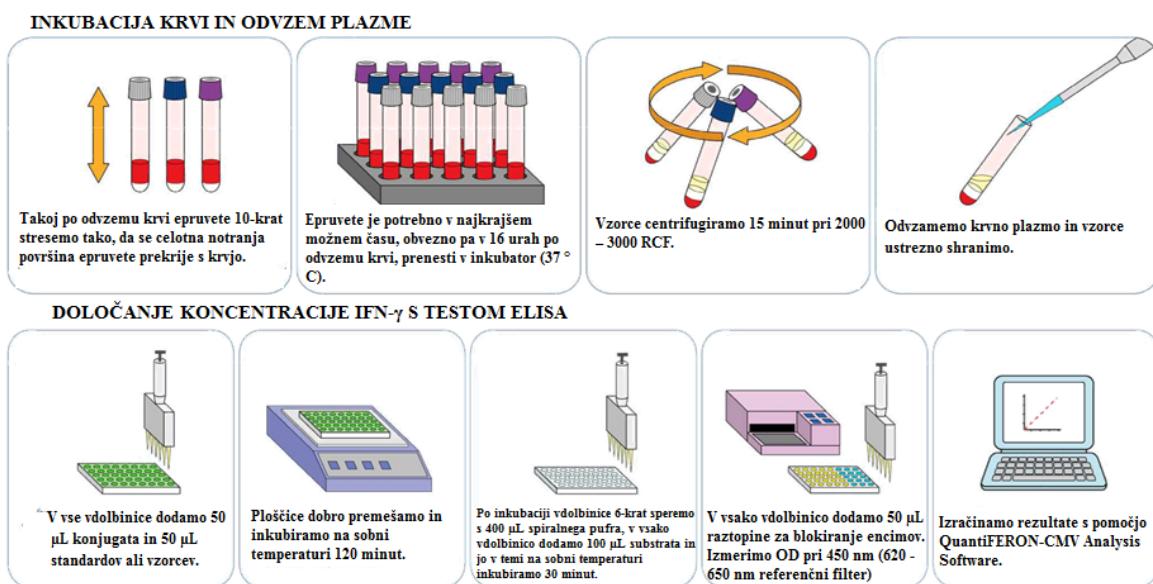
- Vsi vzorci plazme in reagentov z izjemo 100-kratnega koncentrata konjugata morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo (od 17 do 27°C).
- Ob odprtju novega kompleta smo standard in 100-kratni koncentrat konjugata rekonstruirali z ustrezno količino deionizirane ali destilirane vode, kar je navedeno na etiketi stekleničk. Stekleničke smo previdno premešali (minimalno penjenje) in preverili, da se je vsebina popolnoma raztopila.
- Pred izvedbo testa smo vse reagente in vzorce krvne plazme dobro premešali.
- V štirih epruvetah smo pripravili standarde S1, S2, S3 in S4. V vse štiri epruvete smo dodali 150 μL redčitvenega pufra (zelena raztopina). Nato smo v epruveto S1 dodali 150 μL standarda in dobro premešali. 50 μL raztopine smo prenesli iz S1 v S2 in dobro premešali. 50 μL raztopine smo prenesli iz S2 v S3 in dobro premešali. S4 je standard, ki vsebuje le redčitveni pufer (ničelni standard).

- V redčitvenem pufru smo pripravili ustrezeno količino konjugata v razmerju 1 : 100.
- Plazmo smo dobro premešali, da se IFN- γ dobro in enakomerno porazdeli v vzorcu. V redčitvenem pufru smo razredčili plazmo CMV-ANTIGENA in MITOGENA v razmerju 1 : 10 (10 μ L plazme CMV-ANTIGENA / MITOGENA v 90 μ L redčitvenega pufra), ničelne plazme ne redčimo.
- V vse vdolbinice smo dodali 50 μ L konjugata.
- V vdolbinice v 1. in 2. stolpcu v vrsticah A-D smo dodali 50 μ L standardov (v dveh ponovitvah).
- V ostale vdolbinice smo dodali 50 μ L vzorcev v vrstnem redu: NIL, CMV-ANTIGEN, MITOGEN, CMV-ANTIGEN redčitev 1/10 in MITOGEN redčitev 1/10.
- Ploščice smo dobro premešali, jih prekrili in inkubirali na sobni temperaturi 120 minut.
- Po inkubaciji smo vdolbinice 6-krat sprali s 400 μ L spiralnega pufra.
- Vdolbinice smo dobro osušili in nato smo v vsako vdolbinico dodali 100 μ L substrata in dobro premešali.
- Ploščico smo pokrili in jo v temi pri sobni temperaturi inkubirali 30 minut.
- Po inkubaciji smo v vsako vdolbinico dodali 50 μ L raztopine za blokiranje encimov in dobro premešali.
- S čitalnikom za mikrotitrsko ploščico smo izmerili optično gostoto (OD) vsake vdolbinice v roku 5 minut po dodajanju raztopine za blokiranje encimov. Pri tem smo uporabili filter 450 nm in referenčni filter 635 nm (priporočeno s strani proizvajalca med 620 in 650 nm).
- Vrednosti OD smo vnesli v računalniški program QuantiFERON-CMV Analysis Software (Ver. 3.03). Program ovrednoti uspešnost izvedbe testa in poda rezultat kot pozitiven, negativen ali nedoločljiv.

Preglednica 3: Interpretacija rezultatov testa QuantiFERON-CMV

ANTIGEN-NIL [IE/mL]	MITOGEN-NIL [IE/mL]	Rezultat QuantiFERON-CMV	Interpretacija rezultatov
< 0,2	$\geq 0,5$	Nereaktiv	Imunost proti CMV ni zaznana.
$\geq 0,2$	Poljubno	Reaktiv	Imunost proti CMV zaznana.
< 0,2	< 0,5	Nedoločljiv	Nedoločljiv rezultat za odzivnost na CMV (priporočamo ponovni odvzem).

1 IE/mL je ekvivalentna 40 pg/mL človeškega IFN- γ (Desem in Jones, 1998).



Slika 5: Postopek izvedbe testa QuantiFERON-CMV (QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) ..., 2013: 19)

3.2.2 Serologija

3.2.2.1 Določanje protiteles IgG proti CMV

Za določanje CMV-specifičnih protiteles IgG pri zdravih kontrolah in prejemnikih čvrstih organov smo uporabili test DiaSorin Liaison CMV IgG (Dia-Sorin, Italija) v skladu z navodili proizvajalca.

Pred uporabo integrala smo resuspendirali magnetne delce z obračanjem kolesca na dnu posode z magnetnimi delci, dokler se barva suspenzije ni spremenila v rjavo. Prav tako moramo preprečiti penjenje reagentov, zato smo pred uporabo vse reagente v integralu dobro pregledali. Po odstranitvi pečatov smo obrisali vrat vsake posodice, da smo s tem odstranili ostanke tekočine. Nato smo integral vstavili v analizator.

Vzorce smo pred analizo premešali na vrtičnem mešalniku, pregledali in po potrebi odstranili zračne mehurčke. V kolikor vzorcev nismo analizirali takoj, smo jih shranili v hladilnik pri temperaturi od 2 do 8 °C do največ 7 dni, za daljše shranjevanje pa smo vzorce shranili pri temperaturi, nižji od -20 °C.

Vzorce, označene s črtnimi kodami, smo postavili v stojala. V računalniškem programu smo nato odtipkali kodo vzorcev ter želeno analizo.

3.2.2.1.1 Princip metode

LIAISON® CMV IgG II je posredna kvantitativna metoda za določanje CMV-specifičnih protiteles IgG na podlagi kemiluminiscence (CLIA). CMV antigen je vezan na magnetne

delce (trdna faza), mišja monoklonska protitelesa pa so vezana z derivatom izoluminola (konjugat). Med prvo inkubacijo se protitelesa v kalibratorju, vzorcu ali kontroli vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat reagira s CMV-specifičnimi protitelesi IgG, ki so se predhodno vezala na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji se nevezan material spere med spiralnim ciklom. Nato se v reakcijsko mešanico doda vzbujevalne reagente, ki inducirajo kemiluminiscentno reakcijo. Svetlobni signal in posledično koncentracijo konjugata protitelo-izoluminol se meri s fotopomnoževalnikom kot relativne svetlobne enote (angl. relative light units - RLU). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih CMV-specifičnih protiteles IgG v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

3.2.2.1.2 Interpretacija rezultatov

Analizator avtomatsko izračuna koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG, ki jih izrazi v U/mL.

Območje merjenja je od 5,0 do 180 U/mL CMV-specifičnih protiteles IgG. V kolikor koncentracija CMV-specifičnih protiteles IgG presega območje merjenja, lahko vzorec redčimo (priporočeno v razmerju 1 : 10) in ga ponovno testiramo. Analizator pri izračunu upošteva redčitveni faktor.

- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG pod 12,0 U/mL se ocenijo kot negativni.
- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG med 12,0 in 14,0 U/mL se ocenijo kot mejni.
- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG, ki je enaka ali večja od 14,0 U/mL, se ocenijo kot pozitivni.

3.2.2.2 Določanje protiteles IgM proti CMV

Za določanje CMV-specifičnih protiteles IgM pri zdravih kontrolah in prejemnikih čvrstih organov smo uporabili test DiaSorin Liaison CMV IgM (Dia-Sorin, Italija) v skladu z navodili proizvajalca.

Pred uporabo integrala smo resuspendirali magnetne delce z obračanjem kolesca na dnu posode z magnetnimi delci, dokler se barva suspenzije ni spremenila v rjavo. Prav tako moramo preprečiti penjenje reagentov, zato smo pred uporabo vse reagente v integralu dobro pregledali. Po odstranitvi pečatov smo obrisali vrat vsake posodice, da smo s tem odstranili ostanke tekočine. Nato smo integral vstavili v analizator.

Vzorce smo pred analizo premešali na vrtičnem mešalniku, pregledali in po potrebi odstranili zračne mehurčke. V kolikor vzorcev nismo analizirali takoj, smo jih shranili v hladilnik pri temperaturi od 2 do 8 °C do največ 7 dni, za daljše shranjevanje pa smo vzorce shranili pri temperaturi, nižji od -20 °C.

Vzorce, označene s črtnimi kodami, smo postavili v stojala. V računalniškem programu smo nato odtipkali kodo vzorcev ter želeno analizo.

3.2.2.2.1 Princip metode

LIAISON® CMV IgM II je posredna semikvantitativna metoda za določanje CMV-specifičnih protiteles IgM na podlagi kemiluminiscence (CLIA). CMV antigen je vezan na magnetne delce (trdna faza), mišja monoklonska protitelesa pa so vezana z derivatom izoluminola (konjugat). Med prvo inkubacijo se protitelesa v kalibratorju, vzorcu ali kontroli vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugat reagira s CMV-specifičnimi protitelesi IgM, ki so se predhodno vezala na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji se nevezan material spere med spiralnim ciklom. Nato se v reakcijsko mešanico doda vzbujevalne reagente, ki inducirajo kemiluminiscentno reakcijo. Svetlobni signal in posledično koncentracijo konjugata protitelo-izoluminol se meri s fotopomnoževalnikom kot RLU. Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih CMV-specifičnih protiteles IgM v kalibratorju, vzorcu ali kontroli. Pufer A vsebuje kozja protitelesa IgG proti človeškim protitelesom IgG, ki služijo kot absorbent za zmanjšanje motnje humanih CMV-specifičnih protiteles IgG ali revmatoidnih faktorjev.

3.2.2.2.2 Interpretacija rezultatov

Analizator avtomatsko izračuna koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgM, ki jih izrazi v U/mL.

Območje merjenja je od 5,0 do 140 U/mL CMV protiteles IgM.

- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG pod 18,0 U/mL se ocenijo kot negativni.
- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG med 18,0 in 22,0 U/mL se ocenijo kot mejni.
- Vzorci s koncentracijo CMV-specifičnih protiteles IgG, ki je enaka ali večja od 22,0 U/mL, se ocenijo kot pozitivni.

3.2.3 Test za določanje koncentracije CMV DNA

V vzorcih plazme, ki so bili vključeni v našo raziskavo, so virusno breme (koncentracijo CMV DNA) določili v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa (HIV) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani s testom PCR v realnem času COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan (Roch, New Jersey).

3.2.4 Statistična analiza rezultatov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS (angl. Statistical Package for the Social Sciences) Statistics for Windows (Ver. 22.0, IBM, New York) in Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Washington). Preglednice smo oblikovali s programom Microsoft Word 2013 (Microsoft, Washington), grafe pa smo oblikovali s programom GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, California).

Ker sta bili spremenljivki koncentracija CMV DNA v plazmi in koncentracija sproščenega IFN- γ nenormalno porazdeljeni, smo jih analizirali z neparametričnim testom Spearmanov koreacijski koeficient korelacije. Prav tako smo pri nekaterih analizah, kjer je prišlo do velikih razlik med podatki, namesto aritmetične sredine uporabili mediano.

4 REZULTATI

4.1 VALIDACIJA TESTA

Test QuantiFERON-CMV ima oznako CE, kar pomeni, da mora proizvajalec zagotoviti podatke o občutljivosti, specifičnosti, natančnosti, ponovljivosti in obnovljivosti testa ter meje zaznavanja (Directive 98/79/EC, 1998). Test ima tudi oznako IVD, kar pomeni, da je namenjen za uporabo pri diagnostiki bolezni in zdravljenju. Tovrstni testi so namenjeni za zbiranje, pripravo in pregled vzorcev, ki izhajajo iz človeškega telesa (Pravilnik ..., 2002).

