

PEDİATRİK KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYON HASTALARINDA CMV SPESİFİK HÜCRESEL İMMÜN YANITIN İZLENMESİ

**Gül AydınTıǧlı¹, Koray Yalçın², Esvet Mutlu¹, Derya Mutlu³, Alphan Küpesiz²,
Dilek Çolak⁴, Meral Gültekin¹**

1- Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Temel İmmünoloji Bilim Dalı

2-Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji- Onkoloji Bilim Dalı

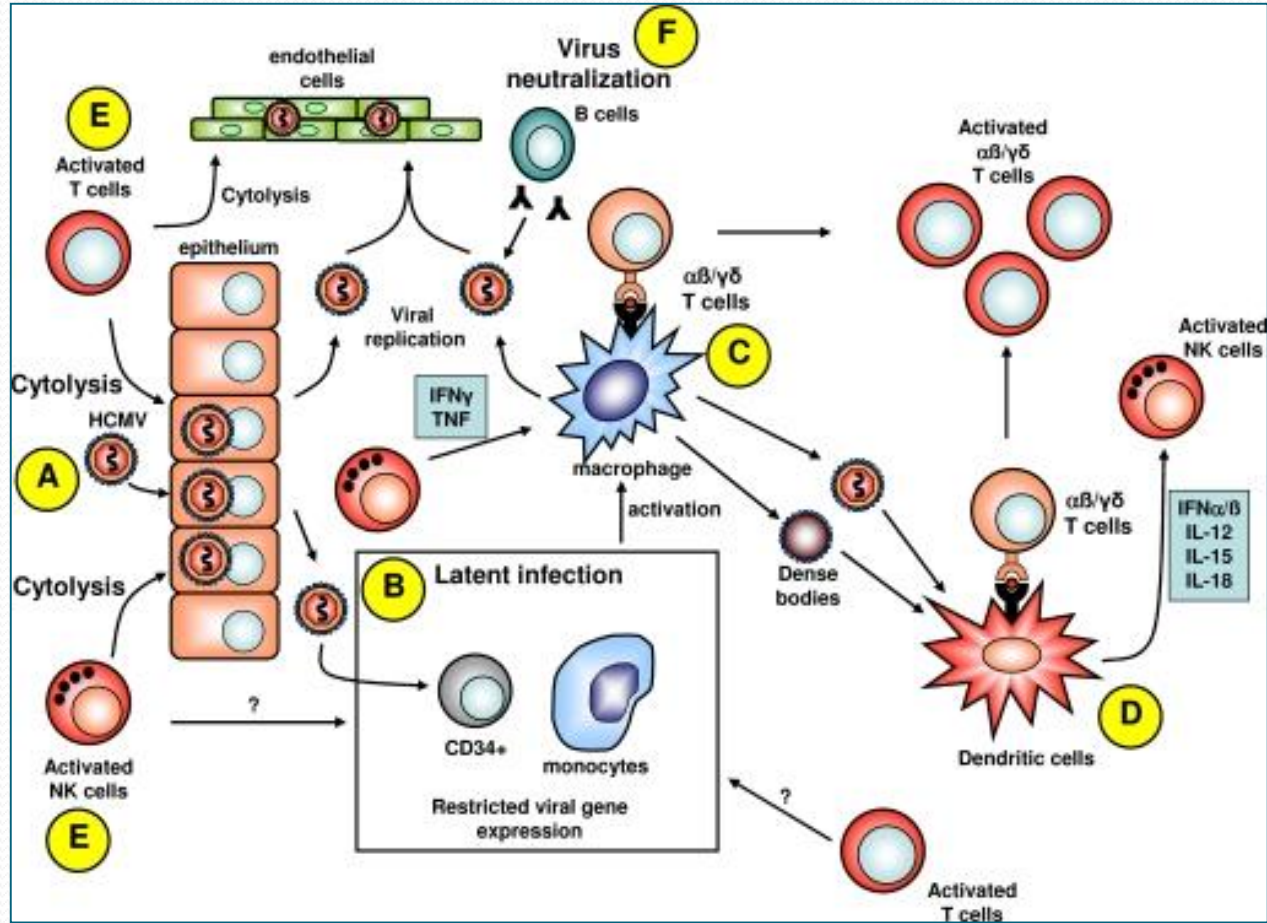
3-Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

4-Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Viroloji Bilim Dalı

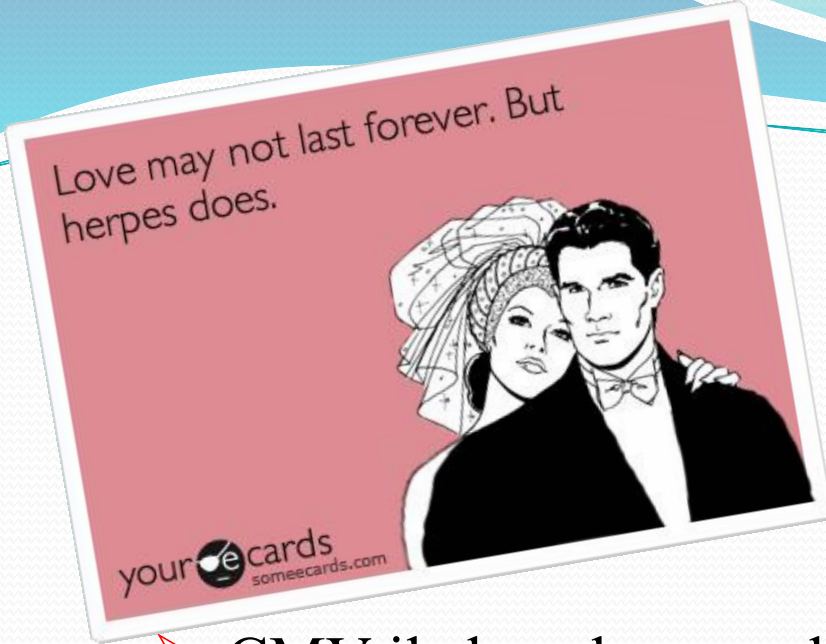
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

*Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TTU-2015-715 kod no' lu proje ile desteklenmiştir.*

GİRİŞ-AMAÇ



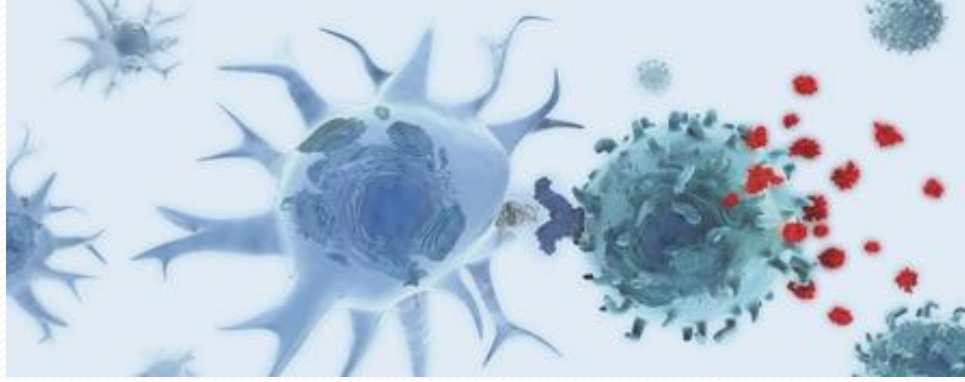
- CMV enfeksiyonunun patogenezi, immun sistem ve virüs arasındaki çok sayıda etkileşimi içerir
- Latent virus enfeksiyonlarının patogeneziinde esas rol hücresel immün yanıtıdır.



- CMV ile konak arasındaki dengenin bozulmasında özellikle konak hücresel bağışık yanıtın baskılanması çok önemlidir.

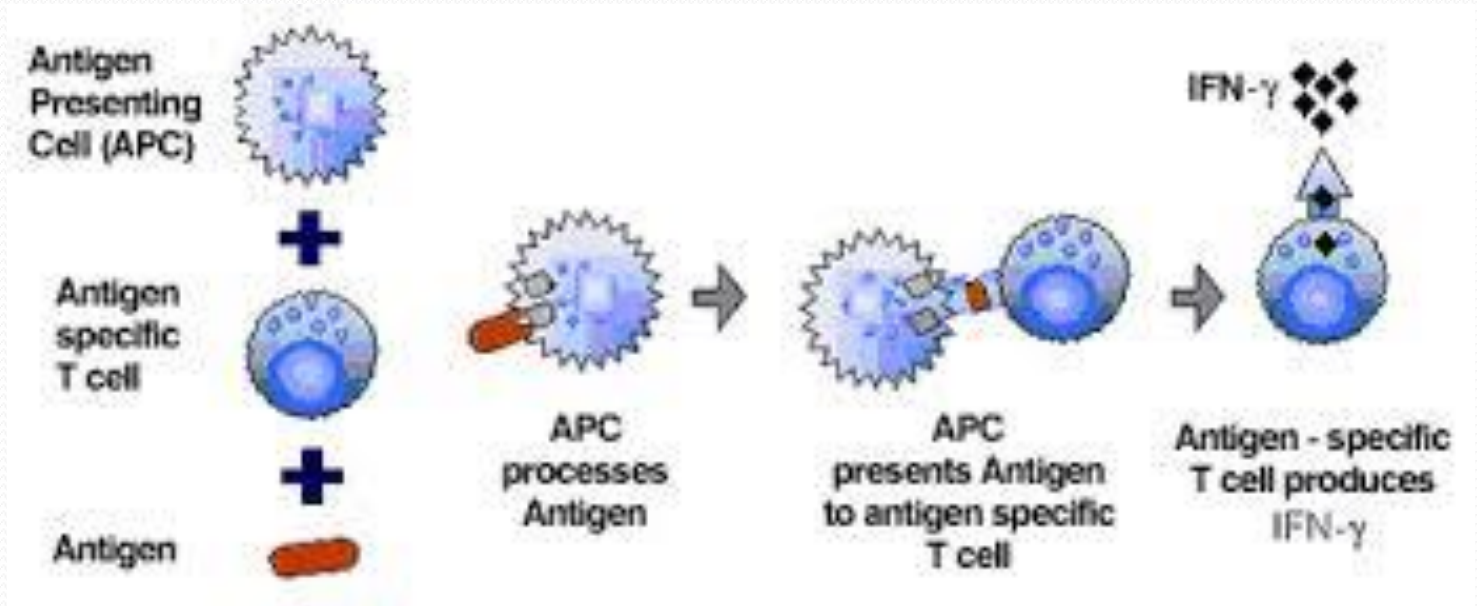


- Kök hücre nakli (KHN) sonrası konak immün cevabında meydana gelen ana değişiklik konak immün sisteminin yok edilip, donör immün sistemiyle yeniden yapılandırılması ve böylece alıcının immün yanıtının vericinin önceki deneyimlerini yansıtmasıdır .



