

**DIJAGNOSTIČKI PRISTUP, PRAĆENJE I LIJEČENJE
CITOMEGALOVIRUSNE (CMV) INFEKCIJE NAKON ALOGENE
TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA**

**DIAGNOSTIC APPROACH AND THERAPY FOR CYTOMEGALOVIRUS (CMV) INFECTION
FOLLOWING ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

NATAŠA BEADER, SMILJA KALENIĆ, BORIS LABAR*

Deskriptori: Citomegalovirusne infekcije – dijagnoza, farmakoterapija, prevencija; Protuvirusni lijekovi – terapijska primjena; Transplantacija krvotvornih matičnih stanica; Transplantacija, homologna

Sažetak. Unatoč napretku u dijagnostici i sprječavanju CMV-bolesti u posljednjih nekoliko desetljeća, CMV-infekcija i dalje je velik dijagnostički i terapijski problem u primatelja alogenih krvotvornih matičnih stanica (aloKMS). Pored znatnog pobola koji se očituje u izravnim učincima CMV-infekcije (hepatitis, gastrointestinalna bolest, pneumonija, retinitis), CMV neizravnim djelovanjem povećava osjetljivost prema oportunističkim infekcijama te povećava rizik od odbacivanja presatka i smrtnosti pridružene presadbi. Također, zbog mijelosupresije, nefrotoksičnosti ili pojave CMV-rezistentnih sojeva javljaju se ograničenja u upotrebi antivirusnih tvari koje se rabe za kontrolu CMV-infekcije. Cilj je ovoga rada prikazati probleme vezane uz CMV-infekciju koji se javljaju u primatelja aloKMS s posebnim naglaskom na dijagnostiku i liječenje odnosno sprječavanje nastanka CMV-bolesti.

Descriptors: Cytomegalovirus infections – diagnosis, drug therapy, prevention and control; Antiviral agents – therapeutic use; Hematopoietic stem cell transplantation; Transplantation, homologous

Summary. In spite of improvements in diagnostics and prevention of CMV disease in recent decades, CMV infection still remains major concern in terms of diagnosis and therapy in recipients of allogeneic stem cells. Besides considerable morbidity with direct effects of CMV infection (hepatitis, gastrointestinal disease, pneumonia, retinitis), there are also indirect effects such as increased susceptibility to opportunistic infections and an increased risk of graft rejection and transplant-related mortality. Also, myelosuppression, nephrotoxicity and emergence of drug-resistant CMV strains may limit the use of antiviral agents for the control of CMV infection. The aim of this paper is to show the problems associated with CMV infection in recipients of allogeneic stem cells with special emphasis on diagnostic procedures and treatment or prophylaxis of CMV disease.

Liječ Vjesn 2011;133:389–396

Uspjeh liječenja bolesnika sa stečenim i nasljednim bolestima krvotvornog sustava presadbom alogenih krvotvornih matičnih stanica (aloKMS), iz periferne krvi, pupkovine ili koštane srži ovisi o stupnju tkivne snošljivosti između davatelja i primatelja presatka. U većine oboljelih, u nedostatku srodnog identičnog davatelja, liječenje se provodi presadbom matičnih stanica od nesrodnog identičnog ili srodnog haploidentičnog davatelja uz imunosupresijske lijekove da bi se spriječila reakcija presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-host-disease* – GvHD) te istodobno smanjila mogućnost reakcije odbacivanja presatka. AloKMS je praćena ovim komplikacijama: GvHD-om, reakcijom odbacivanja presatka te produljenom imunosupresijom i kasnim oporavkom imunskog sustava zbog čega je povećana osjetljivost za infekcije.^{1–3} U svih tih bolesnika postoji visoki rizik od nastanka teških virusnih infekcija, posebice citomegalovirusne (CMV) infekcije. Najčešći uzrok smrtnosti tijekom liječenja presadbom aloKMS, osim osnovne bolesti, upravo je CMV-infekcija, a potom slijede GvHD, bakterijske oportunističke infekcije te superinfekcije gljivama i parazitima. Prema dostupnim podatcima, u približno 70–80% odraslih primatelja aloKMS prisutna je reaktivacija CMV-a tijekom posttransplantacijskog razdoblja.⁴ Značajka CMV-

-infekcije poslije presadbe jest reaktivacija virusa iz faze latencije (ili reinfekcija egzogenim virusom) i povećano umnažanje virusa u različitim organima koji obiluju limfnim tkivom nakon čega slijedi širenje krvnom strujom do udaljenih organa. CMV-viremija služi kao biljeg aktivnoga virusnog umnažanja u ciljnim organima ili diseminirane bolesti.⁴ CMV-infekcija može se klinički očitovati kao izravno oštećenje tkiva u obliku CMV-sindroma s povišenom tjelesnom temperaturom i općom slabošću, a potom i terminalne CMV-bolesti koja je posljedica viremije te mnogostrukog širenja virusa u različite organske sustave. Također, CMV može neizravno imunomodulacijskim djelovanjem pridonijeti razvoju reakcije odbacivanja presatka te nevirusnim superinfekcijama. Najčešće se klinički očituje kao upalni

* **Zavod za mikrobiologiju, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, KBC Zagreb** (dr. sc. Nataša Bader, dr. med.; prof. dr. sc. Smilja Kalenić, dr. med.), **Zavod za hematologiju, Klinika za unutrašnje bolesti Medicinskog fakulteta u Zagrebu, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Boris Labar, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. N. Bader, Zavod za mikrobiologiju, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb
Primljeno 28. rujna 2010., prihvaćeno 1. ožujka 2011.

proces u plućima i probavnom traktu, a potom upala mrežnice i središnjega živčanog sustava te supresija koštane srži. Zbog toga dijagnostika, sprječavanje i liječenje CMV-infekcije zauzima važno mjesto tijekom liječenja presadbom aloKMS. Prema nekim istraživanjima, zahvaljujući profilaksi i preemtivnom liječenju, incidencija CMV-bolesti smanjila se s 20–30% na manje od 5%,⁵ ali ne i ukupna stopa mortaliteta među primateljima aloKMS.^{6–8}

CMV-infekcije – kliničke osobitosti

Klinička sumnja na CMV-infekciju postavlja se temeljem najčešćih simptoma i znakova: povišene tjelesne temperature, slabosti, letargije, mialgije, artralgijske, leukopenije, trombocitopenije, kašlja i povećane aktivnosti jetrenih enzima. No nijedan od navedenih simptoma i znakova nije patognomoničan za CMV-infekciju, posebice u primatelja aloKMS u kojih se ovi simptomi i znakovi mogu javiti zbog mnoštva razloga vezanih uz osnovnu bolest i/ili komplikacije njezina liječenja. Zbog toga je presudna presudba hematologa za pravodobno uzimanje i slanje uzoraka u dijagnostički laboratorij te početak liječenja jer CMV-infekcija može značajno oštetiti ili odgoditi udomljenje presatka aloKMS, povećati incidenciju teškog GvHD-a te zbog komplikacija kao što su bakterijske i gljivične infekcije uzrokovati smrt. Antivirusni lijekovi, pak, zbog svoje toksičnosti (foskarnet i cidofovir), mijelosupresijskog učinka (ganciklovir i valganciklovir) i moguće pojave rezistentnih sojeva (ganciklovir) mogu utjecati na tijek i duljinu preživljenja primatelja aloKMS. Prema tomu potrebno je odabrati odgovarajući dijagnostičko-terapijski program s ciljem što djelotvornijeg liječenja odnosno sprječavanja CMV-infekcije.⁸ Iako postoje različiti programi, u pravilu se rutinska dijagnostika provodi jednom na tjedan neovisno o kliničkoj sumnji na CMV-infekciju.⁹