4.1.1 Temeljno testiranje

V sklopu temeljnega testiranja so proizvajalci mejno vrednost za zaznavanje predhodne izpostavljenosti CMV s testom QuantiFERON-CMV določili na podlagi analize rezultatov v skupini zdravih oseb, pri čemer so rezultate testa primerjali s serološkim testiranjem CMV-specifičnih protiteles IgG. Na podlagi analize ROC (angl. Receiver Operating Characteristic) so ugotovili, da se je mejna vrednost 0,04 IE/mL (po odstotju koncentracije ničelne epruvete) izkazala za najbolj učinkovito pri uporabi na zdravi populaciji. Primerjava učinkovitosti testa QuantiFERON-CMV s serološkim testiranjem CMV-specifičnih protiteles IgG je pokazala, da se je test QuantiFERON-CMV pri zdravih osebah v 95 % ujemal s serološkim testiranjem, pri čemer nihče izmed seronegativnih zdravih posameznikov ni kazal reaktivnosti s testom QuantiFERON-CMV, 90 % seropozitivnih darovalcev pa je imelo reaktiven odziv testa QuantiFERON-CMV. Splošno pozitivno ujemanje je bilo 90-odstotno, negativno pa 100-odstotno (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

4.1.2 Prag testa

Priporočena mejna vrednost, ki jo navajajo proizvajalci, je 0,2 IE/mL (po odstotju koncentracije ničelne epruvete), čeprav se lahko pri imunokompromitiranih bolnikih postavi tudi drugačna mejna vrednost. Razlogi za spremjanje mejne vrednosti izhajajo iz temeljenih imunoloških razlik med zdravo populacijo in populacijo, za katero ima test klinično uporabnost. To je predvsem pri imunokompromitiranih bolnikih, ki imajo zaradi imunosupresije povečano tveganje za nastanek simptomatske CMV okužbe ali bolezni (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

4.1.3 Specifičnost in občutljivost testa

Specifičnost testa QuantiFERON-CMV so proizvajalci izračunali z oceno stopnje lažno pozitivnih rezultatov pri zdravih osebah brez dokazov o predhodni izpostavljenosti CMV (CMV-seronegativni posamezniki), občutljivost pa so izračunali z oceno odzivnosti testa QuantiFERON-CMV pri zdravih osebah z dokazom o predhodni izpostavljenosti CMV

(CMV-seropozitivni posamezniki). Ker podoben standardni test za diagnozo celično posredovane imunosti na CMV ne obstaja, analiza občutljivosti in specifičnosti testa QuantiFERON-CMV praktično ni mogoča (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

Pri seronegativnih posameznikih niso zaznali lažno pozitivnih rezultatov testa QuantiFERON-CMV. Pri seropozitivnih zdravih posameznikih je bila stopnja ujemanja testa QuantiFERON-CMV s serološkim testiranjem 80,5-odstotna (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

4.1.4 Podani znotrajtestna in medtestna ponovljivost

Znotrajtestno in medtestno ponovljivost so proizvajalci ocenili s testiranjem vzorcev plazme z različnimi koncentracijami IFN- γ v več ponovitvah, v različnih laboratorijih, ob različnih dneh in z različnimi operaterji. Ponovljivost so podali s povprečjem odstotka koeficiente variacije (v nadaljevanju % CV) (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

Pri znotrajtestni ponovljivosti se je % CV za vse testirane plazme nahajal na intervalu med 4,1 % in 9,1 %, povprečna vrednost pa je znašala 6,6 %. Povprečna vrednost % CV v ničelni plazmi je znašala 14,1 %. % CV pri medtestni ponovljivosti se je nahajal na intervalu med 6,6 % in 12,3 %. Povprečje % CV je znašalo 8,7 %, povprečna vrednost % CV ničelne plazme pa je znašala 26,1 %. Pri nizkih ocenjenih vrednostih je višja stopnja odklona pričakovana, saj je koncentracija IFN- γ nizka, odklon okoli nizke ocenjene koncentracije pa večji kot pri višjih koncentracijah. Proizvajalci navajajo, da % CV pod 10 % velja za odličnega (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

Prav tako so proizvajalci preverili ponovljivost diagnostičnega statusa testa (tj. reaktiv, nereaktiv in nedoločljiv) pri posameznikih, kjer so kri odvzeli v tri epruvete (NIL, ANTIGEN in MITOGEN). Plazme so testirali v različnih laboratorijih. Ugotovili so, da je ponovljivost testa 100-odstotna (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

4.1.5 Testirana znotrajtestna ponovljivost

V naši raziskavi smo preverili znotrajtestno ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV. Med vzorci smo naključno izbrali tri, ki smo jih znotraj testa ponovili v treh paralelkah. Prav tako smo v preverjanje znotrajtestne ponovljivosti v test vključili tudi komercialno dostopno kontrolo Za izračun znotrajtestne ponovljivosti pri vzorcih in kontrolah smo uporabili koncentracije sproščenega IFN- γ iz antigenske epruvete po odštetju koncentracije ničelne epruvete. % CV rezultatov se je nahajal v intervalu med 2,2 % in 5,0 %, povprečni % CV rezultatov pa je znašal 3,8 % (preglednica 4).

Preglednica 4: Znotrajtestna ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV pri treh naključno izbranih vzorcih in komercialno dostopni kontroli

Vzorec	Povprečje sproščenega IFN- γ [IE/mL]	% CV
A	6,06	3,8
B	0,45	2,2
C	2,15	5,0
Komercialno dostopna kontrola	0,85	4,2
Povprečje % CV		3,8

4.1.6 Testirana medtestna ponovljivost

Želeli smo določiti tudi medtestno ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV. Med vzorci smo naključno izbrali tri, ki smo jih med različnimi testi štirikrat ponovili. Za določanje medtestne ponovljivosti smo v test vključili tudi komercialno dostopne kontrole. Primerjali smo, ali se variabilnost med vzorci in kontrolami razlikuje. Vzorce se namreč – za razliko od kontrol – večkrat odmrzne in zamrzne. Za izračun medtestne ponovljivosti pri vzorcih in kontrolah smo uporabili izračun sproščenega IFN- γ iz antigenske epruvete po odštetju koncentracije ničelne epruvete. Variabilnost rezultatov je za vzorce znašala med 5,6 % in 15,3 %, skupna variabilnost je bila 11,9 % (podatki v preglednici 5). % CV rezultatov kontrol se je nahajal na intervalu med 2,2 % in 7,5 %, povprečni % CV pa je znašal 5,4 % (podatki v preglednici 6).

Preglednica 5: Medtestna ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV pri treh naključno izbranih vzorcih

Vzorec	Povprečje sproščenega IFN- γ [IE/mL]	% CV
D	3,20	14,8
E	1,53	5,6
F	6,29	15,3
Povprečje % CV		11,9

Preglednica 6: Medtestna ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV pri komercialno dostopnih kontrolah

Komercialno dostopne kontrole	Povprečje sproščenega IFN- γ [IE/mL]	% CV
K1	1,03	7,5
K2	0,60	6,7
K3	0,96	2,2
Povprečje % CV		5,4

4.1.7 Določanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri seronegativnih in seropozitivnih zdravih osebah

Za določanje CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pri CMV-seronegativnih in CMV-seropozitivnih zdravih osebah smo rezultate testa QuantiFERON-CMV primerjali z rezultati serološkega testiranja pri desetih zdravih posameznikih. Izmed teh so bili štirje seronegativni, šest pa je bilo seropozitivnih. Nihče od posameznikov ni imel pozitivnega rezultata serološkega testiranja CMV-specifičnih protiteles IgM ($>18 \text{ U/mL}$), prav tako nihče ni imel nedoločljivega rezultata testa QuantiFERON-CMV (ANTIGEN-NIL $< 0,2 \text{ IE/mL}$; MITOGEN-NIL $< 0,5$).

Vsi CMV-seronegativni zdravi posamezniki (4/4; 100 %) so imeli nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV (ANTIGEN-NIL $< 0,2 \text{ IE/mL}$). Raven sproščenega IFN- γ se je pri teh bolnikih gibala med 0,00 IE/mL in 0,01 IE/mL (mediana 0,00 IE/mL).

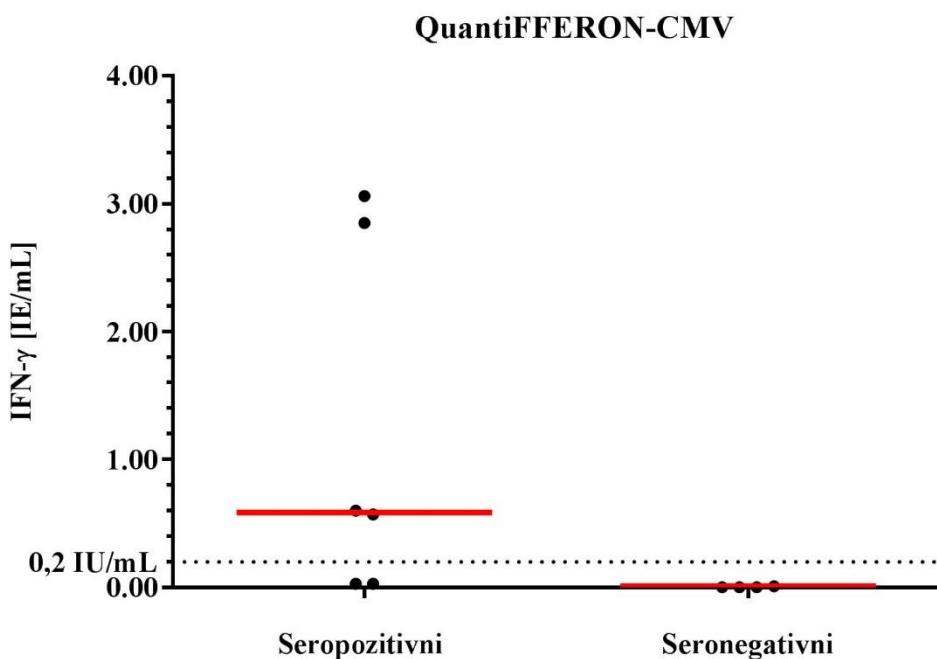
Izmed šestih CMV-seropozitivnih zdravih posameznikov sta imela dva (33 %) nezaznaven odziv IFN- γ s testom QuantiFERON-CMV (ANTIGEN-NIL $< 0,2 \text{ IE/mL}$). Pri obeh je bila raven sproščenega IFN- γ 0,03 IE/mL. Preostali seropozitivni posamezniki (4/6; 67 %) pa so imeli zaznaven odziv IFN- γ s testom QuantiFERON-CMV (ANTIGEN-NIL $> 0,2 \text{ IE/mL}$). Raven sproščenega IFN- γ se je pri teh posameznikih gibala med 0,57 IE/mL in 3,06 IE/mL (mediana 1,73 IE/mL), mediana za vse seropozitivne posameznike pa je znašala 0,59 IE/mL.

Preglednica 7: Primerjava serološkega testiranja proti CMV in koncentracije sproščenega IFN- γ , merjene s testom QuantiFERON-CMV pri seronegativnih zdravih posameznikih

Vzorec	Koncentracija IgM [U/mL]	Interpretacija IgM	Koncentracija IgG [U/mL]	Interpretacija IgG	IFN- γ [IE/mL]	Interpretacija
1	<18	NEGATIVNO	<12	NEGATIVNO	0,01	NEREAKTIVEN
2	<18	NEGATIVNO	<12	NEGATIVNO	0,00	NEREAKTIVEN
3	<18	NEGATIVNO	<12	NEGATIVNO	0,00	NEREAKTIVEN
4	<18	NEGATIVNO	<12	NEGATIVNO	0,00	NEREAKTIVEN
				Mediana	0,00	

Preglednica 8: Primerjava serološkega testiranja proti CMV in koncentracije sproščenega IFN- γ , merjene s testom QuantiFERON-CMV pri seropozitivnih zdravih posameznikih

Vzorec	Koncentracija IgM [U/mL]	Interpretacija IgM	Koncentracija IgG [U/mL]	Interpretacija IgG	IFN- γ [IE/mL]	Interpretacija
5	<18	NEGATIVNO	39,90	POZITIVNO	0,03	NEREAKTIVEN
6	<18	NEGATIVNO	39,00	POZITIVNO	0,60	REAKTIVEN
7	<18	NEGATIVNO	64,70	POZITIVNO	3,06	REAKTIVEN
8	<18	NEGATIVNO	126,00	POZITIVNO	0,57	REAKTIVEN
9	<18	NEGATIVNO	111,00	POZITIVNO	2,85	REAKTIVEN
10	<18	NEGATIVNO	155,00	POZITIVNO	0,03	NEREAKTIVEN
				Mediana	0,59	



Slika 6: Primerjava CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva med CMV-seropozitivnimi in CMV-seronegativnimi zdravimi posamezniki. Pri štirih CMV-seronegativnih in šestih CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih smo določili CMV-specifični T-celični imunski odziv s testom QuantiFERON-CMV. Rezultati prikazujejo primerjavo vrednosti sproščenega IFN- γ [IE/mL] med CMV-seropozitivnimi zdravimi posamezniki in CMV-seronegativnimi zdravimi posamezniki. Črta predstavlja mediano.

