



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. Tratamientos de base inmunológica

Sara Cantisán Bohórquez^{a,*} y David Navarro Ortega^{b,c}

^aInstituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) - Hospital Reina Sofía - Universidad de Córdoba, Córdoba, España

^bServicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, España

^cDepartamento de Microbiología, Facultad de Medicina de Valencia, Valencia España

RESUMEN

Palabras clave:

Citomegalovirus
Inmunidad celular
Cuantificación de linfocitos T
Infección activa por CMV
Transferencia adoptiva de linfocitos T
Vacunación

La respuesta inmunitaria T frente al citomegalovirus (CMV) es esencial en el control de la replicación viral. La cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ funcionales frente a ciertas especificidades antigénicas del CMV mediante citometría de flujo, ELISPOT o el método comercializado QuantiFERON®-CMV permite estimar con relativa precisión el riesgo de infección activa y enfermedad por el CMV en el marco del trasplante de órgano sólido (TOS). La monitorización virológica e inmunológica conjunta de la infección por el CMV podría permitir individualizar y optimizar los tratamientos antivirales en el TOS, aunque no hay experiencia clínica contrastada al respecto. La transferencia adoptiva de células T autólogas específicas frente al CMV, previa selección con multímeros HLA-péptidos o después de ser activadas y expandidas ex vivo, puede ser una alternativa terapéutica eficaz en el manejo de la infección activa o enfermedad orgánica por el CMV refractario al tratamiento antiviral. Se han desarrollado varias vacunas frente al CMV que se han mostrado seguras e inmunogénicas en ensayos preclínicos o clínicos fase I, pero hasta el momento ninguna ha sido evaluada en ensayos clínicos fase III, por lo que no están licenciadas para uso clínico.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Immunological monitoring strategies for cytomegalovirus infection. Immune-based therapies

ABSTRACT

Keywords:

Cytomegalovirus
Cellular immunity
T-lymphocyte quantification
Active CMV infection
Adoptive T-lymphocyte transfer
Vaccination

T-cell response to cytomegalovirus (CMV) is essential in the control of viral replication. Quantification of functional CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes against certain CMV-antigen specificities through flow cytometry, ELISPOT or the QuantiFERON®-CMV kit allows fairly accurate estimation of the risk of active infection and CMV disease in solid organ transplantation (SOT). Combined virological and immunological monitoring of CMV infection could allow antiviral treatments to be individually tailored and optimized in SOT, although clinical experience is currently lacking. The adoptive transfer of CMV-specific T cells before selection with multimer HLA peptides or after activation and expansion ex vivo could be an effective therapeutic alternative in the management of active infection or organic CMV disease refractory to antiviral therapy. Several CMV vaccines have been developed, which have been shown to be safe and immunogenic in preclinical and Phase I clinical trials. However, to date, none of these vaccines has been evaluated in Phase III clinical trials and consequently none has been approved for clinical use.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sacanti@hotmail.com (S. Cantisán Bohórquez).

Control inmunológico de la infección por el CMV

El control de la infección por el citomegalovirus (CMV) es un proceso complejo en el que intervienen, de forma coordinada y conjunta, la inmunidad innata y adaptativa. Hay múltiples evidencias que prueban que la respuesta inmunitaria T es esencial en el control de la infección primaria y recurrente por el CMV. La expansión de linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺/CD4⁺ específicos efectores (citotóxicos y/o productos de citocinas) resulta determinante en la resolución de la replicación viral^{1,2}. El espectro de proteínas virales reconocidas por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ es extraordinariamente amplio (alrededor de un 70% del proteoma de CMV), aunque pp65 e IE-1 son inmunodominantes en la mayoría de individuos^{1,3,4}. Entre un 1 y un 40% de los linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en sujetos inmunocompetentes con infección crónica por CMV reconoce específicamente antígenos del virus^{1,2}. Esta fracción de linfocitos T CMV-específicos muestra características de senescencia, por lo que se ha relacionado la infección crónica por CMV con el envejecimiento prematuro del sistema inmunitario^{5,6}. Los linfocitos T $\gamma\delta$ (V δ 2^{neg}) también parecen mediar respuestas protectoras, particularmente en las mucosas. La expansión de esta subpoblación, capaz de lisar fibroblastos infectados por el CMV ex vivo sin restricción haplotípica HLA, se asocia al control de la infección activa por el CMV en trasplantados renales⁷⁻⁹.