Razdoblje dugotrajne neutropenije kojim prolaze primatelji aloKMS posljedica je imunosupresijskih lijekova. Liječenje ganciklovirom također pridonosi razvoju neutropenije.¹⁰ Tako se povećava rizik od sekundarnih gljivičnih i bakterijskih infekcija i pojave kasne CMV-infekcije zbog odgođenog oporavka imunskog sustava.^{10–12} Zbog toga je važno pratiti CMV-infekciju i pravodobno započeti liječenje, posebice u bolesnika visokog rizika (presadak od HLA-nepodudarnog ili nesrodnog davatelja ili akutni GvHD).

CMV-infekcije – dijagnostički pristup

Uspjeh liječenja ovisi o osjetljivosti metode koja se rabi za detekciju i praćenje CMV-infekcije, kao i o načinu uzimanja i dostave u laboratorij kliničkog uzorka koji se testira.⁸ Dijagnostički algoritam obuhvaća serološko testiranje, CMV pp65-antigenemiju (detekciju CMV-fosfoproteina⁶⁵ u leukocitima periferne krvi) i CMV PCR-testove (detekciju CMV DNA u leukocitima, plazmi, serumu ili punoj krvi).

Serološko testiranje

Serološkim testiranjem primatelja i davatelja prije presadbe mogu se procijeniti učestalost i opseg moguće CMV-infekcije/bolesti nakon presadbe. Infekcija i pridružene joj komplikacije češće se javljaju u primatelja koji su prije presadbe bili seropozitivni zbog reaktivacije latentnoga virusnoga genoma. Ako je davatelj seropozitivan, u primatelja reinfekcija može nastati iz samog presatka. Transfuzija seropozitivnih pripravaka krvi također može potaknuti reinfekciju.²² Primarne infekcije koje se javljaju u CMV-seronegativnih primatelja puno su rjeđe, ali često imaju tešku

kliničku sliku i lošu prognozu. Smatra se da bi prevenciju primarne CMV-infekcije u CMV-seronegativnih primatelja aloKMS trebalo temeljiti na izboru CMV-seronegativnog davatelja, što često nije moguće. Ako su davatelj i primatelj seronegativni, za liječenje treba rabiti krvne pripravke siromašne leukocitima (<5x10⁶ ostatnih leukocita). U CMV-seropozitivnih primatelja aloKMS mjere prevencije CMV-bolesti obuhvaćaju kemoprofilaksu i preemtivno liječenje.¹⁴ Neke studije pokazuju da presadak srodnoga CMV-seropozitivnog davatelja štiti CMV-seropozitivnog primatelja od virusne reaktivacije.¹⁵ Naime, imunost se prenosi CD8+ T-limfocitima. U nesrodnog primatelja, za razliku od srodnih davatelja i primatelja, oporavak traje puno duže, a samim time i nedostatak CD8+ i CD4+ T-limfocita. Osim toga, velika je vjerojatnost da su srodni davatelj i primatelj bili izloženi istom soju CMV-a, a imunost na CMV specifična je za soj. Stoga davateljevi specifični T-limfociti CD8+ koji su preneseni u presadku mogu prepoznati primateljev CMV s visokim afinitetom i u tom smislu djelovati

Tablica 1. Prednosti i slabosti serološke dijagnostike prije i nakon aloKMS

Table 1. Advantages and deficiencies of serodignosis before and after allo SCT

Prednosti seroloških metoda Advantages of serodiagnostic methods	Slabosti seroloških metoda Deficiencies of serodignosis methods
U određivanju CMV-imunosnog statusa davatelja i primatelja /Determination of CMV immune status of donor and recipient	Većina je odraslih osoba seropozitivna (IgG) ^{28,29} /Most adults are seropositive (IgG)
Određivanje rizika od CMV-reaktivacije nakon presadbe i razvoja CMV-bolesti /Determination of the risk of CMV reactivation after transplantation and development of CMV disease	Prisutnost perzistirajućih IgM-protutijela u zdravih osoba /Presence of persistent IgM antibodies in healthy individuals
Probiranje krvi i krvnih pripravaka kako bi se spriječila transfuzija CMV-seropozitivnog pripravka u CMV-seronegativnog primatelja /Screening of blood and blood derivatives to prevent transfusion of CMV seropositive blood to seronegative recipient	Specifična IgM-protutijela prisutna su tijekom primarne infekcije i nakon reaktivacije latentne virusne infekcije /Specific IgM antibodies are present during primary infection and after reactivation of the latent viral infection
Otkrivanje bolesnika s primarnom CMV-infekcijom tijekom poslijetransplantacijskog razdoblja /Detection of patients with primary CMV infection during posttransplantational period	Vremenski razmak varira od nastanka primarne infekcije do stvaranja IgM-protutijela /Interval varies between the beginning of primary infection and production of IgM antibodies
Dokaz serokonverzije u asimptomatskih bolesnika na kraju antivirusne profilakse ³⁴ /Evidence of seroconversion in asymptomatic patients at the end of antiviral prophylaxis	Nakon aloKMS IgM-protutijela mogu se naći u odsutnosti invazivne bolesti ili nema stvaranja IgM-protutijela (zbog imunosupresije) ³⁰ /After allo SCT IgM antibodies can be found in the absence of invasive disease or there is no production of antibodies (immunosuppression)
	EBV-infekcija može stvarati heterotipni IgM-odgovor (lažno pozitivan rezultat), zbog poliklonske stimulacije B-limfocita ^{16,31–33} /EBV infection can produce heterotipical IgM respons (false positive result) because of polyclonal stimulation of B lymphocytes
	Serološkim metodama nije moguće jasno razgraničiti infekciju od invazivne bolesti /With serodiagnostic methods the clear division between infection and invasive disease is not possible