4.1.8 T-celični imunski odziv pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov

Z namenom ugotoviti, ali se pri CMV-seropozitivnih bolnikih ohrani močan T-celični imunski odziv tudi po presaditvi čvrstih organov, smo v raziskavo vključili 9 bolnikov iz Centra za transplantacijo ledvic Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Odziv IFN- γ smo s testom QuantiFERON-CMV spremljali pred presaditvijo ter enkrat mesečno od enega do tri meseca po presaditvi na povprečno 35 dni (od 16 do 56 dni).

Trije od devetih bolnikov so bili pred presaditvijo seronegativni in niso imeli zaznavnega T-celičnega imunskega odziva (ANTIGEN-NIL < 0,2 IE/mL), zato smo jih iz študije izključili. Noben od bolnikov pred presaditvijo ni imel nedoločljivega rezultata testa QuantiFERON-CMV. Ostali bolniki so bili seropozitivni in so imeli pred presaditvijo reaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV. Mediana sproščenega IFN- γ pred presaditvijo je pri teh bolnikih znašala 7,28 IE/mL. Vrednosti sproščenega IFN- γ so se gibale med 5,41 in 54,86 IE/mL.

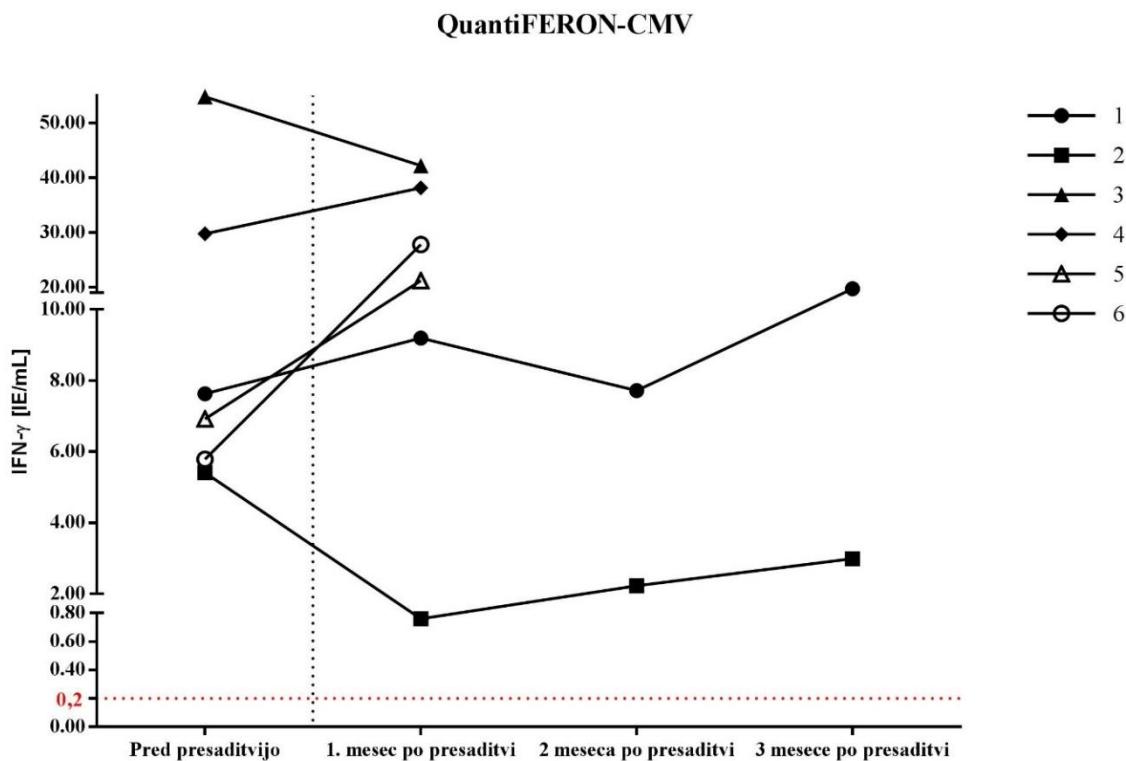
V prvem mesecu po presaditvi so vsi seropozitivni bolniki ohranili T-celični imunski odziv, saj se je pri vseh bolnikih ohranila vrednost sproščenega IFN- γ po stimulaciji s CMV peptidi nad 0,2 IE/mL. Mediana sproščenega IFN- γ je bila 24,50 IE/mL, vrednosti sproščenega IFN- γ so se gibale med 0,76 in 42,27 IE/mL. Pri štirih bolnikih smo v prvem mesecu po presaditvi

opazili povečanje koncentracije sproščenega IFN- γ (20 %, 28 %, 206 % in 380 %), pri dveh pa je prišlo do zmanjšanja le-te (86 % in 23 %).

Dva bolnika smo lahko spremajali dlje časa – tri mesece po presaditvi. Oba bolnika sta tudi v drugem mesecu ohranila T-celični imunski odziv, mediana sproščenega IFN- γ je znašala 4,98 IE/mL (vrednosti med 2,32 in 7,72 IE/mL). Odziv se je ohranil tudi v tretjem mesecu po presaditvi. Mediana sproščenega IFN- γ pa je znašala 11,37 (vrednosti med 2,99 in 19,75 IE/mL).

Preglednica 9: Spremljanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri CMV-seropozitivnih bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov s testom QuantiFERON-CMV

Bolnik	Odvzem	Pred presaditvijo	1 mesec po presaditvi	2 meseca po presaditvi	3 mesece po presaditvi
1 (IFN- γ [IE/mL])	7,63	9,19	7,72	19,75	
2 (IFN- γ [IE/mL])	5,41	0,76	2,23	2,99	
3 (IFN- γ [IE/mL])	54,86	42,27	ni podatka	ni podatka	
4 (IFN- γ [IE/mL])	29,79	38,17	ni podatka	ni podatka	
5 (IFN- γ [IE/mL])	6,92	21,19	ni podatka	ni podatka	
6 (IFN- γ [IE/mL])	5,79	27,81	ni podatka	ni podatka	
Mediana	7,28	24,50	4,98		11,37



Slika 7: CMV-specifični T-celični imunski odziv, merjen s testom QuantiFERON-CMV pri CMV-seropozitivnih bolnikih pred in po presaditvi ledvic. Pri šestih seropozitivnih bolnikih smo določili T-celični imunski odziv pred in po presaditvi s testom QuantiFERON-CMV. Pri vseh bolnikih se je tekom spremljanja T-celični odziv ohranil (> 0.2 IE/mL). Pri štirih bolnikih se je T-celični odziv v prvem mesecu spremljanja povečal, pri dveh pa je prišlo do njegovega zmanjšanja.

4.1.9 Določanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih z visokim CMV virusnim bremenom

Zanimalo nas je, ali imajo bolniki z večjim CMV virusnim bremenom prisoten močnejši T-celični imunski odziv. Za testiranje te hipoteze smo v raziskavo vključili ostanke rutinskih diagnostičnih vzorcev devetih naključno izbranih bolnikov po presaditvi ledvic, pri katerih smo vzporedno določili koncentracijo CMV DNA v plazmi in T-celični imunski odziv s testom QuantiFERON-CMV. Vključili smo tri testirane bolnike, ki so imeli nizko koncentracijo CMV DNA v plazmi (< 137), tri testirane bolnike, ki so imeli koncentracijo CMV DNA v plazmi med 137 in 1000 kopij/mL, in tri testirane bolnike, ki so imeli koncentracijo CMV DNA v plazmi nad 1000 kopij/mL. Med izbranimi bolniki je bilo 6 moških in 3 ženske s povprečno starostjo 51 let.

Preglednica 10: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantiFERON-CMV pri bolnikih z nizko koncentracijo CMV DNA v plazmi

Vzorec	IFN- γ [IE/mL]	Rezultat	CMV DNA [kopij/mL]
1	3,04	REAKTIVEN	0
2	25,16	REAKTIVEN	<137
3	3,90	REAKTIVEN	0
Mediana	3,90		0

Vsi bolniki, ki so imeli nizko koncentracijo CMV DNA, so imeli reaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV, vrednosti sproščenega IFN- γ so se nahajale v intervalu med 3,9 in 25,16 IE/mL (mediana je znašala 3,90 IE/mL). Vrednosti koncentracij CMV DNA so bile med 0 in 137 kopij/mL (srednja vrednost je znašala 0 kopij/mL).

Preglednica 11: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantiFERON-CMV pri bolnikih s koncentracijo CMV DNA v plazmi med 137 in 1000 kopij/mL

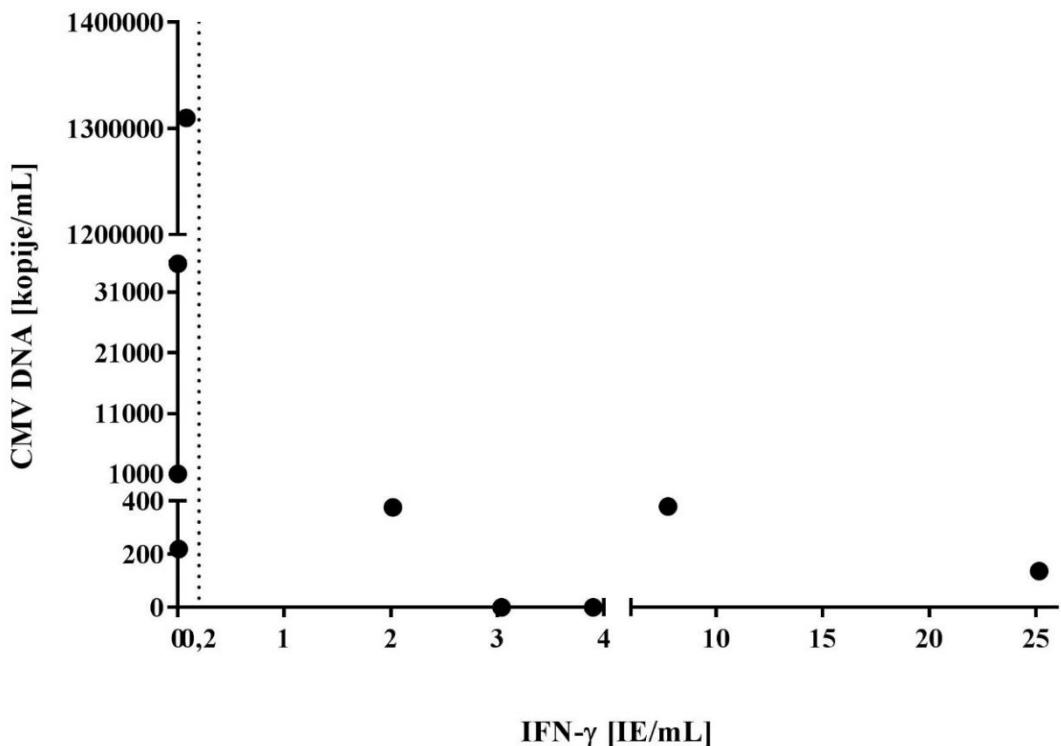
Vzorec	IFN- γ [IE/mL]	Rezultat	CMV DNA [kopij/mL]
4	0,01	NEDOLOČLJIVO	220
5	7,73	REAKTIVEN	380
6	2,02	REAKTIVEN	377
Mediana	2,02		377

Pri bolnikih, ki so imeli koncentracijo CMV DNA med 137 in 1000 kopij/mL, je imel eden izmed bolnikov nedoločljiv rezultat testa QuantiFERON-CMV, ostala dva pa reaktivni rezultat. Mediana izloženega IFN- γ v antigenski epruveti je znašala 2,02 IE/mL, vrednosti so se gibale med 0,01 in 7,73 IE/mL. Vrednosti koncentracij CMV DNA so bile med 220 in 380 kopij/mL (srednja vrednost je znašala 377 kopij/mL).

Preglednica 12: T-celični imunski odziv proti CMV, merjen s testom QuantiFERON-CMV pri bolnikih s koncentracijo CMV DNA v plazmi nad 1000 kopij/mL

Vzorec	IFN- γ [IE/mL]	Rezultat	CMV DNA [kopij/mL]
7	0,00	NEDOLOČLJIVO	35.700
8	0,08	NEDOLOČLJIVO	1.310.000
9	0,00	NEDOLOČLJIVO	1.010
Mediana	0,00		35.700

Pri bolnikih z visoko koncentracijo CMV DNA (>1000 kopij/mL) so imeli vsi bolniki nedoločljiv rezultat testa QuantiFERON-CMV, vrednosti izloženega IFN- γ so se gibale med 0,00 in 0,08 IE/mL (mediana 0,00 IE/mL). Vrednosti koncentracij CMV DNA so bile med 1.010 in 1.310.000 kopij/mL (mediana 35.700 kopij/mL).



Slika 8: Koncentracija CMV DNA v plazmi [kopije/mL] in sproščen IFN- γ , merjen s testom QuantiFERON-CMV [IE/mL]. Na ostankih rutinskih diagnostičnih vzorcev devetih bolnikov po presaditvi ledvic smo vzposeeno določili koncentracijo CMV DNA in T-celični imunski odziv s testom QuantiFERON-CMV. Vključili smo tri bolnike, ki so imeli nizko koncentracijo CMV DNA (<137), tri testirane bolnike, ki so imeli koncentracijo CMV DNA med 137 in 1000 kopij/mL, in tri testirane bolnike, ki so imeli koncentracijo CMV DNA nad 1000 kopij/mL.