- KHN olgularında CMV hastalığının gelişmesinde ve prognozunda, konağın hücresel immün yanıtı önemli rol oynar.
- Nakil sonrası dönemde, preemptif ve profilaktik tedavi yaklaşımları..... CMV enfeksiyonu insidansı azalmıştır.
- Ancak uzamış antiviral ilaç kullanımından kaynaklanan geç başlangıçlı CMV enfeksiyonu ve ilaca dirençli CMV suşları sorun olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır.

- CMV-spesifik T hücre yanıtlarının kantitatif değerlendirilmesi viremi ve hastalık riski altında olan hastaların tanımlanmasına yardımcı olacaktır.
- Allojenik KHN uygulanan çocuk hastaların nakil sonrası CMV-spesifik hücresel immün yanıtları izlenerek, antijen spesifik T hücrelerinin ürünü olan IFN- γ düzeyleri ölçülerek CMV enfeksiyonu gelişimi ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

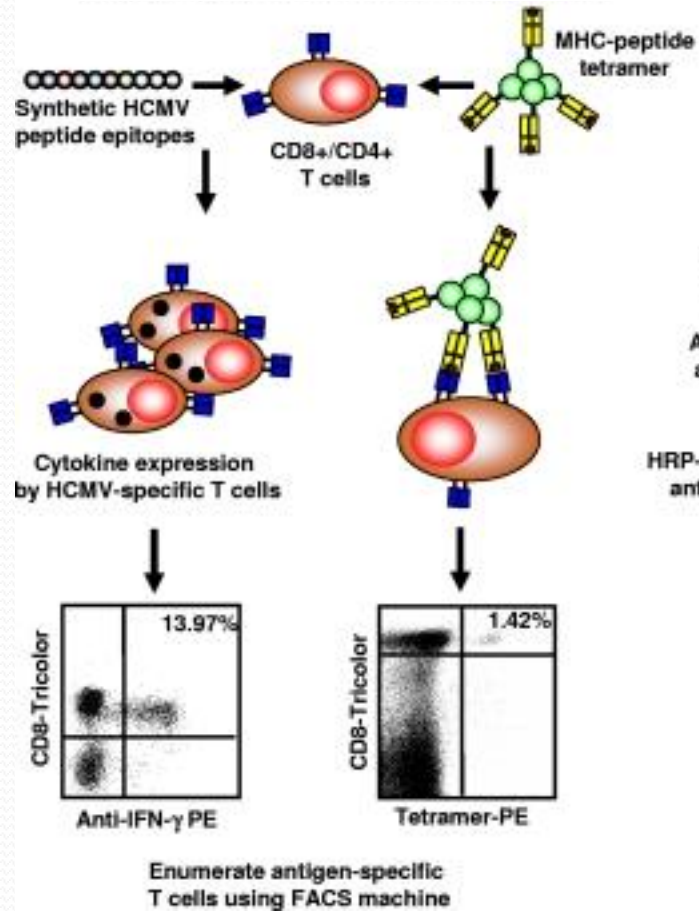


GEREÇ-YÖNTEM

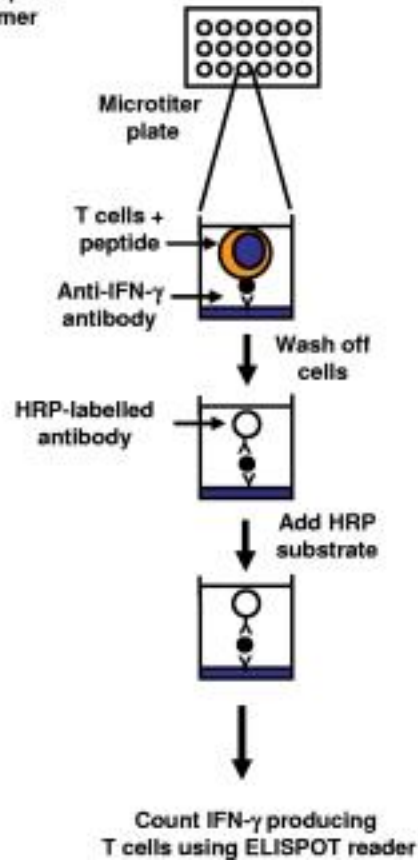
- Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Kök Hücre Transplantasyonu Ünitesi'nde 16.09.2015 ve 19.04.2016 tarihleri arasında allojenik KHN olmuş 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.
- Tüm hastaların nakil sonrası 30, 45, 60, 90. gün örnekleri temin edilirken, viremi gelişen hastalardan ek örnekler de alınmıştır. (Toplam 108 örnek)