La inmunidad innata desempeña un papel igualmente relevante en el control de la infección por CMV^{10,11}, como lo sugieren los siguientes hallazgos: a) la presencia del polimorfismo homocigoto Arg753Gln en el gen que codifica *Toll-like receptor 2* (TLR-2) se asocia a un mayor riesgo de infección activa y enfermedad orgánica en el trasplante hepático¹²; b) la incidencia de infección activa de novo o recurrente es mayor en los receptores de trasplante renal portadores del haplotipo *killing immunoglobulin-like receptors B* (KIR B), que integra genes KIR preferentemente activadores, que en los portadores del haplotipo KIR A, que incluye genes inhibidores^{13,14}; c) en el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), la expansión de células NK CD16⁺/CD94-NKG2C⁺ productoras de IFN γ permite el control de la infección por CMVH en ausencia de tratamiento antiviral y de una respuesta adaptativa detectable¹⁵.

La respuesta humoral mediada por anticuerpos neutralizantes frente a gB y gH protege parcialmente frente a la adquisición del virus

y limita la gravedad de la infección primaria^{10,11,16-19}. No hay unanimidad, sin embargo, en cuanto a su papel en el control de la reactivación viral en trasplantados^{20,21}. La administración de gammaglobulina hiperinmune frente al CMV reduce la incidencia del síndrome CMV en el trasplante renal²² e incrementa la tasa de supervivencia en el trasplante hepático²³. La hipogammaglobulinemia grave (< 400 mg/dl) se asocia a un mayor riesgo de infección por CMV en el trasplante de corazón y pulmón²⁴, pero no en el de hígado²⁵. La determinación del seroestatus CMV al final de la profilaxis en pacientes D+R- no mostraba utilidad para predecir el desarrollo de la enfermedad, pero sí cuando se hacía a los 6 meses postrasplante^{26,27}. La mayoría de estos estudios, sin embargo, no cuantificaban las respuestas B frente a las proteínas virales UL128, UL130 y UL131, ausentes en la cepa de referencia AD169 y necesarias para la penetración del virus en las células^{28,29}. El papel de los anticuerpos neutralizantes en el control de la infección por el CMV debe ser, por lo tanto, cuidadosamente revaluado.

Métodos de cuantificación y análisis de linfocitos T CMV-específicos

Se dispone de varios métodos de laboratorio para la cuantificación y tipificación funcional ex vivo de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ CMV-específicos (tabla 1). Los métodos que emplean múltiplos HLA-péptido permiten determinar el número de linfocitos T que reconocen un determinado epítipo viral, pero no informan de su funcionalidad. Contrariamente, los métodos basados en la cuantificación de poblaciones T que expresan determinadas proteínas de superficie (CD3/CD4/CD8/CD27/CD28/CCR5/CD62L/CD69/CD107a-b/PD-1) y/o intracelulares (IL-2, IFN γ o TNF α , MIP1- β) en respuesta a un estímulo viral permiten la cuantificación de linfocitos T antígeno-específicos funcionales. La técnica ELISPOT no distingue entre T CD4⁺ y T CD8⁺ y sólo puede evaluar un único marcador funcional (IFN γ o TNF α , habitualmente). El QuantiFERON[®]-CMV (Cellestis Ltd., Melbourne, Australia) permite estimar la respuesta mediada por linfocitos T CD8⁺ frente a epítopos inmunogénicos de CMVH (contenidos en IE-1, IE-2, pp65, pp50, pp150, gB, US2, US6, UL16 y UL18) presentados por un amplio espectro de especificidades HLA, a través de la cuantificación de IFN γ . Ninguno de estos ensayos, a excepción del QuantiFERON[®]-CMV recientemente comercializado, está estandarizado³⁰⁻³³.

Tabla 1

Métodos inmunológicos para el estudio de la respuesta mediada por los linfocitos T frente al citomegalovirus (CMV)

