



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟ
(CYTOMEGALOVIRUS-CMV)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Σ. ΖΩΤΟΣ

Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

*«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»*

**N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού
τμήματος)**

Ημερομηνία αίτησης του κ. Ζώτου Νικολάου: 1-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 620^α/20-11-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαυρίδης Ανέστης Καθηγητής Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-1-2008

«Συμβολή των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση λοιμώξεων από Κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus - CMV)»

ΛΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 737^α/12-6-2012

Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα	Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαυρίδης Ανέστης	Ομότιμος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιάρα Σταυρούλα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μάκης Αλέξανδρος	Λέκτορας Παιδιατρικής-Παιδοαιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **20-3-2013**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στην οικογένεια μου

Στους δασκάλους μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	19
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	21
3. ΙΟΛΟΓΙΑ	25
3.1 Μορφολογία-Δομή	25
4. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	31
4.1 Γονιδίωμα ανθρώπινου Κυτταρομεγαλοϊού (hCMV)	33
5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	36
6. ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	38
7. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	40
7.1 Επιπολασμός και δημογραφικά	40
7.2 Οριζόντια μετάδοση	41
7.3 Κάθετη μετάδοση	43
7.4 Μοριακή επιδημιολογία	44
8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ hCMV	47
8.1 Σημασία της ανοσολογικής απάντησης	50
8.2 Μορφές της hCMV λοίμωξης: Πρωτοπαθής λοίμωξη, λανθάνουσα λοίμωξη, επανενεργοποίηση του ιού. Επαναλοίμωξη από άλλο στέλεχος του ιού	50
8.3 Σημασία της ανεύρεσης του ιού στα ούρα και της ιαιμίας Στρατηγικές θεραπείας	51
9. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	53
9.1 Λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή	53
9.2 Σύνδρομο CMV Μονοπυρήνωσης	53
9.3 Σοβαρή CMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή	54
9.4 Συγγενής CMV λοίμωξη	54
9.5 Περιγεννητική CMV Λοίμωξη	55
9.6 CMV λοίμωξη σε ανοσοκατεσταλμένο ξενιστή	56
9.7 CMV και μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων	57
9.8 CMV και μεταμόσχευση μυελού των οστών	58
9.9 CMV νόσος και σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS)	60

9.10	Ενδεχόμενη συσχέτιση με χρόνιες αγγειακές νόσους	60
10.	ΔΙΑΓΝΩΣΗ CMV ΛΟΙΜΩΞΗΣ	62
10.1	Διαφορική διάγνωση	63
10.2	Εργαστηριακή διάγνωση CMV λοίμωξης	64
10.2.1	Κλινικά δείγματα	64
10.2.2	Εργαστηριακοί μέθοδοι διάγνωσης του CMV	64
10.2.2.1	Ιστολογικός έλεγχος	65
10.2.2.2	Κυτταρολογικός έλεγχος	65
10.2.2.3	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	65
10.2.2.4	Κυτταροκαλλιέργεια	65
10.2.2.5	Ταχεία καλλιέργεια DEAFF	66
10.2.2.6	Ανοσοφθορισμός	66
10.2.2.7	Δοκιμασία αντιγοναιμίας CMV-pp65	67
10.2.2.8	Υβριδισμός	67
10.2.2.9	Ορολογικές τεχνικές	67
10.2.2.9.1	EIA	68
10.2.2.9.2	Δοκιμασία LATEX	68
10.2.2.9.3	ACIF TEST- IFA	68
10.2.2.10	Μοριακές τεχνικές	69
11.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ CMV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	71
12.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	76
12.1	Θεραπεία σε ασθενείς με AIDS	76
12.2	Θεραπεία σε μεταμοσχευμένους ασθενείς	77
12.3	Θεραπεία συγγενούς λοίμωξης	78
12.4	Αντοχή στα αντικά	79
13.	ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΜΒΟΛΙΑ	80
13.1	Παθητική ανοσοποίηση	82
13.2	Εμβόλια έναντι κυτταρομεγαλοϊού	83
II.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.	ΣΚΟΠΟΣ	87
2.	ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ	88