CMV spesifik T hücre yanıtının izlemi

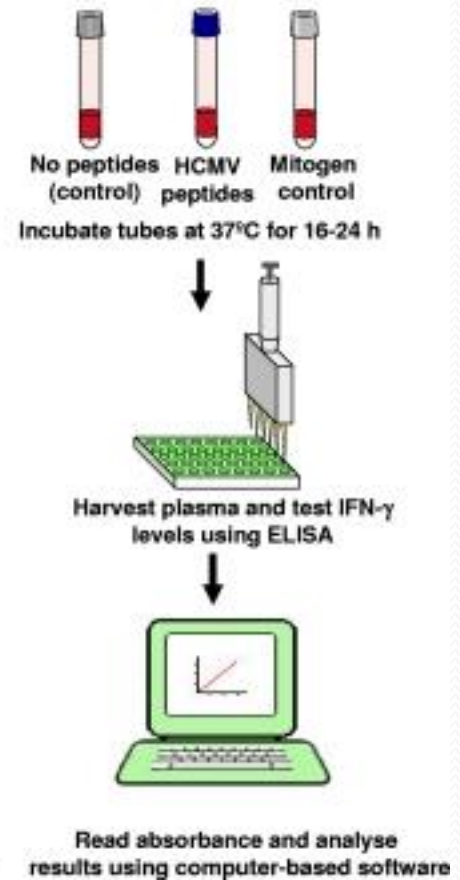
Akış sitometri



ELISPOT

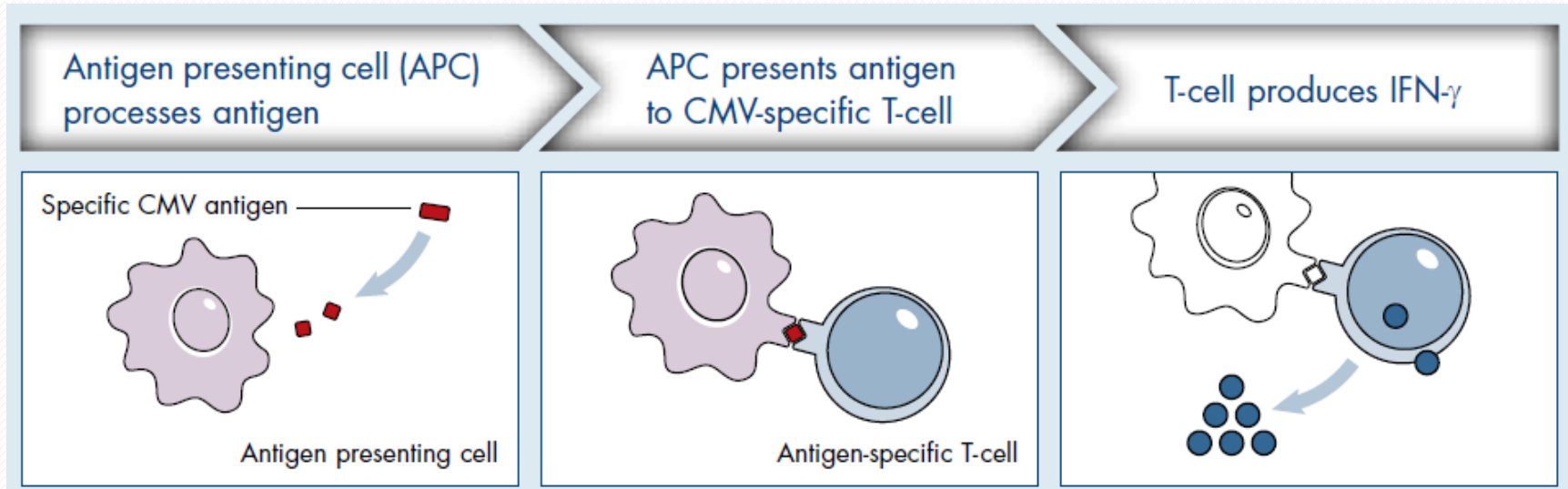


Quantiferon



CMV–spesifik hücresel immün yanıt izlemi

➤ Quantiferon-CMV ,QIAGEN,USA



- HLA sınırlı CMV peptidleri ile *ex vivo* uyarılan CD8⁺ T lenfositleri tarafından sentez edilen IFN-γ'nın ELISA prensipleri ile tam kanda kantitasyonu (IU/ml) esasına dayanır.

Quantiferon - hücresel bağışık yanıt izlemi -

➤ QF-CMV testi çeşitli CMV proteinlerinden elde edilmiş 22 peptid içerir. Toplumun % 98 inden fazlasını kapsayan çeşitli HLA hablotipleri ile sınırlı olarak CD8+ spesifik T hücrelerin stimülasyonu gerçekleşir

➤ FDA onayı : Yok ; CE onaylı

➤ Test aşamaları göreceli daha kolay ve ucuz

➤ Standart

➤ 18-24 saatte sonuç ..

Peptide	Sequence	CMV Protein	HLA Restriction
1	VTEHDTLLY	pp50	A1
2	VLEETSVML	IE-1	A2
3	NLVPMVATV	pp65	A2
4	IMREFNSYK	gB	A3
5	AYAQKIFKIL	IE-1	A23 & A24
6	QYDPVAALF	pp65	A24
7	DIYRIFAEI	pp65	A26
8	TPRVTGGGAM	pp65	B7
9	QIKVRVDMV	IE-1	B8
10	ARVYEIKCR	pp28	B27
11	CPSQEPMSIVY	pp65	B35
12	ELRRKMMYM	IE-1	B8
13	FEQPTETPP	IE-2	B41
14	QEFFWDANDI	pp65	B44
15	QAIRETVEL	pp65	B57 & B58
16	QMWQARLTV	pp65	B52
17	PTFTSQYRIQGL	pp65	A24
18	GPISGHVLK	pp65	A11
19	DALPGPCI	pp65	B51
20	KMQVIGDQY	pp65	B40/B60
21	CEDVPSGKL	pp65	B40/B60
22	TRATKMQVI	pp65	Cw6 (A30/B13)

Performance of the QuantiFERON-Cytomegalovirus (CMV) Assay for Detection and Estimation of the Magnitude and Functionality of the CMV-Specific Gamma Interferon-Producing CD8⁺ T-Cell Response in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Maria Angeles Clari,^a Beatriz Muñoz-Cobo,^a Carlos Solano,^{b,c} Isabel Benet,^{b,c} Elisa Costa,^a Maria José Remigia,^b Dayana Bravo,^a Paula Amat,^b and David Navarro^{a,d}