zaštitno. Humoralni imunski odgovor na CMV-infekciju očituje se stvaranjem specifičnih protutijela na CMV. Unutar 2–4 tjedna nakon primarne infekcije stvaraju se specifična IgM-protutijela i uskoro nakon toga specifična IgG-protutijela¹⁶ koja se mogu otkriti različitim serološkim testovima. IgM-protutijela uopćeno se javljaju u početnoj fazi infekcije i pokazatelj su aktivne infekcije. Za razliku od serokonverzije, koja je pouzdan znak primarne CMV-infekcije, a dokazuje se testiranjem parnih uzoraka seruma, detekcija IgM-protutijela često je nesigurna i dijagnostički je problem.^{17–21} U tom slučaju test određivanja aviditeta (AV) IgG-protutijela olakšava tumačenje i razlikovanje primarnih od ponovljenih (reaktiviranih) infekcija i/ili egzogenih reinfekcija (neprimarnih infekcija) drugim sojem CMV-a.^{22–24} Prva reakcija imunskog sustava na infekciju jest stvaranje protutijela niskog AV-a, a s trajanjem infekcije (tjedni, mjeseci) stvaraju se IgG-protutijela koja su stereoimunokemijski bolje prilagođena antigenu i posjeduju visoki AV. Prema tomu, dok se u serumu ne mogu dokazati protutijela visokog AV-a, infekcija se još uvijek nalazi u ranoj (akutnoj) fazi bolesti. S trajanjem infekcije postepeno nestaju IgG-protutijela niskog AV-a, a raste razina protutijela visokog AV-a, odnosno protutijela visoke podudarnosti i sposobnosti vezanja za antigen. Sukladno tomu AV se može definirati kao stupanj reverzibilnosti veze odnosno mjera čvrstoće veze između protutijela određenog afiniteta i antigena.^{25–27} Metodom određivanja AV-a specifičnih IgG-protutijela može se točno razlikovati primarna od neprimarne infekcije prema ovom algoritmu:

- pozitivna IgM-protutijela i pozitivna IgG-protutijela niskog AV-a upućuju na primarnu CMV-infekciju;
- pozitivna IgM-protutijela i pozitivna IgG-protutijela visokog AV-a upućuju na neprimarnu (ponovljenu, rekurentnu) CMV-infekciju;
- u bolesnika bez specifičnih IgM-protutijela, a ovisno o AV-a IgG-protutijela na antigene CMV-a može se razlikovati primarna od neprimarne CMV-infekcije.

Prednosti i slabosti serološke dijagnostike u bolesnika liječenih aloKMS prikazuje tablica 1.

Test antigenemije CMV pp65

Test su izvorno osmislili van der Bij i sur. 1988. godine.³⁵ To je kvantitativna, specifična, osjetljiva i brza metoda za detekciju CMV pp65-antigena u leukocitima bolesnika. Izvodi se izravnim imunobojeanjem polimorfonuklearnih leukocita (PMNL) iz uzorka periferne krvi s monoklonskim protutijelima usmjerenim na CMV-fosfoprotein donjeg matriksa pp65 (UL83) od 65 kDa.³⁵ Antigen pp65 čini oko 5% ukupnih proteina zrelog virusa. Sinteza CMV pp65-antigena u inficiranim stanicama započinje u ranoj fazi razvoja virusnih antigena (samo nekoliko sati od ulaska virusa u stanicu), a u kasnoj fazi nalazi se u velikim količinama. To je dominantni virusni protein koji se nalazi u cirkulirajućim leukocitima, najviše u granulocitima, a rijetko u monocitima periferne krvi za vrijeme aktivne CMV-infekcije.¹⁸ Zato se test antigenemije CMV pp65 rabi za dokaz aktivne infekcije^{36–38} i ujedno pokazuje kada je potrebno započeti preemtivno liječenje. Tipična aktivna CMV-infekcija s virusnom replikacijom obilježena je produkcijom CMV pp65-antigena koja započinje prije pojave simptoma bolesti i može trajati nekoliko tjedana. Kasnije tijekom infekcije s pojavom kliničkih znakova bolesti počinju se stvarati specifična protutijela koja katkad mogu potpuno izostati zbog primjene imunosupresijskog liječenja. Prema tomu dokaz antigenemije ovim

testom rabi se u ranoj dijagnostici CMV-infekcije, obično prije pojave kliničkih znakova infekcije ili početkom pojave simptoma infekcije u primatelja aloKMS i oboljelih od AIDS-a. Zahvaljujući tomu, u rizičnih bolesnika može se započeti ciljano preventivno liječenje hiperimunim globulinom, iako autori nekih novijih studija ovaj pristup smatraju upitnim.³⁹ U simptomatskih infekcija udio antigen-pozitivnih leukocita može dosegnuti 1%, iako se najčešće nalazi u rasponu od 1 do 100 na 10⁵ leukocita. U simptomatskih i asimptomatskih bolesnika specifičnost i osjetljivost testa iznose oko 90%. Nakon presadbe ovaj se test može iskoristiti za praćenje razvoja infekcije i temelj je preemtivnom liječenju.⁴⁰ Kvantitativna evaluacija testa može poslužiti praćenju razvoja infekcije, predviđanju i dijagnostici CMV-bolesti (npr., veći stupanj antigenemije korelira s aktivnom klinički izraženom bolešću) te primjeni liječenja.⁴¹ Rezultati testa dostupni su 4–6 sati nakon uzimanja uzorka. Za izvedbu ovog testa potreban je odgovarajući broj leukocita u uzorku. Iskustva nekih istraživača⁷ pokazuju da tijekom izvedbe ovoga testa samo 1/3 do 1/2 ukupnog broja leukocita ostane pričvršćena za podlogu. Razlog tomu može biti osobita farmakoterapijska priprema bolesnika za presadbu, što ima za posljedicu promjenu adhezijskih svojstava leukocita. To može biti posebice važno u vrijeme izrazite neutropenije, kada u uzorku krvi nalazimo nedovoljan broj leukocita za izvedbu testa. Najveća je učestalost nalaza nedovoljnog broja leukocita u uzorku krvi za izvedbu testa antigenemije CMV pp65 u prva 2–3 tjedna nakon presadbe kada je učestalost ponovljenih infekcija najmanja, a moguće su primarne infekcije. U tom slučaju test određivanja aviditeta CMV IgG-protutijela može biti koristan pokazatelj primarne CMV-infekcije, posebice u nedostatku specifičnih CMV IgM-protutijela. Iako mnogi centri rabe ovaj test kao pomoć u određivanju i primjeni preemtivnog liječenja gancikloviro, još uvijek ne postoji potpuno ujednačen program o primijenjenoj dozi i vremenu trajanja preemtivnog liječenja.⁴² Kvantitativni rezultat izražava se kao broj stanica inficiranih CMV-om/broj pregledanih stanica.⁷ Smatra se da je ≥ 1 ili 2 pozitivne stanice dovoljno za početak preemtivne terapije.⁴³ Međutim postoje razlike u određivanju praga broja inficiranih PMNL. Smatra se da ovaj test ima i nekoliko ograničenja: uzorak je potrebno obraditi odmah nakon uzimanja; tehnički aspekti obrade uzorka nisu standardizirani među različitim laboratorijima, što ograničava primjenu i reproducibilnost rezultata; postupak je zahtjevan; procjena pripravka podliježe subjektivnosti – ovisi o iskustvu pojedinca; u neutropeničnih bolesnika u uzorku krvi nema uvijek dovoljno leukocita, primjerice kada je apsolutni broj neutrofila $0,2 \times 10^9/l$;^{44–47} monoklonska protutijela koja se rabe u testu spravljena su prema standardnom soju te stoga neće otkriti sojeve u kojih je došlo do manjih promjena u slijedu aminokiselina u ciljnoj regiji epitopa; negativan test antigenemije ne znači apsolutno isključenje CMV-infekcije ili bolesti; neki bolesnici mogu biti istodobno negativni na antigenemiju i pozitivni na viremiju i imati CMV-bolest.