Preglednica 13: Spearmanov korelacijski koeficient povezave med spremenljivkama QuantiFERON-CMV in CMV DNA v plazmi

		Koncentracija sproščenega IFN- γ	Koncentracija CMV DNA
Spearmanov koeficient korelacije	Koncentracija sproščenega IFN- γ	Koeficient korelacije	1,000
		Statistična značilnost (dvostranska)	-0,588 0,096
	Št. enot	9	9
	Koncentracija CMV DNA	Koeficient korelacije	-0,588
		Statistična značilnost (dvostranska)	0,096
		Št. enot	9

Na podlagi vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficiente ugotovimo, da med spremenljivkama (koncentracija sproščenega IFN- γ , merjena s testom QuantiFERON-CMV in koncentracija CMV DNA v plazmi) ni statistično značilne povezanosti ($\rho = -0,588$, $P =$

0,1). Opazili pa smo negativno vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta, kar pomeni, da imajo bolniki z višjo koncentracijo CMV DNA v povprečju prisoten šibkejši CMV-specifični T-celični imunski odziv.

5 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bila uvedba komercialnega testa QuantiFERON-CMV in določitev T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov, in sicer s pomočjo komercialnega testa QuantiFERON-CMV. Rezultati so pokazali primerljive vrednosti % CV naših rezultatov medtestne in znotrajtestne ponovljivosti s podatki proizvajalca. Ugotovili smo, da nihče od CMV-seronegativnih posameznikov ni imel zaznavnega CMV-specifičnega odziva IFN- γ , v skupini CMV-seropozitivnih pa je imelo 67 % preiskovancev zaznaven odziv IFN- γ . Pri CMV-seropozitivnih bolnikih, pri katerih smo s testom QuantiFERON-CMV spremajali odziv IFN- γ pred in po presaditvi, se je CMV-specifični T-celični imunski odziv tekom spremeljanja pri vseh bolnikih ohranil. Ob sočasnem merjenju koncentracije CMV DNA in CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pri bolnikih po presaditvi s testom QuantiFERON-CMV med spremenljivkama ni bilo statistično značilne povezanosti.

5.1 VALIDACIJA TESTA

V sklopu validacije testa za vpeljavo v rutinsko diagnostiko smo določili znotrajtestno in medtestno ponovljivost rezultatov testa QuantiFERON-CMV med naključno izbranimi vzorci in komercialno dostopnimi kontrolami. Za izračun znotrajtestne in medtestne ponovljivosti pri vzorcih in kontrolah smo uporabili koncentracije sproščenega IFN- γ iz antigenske epruvete po odštetju koncentracije ničelne epruvete. Povprečni % CV pri znotrajtestni ponovljivosti je znašal 3,8 %, povprečni % CV pri medtestni ponovljivosti je znašal 11,9 %, % CV rezultatov komercialno dostopnih kontrol pa je znašal 5,4 %.

Študij, kjer bi preverjali znotrajtestno in medtestno ponovljivost, nismo zasledili, podatke o tem pa so zagotovili proizvajalci. Pri znotrajtestni ponovljivosti je v njihovem primeru povprečni % CV za testirane plazme znašal 6,6 %, pri medtestni ponovljivosti pa 8,7 %. Proizvajalci navajajo, da % CV za medtestno in znotrajtestno ponovljivost pod 10 % velja za odličnega (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

Primerjava naših rezultatov s podatki proizvajalca kaže, da so naše vrednosti pri medtestni ponovljivosti primerljive z vrednostmi, ki jih navajajo proizvajalci testa. Malo višje vrednosti pri naših rezultatih so najverjetneje posledica večkratnega odmrzovanja in zamrzovanja vzorcev plazme. Za primerjavo smo določili tudi medtestno ponovljivost komercialno dostopnih kontrol, ki jih odmrznemo le tik pred uporabo. Opazimo lahko, da smo pri medtestni ponovljivosti kontrol dobili zaželene vrednosti % CV po navodilih proizvajalca. Prav tako proizvajalci % CV niso določevali pri antigenski epruveti z odštevanjem koncentracije ničelne epruvete, vendar so za izračun % CV uporabili neodšteeti rezultat. Variacija v pozitivno smer je lahko posledica seštevanja napak pri odštevanju koncentracij sproščenega IFN- γ ničelne epruvete in antigenske epruvete.

Ugotavljam, da je test QuantiFERON-CMV enostaven za izvedbo, zanesljiv in ima dobro ponovljivost. Je pa vredno omeniti, da je za kakovost rezultatov zelo pomembna predanalitska faza testa. Pomembno je, da se v epruvete odvzame zadostna količina krvi, ključnega pomena pa je tudi ustrezno mešanje krvi po odvzemuh, da pride do raztopljanja antigenov, ki so naneseni na steno epruvet. Pomembna sta tudi čas in način transporta, saj je vzorce potrebno v najkrajšem možnem času, obvezno pa v 16 urah po odvzemuh krvi, prenesti v inkubator, vzorci pa morajo biti pred inkubacijo na sobni temperaturi (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

5.2 DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI CMV PRI SERONEGATIVNIH IN SEROPOZITIVNIH ZDRAVIH OSEBAH

Za določanje CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pri CMV-seronegativnih in CMV-seropozitivnih zdravih osebah smo rezultate testa QuantiFERON-CMV primerjali z rezultati serološkega testiranja pri desetih zdravih posameznikih. Izmed teh so bili štirje CMV-seronegativni, šest pa je bilo CMV-seropozitivnih. Ugotovili smo, da nihče od seronegativnih posameznikov ni imel zaznavnega CMV-specifičnega odziva IFN- γ (vsi so imeli nereaktivni rezultat testa), v skupini seropozitivnih pa je 67 % imelo zaznaven odziv IFN- γ , pri 33 % preiskovancev pa s testom QuantiFERON-CMV tega nismo zaznali.

Tudi proizvajalci testa so primerjali ujemanje rezultatov testa QuantiFERON-CMV s serološkim testiranjem pri 250 CMV-seronegativnih in 341 CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih. Ugotovili so, da pri seronegativnih zdravih posameznikih pride do 100-odstotnega ujemanja testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja, pri seropozitivnih posameznikih pa do 80,8-odstotnega ujemanja s testom QuantiFERON-CMV (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012).

Ujemanje rezultatov testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja so preverjali tudi v različnih študijah. Walker in sod. (2007) so v skupini 37 zdravih posameznikov ugotovili 97-odstotno ujemanje rezultatov testa QuantiFERON-CMV s serologijo. Podobno kot pri naših rezultatih nihče izmed seronegativnih zdravih posameznikov ni imel reaktivnega rezultata testa QuantiFERON-CMV. Med seropozitivnimi je imelo 94 % zdravih posameznikov reaktivni rezultat, 8 % pa je imelo nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV. Enako primerjavo so naredili tudi Abate in sod. (2013) pri 39 zdravih posameznikih (33 seropozitivnih; 6 seronegativnih). Vsi seronegativni so imeli nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV, 75,8 % seropozitivnih je imelo reaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV, 24,2 % pa je kljub seropozitivnosti imelo nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV. Prav tako so tudi Kumar in sod. (2009) preverjali ujemanje rezultatov testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja na 32 zdravih posameznikih (21 seronegativnih; 11 seropozitivnih). Tudi tu so imeli vsi seronegativni posamezniki nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV, od 11 seropozitivnih je 81,8 % imelo reaktivni rezultat, 18,2 % pa je imelo nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV.

Enako kot pri podatkih, ki jih je navedel proizvajalec testa, in pri zgoraj omenjenih študijah, tudi pri naših rezultatih testiranja seronegativnih zdravih posameznikov pride do 100 % ujemanja med rezultati testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja. Pri seropozitivnih zdravih posameznikih pa je v našem primeru v 33 % prišlo do neskladja s serološkim testiranjem. Odstotek neujemanja je v našem primeru višji, kot ga navajajo proizvajalci testa oz. ga navajajo v člankih.

Vzrok za odstopanje je najverjetneje majhno število kontrolnih oseb, ki smo jih vključili v študijo. Prav tako so proizvajalci v sklopu temeljnega testiranja ugotovili, da je mejna vrednost 0,04 IE/mL (po odštetju koncentracije ničelne epruvete) najbolj učinkovita pri uporabi na zdravi populaciji (QuantiFERON-CMV Package Insert, 2012). V kolikor bi uporabili mejno vrednost 0,04 IE/mL, se občutljivost testa pri našem vzorcu zdravih posameznikov kljub vsemu ne bi spremenila, saj sta oba seropozitivna zdrava posameznika imela vrednost sproščenega IFN- γ manjšo od 0,04 IE/mL. Opažena odstopanja so lahko posledica neodzivnosti seropozitivnih posameznikov na peptide, uporabljene v testu (podatkov o HLA-I tipizaciji nimamo), ali pa lažno pozitivnih rezultatov serološkega testiranja. Proizvajalci poudarjajo, da test QuantiFERON-CMV ni neposreden test za ugotavljanje predhodne okužbe s CMV, zato ni nadomestilo za serološko testiranje, vendar pa zdravniku lahko omogoči bolj podrobен vpogled v stanje bolnika pred ali po presaditvi (CMV-specific immune monitoring ..., 2013).

5.3 T-CELIČNI IMUNSKI ODZIV PRI BOLNIKIH PO PRESADITVI ČVRSTIH ORGANOV

Pri šestih CMV-seropozitivnih bolnikih smo s testom QuantiFERON-CMV spremljali odziv IFN- γ pred presaditvijo ter enkrat mesečno od enega do tri mesece po presaditvi. Vsi seropozitivni bolniki so imeli pred presaditvijo reaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV. Tekom spremljanja po presaditvi se je pri vseh bolnikih CMV-specifični odziv IFN- γ ohranil.

V raziskavah ugotavljajo, da ima lahko spremljanje T-celičnega imunskega odziva po presaditvi boljšo napovedno vrednost za nastanek viremije kot le magnituda odziva IFN- γ enkratnega odvzema (Westall in sod., 2008; Weseslindtner in sod., 2012; Crough in sod., 2007). Westall in sod. (2008) so pri CMV-seropozitivnih prejemnikih pljuč, ki niso imeli ali so imeli blago reaktivacijo CMV, spremljali kinetiko T-celičnega imunskega odziva. Pri teh bolnikih so v daljšem časovnem obdobju opazili dva vzorca imunosti proti CMV. Pri enih se odziv IFN- γ (merjen s testom QuantiFERON-CMV) po presaditvi ni spremjal s časom, pri drugi skupini seropozitivnih prejemnikov pljuč pa je prišlo do postopnega povečanja odziva IFN- γ . Za razliko od slednjih bolnikov, se je pri seropozitivnih bolnikih, pri katerih je prišlo do močne reaktivacije virusa, T-celični imunski odziv izrazito zmanjšal pred pojavim viremije. Ugotovili so tudi, da absolutna raven sproščenega IFN- γ v kateri koli časovni točki ni napovedala reaktivacije CMV. Prav tako so tudi Weseslindtner in sod.

(2012) s testom QuantiFERON-CMV spremljali 67 prejemnikov pljuč enkrat mesečno do enega leta po presaditvi. Ugotovili so, da je incidenca visoke ravni CMV DNA pri seropozitivnih prejemnikih pljuč povezana z dinamiko T-celičnega odziva. Pri seropozitivnih prejemnikih pljuč, pri katerih je prišlo do nihanja odziva IFN- γ tekom spremeljanja in pri katerih se je pred pojavom visoke viremije (>1000 kopij/mL) raven sproščenega IFN- γ zmanjšala in se je pojavila šele po nastopu viremije, se je CMV viremija razvila pri 53 % bolnikov. V nasprotju s tem so virusno DNA v plazmi zaznali le pri 18 % bolnikov, ki so imeli stabilnejšo dinamiko odziva in pri katerih so CMV-specifični T-celični odziv zaznali že med profilaktičnim zdravljenjem ali pred detekcijo CMV DNA. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Crough in sod. (2007), ki so s testom ELISpot spremljali bolnike po presaditvi čvrstih organov. Longitudinalna analiza imunskega odziva je pokazala, da se je pri prejemnikih čvrstih organov, pri katerih ni prišlo do pojava viremije ali pa je prišlo do asimptomatske viremije, ohranilo stabilno izražanje IFN- γ s strani CD8 $^{+}$ celic T v celotnem obdobju spremeljanja. V nasprotju s tem so pri prejemnikih čvrstih organov, pri katerih je prišlo do simptomatske viremije, opazili precejšnje nihanje CD8 $^{+}$ celic T, ki izražajo IFN- γ . Pri več kot 70 % vzorcev bolnikov s simptomatsko viremijo so opazili zmanjšano izražanje IFN- γ s strani CMV-specifičnih CD8 $^{+}$ celic T, medtem ko je pri bolnikih, pri katerih ni prišlo do pojava viremije ali je prišlo do asimptomatske viremije, pri manj kot 10 % vzorcev prišlo do zmanjšanja izražanja IFN- γ .

Test QuantiFERON-CMV je prav tako uporaben za spremeljanje T-celičnega imunskega odziva tudi po končanem protivirusnem zdravljenju. Kumar in sod. (2009) so pri 108 bolnikih s testom QuantiFERON-CMV spremljali T-celični odziv pred in tri mesece po presaditvi čvrstih organov. Ugotovili so, da imajo bolniki, ki imajo ob koncu protivirusnega zdravljenja zaznaven CMV-specifični T-celični imunski odziv, bistveno nižje tveganje za nastanek CMV-bolezni (3,3 %) kot bolniki z nezaznavnim odzivom (21,8 %). Le v D+/P-podskupini bolnikov so po prenehanju protivirusnega zdravljenja, pri bolnikih z reaktivnim rezultatom testa QuantiFERON-CMV, ugotovili 14,3-odstotno stopnjo kasnejše CMV-bolezni in 35,7-odstotno pri bolnikih z nereaktivnim rezultatom testa. Podobno so Lisboa in sod. (2012) pri 37 bolnikih po presaditvi organov spremljali T-celični odziv ob pojavu viremije in nato en in dva tedna kasneje. Ugotovili so, da je bila pri bolnikih z reaktivnim rezultatom testa QuantiFERON-CMV incidenca poznejše spontane odstranitve virusna 92,3 % v primerjavi s 45,5 % pri bolnikih z nereaktivnim rezultatom testa pri prvem testiranju.