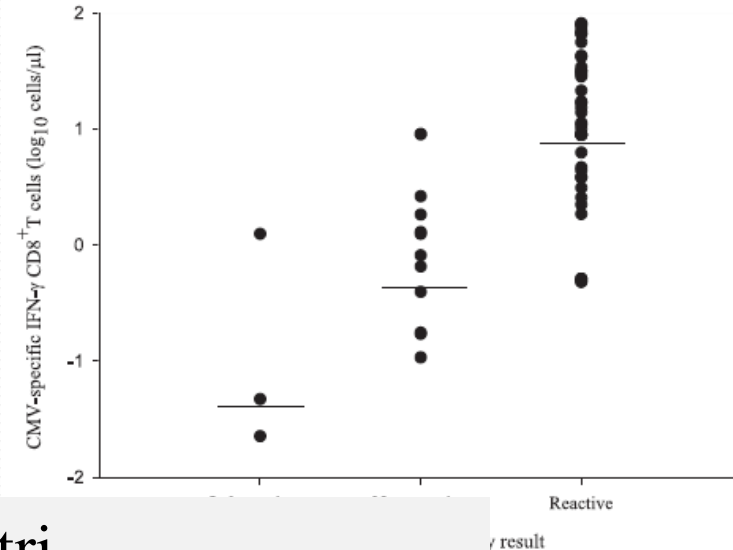
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^a; Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^b; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^c; and Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^d

n : 23

Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(5):791.

TABLE 1 Detection of cytomegalovirus-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells by ICS and the QuantiFERON-CMV assay in whole-blood specimens from allogeneic stem cell transplant recipients

Result of ICS method (no. of specimens)	No. of specimens with QuantiFERON-CMV assay result of:		
	Positive	Negative	Indeterminate
Positive (55)	42	10	3
Negative (35)	1	20	14



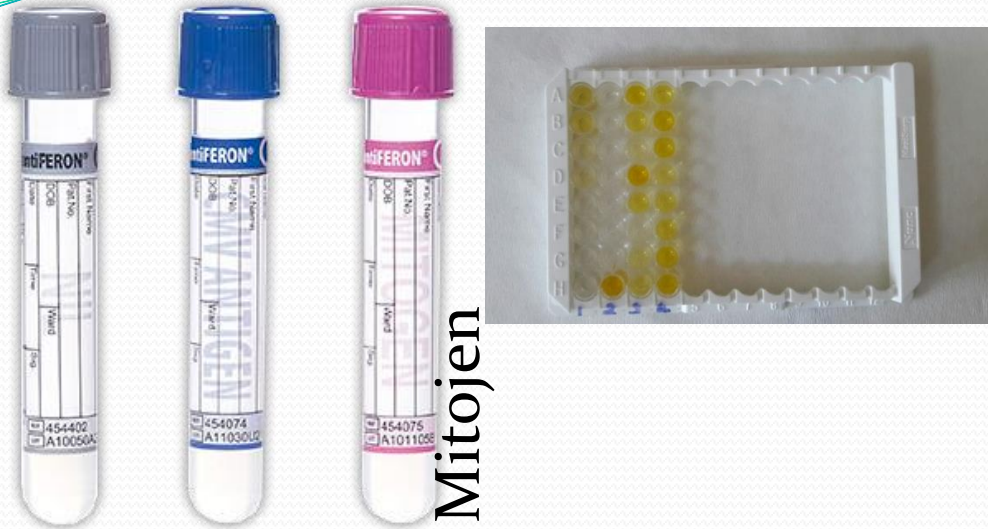
QuantiFERON – CD8 T Sitokin akış sitometri

Uyum : % 68,8

(k=0,695; 95% confidence interval [CI], 0.548 to 0.835)

QuantiFERON-CMV duyarlık : % 76.3

Quantiferon - CMV



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.815	0.016	0.022	0.221	0.012	0.038	0.113	0.009	1.169	0.050
B	0.213	0.079	0.016	2.128	3.347	0.013	0.018	0.036	0.021	0.356
C	0.054	0.317	1.121	0.008	3.070	0.054	0.431	0.128	1.003	0.034
D	0.010	0.057	2.627	0.109	0.014	0.525	0.415	0.013	0.695	2.970
E	0.856	0.141	0.009	2.118	0.021	0.311	0.546	0.024	0.039	2.547
F	0.204	1.329	0.047	0.009	0.141	0.362	0.014	0.064	0.099	0.012
G	0.051	0.017	0.227	0.112	0.009	0.681	2.384	0.010	2.384	0.031
H	0.012	0.020	0.010	0.346	0.254	0.007	3.363	0.235	0.012	0.040

Subject ID	Nil	CMV	Mitogen	CMV/Nil	Mitogen/Nil	Result
ID 1						
ID 2	0.08	0.38	1.52	0.40	1.44	REACTIVE
ID 3	0.27	0.67	6.38	0.40	1.44	REACTIVE
ID 4	0.08	0.10	0.10	0.02	6.11	REACTIVE
ID 5	0.08	5.38	> 10	> 10	> 10	INDETERMINATE
ID 6	0.04	0.22	1.09	0.18	> 10	REACTIVE
ID 7	0.05	1.06	> 10	1.05	> 10	NON-REACTIVE
ID 8	0.04	0.52	> 10	1.01	1.05	REACTIVE
ID 9	0.04	0.53	> 10	0.49	> 10	NON-REACTIVE
ID 10	0.06	1.66	0.49	1.62	> 10	REACTIVE
ID 11	0.07	> 10	0.49	1.62	> 10	REACTIVE
ID 12	0.03	0.60	> 10	1.18	0.60	NON-REACTIVE
ID 13	0.20	0.14	2.45	3.22	2.45	REACTIVE
ID 14	0.51	1.68	0.06	0.51	1.68	REACTIVE