Características	Múltiplos HLA-péptido	ICS	ELISPOT	QuantiFERON [®] -CMV
Muestra/ volumen	CMNSP/0,5-1 ml	SC o CMNSP/1-2 ml	CMNSP/10 ml	SC/3-5 ml
Duración	1-2 h	8-10 h	24-48 h	24-48 h
Antígeno	Péptido individual (pp65, IE-1, pp50)	Péptido individual/librería de péptidos/lisado/proteínas recombinantes/células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Péptido individual/librería de péptidos/lisado/proteínas recombinantes/células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Combinación de péptidos pp65/gB/IE-1/pp50
Conocimiento previo del epítipo	Sí	No	No	No
Distingue T CD4 ⁺ de T CD8 ⁺	Sí	Sí	No	Péptidos diseñados para estimular a CD8 ⁺
Análisis funcional	No (sólo si se combina con ICS)	Sí	Sí	Sí
Análisis fenotípico	Sí	Sí	No	No
Conocimiento previo de HLA necesario	Sí	No	No	No
Comentarios: - Ventajas (V) - Limitaciones (L)	(V) Resultados en 1-2 h (L) Requiere citómetro de flujo (L) No estandarizado	(V) Caracterización cuali y cuantitativa (L) Requiere citómetro de flujo (L) No estandarizado	(V) Permite congelación de muestras y su envío a laboratorio de referencia (L) Requiere purificar CMNSP (L) No estandarizado	(V) Aprobado en Europa (V) Fácil de hacer y mínima manipulación (L) Sensible a linfopenia (L) No cubre a pacientes con alelos raros de HLA clase I

CMNSP: células mononucleares de sangre periférica; ICS: marcaje intracelular; SC: sangre completa.

Tabla 2
 Marcadores inmunológicos de protección frente al citomegalovirus humano (CMVH) en el trasplante de órgano sólido (TOS)

Trasplante/serología-CMV*	Método	Población T	Antígeno	Protección frente a	Referencia
Riñón/-	ICS	CD4 ⁺ IFN γ	Lisado viral	Síndrome CMVH	Gamadia et al, 2003
Pulmón/+	ICS	CD4 ⁺ IFN γ	Lisado viral	Infección activa	Sester et al, 2005
Corazón/pulmón/+	ICS	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos solapados IE-1	Enfermedad orgánica	Bunde et al, 2005
Corazón/pulmón/ riñón/+	ICS	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ IFN γ	CD infectadas CMV-VR1814	Infección activa	Gerna, et al, 2006; Lilleri et al, 2007
Hígado/+ o -	ICS	CD4 ⁺ IFN γ y/o IL-2	Lisado	Infección activa	Nebbia et al, 2008
Hígado/ + o -	ICS	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos solapados pp65	Infección activa	Nebbia et al, 2008
Riñón/+ o -	ICS/multímero	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos solapados pp65	Infección activa	Mattes et al, 2008
			Péptido NLV		
Pulmón/+	QF-CMV	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos (pp65/IE-1/gB/pp50)	Infección activa	Westall et al, 2008
Pulmón/riñón/hígado/páncreas/+ o -	QF- CMV	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos (pp65/IE-1/gB/pp50)	Enfermedad orgánica	Kumar et al, 2009
Riñón/corazón/ pulmón/+ o -	ELISPOT	CD8 ⁺ IFN γ	Péptidos solapados pp65	Síndrome CMV/ enfermedad orgánica	Crough et al, 2007
Riñón/+	ICS/multímero	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ PD-1	Lisado viral/péptido pp65	Infección activa	Sester et al, 2008
Hígado/+	Multímero	CD8 ⁺ PD-1	Péptido pp65	Síndrome CMVH/ enfermedad orgánica	La Rosa et al, 2008

CD: células dendríticas; ICS: marcaje intracelular; IFN γ : interferón gamma; IL-2: interleucina 2; PD-1: *programmed death-1*; QF-CMV: QuantiFERON®-CMV.
 *Serología del receptor frente a CMV.

Estrategias de monitorización inmunológica de linfocitos T

La monitorización conjunta virológica e inmunológica de la infección por el CMV podría permitir individualizar y optimizar los tratamientos antivirales en trasplantes de órgano sólido (TOS)³⁴. En TPH se dispone de marcadores inmunológicos que correlacionan aceptablemente con el riesgo de desarrollo de infección activa y enfermedad orgánica por el CMV³⁵⁻³⁷. En TOS se ha documentado exhaustivamente la existencia de una relación inversa entre los valores periféricos de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ citotóxicos o productores de IFN γ , TNF α y/o IL-2 frente a CMV y el riesgo de desarrollo de enfermedad y/o infección activa^{31-33,38-48} (tabla 2). La cuantificación de los linfocitos T CD8⁺/CD4⁺ multifuncionales (CD107a+IFN γ /TNF α +IL-2) permite predecir con mayor precisión el riesgo de desarrollo de infección activa o enfermedad orgánica que el simple recuento de linfocitos T CD8⁺ CMV-específicos (multímeros) o de poblaciones monofuncionales (productoras de IFN γ , TNF α o IL-2). La caracterización fenotípica de los linfocitos T CMV-específicos también ofrece información sobre el riesgo de aparición de infección activa y enfermedad por CMV. En este sentido, la expresión del marcador *programmed death-1* (PD-1) en la superficie de los linfocitos T CMV-específicos se ha vinculado con un riesgo elevado de desarrollo de infección activa, síndrome CMV y enfermedad orgánica^{49,50}. Además, ciertos polimorfismos de PD-1 se han asociado con el desarrollo de infección por CMV en trasplantados de riñón⁵¹, y el análisis combinado de la expresión de PD-1 junto con la producción de citoquinas ha mostrado su utilidad para identificar a pacientes trasplantados de hígado con riesgo de enfermedad tardía por CMV⁴⁹.