Manuel in sod. (2013) so 124 D+/P- bolnikov spremljali tri mesece po končanem profilaktičnem zdravljenju. Ko so analizirali incidenco CMV-bolezni v enem letu po presaditvi v različnih časovnih točkah, so imeli bolniki z reaktivnim rezultatom testa QuantiFERON-CMV nižjo incidenco CMV-bolezni (6,4 %) kot bolniki z nereaktivnim (22,2 %) ali nedoločljivim (58,3 %) rezultatom. Če so nedoločljiv rezultat interpretirali kot nereaktiv, je bila incidenca CMV-bolezni 6,4 % v primerjavi s 26,8 %. Incidenca CMV viremije (bodisi asimptomatske ali pri bolnikih s CMV-boleznijo) se ni razlikovala pri bolnikih z reaktivnim (36 %) ali nereaktivnim rezultatom (31,7 %) testa QuantiFERON-

CMV, vendar pa je bila večja pri bolnikih z nedoločljivim rezultatom (72,7 %). V raziskavi so določili tudi občutljivost in specifičnost ter negativno in pozitivno napovedno vrednost testa za pojav CMV-bolezni. Občutljivost in specifičnost za zaščito pred CMV-boleznijo sta bili na podlagi prvega testa 14 % in 96 %, pozitivna napovedna vrednost (zaščita pred CMV-boleznijo pri bolnikih s pozitivnim rezultatom testa) je bila na podlagi prvega testa 93 %, negativna pa 24 %. Občutljivost in specifičnost testa sta bili, na podlagi katere koli točke spremeljanja, 30 % in 93 %, pozitivna in negativna napovedna vrednost pa 93 % in 27 %.

Prav tako ugotavlja, da ima testiranje T-celičnega imunskega odziva pred presaditvijo napovedno vrednost za pomnoževanje CMV po presaditvi. Cantisán in sod. (2013) so pri 55 prejemnikih pljuč ugotavliali, ali rezultati testa QuantiFERON-CMV pred presaditvijo napovejo pojav viremije po presaditvi. Pri seropozitivnih bolnikih, ki pred presaditvijo niso imeli zaznavnega odziva IFN- γ s testom QuantiFERON-CMV, so opazili višjo incidenco pomnoževanja CMV po presaditvi. Pri 50 % takih bolnikov je prišlo do pomnoževanja CMV po presaditvi, medtem ko je do virusnega pomnoževanja pri seropozitivnih bolnikih z zaznavnim odzivom IFN- γ prišlo pri 13,3 %. Prav tako je pri seropozitivnih prejemnikih, ki so imeli pred presaditvijo nereaktivni rezultat testa QuantiFERON-CMV, prišlo do virusnega pomnoževanja prej kot pri seropozitivnih bolnikih z reaktivnim rezultatom testa, imeli so višje virusno breme, pomnoževanje CMV je trajalo dlje časa, imeli so višjo frekvenco pojava CMV-bolezni.

Na podlagi naših rezultatov spremeljanja seropozitivnih bolnikov pred in do tri meseca po presaditvi ledvic lahko zaključimo, da se je CMV-specifični CD8 $^{+}$ T-celični odziv pri preiskovanih bolnikih ohranil tudi po presaditvi. Glede na to, da smo vse bolnike spremljali krajsi čas in so vsi bolniki v času spremeljanja še vedno prejemali profilaktično zdravljenje, napovedne vrednosti za kasnejši pojav viremije in CMV-bolezni še ne moremo določiti. Te bolnike bi bilo smiselno spremljati tudi po končanem profilaktičnem zdravljenju. Menimo, da bi bilo potrebno bolnike, pri katerih se je v prvem mesecu po presaditvi pokazal trend zmanjševanja odziva, potrebno bolj podrobno spremljati, saj se lahko trend zmanjševanja odziva IFN- γ nadaljuje in pade pod mejo za reaktivni rezultat, kar bi pomenilo višje tveganje za nastanek CMV-bolezni. Prav tako bi bilo za boljši vpogled v stanje bolnika smiselno, poleg kinetike T-celičnega imunskega odziva, spremljati tudi kinetiko virusnega bremena. Na podlagi zgoraj opisanih raziskav, ki so bolj celostno zajeli stanje bolnikov po presaditvi čvrstih organov, pa lahko zaključimo, da je incidenca viremije pri seropozitivnih prejemnikih organov povezana z dinamiko T-celičnega odziva. Incidenca je bila bistveno višja pri posameznikih, kjer je prišlo do nihanja, zakasnjene detekcije ali popolne odsotnosti odziva IFN- γ (Westall in sod., 2008; Weseslindtner in sod., 2012; Crough in sod., 2007). Test QuantiFERON-CMV je lahko uporaben tudi za ugotavljanje tveganja za CMV-bolezen po prenehanju profilaktičnega zdravljenja, saj imajo bolniki z reaktivnim testom QuantiFERON-CMV nižjo incidenco kasnejše CMV-bolezni, bolniki z nereaktivnim testom imajo srednje, tisti z nedoločljivim pa visoko tveganje za CMV-bolezen (Manuel in sod., 2013). Spremljanje CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva s testom

QuantiFERON-CMV pred presaditvijo napoveduje nevarnost pomnoževanja virusa pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov. Tako imajo seropozitivni bolniki z nereaktivnim rezultatom povečano tveganje za pomnoževanje CMV po presaditvi v primerjavi s seropozitivnimi z reaktivnim rezultatom testa (Cantisán in sod., 2013). Prav tako lahko spremeljanje pred presaditvijo pomaga zdravnikom razlikovati med bolniki, pri katerih uvedba profilaktičnega zdravljenja ni potrebna, od tistih, pri katerih bi bila uvedba profilaktičnega zdravljenja potrebna (Bestard in sod., 2013).

5.4 DOLOČANJE T-CELIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI CMV PRI BOLNIKIH Z VISOKIM CMV VIRUSNIM BREMENOM

Ob sočasnem merjenju koncentracije CMV DNA in CMV-specifičnega CD8⁺ T-celičnega imunskega odziva s testom QuantiFERON-CMV smo ugotovili, ali imajo bolniki z visoko koncentracijo CMV DNA prisoten močnejši T-celični odziv. Na podlagi vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficiente smo ugotovili, da med spremenljivkama (koncentracija sproščenega IFN-γ, merjena s testom QuantiFERON-CMV in koncentracija CMV DNA v plazmi) ni bilo statistično značilne povezanosti ($\rho = -0,588$, $P = 0,1$), opazili pa smo nakazano negativno povezanost.

Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Lisboa in sod. (2012), ki so ugotovili, da je CMV-specifični odziv IFN-γ, merjen s testom QuantiFERON-CMV, obratno sorazmerno povezan s koncentracijo CMV DNA ob sočasnem merjenju ($\rho = -0,318$, $P = 0,007$). Mediana koncentracije CMV DNA je bila ob vsakem reaktivnem testu 225 kopij/mL, medtem ko je bila mediana koncentracije CMV DNA, ob nereaktivnem rezultatu testa QuantiFERON-CMV, 2.345 kopij/mL. Tudi Tormo in sod. (2010b) so z metodo znotrajceličnega označevanja citokinov prišli do podobnih rezultatov. Ugotovili so, da je število perifernih CD8⁺ in CD4⁺ celic T, ki izločajo IFN-γ, obratno sorazmerno povezano z nivojem virusnega bremena ($\rho = -0,806$; $P = < 0,001$). Ugotovili so tudi, da je koncentracija CMV-specifičnih CD8⁺ in CD4⁺ celic T v prisotnosti CMV DNA znatno nižja kot koncentracija celic ob negativnem rezultatu PCR.

Na podlagi naših rezultatov smo prišli do podobnih ugotovitev kot v zgoraj omenjenih raziskavah. Smiselno bi bilo povezavo med koncentracijo sproščenega IFN-γ, merjeno s testom QuantiFERON-CMV in koncentracijo CMV DNA v plazmi določiti na večjem številu vzorcev, saj bi s tem najverjetneje dobili bolj zanesljive rezultate. Prav tako bi bilo namesto ostankov rutinskih diagnostičnih vzorcev bolje uporabiti vzorce bolnikov, ki smo jih spremljali pred in po presaditvi, saj o bolnikih, ki jih dobimo za rutinsko diagnostiko, nimamo pomembnih podatkov, ki lahko vplivajo na povezavo (npr. ali bolnik prejema protivirusno zdravljenje, ali je pri bolniku prišlo do reaktivacije virusa ali je viremija posledica primarne okužbe, ali bolnik prejema imunosupresivno zdravljenje). Veliko več informacij o napovedi tveganja za pojav CMV-viremije ali CMV-bolezni dobimo s spremeljanjem kinetike T-celičnega odziva in virusnega bremena. S podatkom o korelaciji

med prisotnostjo T-celičnega imunskega odziva in virusnega bremena pri enkratnem odvzemenu ne moremo napovedati kasnejšega pojava CMV-viremije ali CMV-bolezni, pove nam le to, da ima bolnik z močnejšim T-celičnim imunskim odzivom na isti časovni točki nižje virusno breme.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da ima test QuantiFERON-CMV dobro ponovljivost, je zanesljiv in enostaven za izvedbo. Test se je 100-odstotno ujemal z rezultati serološkega testiranja pri CMV-seronegativnih zdravih posameznikih, pri tretjini CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih pa je prišlo do neujemanja z rezultati serološkega testiranja, pri dveh tretjinah pa do ujemanja. Potrebno je poudariti, da test QuantiFERON-CMV ni neposreden test za ugotavljanje predhodne okužbe s CMV, zato ni nadomestilo za serološko testiranje (CMV-specific immune monitoring ..., 2013). Spremljanje T-celičnega imunskega odziva pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov lahko pomaga pri napovedovanju tveganja za okužbo s CMV ali za pojav CMV-bolezni ter pomaga pri odločitvah o zdravljenju bolnikov, saj je incidenca viremije in CMV-bolezni odvisna od dinamike odziva IFN- γ . Pomembno je tudi testiranje CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pred presaditvijo, saj napoveduje nevarnost pomnoževanja virusa pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov. Ugotovili smo, da med koncentracijo sproščenega IFN- γ , merjeno s testom QuantiFERON-CMV in koncentracijo DNA v plazmi ni bilo značilne povezanosti. Menimo, da je spremljanje T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov pomembno, saj lahko pomaga pri napovedovanju tveganja za okužbo s CMV ali za pojav CMV-bolezni ter pomaga pri odločitvah o zdravljenju bolnikov.

6 SKLEPI

- V sklopu validacijskega testiranja testa QuantiFERON-CMV za vpeljavo v rutinsko diagnostiko smo ugotovili, da % CV pri znotrajtestni ponovljivosti znaša 3,8 %, pri medtestni pa 11,9 % oz. pri komercialno dostopnih kontrolah 5,4 %, kar so zaželene vrednosti % CV po navodilih proizvajalca (% CV pod 10 %). Test QuantiFERON-CMV smo uspešno uvedli v rutinsko diagnostiko.
- Pri CMV-seronegativnih zdravih posameznikih smo ugotovili 100-odstotno (4/4) ujemanje med rezultati testa QuantiFERON-CMV in rezultati serološkega testiranja (vsi seronegativni posamezniki so imeli odsoten CMV-specifični odziv IFN- γ).
- Pri seropozitivnih zdravih posameznikih je pri 33 % (2/6) preiskovancev prišlo do neskladja med rezultati testa QuantiFERON-CMV in rezultati serološkega testiranja (kljub seropozitivnosti nismo zaznali CMV-specifičnega odziva IFN- γ), 67 % (4/6) seropozitivnih zdravih posameznikov pa je imelo močan CMV-specifični odziv IFN- γ .
- Na podlagi spremeljanja seropozitivnih bolnikov pred in do tri mesece po presaditvi ledvic lahko zaključimo, da se je CMV-specifični T-celični imunski odziv pri preiskovanih bolnikih ohranil tudi po presaditvi.
- Na podlagi vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficiente smo ugotovili, da med spremenljivkama (koncentracija sproščenega IFN- γ , merjena s testom QuantiFERON-CMV in koncentracija CMV DNA v plazmi) ni statistično značilne povezanosti ($\rho = -0,588$, $P = 0,1$). Opazili pa smo negativno vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficiente, kar pomeni, da imajo bolniki z večjim CMV virusnim bremenom v povprečju prisoten šibkejši CMV-specifični T-celični imunski odziv.