Nil

Mitojen

CMV peptid

"CMV Antigen" minus "Nil" (IU/mL)	"Mitogen" minus "Nil" (IU/mL)	QF-CMV Result	QF-CMV Result Interpretation
< 0.2	≥ 0.5	Non Reactive	Anti-CMV immunity NOT Detected
≥ 0.2	Any	Reactive	Anti-CMV immunity Detected
< 0.2	< 0.5	Indeterminate	Result indeterminate for CMV responsiveness

- Pozitiflik için sınır değeri 0,2 IU/ml
- Hem mitojen hem de CMV tüpünde IFN γ yanıtı saptanmaması durumunda sonuçlar indeterminate olarak tanımlanmıştır.

Viral Yük İzlemi

- İlk üç ay haftada iki, ikinci üç ay haftada bir rnek....
- Plazma rnekleri
- The COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV Testi (Roche Molecular Systems-ABD)
- Cobas AmpliPrep (Roche Molecular Systems, ABD)
- Testin
- Saptama sınırı 50 kopya/ml
- Kantitasyon aralığı 150 - 10,000,000 kopya /ml'dir.
- Bu test ile tanımlanan 1 kopya/ml : 0,91 IU

Kök hücre alıcılarında spesifik immün yapılanmayı etkileyen faktörler

- Hasta / donör yaşı
- Primer hastalığı
- Transplant tipi- kök hücre kaynağı, graft yapısı-
- Uygulanan protokollar
- GVHD / steroid kullanımı
- HLA farklılığı derecesi
- Hasta / donör serolojik durumu

V⁻ / A⁺

V⁺ / A⁺

Multifonksiyonel CMV spesifik T hücre oluşturduklarından reaktivasyon, hastalık, mortalite kümülatif indeksi daha azdır ve daha az antiviral tedaviye gereksinim duyarlar.

Çizelge : Viremi gelişen olguların özellikleri

		Cinsiyet		Hastalık		Verici		Kök hücre kaynağı			Transplant türü	
		n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
		Kadın	Erkek	Tala-semi	Diğer	UK	UAD	Kİ	PKH	KK	MA	NMA
Viremi	Var	3	7	3	7	5	5	7	2	1	7	3
	Yok	7	3	5	5	8	2	7	1	2	8	2
Toplam		10	10	8	12	13	7	14	3	3	15	5

UK: uyumlu kardeş ;UAD: Uyumlu akraba dışı ;Kİ: Kemik iliği ,PKH: Periferik kök hücre KK: Kordon kanı; MA: Myeloablatif ;
NMA: Nonmyeloablatif

Çizelge : Viremi gelişen olguların özellikleri-devamı-

		ATG n		GVHD n		Steroid n		V / A Serolojik durum n(%)		
		Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	V+ A+	V- A+	V+A-
Viremi	Var	8	2	4	6	4	6	5(45)	5(63)	0
	Yok	8	2	1	9	1	9	6(55)	3(27)	1
Toplam		16	4	5	15	5	15	11(100)	8(100)	1

ATG: Anti timosit globülin GVHD: Graft versus host hastalığı

Çizelge : Viremi gelişen olguların özellikleri-devamı-

		Ortalama ± Standart sapma	P değeri
yaş	viremisiz	8,2 ± 4,5	0,7
	viremili	8,4 ± 3,5	
	toplam	8,3 ± 3,9	
plt engrafman gün	viremisiz	13,8 ± 5,7	0,9
	viremili	13,7 ± 5,5	
	toplam	13,6 ± 5,4	
pmnl engrafman gün	viremisiz	12,8 ± 2,0	0,4
	viremili	12,0 ± 1,9	
	toplam	12,4 ± 2,0	

Çizelge : Viremi saptanan / saptanmayan olguların izlem günlerinde CMV-spesifik IFN γ düzeyleri

Olgu No Viremi gelişen	Nakil sonrası CMV-spesifik IFN γ (IU / ml)			
	30. gün	45. gün	60. gün	90.gün
1	0,01	0,32	0,2	0,17
2	İND	0,24	0,56	0,98
3	2,36	28,2	6,64	18,6
4	5,05	4,49	7,85	9,05
5	0,82	0,31	İND	2,14
6	0,01	0,71	0,34	0,68
7	3,58	4,0	3,75	0,03
8	1,13	3,19	3,1	1,01
9	0,22	0,16	0,48	0
10	0,76	İND	0,18	0,48
11	48,3	100	91	39,4
12	1,22	1,22	1,01	1,61
13	İND	0,02	0,49	0,77
14	1,59	5,3	29	87,6
15	İND	0,18	0,13	0,29
16	0,4	0,03	0,3	0,43
17	İND	0,51	İND	0,26
18	0	0,28	0,05	0
19	3,22	İND	45,2	5,93
20	51,2	93,2	8,55	47,9

Çizelge : Nakil sonrası 30.,45.,60.,90 .günlerde viremi saptanan /saptanmayan olguların CMV-spesifik IFN γ düzeyleri