Tratamientos de base inmunológica

Inmunoterapia adoptiva

La transferencia adoptiva de células T CMV-específicas se ha demostrado eficaz en la prevención de la ADNemia viral y en la resolución de episodios de infección activa y enfermedad orgánica refractarios a los tratamientos antivirales convencionales⁵²⁻⁵⁷. Estas células pueden ser transferidas directamente del donante (o del propio re-

ceptor en el caso de TOS) previa selección con multímeros HLA-péptidos, o después de ser activadas y expandidas ex vivo. En este sentido hay múltiples protocolos de expansión que emplean como antígeno estimulante péptidos individuales, librerías solapadas de péptidos, células dendríticas pulsadas con péptidos o proteínas virales recombinantes⁵⁴. La eficacia de la transferencia adoptiva de linfocitos T no sólo depende de la funcionalidad de las células infundidas, sino también de su estado de diferenciación, capacidad proliferativa y longevidad. En el TPH se ha demostrado que cuanto menos diferenciadas son las células transferidas más perviven y protegen frente al CMV en el receptor⁵⁸. En el TOS existe poca experiencia al respecto⁵⁹.

Vacunación profiláctica

Durante las últimas décadas se han desarrollado varias vacunas frente al CMV que emplean antígenos de distinta naturaleza (virus vivos atenuados, virus recombinantes, proteínas/péptidos inmunogénicos o ADN viral), y que se han mostrado seguras e inmunogénicas en ensayos preclínicos o clínicos fase I, pero hasta el momento ninguna ha sido evaluada en ensayos clínicos fase III, por lo que no están licenciadas para uso clínico^{11,60}. La vacuna de virus vivo atenuado Towne minimiza la gravedad de la enfermedad por el CMV en pacientes CMV-seronegativos receptores de trasplante renal de donante CMV-seropositivo, pero no previene la infección primaria^{61,62}. Los prototipos de vacunas que emplean como inmunógenos virus recombinantes (canarypox gB/pp65 o adenovirus gB/epítapos T de pp65, IE-1, pp150, gB,IE-2,pp50, gH, ADNsa) o vectores replicativos (alphavirus gB/proteína de fusión pp65-IE-1) generan respuestas B y T de magnitud variable⁶³⁻⁷⁰. No hay datos acerca de su eficacia en la prevención de la infección por el CMV. La vacuna subunitaria recombinante gB, administrada con el adyuvante MF59, genera una respuesta de anticuerpos neutralizantes comparable a la que se observa tras la infección natural. En un ensayo reciente se ha demostrado que protege frente a la infección primaria en un 50% de los sujetos vacunados^{66,67}. Recientemente se ha desarrollado una vacuna ADN bivalente (VCL-CB01) que contiene dos plásmidos que codifican para gB y pp65, respectivamente. Su inocuidad e inmunogenicidad en sujetos sanos CMV-seropositivos y CMV-seronegativos han sido acredi-

tadas en un ensayo clínico fase I. La fase II, llevada a cabo en donantes y receptores de TPH CMV-seropositivos, se ha completado y, a falta de los resultados finales, el análisis provisional de éstos indica que la vacuna incrementa la respuesta de células T^{71,72}.