Test lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction – PCR)

PCR je među molekularnim metodama najvažnije otkriće u laboratorijskoj dijagnostici posttransplantacijske CMV-infekcije zbog široke primjenjivosti u detekciji virusnih nukleinskih kiselina (DNK ili RNK). Donedavno su mnogi laboratoriji rabili ovu metodu kao *in house* CMV

PCR, koja je upravo zbog toga imala mnoge manjkavosti jer je bila izrazito zahtjevna u samom postupku i potrebnom vremenom za izvedbu. Osim toga postojale su velike razlike u tehnici koje su rabili različiti centri kao što su podrijetlo uzorka (leukociti ili plazma) ili vrsta postupka (kvalitativno ili kvantitativno), tako da dobiveni rezultati nisu bili reproducibilni među različitim laboratorijima. CMV se *in vivo* brzo umnaža, a u bolesnika visokog rizika vrijeme koje je potrebno od prve detekcije virusa do klinički izražene bolesti može biti <7 dana.⁴⁸ Zbog toga svaki kvantitativni test za detekciju DNK da bi bio koristan, mora biti visoko osjetljiv uz najmanju moguću varijabilnost te zahtijevati što kraće vrijeme potrebno za izvedbu testa (<24 h). U tom smislu mnoge su metode ili nedovoljno specifične ili slabo osjetljive ili dugotrajne.⁴⁹ Zato danas postoje automatizirani PCR-aparati koji mogu u realnom vremenu kvantificirati virusni genom (real time PCR).^{40,50-53} Ovaj je test visoko osjetljiv, specifičan i brz (4 h). PCR-metoda rabi se za praćenje viremije i određivanje početka i trajanja preemptivnog liječenja nakon presadbe aloKMS. CMV DNK može se detektirati u leukocitima, plazmi, serumu ili punoj krvi. Tijekom latentne CMV-infekcije CMV DNK nalazi se u jezgri zaraženih leukocita. Liza ovih leukocita izvor je CMV DNK-emije u serumu. U vrijeme aktivne infekcije, osim leukocita, virus u serum otpuštaju i druge stanice, primjerice endotelne. Tada je CMV DNK većinom smještena u citoplazmi cirkulirajućih leukocita, što je posljedica preuzimanja viriona s drugih mjesta virusnog umnažanja. Povišena razina DNK-emije u leukocitima i serumu koja se dobije kvantitativnom PCR-metodom smatra se pokazateljem klinički izražene bolesti. Razine DNK u leukocitima i serumu u korelaciji su s time da je razina u leukocitima nešto viša. DNK-emija u leukocitima obično se detektira u CMV IgG-pozitivnih osoba bez drugih znakova aktivne infekcije, dok se pozitivan PCR-nalaz u serumu povezuje s kliničkim znakovima bolesti i smatra se pokazateljem aktivnog virusnog umnažanja. Prema tomu, PCR koji se izvodi u uzorku seruma ili plazme ima prednost pred drugim metodama detekcije CMV-a u razdoblju aplazije, prva 3 tjedna od presadbe kada je broj leukocita izrazito malen. Isto tako, u tom je razdoblju rizik od reaktivacije CMV-a izrazito nizak. Osim toga, za detekciju virusa iz uzorka plazme nije potreban dugotrajni postupak odvajanja stanica. U zdravih osoba učestalost detekcije DNK u plazmi je niska, suprotno od nalaza u osoba umrlih poslije presadbe ili zaraženih HIV-om, što upućuje na visoku specifičnost ovog testa.^{53,54} Neke ranije studije pokazale su da je razina CMV DNK u plazmi i serumu značajno niža od one koja se nalazi u leukocitima.^{8,49,55-59} Boom i sur.⁵⁶ našli su da je CMV DNK u plazmi i serumu visoko fragmentirana i kao takva nije cirkulirajući infektivni virus koji nosi intaktan DNK-genom. Veličina fragmenata je <2000 bp. Moguće je da se DNK u serumu nalazi u nezaštićenom obliku (nije obavijena kapsidom) i osjetljiva je na djelovanje enzima DNK-za zaduženih za njezinu razgradnju za vrijeme ili nakon procesa koagulacije, a kojih u serumu ima u velikom broju. U tom smislu povećanje broja CMV DNK-kopija ne znači nužno i povećanje virusne produkcije, nego može biti aktivni imunosni odgovor koji dovodi do razgradnje CMV DNK. To bi mogao biti jedan od razloga na kojemu se temelje razlike među istraživanjima koja se provode unutar sličnih skupina bolesnika, a koje predlažu smjernice izražene brojem CMV DNK za početak liječenja i predviđanje pojave bolesti. Boivin i sur.⁶⁰ ovom su metodom testi-

rali uzorke plazme i leukocita i usporedili ih s testom antigenemije CMV pp65 u primatelja aloKMS. Našli su statistički značajnu razliku u broju kopija virusne DNK u korist uzorka leukocita u odnosu prema plazmi.⁶¹ Osim toga ova je metoda pokazala približno jednaku osjetljivost (62,5%) kao i test antigenemije CMV pp65 (67,5%).^{47,62} Sukladno tomu oba testa mogu se podjednako rabiti za sigurno praćenje viremije nakon presadbe aloKMS.⁶³⁻⁶⁵ Mnogi autori smatraju da se ova metoda ne može rabiti kao pokazatelj simptomatske bolesti jer ne korelira s aktivnom CMV-infekcijom zbog toga što može amplificirati signal nekompletnoga virusnoga genoma ili latentnog virusa.^{17,66-73} Općenito se smatra da CMV PCR-nalaz korelira s nalazom testa antigenemije CMV pp65 ili čak da kadkad, iako je kliničko značenje nejasno, test antigenemije CMV pp65 može biti negativan u CMV PCR-pozitivnih uzoraka uz klinički izraženu CMV-bolest.⁷⁴ Ovo se može potkrijepiti činjenicom da su monoklonska protutijela koja se rabe u testu spravljeni za standardni soj virusa i stoga ne detektiraju sve antigene varijante, tj. nove sojeve. Npr. monoklonska protutijela ne detektiraju one sojeve CMV-a u kojih su se dogodile manje promjene slijeda aminokiselina u ciljnoj epitopskoj regiji. Štoviše, neki autori smatraju da je u PCR-pozitivnih uzoraka, ako nema visoke razine kliničke sumnje na postojanje CMV-bolesti, potrebno načiniti potvrdni test antigenemije CMV pp65.⁷⁵

Testovi na uzorcima leukocita koji rabe automatizaciju objektivniji su u procjeni infekcije (COBAS AMPLICOR CMV MONITOR /CACM/).⁶⁰ No za izvedbu ovog testa potreban je veći broj leukocita (8×10^5) u uzorku krvi, za razliku od testa antigenemije CMV pp65 za čiju izvedbu treba manji broj leukocita (2×10^5), što je osobito važno u razdoblju neutropenije. Usto, test antigenemije CMV pp65 prikladniji je za laboratorije s manjim brojem uzoraka. Suprotno, prednost LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Ind.) pred CACM-testom jest što može obraditi puno veći broj uzoraka pa je prikladan za laboratorije velikog kapaciteta.^{76,77}