2.1	Υλικό	88
2.2	Μέθοδοι	89
2.2.1	Ανίχνευση αντισωμάτων	89
2.2.1.1	Ανίχνευση CMV-IgM Αντισωμάτων	89
2.2.1.2	Ανίχνευση CMV-IgG Αντισωμάτων	90
2.2.1.3	Προσδιορισμός Συνάφειας των anti-CMV IgG Avidity	91
2.2.2	Μοριακές μέθοδοι	92
2.2.2.1	Συλλογή, Μεταφορά και Αποθήκευση Δειγμάτων	92
2.2.2.2	Προετοιμασία Δειγμάτων και Ορών Ελέγχου (Controls)	93
2.2.2.3	Βασικές Αρχές της Διαδικασίας	94
2.2.2.3.A	Προετοιμασία Δείγματος	95
2.2.2.3.B	Ενίσχυση PCR	96
2.2.2.3.B.1	Επιλογή Στόχου	96
2.2.2.3.B.2	Ενίσχυση Στόχου	96
2.2.2.3.B.3	Επιλεκτική Ενίσχυση	97
2.2.2.3.Γ	Αντίδραση Υβριδισμού	97
2.2.2.3.Δ	Αντίδραση Ανίχνευσης	98
2.2.2.4	Ποσοτικοποίηση του CMV DNA	98
2.2.2.5	Αποτελέσματα	100
2.2.2.5.1	Υπολογισμός Αποτελεσμάτων	100
2.2.2.5.2	Επαλήθευση Ανάλυσης	101
2.2.2.6	Ποιοτικός Έλεγχος	103
2.2.2.6.1	Αρνητικός Ορός Ελέγχου	103
2.2.2.6.2	Θετικοί Οροί Ελέγχου	103
2.3	Επεξεργασία δεδομένων	104
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	105
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	127
III.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ-SUMMARY	135
IV.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κυτταρομεγαλοϊός είναι ο μεγαλύτερος σε μέγεθος από τους ανθρώπινους ερπητοϊούς. Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (human cytomegalovirus-hCMV) είναι αποκλειστικά παθογόνος για τον άνθρωπο και προσβάλλει κατά προτίμηση τα επιθηλιακά κύτταρα. Είναι ευρύτατα διαδεδομένος σε παγκόσμια κλίμακα, βάση στοιχείων από οροεπιδημιολογικές μελέτες, ενώ οι περισσότερες λοιμώξεις δεν διαγιγνώσκονται κλινικά, επειδή ο ιός προκαλεί ήπια ή σχεδόν καθόλου συμπτωματολογία σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς. Σε άλλες περιπτώσεις δε, προκαλεί μια πολύ ήπια συμπτωματολογία, που εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με λοιμώδη μονοπυρήνωση, που προκαλείται από τον ιό Epstein-Barr.

Αν και στο γενικό πληθυσμό η λοίμωξη από hCMV δεν προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία, υπάρχουν συγκεκριμένες ομάδες πληθυσμού όπου ο ιός προκαλεί σοβαρές επιπλοκές όπως: α) μόλυνση εμβρύου από τον ιό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και β) μόλυνση σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, όπως μεταμοσχευμένοι συμπαγών οργάνων ή μυελού των οστών, καθώς και ασθενείς μολυσμένοι με τον ιό HIV.

Τα τελευταία χρόνια ραγδαίες εξελίξεις στις μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και κυρίως η ανάπτυξη ποσοτικών μοριακών τεχνικών, όπως αυτή που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη μας, έχουν μετατραπεί σε τεχνικές γρήγορες, απολύτως ακριβείς και με μεγάλη επαναληψιμότητα. Αυτό έχει συμβάλει σημαντικά στην γρήγορη διάγνωση με ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου, βοηθώντας έτσι στην διαχείριση των ασθενών για έναρξη αλλά και για παρακολούθηση της αντιικής θεραπείας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η διαγνωστική αξία της ποσοτικής PCR για την διάγνωση και παρακολούθηση της ενεργούς λοίμωξης με hCMV, καθώς και η αξιολόγησή της ως ταχεία και αξιόπιστη μέθοδος, τόσο για την διάγνωση των λοιμώξεων που ο ιός αυτός προκαλεί, όσο και για την παρακολούθηση της αντιικής θεραπείας. Συγχρόνως έγινε και η σκιαγράφηση του επιδημιολογικού προφίλ της λοίμωξης από hCMV στην περιοχή μας.

Για την υλοποίηση αυτής της εργασίας παρακινήθηκα από την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου.

Η εργασία αυτή διενεργήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την αδιάκοπη επίβλεψη της.