Conflicto de intereses

S. Cantisán ha recibido una beca de investigación de Roche Farma. D. Navarro declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol.* 2004;65:456-64.
- Vescovini R, Biasini C, Fagnoni FF, Telera AR, Zanlari L, Pedrazzoni M, et al. Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol.* 2007;179:4283-91.
- Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, et al. Ex vivo profiling of CD8+ T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol.* 2003;77:5226-40.
- Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005;202:673-85.
- Cantisán S, Torre-Cisneros J, Lara R, Rodríguez-Benot A, Santos F, Gutiérrez-Aroca J, et al. Age-dependent association between low frequency of CD27/CD28 expression on pp65 CD8+ T cells and cytomegalovirus replication after transplantation. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1429-38.
- Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:440-5.
- Couzi L, Lafarge X, Pitard V, Neau-Cransac M, Dromer C, Billes MA, et al. Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients. *Transpl Int.* 2011;24:e40-2.
- Dechanet J, Merville P, Berge F, Bone-Mane G, Taupin JL, Michel P, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis.* 1999;179:1-8.
- Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis.* 2001;184:533-41.
- Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:76-98.
- Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:725-38.
- Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1315-20.
- Hadaya K, De Rham C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Berney T, et al. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:2674-83.
- Stern M, Elsasser H, Honger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2008;8:1312-7.
- Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, Van den Burg M, Van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood.* 2008;112:914-5.
- Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* 1993;197:143-58.
- Navarro JF, Mora-Fernández C. Antibody level after hepatitis B vaccination. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:2207.
- Pereira L, Lennette E, Paz P, Navarro D. Humoral immunity to glycoprotein B in primary and recurrent cytomegalovirus infection. *Progress in Cytomegalovirus Research.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 145-8.
- Alberola J, Tamarit A, Igual R, Navarro D. Early neutralizing and glycoprotein B (gB)-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with distinct clinical presentations of primary HCMV infection. *J Clin Virol.* 2000;16:113-22.
- Di Martino D, Terranova MP, Valetto A, Scarso L, Faraci M, Lanino E, et al. An unusual pattern of B-cell immunological reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: A possible correlation with CMV reactivation? *Pediatr Transplant.* 2008;13:1050-2.
- Muñoz I, Gutiérrez A, Gimeno C, Farga A, Alberola J, Solano C, et al. Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein B (gB)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from HCMV active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant. *J Med Virol.* 2001;65:77-84.
- Snydman DR, Werner BG, Heinze-Lacey B, Berardi VP, Tilney NL, Kirkman RL, et al. Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1987;317:1049-54.
- Falagas ME, Snydman DR, Ruthazer R, Griffith J, Werner BG, Freeman R, et al. Cytomegalovirus immune globulin (CMVIG) prophylaxis is associated with increased survival after orthotopic liver transplantation. The Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin Transplant.* 1997;11:432-7.
- Goldfarb NS, Avery RK, Goormastic M, Mehta AC, Schilz R, Smedira N, et al. Hypogammaglobulinemia in lung transplant recipients. *Transplantation.* 2001;71:242-6.
- Doron S, Ruthazer R, Werner BG, Rabson A, Snydman DR. Hypogammaglobulinemia in liver transplant recipients: incidence, timing, risk factors, and outcomes. *Transplantation.* 2006;81:697-703.
- Humar A, Paya C, Pescovitz MD, Domínguez E, Washburn K, Blumberg E, et al. Clinical utility of cytomegalovirus viral load testing for predicting CMV disease in D+/R- solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004;4:644-9.
- Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5:1065-70.
- Gerna G, Percivalle E, Lillieri D, Lozza L, Fornara C, Hahn G, et al. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol.* 2005;86:275-84.
- Gerna G, Sarasini A, Patrone M, Percivalle E, Fiorina L, Campanini G, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol.* 2008;89:853-65.
- Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11:17-25.
- Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9:1214-22.
- Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis.* 2007;9:165-70.
- Westall GP, Mifsud NA, Kotsimbos T. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant.* 2008;8:1749-54.
- Torre-Cisneros J. Toward the individualization of cytomegalovirus control after solid-organ transplantation: the importance of the "individual pathogenic balance". *Clin Infect Dis.* 2009;49:1167-8.
- Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, De la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon-gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica.* 2008;93:1434-6.
- Solano C, Navarro D. Clinical virology of cytomegalovirus infection following hematopoietic transplantation. *Future Virology.* 2010;5:1-14.
- Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, De la Cámara R, et al. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN-gamma CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2009;45:543-9.
- Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Hadedank D, Hetzer R, Cherepnev G, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2005;201:1031-6.
- Crough T, Fazou C, Weiss J, Campbell S, Davenport MP, Bell SC, et al. Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *J Virol.* 2007;81:11538-42.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, Van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood.* 2003;101:2686-92.
- Gerna G, Lillieri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:2356-64.
- Lillieri D, Zelini P, Fornara C, Comolli G, Gerna G. Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2007;7:1997-2005.
- Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, Hainsworth EG, Sweny P, Nebbia G, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:990-9.
- Nebbia G, Mattes FM, Smith C, Hainsworth E, Kopycinski J, Burroughs A, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:2590-9.
- Radha R, Jordan S, Puliyaanda D, Bunnaradist S, Petrosyan A, Amet N, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5:110-7.
- Sester M, Sester U, Gartner BC, Girndt M, Meyerhans A, Kohler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2577-84.
- Sester U, Gartner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wossner R, Kindermann I, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005;5:1483-9.
- Shlobin OA, West EE, Lechtzin N, Miller SM, Borja M, Orens JB, et al. Persistent cytomegalovirus-specific memory responses in the lung allograft and blood following primary infection in lung transplant recipients. *J Immunol.* 2006;176:2625-34.
- Krishnan A, Zhou W, Lacey SF, Limaye AP, Diamond DJ, La Rosa C. Programmed death-1 receptor and interleukin-10 in liver transplant recipients at high risk for late cytomegalovirus disease. *Transpl Infect Dis.* 2010;12:363-70.