Digene Hybrid Capture CMV DNA test (Digene Corporation, Silver Spring, Md.) metoda je hibridizacije nukleinskih kiselina čije su osjetljivost i specifičnost slične onima u testu antigenemije CMV pp65.⁷⁸ Međutim zbog kvalitativne prirode testa, kliničko značenje pozitivnog rezultata često je nejasno jer ovaj test može detektirati vrlo malen broj supkliničkog umnažanja CMV-a koji se neće razviti u klinički izraženu bolest. NucliSens assay (Organon Teknica Diagnostics, Boxtel, Nizozemska) test je koji detektira CMV-kasnu glasničku (mRNA) pp67 koja je pokazatelj aktivnog umnažanja virusa, dakle aktivne virusne infekcije; pokazao se manje osjetljivim od DNK-amplifikacijskih testova i testa antigenemije CMV pp65. Manja osjetljivost ovog testa može imati za posljedicu nemogućnost detekcije ili predviđanja CMV-bolesti.⁷⁹⁻⁸¹ Suprotno, NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) test koji detektira CMV IE1 mRNK ima veću osjetljivost i zbog toga otkriva i nesimptomatske ili supkliničke infekcije i u tom smislu nije za kliničku upotrebu¹⁸

Antivirusno liječenje

Nakon presadbe aloKMS pristup profilaksi CMV-infekcija može biti:

1. Prevencija tijekom prvih 100 dana od presadbe u svih primatelja ili bolesnika s predispozicijom za razvoj klinički izražene CMV-bolesti i

2. preemtivni pristup (ili rano liječenje) koje se temelji na dokazanoj viremiji (aktivno umnažanje virusa) prije pojave kliničkih znakova bolesti.^{11,55,82,83}

Antivirusni su lijekovi: nukleozidni analog ganciklovir (GCV) i njegov valinski ester valganciklovir, pirofosfatni analog foskarnet (PFA) i nukleotidni analog cidofovir (HPMPC).⁸⁴⁻⁸⁸ Ganciklovir –(9-(1,3-dihidroksi-2-propoksi-metil)gvanin monofosforilira se u ganciklovir 5' monofosfat u CMV-inficiranim stanicama s pomoću timidin kinaze UL97 kodirane virusom, a zatim di- i tri-fosforilira s pomoću kinaza iz stanica domaćina. Aktivni trifosforilirani oblik ganciklovira inhibira DNK-polimerazu natječući se s deoksigvanozin trifosfatom i na taj način zaustavlja elongaciju lanca i virusnu replikaciju.¹² Na sličan način djeluje i valganciklovir.⁹ Foskarnet –fosfonofornna kiselina –analog je pirofosfata koji izravno inhibira virusnu DNK-polimerazu interferirajući s otpuštanjem pirofosfata za vrijeme ugradnje supstrata. Cidofovir – (1-[(s)-3-hidroksi-2-(fosfometoksi)propil]citozin –analog je nukleotida koji se mora fosforilirati s pomoću staničnih enzima da bi prešao u aktivni oblik. Za razliku od ganciklovira za aktivaciju foskarneta i cidofovira nije potrebna timidin kinaza kodirana virusom. Međutim nepoželjni popratni učinci ovih lijekova, kao što su mijelosupresija i nefrotoksičnost te razvoj rezistentnih CMV sojeva mogu značajno umanjiti uspjeh liječenja. Novija klinička istraživanja usmjerena su prema novom lijeku iz skupine benzimidazol ribozida, maribaviru, koji nema mijelosupresijskog učinka, a djeluje na sintezu virusne DNK inhibicijom UL97, specifične CMV-protein kinaze.⁸⁹

Danas se CMV-bolest uglavnom liječi intravenskom primjenom ganciklovira, obično u dozi od 5 mg/kg tjelesne mase svakih 12 sati u razdoblju od 2 do 4 tjedna, uz prilagodbu doze ovisno o bubrežnoj funkciji. Moguće neželjene pojave tijekom liječenja ganciklovrom jesu neutropenija odnosno leukopenija, trombocitopenija i poremećaji bubrežne funkcije.⁸⁶ Nižom dozom ganciklovira (5 mg/kg/dan) moguće je postići željeni učinak u bolesnika visokog rizika od nastanka CMV-bolesti uz prihvatljivu toksičnost ako se neutropenija kontrolira primjenom faktora rasta G-CFS (granulocyte colony-stimulating factor support).

Zahvaljujući prevenciji antivirusnim tvarima kao što su ganciklovir i valganciklovir, smanjena je incidencija CMV-bolesti u ranom poslijetransplantacijskom razdoblju, ali ne i ukupna stopa mortaliteta među bolesnicima s transplantacijom.⁶⁻⁸ Primjenom opće profilakse može se smanjiti pojava rane CMV-bolesti uz veću učestalost bakterijskih i gljivičnih infekcija te povećanu mijelotoksičnost. Usto, smatra se da dugotrajna primjena ganciklovira potiče razvoj kasne CMV-bolesti i omogućuje razvoj ganciklovir-rezistentnih sojeva.¹¹ Nakon završetka peroralne antivirusne profilakse CMV-bolest se često javlja u primatelja kod kojih se razvio GvHD ili kojima je bila potrebna prolongirana antivirusna profilaksa za vrijeme ranoga posttransplantacijskog razdoblja.⁶⁰

Primjenom ganciklovira u kraćem vremenskom razdoblju u visoko rizičnih bolesnika moguće je izbjeći neželjene učinke njegove dugotrajne primjene. Usto, kraća primjena omogućuje brži oporavak specifičnog anti-CMV-imunosnog odgovora s posljedično smanjenim rizikom od razvoja kasne CMV-bolesti.^{90,91} To se može postići preemtivnim (ili ranim) liječenjem koje se temelji na dokazanoj viremiji (aktivno umnažanje virusa) prije pojave kliničkih znakova bolesti.

Međutim postoje različiti programi s obzirom na dozu, vrijeme primjene i trajanje preemtivnog liječenja. Program iz Seattlea⁷ koristi se agresivnim pristupom u primjeni ganciklovira koja počinje bilo kojom razinom pozitivnosti testa antigenemije CMV pp65 i traje do 100 dana nakon transplantacije. Prema japanskom⁷ programu liječenje ganciklovrom prekida se čim test antigenemije postane negativan.

Uspjeh preemtivnog liječenja ovisi o osjetljivosti metode koja se rabi za detekciju CMV-infekcije, kao i načinu uzimanja i dostave u laboratorij kliničkog uzorka koji se testira.⁸

Preemtivno liječenje CMV-bolesti smanjuje incidenciju CMV-bolesti, međutim toksičnost, posebice neutropenija, koju uzrokuje ganciklovir ograničava dozu i trajanje liječenja.¹² Uvođenje preemtivne terapije ganciklovrom povećalo je rizik od sekundarnih gljivičnih i bakterijskih infekcija koje su posljedica neutropenije izazvane ganciklovrom, kao i pojavu kasne CMV-infekcije zbog odgođenog oporavka imunskog sustava.¹¹ Zbog toga je važno pratiti CMV-infekciju i pravodobno započeti liječenje u bolesnika s visokim rizikom (presadak od HLA-nepodudarnog ili nesrodnog davatelja ili akutni GvHD).