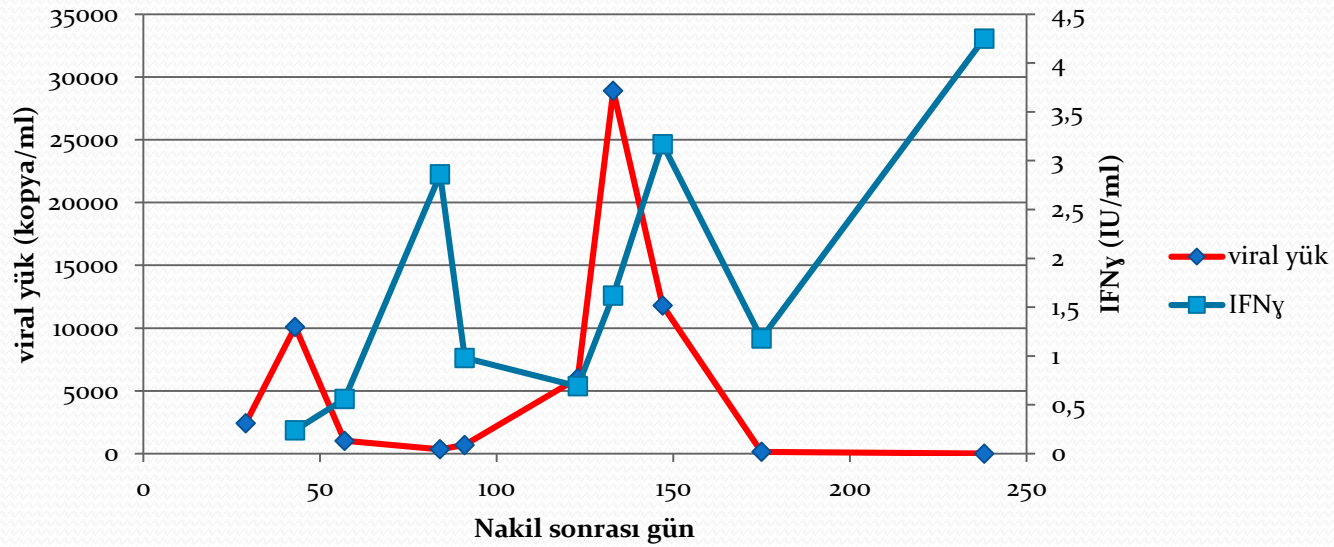
İzlem günü	CMV DNA	Ortalama \pm standart sapma IFN γ	P değeri
30. gün	viremisiz	6 \pm 15,0	0,4
	viremili	10 \pm 20,2	
	toplam	7,5 \pm 16,6	
45.gün	viremisiz	14,4 \pm 31,2	0,1
	viremili	12,3 \pm 32,7	
	toplam	13,5 \pm 30,7	
60. gün	viremisiz	14,0 \pm 28,5	0,7
	viremili	7,4 \pm 15,6	
	toplam	11,0 \pm 23,2	
90. gün	viremisiz	15,8 \pm 28,2	0,6
	viremili	5,9 \pm 14,9	
	toplam	10,9 \pm 22,5	

Rutin izlem günlerimizdeki CMV-spesifik IFN γ ortalamalarında iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark yok

Çizelge. Viremi gelişen olgu 2 ' nin izlem sürecinde CMV DNA ve CMV-spesifik IFN γ düzeyleri

Örnek alınma Gün.ay 2016	12.11	16.11	19.11	23.11	26.11	30.11	3.12	7.12	10.12	14.12
KHT sonrası gün	22	26	29	33	36	40	43	47	50	54
CMV DNA (kopya / ml)	230	455	2410	3860	11600	32600	10100	4790	2120	1340
CMV-spesifik IFN γ (IU / ml)			İND				0,24			
Örnek alınma Gün.ay 2016	17.12	21.12.	24.12	28.12	31.12	04.01	07.01	11.01	14.01	18.01
KHT sonrası gün	57	60	63	67	70	74	77	81	84	88
CMV DNA (kopya / ml)	1020	829	156	198	478	497	2560	5360	352	6100
CMV-spesifik IFN γ (IU / ml)	0,56								2,86	
Örnek alınma Gün.ay 2016	17.12	21.12.	24.12	28.12	31.12	04.01	07.01	11.01	14.01	18.01
KHT sonrası gün	57	60	63	67	70	74	77	81	84	88
CMV DNA (kopya / ml)	1020	829	156	198	478	497	2560	5360	352	6100
CMV-spesifik IFN γ (IU / ml)	0,56								2,86	
Örnek alınma Gün.ay 2016	21.01	25.01	28.01	01.02	08.02	11.02	15.02	18.02	22.02	25.02
KHT sonrası gün	91	95	98	102	109	112	116	119	123	126
CMV DNA (kopya / ml)	687	1490	1040	225	3400	510	4110	9190	6010	10700
CMV-spesifik IFN γ (IU / ml)	0,98	25.01	28.01	01.02	08.02	11.02			0,69	

Hasta 2



Viremili hastaların viral yük ve CMV-spesifik IFN γ değişimi her hasta için farklı özellikte...