50. La Rosa C, Krishnan A, Longmate J, Martínez J, Manchanda P, Lacey SF, et al. Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 2008;197:25-33.
51. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al-Najjar A, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet.* 2009;47:54-8.
52. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002;99:3916-22.
53. Dong L, Gao ZY, Chang LJ, Liang Y, Tan XY, Liu JH, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus/Epstein-Barr virus-specific immune effector cells for therapeutic and preventive/preemptive treatment of pediatric allogeneic cell transplant recipients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32:e31-7.
54. Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU. CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40:71-5.
55. Micklethwaite KP, Clancy L, Sandher U, Hansen AM, Blyth E, Antonenas V, et al. Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2008;112:3974-81.
56. Horn B, Bao L, Dunham K, Stamer M, Adler S, Cowan M, et al. Infusion of cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes from a sero-negative donor can facilitate resolution of infection and immune reconstitution. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:65-7.
57. Hill GR, Tey SK, Beagley L, Crough T, Morton JA, Clouston AD, et al. Successful immunotherapy of HCMV disease using virus-specific T cells expanded from an allogeneic stem cell transplant recipient. *Am J Transplant.* 2009;10:173-9.
58. Scheinberg P, Melenhorst JJ, Brenchley JM, Hill BJ, Hensel NF, Chattopadhyay PK, et al. The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood.* 2009;114:5071-80.
59. Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmuck M, Rohmhold A, Hammer MH, et al. Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transplant.* 2009;9:1679-84.
60. Schleiss MR. Prospects for development and potential impact of a vaccine against congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *J Pediatr.* 2007;151:564-70.
61. Adler SP. Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1995;99:105-9.
62. Plotkin SA, Smiley ML, Friedman HM, Starr SE, Fleisher GR, Wlodaver C, et al. Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet.* 1984;1:528-30.
63. Adler SP, Plotkin SA, Gonczol E, Cadoz M, Meric C, Wang JB, et al. A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis.* 1999;180:843-6.
64. Berencsi K, Gyulai Z, Gonczol E, Pincus S, Cox WL, Michelson S, et al. A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *J Infect Dis.* 2001;183:1171-9.
65. Bernstein DI, Schleiss MR, Berencsi K, Gonczol E, Dickey M, Khoury P, et al. 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. *J Infect Dis.* 2002;185:686-90.
66. Pass RF, Duliege AM, Boppana S, Sekulovich R, Percell S, Britt W, et al. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis.* 1999;180:970-5.
67. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2009;360:1191-9.
68. Reap EA, Morris J, Dryga SA, Maughan M, Talarico T, Esch RE, et al. Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon particle vaccine for cytomegalovirus. *Vaccine.* 2007;25:7441-9.
69. Schleiss MR, Lacayo JC, Belkaid Y, McGregor A, Stroup G, Rayner J, et al. Preconceptual administration of an alphavirus replicon UL83 (pp65 homolog) vaccine induces humoral and cellular immunity and improves pregnancy outcome in the guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 2007;195:789-98.
70. Zhong J, Rist M, Cooper L, Smith C, Khanna R. Induction of pluripotent protective immunity following immunisation with a chimeric vaccine against human cytomegalovirus. *PLoS One.* 2008;3:e3256.
71. Schleiss MR. VCL-CB01, an injectable bivalent plasmid DNA vaccine for potential protection against CMV disease and infection. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11:572-8.
72. Wloch MK, Smith LR, Boutsabouloy S, Reyes L, Han C, Kehler J, et al. Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects. *J Infect Dis.* 2008;197:1634-42.