Pored navedenoga u liječenju CMV-infekcije može se rabiti i CMV-imunoglobulin ili polivalentni imunoglobulin iako njihova učinkovitost nije potpuno jasna. Smatra se da intravenski primijenjen imunoglobulin djeluje imunomodulacijski i tako smanjuje incidenciju i težinu GvHD-a,³² a ne izravnim zaštitnim djelovanjem protiv CMV-a.³⁹

U novije vrijeme sve je prisutnija rezistencija CMV-a na antivirusne tvari u bolesnika s transplantacijom.^{9,32,92} Pri dugotrajnom liječenju ganciklovrom pojavljuju se rezistentni sojevi uzročno povezani s mutacijom na genu UL97.⁷ Različite studije koje su provedene u primatelja aloKMS i osoba zaraženih HIV-om pokazuju da mutacije na virusnoj DNK-polimerazi UL54 (ciljno mjesto antivirusnih tvari) i timidin kinazi UL97 (fosfotransferaza; fosforilira ganciklovir u aktivni oblik) potvrđuju rezistenciju CMV-a na antivirusne tvari.^{85,93-98}

Danas su dostupne dvije vrste metoda koje se rabe za određivanje virusne osjetljivosti, a temelje se na fenotipskim i genotipskim testovima. Fenotipski testovi temelje se na supresiji virusnog rasta u različitim serijskim koncentracijama antivirusnih tvari. Genotipski testovi temelje se na određivanju specifičnih mutacija koje se smatraju potvrdom razvoja rezistencije. Izvode se jednostavno s pomoću suvremenih molekularnih metoda kao što su PCR i sekvencioniranje amplificiranih produkata.^{99,100} Međutim te se metode također moraju optimizirati i klinički evaluirati, jer postojeće dokazane mutacije na UL97 i UL54-genima nisu u korelaciji s fenotipskom rezistencijom. Neka su istraživanja pokazala da se katkad ne radi o spomenutoj genskoj mutaciji, već da stanice domaćina ne mogu fosforilirati GCV u aktivni oblik.¹⁰¹

Testiranje virusne osjetljivosti u području transplantacijske medicine postaje sve više rutinska pretraga. Uobičajene fenotipske metode temeljene na staničnoj kulturi nisu ni dovoljno standardizirane ni dovoljno brze da bi se mogle rabiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi liječenja i prevencije CMV-bolesti. Zbog toga se danas najčešće rabe zamjenski pokazatelji kao što je sniženje koncentracije virusnih čestica za vrijeme antivirusne terapije, što se smatra neizravnim mjerom antivirusne rezistencije. Sljedeća istraživanja trebaju dokazati potvrđuju li specifične

mutacije na genomu rezistenciju niske ili visoke razine ili uopće ne dokazuju bilo koju vrstu rezistencije na antivirusne tvari. Zbog svega toga infekcije uzrokovane CMV-om zahtijevaju upotrebu mnoštva različitih terapijskih i dijagnostičkih sredstava i postupaka, a to svakako povećava ukupnu cijenu koštanja transplantacije. Sukladno tomu temelj učinkovitog liječenja CMV-infekcije odnosno bolesti čine rana dijagnostika i razlikovanje supkliničke od sustavne (produktivne) infekcije visokog rizika koja je izravno povezana s razvojem CMV-bolesti te primjena učinkovitih protu-CMV-lijekova. Novija istraživanja usmjerena su prema imunoterapijskom pristupu koji je za sada pokazao visoku razinu sigurnosti i ekonomičnosti, a temelji se na izdvajanju CMV-reaktivnih T-limfocita iz krvi davatelja i njihovu umnažanju *ex vivo*, a potom vraćanju u organizam primatelja.¹⁰²