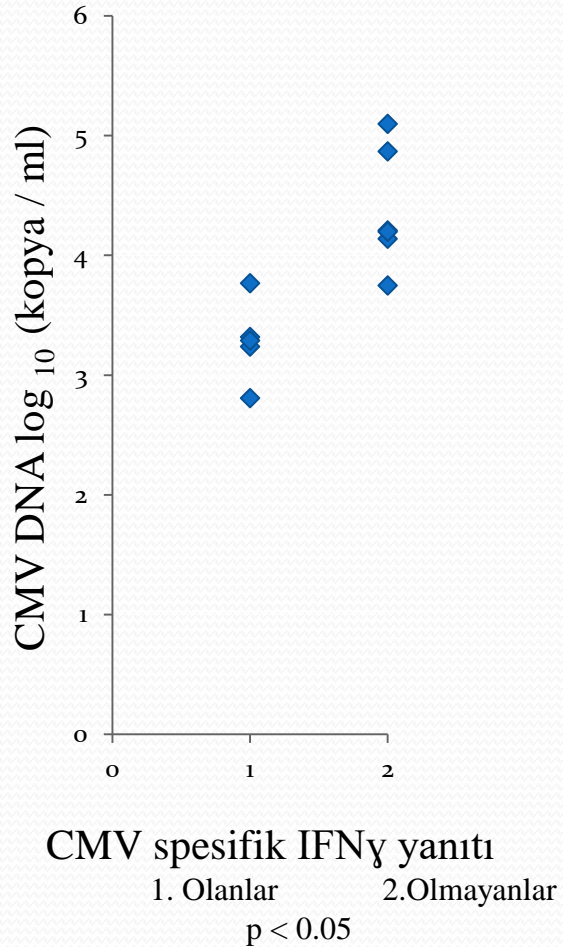
Çizelge : Viremi gelişen olguların viremi başlangıcında CMV-spesifik hücresel immün yanıt yapılanması

CMV	CMV-spesifik IFN γ	
	Yanıtı olan n: 5	Yanıtı olmayan n: 6
CMV DNA (kopya / ml) Ort. (min.-maks.)	2460 \pm 2000,7 (640-5890)	42191,6 \pm 48429,5 (5650-127000)
Viremi süresi (gün) Ort. (min.-maks.)	17,0 \pm 10,1 (2-30)	81,7 \pm 60,6 (25-170)

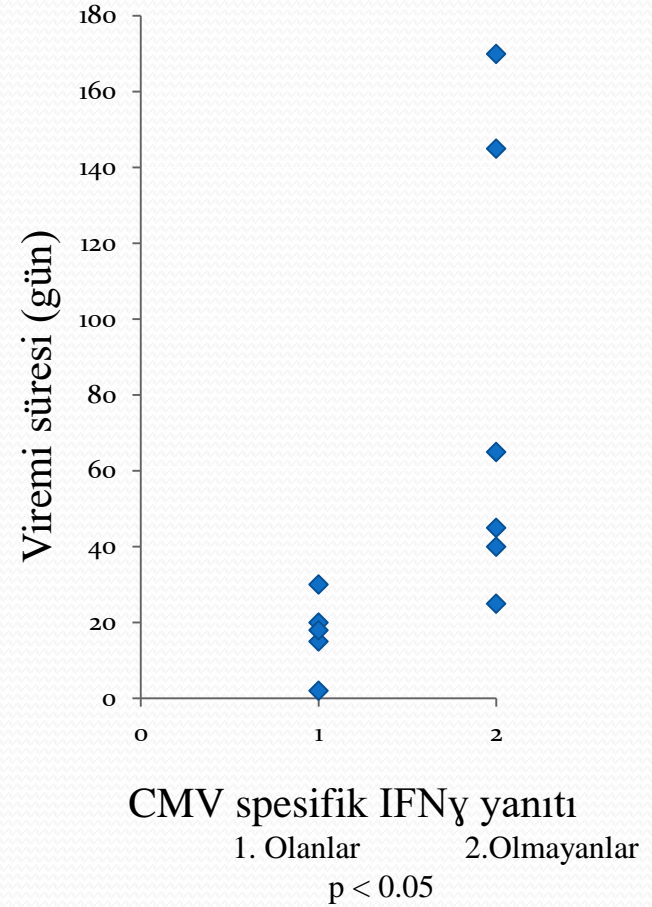
İki grubun viremi süreleri ve viral yükleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Viremi başlangıcında CMV-spesifik IFN γ yanıtı

Viral yük



Viremi süresi



Ex Vivo Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD8⁺ T-Cell Responses Using the QuantiFERON[®]-CMV Assay in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Attending an Irish Hospital

T. Fleming,^{1,2} J. Dunne,³ and B. Crowley^{1,2,4*}

Allojenik kök hücre n: 43 D-/ R⁺ n:18, D⁺/ R⁺ n:17, D⁺/ R⁻ n:8 ; hematolojik kanser n:29

İzlem : Nakil sonrası ilk 100 gün haftada bir (CMV DNA PCR + ise haftada 2 , tek + CMV DNA : Preemptif tedavi

Yüksek risk grubunda ort.48 gün sonra CMV enf.

Yüksek ve orta risk grubunda CMV DNA saptandığında CMV spesifik IFN- γ mevcut değil.

Geç CMV hastalığı gelişenlerde CMV spesifik immünite yapılanması / iyileşmesi / düzelmesinde gecikme mevcut.

Akraba olmayandan nakil yapılanlarda kardeşten yapılanlara göre CMV spesifik immün yanıtta gecikme (ort.200 ve 58 gün)

Sonuç

- KHN yapılan çocuk hastalarda CMV enfeksiyonu geliştiğinde, viremi başlangıcında CMV-spesifik IFN γ yanıtı saptananlarda viremi düzeyi ve süresi daha azdır.
- CMV hücrel immün yanıt izleminde Quantiferon-CMV testi uygulaması kolay bir testdir.
- KHN hastalarında CMV hastalığının önlenmesi ve tedavisinde, diğer risk faktörleri yanı sıra, hücrel immünitinin de araştırılması ve izlenmesi tanı ve tedavi algoritmalarının kişiye özel olarak değerlendirilmesini sağlayacaktır.

[Transplantation](#), 2013 Aug 27;96(4):333-60. doi: 10.1097/TP.0b013e31829df29d.

Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation.

Kotton CN¹, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group.