7 POVZETEK

Humani citomegalovirus (CMV) spada v družino herpesvirusov. Prekuženost s CMV variira glede na socialno-ekonomski status prebivalcev od 30 pa tudi do 90 %. Pri zdravih posameznikih je primarna okužba s CMV pogosto asimptomatska. Redkeje lahko povzroči mononukleozi podobno bolezen. CMV pa je še vedno najpomembnejši infekcijski patogen pri prejemnikih čvrstih organov in lahko, preko številnih posrednih in neposrednih učinkov, vpliva na delovanje presajenega organa ter povzroči visoko obolenost in umrljivost po presaditvah. Bolniki lahko razvijejo asimptomatsko CMV viremijo, CMV-sindrom ali tkivno invazivno bolezen. Pozna CMV-okužba je še vedno velik problem pri bolnikih z visokim tveganjem po zaključku protivirusne profilakse, ki je povezana z odpovedjo organa in umrljivostjo.

Napovedovanje CMV-bolezni pri bolnikih po presaditvi čvrstih organov je težavno. Hitri in natančni diagnostični testi so ključnega pomena za ustrezno diagnozo in zdravljenje CMV-bolezni po presaditvi. Novejši pristop v diagnostiki je imunski monitoring CMV-specifičnega T-celičnega odziva. Za ugotavljanje omenjenega odziva obstajajo različni testi, eden izmed teh je test QuantiFERON-CMV. Je encimskoimunski test, ki omogoča spremeljanje specifičnega CD8⁺ T-celičnega odziva proti CMV. Temelji na merjenju sproščenega IFN-γ iz CMV-specifičnih CD8⁺ T-celic po *in vitro* stimulaciji polne krvi z imunogenimi virusnimi peptidi in s tem omogoča oceno celične imunosti proti CMV.

Namen magistrske naloge je bila uvedba komercialnega testa QuantiFERON-CMV v rutinsko diagnostiko in določitev T-celičnega imunskega odziva proti CMV pri bolnikih pred in po presaditvi čvrstih organov.

V sklopu validacijskega testiranja testa QuantiFERON-CMV za vpeljavo v rutinsko diagnostiko smo preverjali znotrajtestno in medtestno ponovljivost. Dobili smo zaželene vrednosti % CV, ki jo priporoča proizvajalec (pod 10 %). Ugotavljamo, da je test QuantiFERON-CMV enostaven za izvedbo, zanesljiv in ima dobro ponovljivost, zato smo test QuantiFERON-CMV uspešno uvedli v rutinsko diagnostiko.

Pri določanju CMV-specifičnega T-celičnega imunskega odziva pri desetih zdravih posameznikih smo ugotovili, da pride pri CMV-seronegativnih zdravih posameznikih do 100-odstotnega ujemanja rezultatov testa QuantiFERON-CMV in serološkega testiranja ter do 67-odstotnega ujemanja pri CMV-seropozitivnih zdravih posameznikih. Odstotek ujemanja je v našem primeru nižji, kot ga navajajo proizvajalci testa oz. so ga določile druge raziskovalne skupine. Najverjetneje do odstopanja pride zaradi manjšega števila kontrolnih oseb, ki smo jih vključili v študijo. Odstopanja so lahko tudi posledica neodzivnosti seropozitivnih posameznikov na peptide, uporabljene v testu, ali lažno pozitivnih rezultatov serološkega testiranja. Proizvajalci poudarjajo, da test QuantiFERON-CMV ni neposreden test za ugotavljanje predhodne okužbe s CMV, zato ni nadomestilo za serološko testiranje,

vendar pa lahko zdravniku omogoči bolj podroben vpogled v stanje bolnika pred ali po presaditvi (CMV-specific immune monitoring ..., 2013).

Pri šestih seropozitivnih bolnikih, ki so prestali presaditev ledvic, smo s testom QuantiFERON-CMV spremljali odziv IFN- γ pred presaditvijo ter enkrat mesečno od enega do tri mesece po presaditvi. Vsi seropozitivni bolniki so imeli pred presaditvijo reaktivен rezultat testa QuantiFERON-CMV. Ta odziv se je pri vseh bolnikih ohranil tudi ves čas spremeljanja po presaditvi. Bolnike bi bilo smiselno spremljati tudi po končanem profilaktičnem zdravljenju. S tem bi lahko določili napovedno vrednost za kasnejši pojav viremije in CMV-bolezni, ki ju na podlagi naših rezultatov ne moremo določiti. Prav tako bi bilo za boljši vpogled v stanje bolnika smiselno poleg kinetike T-celičnega imunskega odziva spremljati tudi kinetiko virusnega bremena. Menimo, da bi bilo potrebno bolnike, pri katerih se je v prvem mesecu po presaditvi pokazal trend zmanjševanja odziva, potrebno bolj podrobno spremljati, saj se lahko trend zmanjševanja odziva IFN- γ nadaljuje in pade pod mejo za reaktivni rezultat, kar bi pomenilo višje tveganje za nastanek CMV-bolezni.

Ob sočasnem merjenju virusnega bremena in CMV-specifičnega CD8 $^{+}$ T-celičnega imunskega odziva s testom QuantiFERON-CMV smo ugotovili, da med spremenljivkama (koncentracija sproščenega IFN- γ , merjena s testom QuantiFERON-CMV in koncentracija CMV DNA v plazmi) ni statistično značilne povezanosti, bila pa je nakazana negativna povezanost. Povezavo med koncentracijo sproščenega IFN- γ in koncentracijo CMV DNA v plazmi bi bilo smiselno določiti na večjem številu vzorcev, saj bi s tem dobili bolj zanesljive rezultate. Prav tako bi bilo namesto ostankov rutinskih diagnostičnih vzorcev bolje uporabiti vzorce bolnikov, ki smo jih spremljali pred in po presaditvi, saj o bolnikih, katerih kri smo dobili za rutinsko diagnostiko, nimamo pomembnih podatkov, ki lahko vplivajo na povezavo (npr. ali bolnik prejema protivirusno zdravljenje, imunosupresivno zdravljenje, serostatus donorja in prejemnika).

8 VIRI

- Abate D., Fiscon M., Saldan A., Cofano S., Mengoli C., Sgarabotto D., d'Agostino C., Barzon L., Cusinato R., Toscano G., Feltrin G., Gambino A., Gerosa G., Palù G. 2012. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 6: 1974–1980
- Abate D., Saldan A., Mengoli C., Fiscon M., Silvestre C., Fallico L., Peracchi M., Furian L., Cusinato R., Bonfante L., Rossi B., Marchini F., Sgarabotto D., Rigotti P., Palù G. 2013. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV QuantiFERON gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 8: 2501–2507
- Audard V., Matignon M., Hemery F., Snanoudj R., Desgranges P., Anglade M.C., Kobeiter H., Durrbach A., Charpentier B., Lang P., Grimbert P. 2006. Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *American Journal of Transplantation*, 6, 1: 95–99
- Barron M.A., Gao,D., Springer K.L., Patterson J.A., Brunvand M.W., McSweeney P.A., Zeng C., Baron A.E., Weinberg A. 2009. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 12: 1777–1783
- Bernstein D.I., Reap E.A., Katen K., Watson A., Smith K., Norberg P., Olmsted R.A., Hoeper A., Morris J., Negri S., Maughan M.F., Chulay J.D. 2009. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine*, 28, 2: 484–493
- Bernstein D.I., Schleiss M.R., Berencsi K., Gonczol E., Dickey M., Khoury P., Cadoz M., Meric C., Zahradník J., Duliege A.M., Plotkin S. 2002. Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 5: 686–690
- Bestard O., Lucia M., Crespo E., Van Liempt B., Palacio D., Melilli E., Torras J., Llaudó I., Cerezo G., Taco O., Gil-Vernet S., Grinyó J.M., Cruzado J.M. 2013. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13, 7: 1793–1805
- Biron C.A., Byron K.S., Sullivan J.L. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *New England Journal of Medicine*, 320, 26: 1731–1735
- Boeckh M., Geballe A.P. 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 5: 1673–1680

- Boehme K.W., Guerrero M., Compton T. 2006. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *Journal of Immunology*, 177, 10: 7094–7102
- Bratcher D.F., Bourne N., Bravo F.J., Schleiss M.R., Slaoui M., Myers M.G., Bernstein D.I. 1995. Effect of passive antibody on congenital cytomegalovirus infection in guinea pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 172, 4: 944–950
- Brennan D.C., Legendre C., Patel D., Mange K., Wiland A., McCague K., Shihab F.S. 2011. Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in *de novo* renal transplants: pooled analysis of three clinical trials. *American Journal of Transplantation*, 11, 11: 2453–2462
- Brown M.G., Dokun A.O., Heusel J.W., Smith H.R., Beckman D.L., Blattenberger E.A., Dubbelde C.E., Stone L.R., Scalzo A.A., Yokoyama W.M. 2001. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science*, 292, 5518: 934–937
- Cantisán S., Lara R., Montejo M., Redel J., Rodríguez-Benot A., Gutiérrez-Aroca J., González-Padilla M., Bueno L., Rivero A., Solana R., Torre-Cisneros J. 2013. Pretransplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13, 3: 738–745
- Caposio P., Streblow D.N., Nelson J.A. 2013. Cytomegalovirus proteomics. V: Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention. Vol. 1. Reddehase M. J. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 98–108
- Chen S.F., Tu W.W., Sharp M.A., Tongson E.C., He X.S., Greenberg H.B., Holmes T.H., Wang Z., Kemble G., Manganello A.M., Adler S.P., Dekker C.L., Lewis D.B., Arvin A.M. 2004. Antiviral CD8 T cells in the control of primary human cytomegalovirus infection in early childhood. *Journal of Infectious Diseases*, 189, 9: 1619–1627
- Cheung A.K., Abendroth A., Cunningham A.L., Slobodman B. 2006. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood*, 108, 12: 3691–3699
- CMV-specific immune monitoring test with QuantiFERON®-CMV »How do I know which of my transplant patients are at risk of CMV disease?«. 2013. Hilden, QIAGEN: 4 str.
- Compton T., Kurt-Jones E.A., Boehme K.W., Belko J., Latz E., Golenbock D.T., Finberg R.W. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of Virology*, 77, 8: 4588–4596
- Compton T., Nepomuceno R.R., Nowlin D.M. 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, 191, 1: 387–395
- Couzi L., Pitard V., Moreau J.F., Merville P., Déchanet-Merville J. 2015. Direct and indirect effects of cytomegalovirus-induced $\gamma\delta$ T cells after kidney transplantation. *Frontiers in Immunology*, 6: 3, doi: 10.3389/fimmu.2015.00003: 13 str.

- Crapnell K., Zanjani E.D., Chaudhuri A., Ascensao J.L., St Jeor S., Maciejewski J.P. 2000. *In vitro* infection of megakaryocytes and their precursors by human cytomegalovirus. *Blood*, 95, 2: 487–493
- Crough T., Fazou C., Weiss J., Campbell S., Davenport M.P., Bell S.C., Galbraith A., McNeil K., Khanna R. 2007. Symptomatic and asymptomatic viral rerudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *Journal of Virology*, 81, 20: 11538–11542
- Crough T., Khanna R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 1: 76–98
- Dalod M., Salazar-Mather T.P., Malmgaard L., Lewis C., Asselin-Paturel C., Briere F., Trinchieri G., Biron C.A. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*, 195, 4: 517–528
- DeFilippis V.R., Alvarado D., Sali T., Rothenburg S., Früh K. 2010. Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *Journal of Virology*, 84, 1: 585–598
- Desem N., Jones S.L. 1998. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 4: 531–536
- Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 1998. *Official Journal of the European Union*, L 331: 1–37
- Dugan G.E., Hewitt E.W. 2008. Structural and functional dissection of the human cytomegalovirus immune evasion protein US6. *Journal of Virology* 82, 7: 3271–3282
- Egli A., Binet I., Binggeli S., Jäger C., Dumoulin A., Schaub S., Steiger J., Sester U., Sester M., Hirsch H.H. 2008. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *Journal of Translational Medicine*, 6: 29, doi: 10.1186/1479-5876-6-29: 12 str.
- Einsele H., Roosnek E., Rufer N., Sinzger C., Riegler S., Loffler J., Grigoleit U., Moris A., Rammensee H.G., Kanz L., Kleihauer A., Frank F., Jahn G., Hebart H. 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, 99, 11: 3916–3922
- Elkington R., Shoukry N.H., Walker S., Crough T., Fazou C., Kaur A., Walker C.M., Khanna R. 2004. Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by man CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H. *European Journal of Immunology*, 34, 11: 3216–3226
- Elkington R., Walker S., Crough T., Menzies M., Tellam J., Bharadwaj M., Khanna R. 2003. *Ex vivo* profiling of CD8+ T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *Journal of Virology*, 77, 9: 5226–5240