LITERATURA

- Kalwak K, Moson I, Cwian J i sur. A prospective analysis of immune recovery in children following allogeneic transplantation of T-cell-depleted or non-T-cell-depleted hematopoietic cells from HLA-disparate family donors. *Transplant Proc* 2003;35:1551–5.
- Lacey SF, Gallez-Hawkins G, Crooks M i sur. Characterization of cytotoxic function of CMV-pp65-specific CD8+ T-lymphocytes identified by HLA tetramers in recipients and donors of stem-cell transplants. *Transplantation* 2002;74:722–32.
- Storek J, Joseph A, Dawson MA, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2002;73:1154–8.
- Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Zenone Bragotti L, Alessandrino EP. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:873–9.
- Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:543–58.
- Bechtel JT, Shenk T. Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *J Virol* 2002;76:1043–50.
- Kanda Y, Mineishi S, Saito T i sur. Response-oriented preemptive therapy against Cytomegalovirus disease with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. *Transplantation* 2002;73:568–72.
- Weinberg A, Schissel D, Giller R. Molecular methods for Cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40:4203–6.
- Pillay D, Emery VC, Mutimer D i sur. Guidelines for laboratory monitoring of treatment of persistent virus infections. *J Clin Virol* 2002;25:73–92.
- Koszalka GW, Johnson NW, Good SS i sur. Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2373–80.
- Singh N. Delayed occurrence of cytomegalovirus disease in organ transplant recipients receiving antiviral prophylaxis: are we winning the battle only to lose the war? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:643–6.
- Jawetz E. Antiviral chemotherapy and prophylaxis. U: Katzung BG, ur. *Basic and Clinical Pharmacology*, 6. izd. Norwalk: Appleton and Lange; 1995, str. 733.
- de la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches to CMV infections in adult patients. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl 2:S1–12.
- Ljungman P, da la Camara R, Cordonnier C i sur. European Conference on Infections in Leukemia, Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008;42(4):227–40.
- Lin TS, Zahrieh D, Weller E, Aleya EP, Antin JH, Soiffer RJ. Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6+ T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2002;74(1):49–54.
- Essa S, Pacha AS, Raghupathy R, Al-Attayah R, El-Shazly A, Said T. CD4+ T cell levels are decreased during active CMV infection in kidney transplant recipients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:17–22.
- Schäfer P, Tenschert W, Schröter M, Gutensohn K, Laufs R. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. *J Clin Microbiol* 2000;38:3249–53.
- Goossens VJ, Vink C, Mullers W, Middeldorp JM, Bruggeman CA. Different profiles of cytomegalovirus RNA transcripts and anti-cytomegalovirus IgM antibodies in renal transplant recipients. *J Clin Virol* 2001;23:87–95.
- Demmler GJ, Istas A, Easley KA, Kovacs A and the pediatric pulmonary and cardiovascular complications of vertically transmitted HIV-1 infection study group. Results of a quality assurance program for detection of cytomegalovirus infection in the pediatric pulmonary and cardiovascular complications of vertically transmitted human immunodeficiency virus infection study. *J Clin Microbiol* 2000;38:3942–5.
- Maine GT, Stricker R, Schuler M i sur. Development and clinical evaluation of a recombinant-antigen-based cytomegalovirus immunoglobulin M automated immunoassay using the Abbott AxSYM analyzer. *J Clin Microbiol* 2000;38:1476–81.
- Landini MP, Lazzarotto T, Maine GT, Ripalti A, Flanders R. Recombinant mono- and polyantigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995;33:2535–42.
- Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;6:469–73.
- Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF. Differentiation of primary Cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol* 1991;33:6–9.
- Deckers M, Hofmann J, Kreuzer KA i sur. High genotypic diversity and a novel variant of human cytomegalovirus revealed by combined UL33/UL55 genotyping with broad range PCR. *Virol J* 2009;6:210.
- Hedman K, Lappalainen M, Söderlund M, Hedman L. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev Med Microbiol* 1993;4:123–9.
- Suligoi B, Galli C, Massi M i sur. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J Clin Microbiol* 2002;40:4015–20.
- Sipewa MJ, Goubau P, Bodéus M. Evaluation of a cytomegalovirus glycoprotein B recombinant enzyme immunoassay to discriminate between a recent and a past infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:3689–93.
- Sund F, Wahlberg J, Eriksson BM. CMV disease in CMV-mismatched renal transplant recipients with prophylactic low dose valganciclovir. *J Clin Virol* 2001;23:107–11.
- Emery VC. Cytomegalovirus and the aging population. *Drugs Aging* 2001;18:927–33.
- Müller TF, Gickhorn D, Jungraithmayr T i sur. Pattern and persistence of the epitope-specific IgM response against human cytomegalovirus in renal transplant patients. *J Clin Virol* 2002;24:45–56.
- Hodinka RL. Human cytomegalovirus in clinical microbiology. U: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, ur. *Manual of clinical microbiology*, 7. izd. Washington: ASM Press; 2003; 2:1304–14.
- Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. U: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, ur. *Fields Virology*, 3. izd. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers; 1996;2:2493–523.
- Bodéus M, Beulné D, Goubau P. Ability of three IgG-avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:248–52.
- Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA i sur. Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2734–7.
- van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzeg AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988;26:2531–5.
- Themeli-Digalaki K, Orcopoulou E, Karonis T, Poutilina L, Kairis D, Carouzou C. Evaluation of the antigenemia assay in early diagnosis of active cytomegalovirus infections in hospitalised patients. U: 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Clinical Microbiology and Infection Abstracts, Copenhagen, Denmark, 2005;11(suppl 2):735–6.
- Cardenoso L, Blazquez C, Rodriguez R i sur. Quantitative CMV PCR in allogeneic stem-cell transplant patients. *ECCMID: Clin Microbiol Infect Abstr*, 2005;11(suppl 2):283.
- Ki HK, Sohn KM, Rhee YJ i sur. Usefulness of CMV antigenemia assay after liver transplantation. *ECCMID: Clin Microbiol Infect Abstr*, 2005;11(suppl 2):281.
- Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;42 Suppl 1:S70–S72.

40. Kanda Y, Yamashita T, Mori T i sur. A randomized controlled trial of plasma real-time PCR and antigenemia assay for monitoring CMV infection after unrelated BMT. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1325–32.
41. Razonable RR, Paya CV, Snith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40:746–52.
42. Crumacker CS. Use of antiviral drugs to prevent herpesvirus transmission. *N Engl J Med* 2004;350:67–8.
43. Andre-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S i sur. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase ½ study. *Lancet* 2002;360:130–7.
44. Poirier-Toulemonde AS, Milpied N, Cantarovich D, Morcet JF, Billaudel S, Imbert-Marcelle BM. Clinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:3143–9.
45. Landry ML, Ferguson D. 2-Hour cytomegalovirus pp65 antigenemia assay for rapid quantitation of cytomegalovirus in blood samples. *J Clin Microbiol* 2000;38:427–8.
46. Weinberg A, Hodges TN, Li S, Cai G, Zamora MR. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38:768–72.
47. Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis JH. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:4362–9.
48. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* 1999;190:177–82.
49. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:533–54.
50. Yun Z, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Vahlne A. Real-time monitoring of cytomegalovirus infections after stem cell transplantation using the TaqMan polymerase chain reaction assays. *Transplantation* 2000;69:1733–6.
51. Gault E, Michel Y, Dehée A, Belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:772–5.
52. Gimeno C, Solano C, Latorre JC i sur. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (Cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008;46:3311–8.
53. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J i sur. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1142–8.
54. Spector SA, Hsia K, Crager M, Pilcher M, Cabral S, Stempien MJ. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol* 1999;73:7027–30.
55. Boivin G, Handfield J, Toma E, Lalonde R, Bergeron G. Expression of the late cytomegalovirus (CMV) pp150 transcript in leukocytes of AIDS patients is associated with a high viral load in leukocytes and presence of CMV DNA in plasma. *J Infect Dis* 1999;179:1101–7.
56. Boom R, Sol CJA, Schuurman T i sur. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *J Clin Microbiol* 2002;40:4105–13.
57. Boivin G, Handfield J, Toma E, Murray G, Lalonde R, Bergeron G. Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 1998;177:355–60.
58. Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:2709–17.
59. Zipeto D, Morris S, Hong C i sur. Human cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma reflects quantity of CMV DNA present in leukocytes. *J Clin Microbiol* 1995;33:2607–11.
60. Boivin G, Bélanger R, Delage R i sur. Quantitative analysis of Cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS AMPLICOR MONITOR PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38:4356–60.
61. Weinberg A, Schissel D, Giller R. Molecular methods for cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40:4203–6.
62. Flexman J, Kay I, Fonte R, Herrmann R, Gabbay E, Palladino S. Differences between the quantitative antigenemia assay and the cobas amplicor monitor quantitative PCR assay for detecting CMV viraemia in bone marrow and solid organ transplant patients. *J Med Virol* 2001;64:275–82.
63. van der Heiden PLJ, Kalpoe JS, Barge RM, Willemze R, Kroes ACM, Schippers EF. Oral valganciclovir as preemptive therapy has similar efficacy on cytomegalovirus DNA load reduction as intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:693–8.
64. Kaiser L, Perin L, Chapuis B i sur. Improved monitoring of Cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by an ultrasensitive plasma DNA PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4251–5.
65. Mañez R, Breining MC, Linden P i sur. Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997;176:1462–7.
66. Razonable RR, Brown RA, Espy MJ i sur. Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. *J Clin Microbiol* 2001;39:4472–6.
67. Blank BSN, Meenhors PL, Mulder JW i sur. Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:563–9.
68. Machida U, Kami M, Fukui T i sur. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38:2536–42.
69. Witt DJ, Kemper M, Stead A i sur. Analytical performance and clinical utility of a nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:3994–9.
70. Blank BSN, Meenhors PL, Pauw W i sur. Detection of late pp67-mRNA by NASBA in peripheral blood for the diagnosis of human cytomegalovirus disease in AIDS patients. *J Clin Virol* 2002;25:29–38.
71. Delgado R, Lumbrebrer C, Alba C i sur. Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1992;30:1876–8.
72. Greijer AE, Adriaanse HMA, Dekkers CAJ, Middeldrop JM. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. *J Clin Virol* 2002;24:57–66.
73. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA i sur. Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2734–7.
74. Lin TS, Zahrieh D, Weller E, Aleya EP, Antin JH, Soiffer RJ. Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6+ T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2002;74(1):49–54.
75. Butt NM, Clark RE. High frequency of positive surveillance for cytomegalovirus (CMV) by PCR in allograft recipients at low risk of CMV. *Bone Marrow Transpl* 2001;27:615–19.
76. Madhavan HN, Samson MY, Ishwarya M, Vijayakumar R, Malathi J. pp65 antigenemia and real time polymerase chain reaction (PCR) based-study to determine the prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) in kidney donors and recipients with follow-up studies. *J Virol* 2010;7:322.
77. Schaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by light cycler PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:4006–9.
78. Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B i sur. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol* 1999;37:958–63.
79. Pellegrin I, Garrigue I, Ekouevi D i sur. New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2000;182:36–42.
80. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D i sur. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:1845–53.
81. Diaz-Mitoma F, Leger C, Miller H i sur. Comparison of DNA amplification, mRNA amplification, and DNA hybridization techniques for detection of cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003;41:5159–66.
82. Humar A, Kumar D, Caliendo AM i sur. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:599–604.
83. Gilbert C, Roy J, Belanger R i sur. Lack of emergence of cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir (GCV) resistance following preemptive GCV therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3669–71.
84. Pillay D, Emery VC, Mutimer D i sur. Guidelines for laboratory monitoring of treatment of persistent virus infections. *J Clin Virol* 2002;25:73–92.
85. Lalezari JP, Friedberg DN, Bissett J i sur. Roche cooperative oral ganciclovir study group. High dose oral ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinitis. *J Clin Virol* 2002;24:67–77.
86. Koszalka GW, Johnson NW, Good SS i sur. Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2373–80.
87. Mousavi-Jazi M, Schloss L, Drew WL i sur. Variations in the cytomegalovirus DNA polymerase and phosphotransferase genes in relation to foscarnet and ganciclovir sensitivity. *J Clin Virol* 2001;23:1–15.

88. *Bueno J, Ramil C, Green M.* Current management strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection in pediatric transplant recipients. *Paediatr Drugs* 2002;4:279–90.
89. *Ljungman P.* Managing CMV in stem-cell recipients: The role of benzimidazoles. U: *Managing CMV infection: The quest for better outcomes.* 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2009.
90. *Peggs KS, Preiser W, Kottaridis PD i sur.* Extended routine polymerase chain reaction surveillance and preemptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000;111:782–90.
91. *Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C i sur.* Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transpl* 2000;25:757–63.
92. *Ogawa-Goto K, Irie S, Omori A i sur.* An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus – permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48. *J Virol* 2002;76:2350–62.
93. *Drew WL.* Cytomegalovirus resistance testing: pitfalls and problems for the clinicians. *Clin Infect Dis* 2010;50:733–6.
94. *Beadle JR, Hartline C, Aldern KA i sur.* Alkoxyalkil esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2381–6.
95. *Littler E, Stuart AD, Chee MS.* Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 1992;358:160–1.
96. *Chou S, Erice A, Jordan MC i sur.* Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis* 1995;171:576–83.
97. *Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK.* A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 1992;358:162–4.
98. *Gane E, Saliba F, Valdecasas GJC, O'Grady J, Pescovitz MD, Lyman S.* Randomised trial of efficacy and safety of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease in liver-transplant recipients. *Lancet* 1997;350:1729–33.
99. *Lurain NS, Weinberg A, Crumacker CS, Chou S.* Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2775–80.
100. *Eric A.* Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:286–97.
101. *Stanat SC, Reardon JE, Erice A, Jordan MC, Drew WL, Biron KK.* Ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates: mode of resistance to ganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2191–7.
102. *Brenner MK.* EBV and CMV-specific immunity. *Clin Microb Inf* 2010;16(suppl):2.

USPOREDBA NOVE I STARE DIJAGNOSTIKE LATENTNE TUBERKULOZNE INFEKCIJE (QuantiFERON I PPD)

COMPARISON OF NEW AND OLD TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION (QuantiFERON AND TST)

DUBRAVKA MAJIĆ MILOTIĆ, SANJA POPOVIĆ-GRLE,
VERA KATALINIĆ-JANKOVIĆ, ALEKSANDAR ŠIMUNOVIĆ*

Deskriptori: Latentna tuberkuloza – dijagnoza; Bakteriološke tehnike – metode; Tuberkulinski test; Kožni testovi; Gama interferon – u krvi

Sažetak. Tuberkuloza (TBC) druga je najčešća zarazna bolest na svijetu, uzrokovana bacilom *Mycobacterium tuberculosis*. Uz rijetku laringalnu, plućna tuberkuloza jedini je zarazni oblik bolesti, iako može zahvatiti bilo koji organ ljudskog tijela. Tuberkuloza je ponovni izazov liječnicima, jer se javlja uz brojne kronične bolesti i imunokompromitirana stanja, u starijoj životnoj dobi i jer neprikladno liječenje može dovesti do pojave rezistentnih oblika tuberkuloze. Stoga je dobra rana dijagnostika bolesti ključna za sve programe sprječavanja i suzbijanja tuberkuloze. Prije nego što je QuantiFERON odobren 2001. godine, tuberkulinski kožni test (PPD) bio je jedini test za otkrivanje latentne tuberkuloze. Za razliku od PPD-a, koji je test *in vivo*, postoje novi krvni testovi *in vitro*, tzv. IGRA-testovi (QuantiFERON i EliSPOT.TB). U radu su prezentirane prednosti i nedostaci obju metoda, a pokazalo se da IGRA-testovi u odnosu prema PPD-u imaju višu specifičnost i osjetljivost.

Descriptors: Latent tuberculosis – diagnosis; Bacteriological techniques – methods; Tuberculin test; Skin tests; Interferon-gamma – blood

Summary. Tuberculosis (TB) is the second most common contagious disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Besides a rare laryngeal tuberculosis, pulmonary tuberculosis is the only one contagious form of the disease, although it can affect any organ of the human body. TB represents a new challenge to the doctors because it appears with numerous chronic diseases, affects immunocompromised hosts, elderly people and because nonadequate therapy could create drug resistant tuberculosis. Early diagnosis of TB is fundamental for every tuberculosis control program. Before

* KB Merkur, Sveučilišna klinika »Vuk Vrhovac« (Dubravka Majić Milotić, dr. med.), Klinika za plućne bolesti »Jordanovac«, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb (doc. dr. sc. Sanja Popović-Grle, dr. med), Hrvatski zavod za javno zdravstvo (prim. dr. sc. Vera Katalinić-Janković, dr. med.; Aleksandar Šimunović, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. D. Majić Milotić, Dolčić 32, 10000 Zagreb, e-mail: dubravkamajic@yahoo.com

Primljeno 7. lipnja 2010., prihvaćeno 18. srpnja 2011.