- Emery V.C., Hassan-Walker A.F., Burroughs A.K., Griffiths P.D. 2002. Human cytomegalovirus (HCMV) replication dynamics in HCMV-naive and -experienced immunocompromised hosts. *Journal of Infectious Diseases*, 185,12: 1723–1728
- Feire A. L., Compton T. 2013. Virus entry and activation of innate defence. V: Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention. Vol. 1. Reddehase M. J. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 125–140
- Feire A.L., Koss H., Compton T. 2004. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 43: 15470–15475
- Fernández-Ruiz M., Kumar D., Humar A. 2014. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clinical & Translational Immunology*, 3, 2: e12, doi: 10.1038/cti.2014.3: 11 str.
- Fowler K.B., Stagno S., Pass R.F., Britt W.J., Boll T.J., Alford C.A. 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *New England Journal of Medicine*, 326, 10: 663–667
- Freeman R.B. Jr. 2009. The ‘indirect’ effects of cytomegalovirus infection. *American Journal of Transplantation*, 9, 11: 2453–2458
- Fuhrmann S., Streitz M., Reinke P., Volk H.D., Kern F. 2008. T cell response to the cytomegalovirus major capsid protein (UL86) is dominated by helper cells with a large polyfunctional component and diverse epitope recognition. *Journal of Infectious Diseases*, 197, 10: 1455–1458
- Gamadia L.E., Remmerswaal E.B., Weel J.F., Bemelman F., van Lier R.A., Ten Berge I.J. 2003. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood*, 101, 7: 2686–2692
- Gamadia L.E., Rentenaar R.J., van Lier R.A., ten Berge I.J. 2004. Properties of CD4+ T cells in human cytomegalovirus infection. *Human Immunology*, 65, 5: 486–492
- Gandhi M.K., Khanna R. 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infectious Diseases*, 4, 12: 725–738
- Gerna G., Lilleri D., Chiesa A., Zelini P., Furione M., Comolli G., Pellegrini C., Sarchi E., Migotto C., Bonora M.R., Meloni F., Arbustini E. 2011. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 11, 11: 2463–2471
- Gerna G., Lilleri D., Fornara C., Comolli G., Lozza L., Campana C., Pellegrini C., Meloni F., Rampino T. 2006. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6, 10: 2356–2364
- Gerna G., Percivalle E., Lilleri D., Lozza L., Fornara C., Hahn G., Baldanti F., Revello M.G. 2005. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying

- functional UL131–128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *Journal of General Virology*, 86, 2: 275–284
- Gibson W. 2008. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 325: 187–204
- Giulieri S., Manuel O. 2011. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11, 1: 17–25
- Gratama J.W., van Esser J.W., Lamers C.H., Tournay C., Löwenberg B., Bolhuis R.L., Cornelissen J.J. 2001. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*, 98, 5: 1358–1364
- Gredmark-Russ S., Söderberg-Nauclér C. 2012. Dendritic cell biology in human cytomegalovirus infection and the clinical consequences for host immunity and pathology. *Virulence*, 3, 7: 621–634
- Griffi P.D. 2012. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. *Lancet Infectious Diseases*, 12: 790–798
- Griffiths P., Plotkin S., Mocarski E., Pass R., Schleiss M., Krause P., Bialek S. 2013. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine*, 31, 2: B197–B203
- Grosse S.D., Ross D.S., Dollard S.C. 2008. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *Journal of Clinical Virology*, 41, 2: 57–62
- Grundy J.E., McKeating J.A., Sanderson A.R., Griffiths P.D. 1988. Cytomegalovirus and beta 2 microglobulin in urine specimens. Reciprocal interference in their detection is responsible for artifactualy high levels of urinary beta 2 microglobulin in infected transplant recipients. *Transplantation*, 45, 6: 1075–1079
- Halary F., Pitard V., Dlubek D., Krzysiek R., de la Salle H., Merville P., Dromer C., Emilie D., Moreau J.F., Dechanet-Merville J. 2005. Shared reactivity of V $\{\delta\}$ 2(neg) $\{\gamma\}\{\delta\}$ T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 10: 1567–1578
- Hammond S.P., Martin S.T., Roberts K., Gabardi S., Fuhlbrigge A.L., Camp P.C., Goldberg H.J., Marty F.M., Baden L.R. 2013. Cytomegalovirus disease in lung transplantation: impact of recipient seropositivity and duration of antiviral prophylaxis. *Transplant Infectious Disease*, 15, 2: 163–170
- Hanley P.J., Bolland C.M. 2014. Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses*, 6, 6: 2242–2258
- Hanley P.J., Shaffer D.R., Cruz C.R., Ku S., Tzou B., Liu H., Demmler-Harrison G., Heslop H.E., Rooney C.M., Gottschalk S., Bolland C.M. 2011. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy*, 13, 8: 976–986

- Harvala H., Stewart C., Muller K., Burns S., Marson L., MacGilchrist A., Johannessen I. 2013. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *Journal of Medical Virology*, 85, 5: 893–898
- Hegde N.R., Dunn C., Lewinsohn D.M., Jarvis M.A., Nelson J.A., Johnson D.C. 2005. Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4+ CTL. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 8: 1109–1119
- Heineman T.C., Schleiss M., Bernstein D.I., Spaete R.R., Yan L., Duke G., Prichard M., Wang Z., Yan Q., Sharp M.A., Klein N., Arvin A.M., Kemble G. 2006. A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *Journal of Infectious Diseases*, 93, 10: 1350–1360
- Hertoghs K.M., Moerland P.D., van Stijn A., Remmerswaal E.B., Yong S.L., van de Berg P.J., van Ham S.M., Baas F., ten Berge I.J., van Lier R.A. 2010. Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 11: 4077–4090
- Hindupur S., Yeung M., Shroff P., Fritz J., Kirmani N. 2007. Vanishing bile duct syndrome in a patient with advanced AIDS. *HIV Medicine*, 8, 1: 70–72
- Hoebe K., Janssen E., Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5, 10: 971–974
- Humar A., Gregson D., Caliendo A.M., McGeer A., Malkan G., Krajden M., Corey P., Greig P., Walmsley S., Levy G., Mazzulli T. 1999. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation*, 68, 9: 1305–1311
- Humar A., Lebranchu Y., Vincenti F., Blumberg E.A., Punch J.D., Limaye A.P., Abramowicz D., Jardine A.G., Voulgari A.T., Ives J., Hauser I.A., Peeters P. 2010. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 10, 5: 1228–1237
- Humar A., Michaels M. 2006. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6, 2: 262–274
- Huygens A., Dauby N., Vermijlen D., Marchant A. 2014. Immunity to cytomegalovirus in early life. *Frontiers in Immunology*, 5:552, doi: 10.3389/fimmu.2014.00552: 11 str.
- Irmiere A., Gibson W. 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130, 1: 118–133
- Isaacson M.K., Juckem L.K., Compton T. 2008. Virus entry and innate immune activation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 325: 85–100
- Ishibashi K., Yamaguchi O., Suzutani T. 2011. Reinfection of cytomegalovirus in renal transplantation. *Fukushima Journal of Medical Science*, 57, 1: 1–10

- Jackson S.E., Mason G.M., Wills M.R. 2011. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research*, 157, 2: 151–160
- Janeway C. A. Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197–216
- Juckem L.K., Boehme K.W., Feire A.L., Compton T. 2008. Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *Journal of Immunology*, 180, 7: 4965–4977
- Kalejta R.F. 2008. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 2: 249–265
- Karrer U., Sierro S., Wagner M., Oxenius A., Hengel H., Koszinowski U.H., Phillips R.E., Klenerman P. 2003. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. *Journal of Immunology*, 170, 4: 2022–2029
- Kern F., Bunde T., Faulhaber N., Kiecker F., Khatamzas E., Rudawski I.M., Pruss A., Gratama J.W., Volkmer-Engert R., Ewert R., Reinke P., Volk H.D., Picker L.J. 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 12: 1709–1716
- Khanna R., Smith C. 2013. Cellular immune therapy for viral infections in transplant patients. *Indian Journal of Medical Research*, 138, 5: 796–807
- Kharfan-Dabaja M.A., Boeckh M., Wilck M.B., Langston A.A., Chu A.H., Wloch M.K., Guterwill D.F., Smith L.R., Rolland A.P., Kenney R.T. 2012. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infectious Diseases*, 12, 4: 290–299
- Koskinen P.K., Nieminen M.S., Krogerus L.A., Lemström K.B., Mattila S.P., Häyry P.J., Lautenschlager I.T. 1993. Cytomegalovirus infection accelerates cardiac allograft vasculopathy: correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients. *Transplant International*, 6, 6: 341–347
- Kotton C.N. 2013. CMV: prevention, diagnosis and therapy. *American Journal of Transplantation*, 13: 24–40
- Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Asberg A., Chou S., Danziger-Isakov L., Humar A. 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*, 96, 4: 333–360
- Krishnan A., Zhou W., Lacey S.F., Limaye A.P., Diamond D.J., La Rosa C. 2010. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transplant Infectious Disease*, 12, 4: 363–370
- Kumar D., Chernenko S., Moussa G., Cobos I., Manuel O., Preiksaitis J., Venkataraman S., Humar A. 2009. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 9, 5: 1214–1222

- Kwakkel-van Erp J.M., Paantjens A.W., van Kessel D.A., Grutters J.C., van den Bosch J.M., van de Graaf E.A., Otten H.G. 2011. Mannose-binding lectin deficiency linked to cytomegalovirus (CMV) reactivation and survival in lung transplantation. *Clinical and Experimental Immunology*, 165, 3: 410–416
- La Rosa C., Diamond D.J. 2012. The immune response to human CMV. *Future Virology*, 7, 3: 279–293
- Lilleri D., Fornara C., Revello M.G., Gerna G. 2008. Human cytomegalovirus-specific memory CD8+ and CD4+ T cell differentiation after primary infection. *Journal of Infectious Diseases*, 198, 4: 536–543
- Lilleri D., Zelini P., Fornara C., Comolli G., Gerna G. 2007. Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 7, 8: 1997–2005
- Limaye A.P., Boeckh M. 2010. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Reviews in Medical Virology*, 20, 6: 372–379
- Lisboa L.F., Kumar D., Wilson L.E., Humar A. 2012. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation*, 93, 2: 195–200
- Ljungman P., Griffiths P., Paya C. 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 8: 1094–1097
- Loewendorf A., Benedict C.A. 2010. Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *Journal of Internal Medicine*, 267, 5: 483–501
- Luan F.L. 2013. Six-month low-dose valganciclovir prophylaxis in cytomegalovirus D+/R-kidney transplant patients receiving thymoglobulin induction. *Transplantation Proceedings*, 45, 1: 175–177
- Lučin P., Mahmutfendić H., Blagojević Zagorac G., Ilić Tomaš M. 2015. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cellular & Molecular Immunology*, 12, 2: 154–169
- Manuel O. 2013. Clinical experience with immune monitoring for cytomegalovirus in solid-organ transplant recipients. *Current Infectious Disease Reports*, 15, 6: 491–496
- Manuel O., Husain S., Kumar D., Zayas C., Mawhorter S., Levi M.E., Kalpoe J., Lisboa L., Ely L., Kaul D.R., Schwartz B.S., Morris M.I., Ison M.G., Yen-Lieberman B., Sebastian A., Assi M., Humar A. 2013. 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*, 56, 6: 817–824
- McGeoch D.J., Rixon F.J., Davison A.J. 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 117, 1: 90–104

- Mendelson M., Monard S., Sissons P., Sinclair J. 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *Journal of General Virology*, 77, 12: 3099–3102
- Mendez-Eirin E., Paniagua-Martín M.J., Marzoa-Rivas R., Barge-Caballero E., Grille-Cancela Z., Cañizares A., Naya-Leira C., Gargallo-Fernández P., Castro-Beiras A., Crespo-Leiro M. 2012. Cumulative incidence of cytomegalovirus infection and disease after heart transplantation in the last decade: effect of preemptive therapy. *Transplantation Proceedings*, 44, 9: 2660–2662
- Mettenleiter T.C., Klupp B.G., Granzow H. 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 4: 423–429
- Mitrović M., Arapović J., Traven L., Krmpotić A., Jonjić S. 2012. Innate immunity regulates adaptive immune response: lessons learned from studying the interplay between NK and CD8+ T cells during MCMV infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 201, 4: 487–495
- Mocarski E. S. Jr., Shank T., Pass R. F. 2007. Cytomegaloviruses V: Fields virology. Vol. 2. Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E. (eds.). 5th ed. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins: 2701–2772
- Motta V.N., Martins S.L. 2008. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41: 5–11
- Murphy E., Shenk T.E. 2008. Human cytomegalovirus genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 325: 1–19
- Mutter W., Reddehase M.J., Busch F.W., Bühring H.J., Koszinowski U.H. 1988. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *Journal of Experimental Medicine*, 167, 5: 1645–1658
- Ohlin M., Söderberg-Nauclér C. 2015. Human antibody technology and the development of antibodies against cytomegalovirus. *Molecular Immunology*, 67: 153–170
- Pass R.F. 1985. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *Journal of Infectious Diseases*, 152: 243–248
- Pawelec G., Derhovanessian E., Larbi A., Strindhall J., Wikby A. 2009. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Reviews in Medical Virology*, 19, 1: 47–56
- Pedersen M., Seetharam A. 2014. Infections after orthotopic liver transplantation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4, 4: 347–360
- Peggs K.S., Verfuerth S., Pizzey A., Khan N., Guiver M., Moss P.A., Mackinnon S. 2003. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*, 362, 9393: 1375–1377
- Pitard V., Roumanes D., Lafarge X., Couzi L., Garrigue I., Lafon M.E., Merville P., Moreau J.F., Déchanet-Merville J. 2008. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-

- gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, 12, 4: 1317–1324
- Plotkin S.A., Higgins R., Kurtz J.B., Morris P.J., Campbell D.A. Jr, Shope T.C., Spector S.A., Dankner W.M. 1994. Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation*, 58, 11: 1176–1178
- Polić B., Hengel H., Krmpotić A., Trgovcich J., Pavić I., Luccaroni P., Jonjić S., Koszinowski U.H. 1998. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 6: 1047–1054
- Pravilnik o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 47: 4766–4799
- QuantiFERON®-CMV (QF-CMV) product training. 2013. Hilden, QIAGEN: 37 str.
- QuantiFERON®-CMV Package Insert. 2012. Hilden, QIAGEN: 32 str. (Navodilo za uporabo)
- Quinnan G.V. Jr, Kirmani N., Rook A.H., Manischewitz J.F., Jackson L., Moreschi G., Santos G.W., Saral R., Burns W.H. 1982. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, 307, 1: 7–13
- Radha R., Jordan S., Puliyanda D., Bunnapradist S., Petrosyan A., Amet N., Toyoda M. 2005. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 5, 1: 110–117
- Ramanan P., Razonable R.R. 2013. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. *Infection & Chemotherapy*, 45, 3: 260–271
- Rapp M., Messerle M., Bühler B., Tannheimer M., Keil G.M., Koszinowski U.H. 1992. Identification of the murine cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *Journal of Virology*, 66, 7: 4399–4406
- Razonable R.R., Humar A. 2013. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13: 93–106
- Reddehase M.J., Jonjić S., Weiland F., Mutter W., Koszinowski U.H. 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *Journal of Virology*, 62, 3: 1061–1065
- Reeves M., Sinclair J. 2013. Epigenetic regulation of human cytomegalovirus gene expression: impact on latency and reactivation. V: *Cytomegaloviruses from molecular pathogenesis to intervention*. Vol. 1. Reddehase M. J. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 330–346
- Reeves M., Sinclair J. 2008. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 325: 297–313

- Rentenaar R.J., Gamadia L.E., van DerHoek N., van Diepen F.N., Boom R., Weel J.F., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. 2000. Development of virus-specific CD4⁺ T cells during primary cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 4: 541–548
- Revilleza J.M., Wang R., Mans J., Hong M., Natarajan K., Margulies D.H. 2011. How the virus outsmarts the host: function and structure of cytomegalovirus MHC-I-like molecules in the evasion of natural killer cell surveillance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 724607, doi:10.1155/2011/724607: 12 str.
- Ritter M., Schmidt T., Dirks J., Hennes P., Juhasz-Böss I., Solomayer E.F., Gortner L., Gärtnner B., Rohrer T., Sester U., Sester M. 2013. Cytomegalovirus-specific T cells are detectable in early childhood and allow assignment of the infection status in children with passive maternal antibodies. *European Journal of Immunology*, 43, 4: 1099–1108
- Roman A., Manito N., Campistol J.M., Cuervas-Mons V., Almenar L., Arias M., Casafont F., del Castillo D., Crespo-Leiro M.G., Delgado J.F., Herrero J.I., Jara P., Morales J.M., Navarro M., Oppenheimer F., Prieto M., Pulpón L.A., Rimola A., Serón D., Ussetti P. 2014. The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation Reviews*, 28, 2: 84–91
- Ross S.A., Novak Z., Pati S., Boppana S.B. 2011. Diagnosis of cytomegalovirus infections. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 11, 5: 466–474
- Rossini G., Cerboni C., Santoni A., Landini M.P., Landolfo S., Gatti D., Gribaudo G., Varani S. 2012. Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators of Inflammation*, 2012, 607276: doi: 10.1155/2012/607276: 17 str.
- Rowshani A.T., Bemelman F.J., van Leeuwen E.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. 2005. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 79, 4: 381–386
- Ryckman B.J., Jarvis M.A., Drummond D.D., Nelson J.A., Johnson D.C. 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes *UL128* to *UL150* and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *Journal of Virology*, 80, 2: 710–722
- Scalzo A.A., Yokoyama W.M. 2008. Cmv1 and natural killer cell responses to murine cytomegalovirus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 321: 101–122
- Schleiss M. R. 2013. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of infection and protection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: 501801, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/501801>: 14 str.
- Schleiss M.R. 2009. Cytomegalovirus vaccines: at last, a major step forward. *Herpes*, 15, 3: 44–45
- Schleiss M.R., Bourne N., Stroup G., Bravo F.J., Jensen N.J., Bernstein D.I. 2004. Protection against congenital cytomegalovirus infection and disease in guinea pigs, conferred by a

- purified recombinant glycoprotein B vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 189, 8: 1374–1381
- Schottstedt V., Blümel J., Burger R., Drosten C., Gröner A., Gürtler L., Heiden M., Hildebrandt M., Jansen B., Montag-Lessing T., Offergeld R., Pauli G., Seitz R., Schlenkrich U., Strobel J., Willkommen H., von König C.H. 2010. Human cytomegalovirus (HCMV) – revised. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37: 365–375
- Seckert C.K., Griessl M., Büttner J.K., Scheller S., Simon C.O., Kropp K.A., Renzaho A., Kühnapfel B., Grzimek N.K., Reddehase M.J. 2012. Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 201, 4: 551–566
- Sester M., Sester U., Gärtner B., Heine G., Girndt M., Mueller-Lantzsch N., Meyerhans A., Köhler H. 2001. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*, 71, 9: 1287–1294
- Sester M., Sester U., Gärtner B.C., Girndt M., Meyerhans A., Köhler H. 2002. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 10: 2577–2584
- Sester U., Gärtner B.C., Wilkens H., Schwaab B., Wössner R., Kindermann I., Girndt M., Meyerhans A., Mueller-Lantzsch N., Schäfers H.J., Sybrecht G.W., Köhler H., Sester M. 2005. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *American Journal of Transplantation*, 5, 6: 1483–1489
- Sester U., Presser D., Dirks J., Gärtner B.C., Köhler H., Sester M. 2008. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *American Journal of Transplantation*, 8, 7: 1486–1497
- Shellam G.R., Allan J.E., Papadimitriou J.M., Bancroft G.J. 1981. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 8: 5104–5108
- Shlobin O.A., West E.E., Lechtzin N., Miller S.M., Borja M., Orens J.B., Dropulic L.K., McDyer J.F. 2006. Persistent cytomegalovirus-specific memory responses in the lung allograft and blood following primary infection in lung transplant recipients. *Journal of Immunology*, 176, 4: 2625–2634
- Sinclair J. 2008. Human cytomegalovirus: latency and reactivation in the myeloid lineage. *Journal of Clinical Virology*, 41: 180–185
- Sinclair J., Sissons P. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 87: 1763–1779
- Sinzger C., Digel M., Jahn G. 2008. Cytomegalovirus cell tropism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 325: 63–83

- Sinzger C., Kahl M., Laib K., Klingel K., Rieger P., Plachter B., Jahn G. 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *The Journal of General Virology*, 81, 12: 3021–3035
- Sissons J.G., Carmichael A.J. 2002. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *Journal of Infection*, 44: 78–83
- Sissons J.G., Bain M., Wills M.R. 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of Infection*, 44, 2: 73–77
- Söderberg-Nauclér C. 2006. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *Journal of Internal Medicine*, 259, 3: 219–246
- Sohn Y.M., Oh M.K., Balcarek K.B., Cloud G.A., Pass R.F. 1991. Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents. *Journal of Infectious Diseases*, 163: 460–463
- Staras S.A., Flanders W.D., Dollard S.C., Pass R.F., McGowan J.E., Cannon M.J. 2008. Influence of sexual activity on cytomegalovirus seroprevalence in the United States, 1988 – 1994. *Sexually Transmitted Diseases*, 35: 472–479
- Streblow D.N., Orloff S.L., Nelson J.A. 2007. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Current Opinion in Immunology*, 19, 5: 577–582
- Sylwester A.W., Mitchell B.L., Edgar J.B., Taormina C., Pelte C., Ruchti F., Sleath P.R., Grabstein K.H., Hosken N.A., Kern F., Nelson J.A., Picker L.J. 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 5: 673–685
- Takeuchi O., Akira S. 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology*, 1, 4: 325–635
- Tan B.H. 2014. Cytomegalovirus treatment. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 6, 3: 256–270
- Taylor-Wiedeman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.H. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*, 72, 9: 2059–2064
- Terrazzini N., Kern F. 2014. Cell-mediated immunity to human CMV infection: a brief overview. *F1000 Prime Reports*, 6: 28, doi: 10.12703/P6-28: 9 str.
- Tolkoff-Rubin N.E., Rubin R.H. 1994. The interaction of immunosuppression with infection in the organ transplant recipient. *Transplantation Proceedings*, 26, 5: 16–19
- Tomtishen J.P. 3rd. 2012. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*, 9: 22, doi: 10.1186/1743-422X-9-22: 9 str.
- Tormo N., Solano C., Benet I., Clari M.A., Nieto J., de la Camara R., Lopez J., Lopez-Aldeguer N., Hernandez-Boluda J.C., Remigia M.J., Garcia-Noblejas A., Gimeno C., Navarro D. 2010a. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia

- and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 45, 3: 543–549
- Tormo N., Solano C., Benet I., Nieto J., de la Cámara R., Garcia-Noblejas A., Clari M.A., Chilet M., López J., Hernández-Boluda J.C., Remigia M.J., Navarro D. 2010b. Kinetics of cytomegalovirus (CMV) pp65 and IE-1-specific IFNgamma CD8+ and CD4+ T cells during episodes of viral DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients: potential implications for the management of active CMV infection. *Journal of Medical Virology*, 82, 7: 1208–1215
- Tselis A. 2013. Epstein–Barr virus and cytomegalovirus infections. V: *Viral infections of the human nervous system*. Jackson A.C. (ed.). Basel, Springer: 23–46
- Tu W., Chen S., Sharp M., Dekker C., Manganello A.M., Tongson E.C., Maecker H.T., Holmes T.H., Wang Z., Kemble G., Adler S., Arvin A., Lewis D.B. 2004. Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *Journal of Immunology*, 172, 5: 3260–3267
- van de Berg P.J., van Stijn A., Ten Berge I.J., van Lier R.A. 2008. A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *Journal of Clinical Virology*, 41, 3: 213–217
- van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Heemskerk M.H., ten Berge I.J., van Lier R.A. 2006. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood*, 108, 9: 3121–3127
- van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. 2004. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of Immunology*, 173, 3: 1834–1841
- Vandevenne P., Sadzot-Delvaux C., Piette J. 2010. Innate immune response and viral interference strategies developed by human herpesviruses. *Biochemical Pharmacology*, 80, 12: 1955–1972
- Varnum S.M., Streblow D.N., Monroe M.E., Smith P., Auberry K.J., Pasa-Tolic L., Wang D., Camp D.G. 2nd, Rodland K., Wiley S., Britt W., Shenk T., Smith R.D., Nelson J.A. 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of Virology*, 78, 20: 10960–10966
- Venema H., van den Berg A.P., van Zanten C., van Son W.J., van der Giessen M., The T.H. 1994. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *Journal of Medical Virology*, 42, 2: 188–192
- Walker A., Petheram S.J., Ballard L., Murph J.R., Demmler G.J., Bale J.F. Jr. 2001. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 6: 2219–2226
- Walker S., Fazou C., Crough T., Holdsworth R., Kiely P., Veale M., Bell S., Gailbraith A., McNeil K., Jones S., Khanna R. 2007. *Ex vivo* monitoring of human

- cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transplant Infectious Disease*, 9, 2: 165–170
- Walter E.A., Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas E.D., Riddell S.R. 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *New England Journal of Medicine*, 333, 16: 1038–1044
- Wang D., Shenk T. 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 50: 18153–8158
- Weekes M.P., Wills M.R., Sissons J.G., Carmichael A.J. 2004. Long-term stable expanded human CD4+ T cell clones specific for human cytomegalovirus are distributed in both CD45RAhigh and CD45ROhigh populations. *Journal of Immunology*, 173, 9: 5843–5851
- Weseslindtner L., Kerschner H., Steinacher D., Nachbagauer R., Kundi M., Jaksch P., Simon B., Hatos-Agyi L., Scheid A., Klepetko W., Puchhammer-Stöckl E. 2012. Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T cell responses in lung transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 12, 8: 2172–2180
- Westall G.P., Mifsud N.A., Kotsimbos T. 2008. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *American Journal of Transplantation*, 8, 8: 1749–1754
- Wirtz N., Schader S.I., Holtappels R., Simon C.O., Lemmermann N.A., Reddehase M.J., Podlech J. 2008. Polyclonal cytomegalovirus-specific antibodies not only prevent virus dissemination from the portal of entry but also inhibit focal virus spread within target tissues. *Medical Microbiology and Immunology*, 97, 2: 151–158
- Wistuba-Hamprecht K., Frasca D., Blomberg B., Pawelec G., Derhovanessian E. 2013. Age-associated alterations in $\gamma\delta$ T-cells are present predominantly in individuals infected with Cytomegalovirus. *Immunity & Ageing*, 10, 1: 26, doi: 10.1186/1742-4933-10-26: 7 str.
- Yeager A.S., Grumet F.C., Hafleigh E.B., Arvin A.M., Bradley J.S., Prober C.G. 1981. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *Journal of Pediatrics*, 98, 2: 281–228

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu za strokovno svetovanje in spodbudo pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi dr. Sanji Stopinšek za vse spodbudne besede in za vso podporo, prijaznost, pomoč, čas in trud, ki mi ga je namenila pri nastajanju magistrskega dela.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Mojci Narat za natančen in hiter pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem Laboratorija za imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani za pomoč, koristne nasvete in razumevanje. Posebej bi se zahvalila Maji Mrgole za strokovno uvajanje v laboratorijsko delo.

Največja zahvala gre mami Metki, sestrama Jelki in Tinki ter bratu Aljažu, ki ste mi omogočili študij, me spodbujali pri vsaki odločitvi in me usmerjali na pravo življenjsko pot.

Hvala Mihu za vso podporo in ljubezen.

Hvala vsem sošolcem, ki so mi polepšali in razvedrili vsak dan študija. Hvala tudi prijateljem za koristne nasvete in podporo.