Θα ήθελα λοιπόν να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση αυτής της μελέτης, όσο και για την εξαιρετική βοήθεια και

υποστήριξη που συνεχώς μου προσέφερε από τη στιγμή της ανάθεσης του θέματος έως και την ολοκλήρωση της διατριβής. Οι παρεμβάσεις της ήταν αποφασιστικές και οι συμβουλές της αποτέλεσαν οδηγό στην πορεία της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της τριμελούς Επιτροπής, τον ομότιμο Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Μαυρίδη Ανέστη και τον ομότιμο Καθηγητή Αιματολογίας κ. Μπουραντά Κωνσταντίνο για την ουσιαστική συμμετοχή τους στην επιτέλεση της διατριβής. Οι συμβουλές τους και η συνεχής τους υποστήριξη υπήρξαν πολύ σημαντικά στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα για το ξεχωριστό ενδιαφέρον, την επιστημονική υποστήριξη, την συνεισφορά της σε θέματα τεχνογνωσίας, καθώς και την ουσιώδη συμβολή της στην τελική διαμόρφωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, όλο το επιστημονικό, τεχνικό και διοικητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και ιδιαίτερα τους κ. Παπαμιχαήλ Δημήτριο, κα Μπομπογιάννη Χαρίκλεια, κ. Μποζίδη Πέτρο και κα Παπανίκου Έφη για την ιδιαίτερη συμπαράστασή τους, καθώς και για τη βοήθεια στη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων.

Πολλές ευχαριστίες επίσης ανήκουν στον Φιλόλογο κ. Σιόντη Κωνσταντίνο που συμμετείχε ενεργά στην διόρθωση των κειμένων της εργασίας μου, καθώς και στην Καθηγήτρια Πληροφορικής κα Θάνου Ελένη για τις πολύτιμες υποδείξεις της στην συγγραφή και ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σωτήριο και Ζωίτσα για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Στους αγαπημένους μου γονείς αφιερώνω αυτή τη μελέτη γνωρίζοντας ότι είναι το λιγότερο που μπορώ να τους προσφέρω ως ανταμοιβή για το ότι ήταν πάντα δίπλα μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* η λοίμωξη με CMV παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα και προκαλεί το σχηματισμό παθολογικών γιγαντοκυττάρων με ενδοπυρηνικά ή κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Αυτά τα έγκλειστα προσομοιάζουν με τα έγκλειστα του απλού έρπητος και του ιού της ανεμοβλογιάς-έρπητος ζωστήρος. Τα χαρακτηριστικά μεγάλα κύτταρα με τα έγκλειστα, που μοιάζουν με «μάτι κουκουβάγιας» και σχετίζονται με τη νόσο των κυτταρομεγαλοϊκών εγκλείστων (cytomegalic inclusion disease- CID), πρωτοαναφέρθηκαν από τον Ribbert σε ένα ιατρικό συνέδριο στη Γερμανία, στο οποίο προέδρευσε ο Dr Leo στις 27 Ιούνη 1881, ο οποίος τα είχε ανιχνεύσει στους νεφρούς ενός θνησιγενούς βρέφους με συμπτωματολογία συγγενούς σύφιλης.¹

Ακολούθως, το 1904 οι Jesionek και Kiolemenoglou ανέφεραν ότι αυτά τα «περίεργα κύτταρα» παρατηρήθηκαν ξανά σε νεφρούς, πνεύμονες και ήπαρ σε άλλη περίπτωση βρέφους με συμπτωματολογία συγγενούς σύφιλης. Αυτά τα κυτταρομεγαλικά κύτταρα τότε θεωρήθηκαν λανθασμένα σαν πρωτόζωα. Δυστυχώς, όταν ο Ribbert είδε την αναφορά των Jesionek και Kiolemenoglou για τα κύτταρα που μοιάζουν με πρωτόζωα, αναδημοσίευσε την αρχική του παρατήρηση υποστηρίζοντας και αυτός την υπόθεση των πρωτόζωων.²

Το 1907, ο Lowenstein περιέγραψε έγκλειστα σε 4 από 30 παρωτιδικούς αδένες που είχαν αφαιρεθεί από παιδιά ηλικίας 2 μηνών ως 2 ετών.^{3,4}

Αργότερα, οι Goodpasture και Talbot σημείωσαν την ομοιότητα αυτών των κυττάρων με τα γιγαντοκύτταρα των δερματικών αλλοιώσεων της ανεμοβλογιάς και θεώρησαν ότι η προκαλούμενη κυτταρομεγαλία ήταν αποτζέλεσμα ενός αντίστοιχου παράγοντα.⁵ Η παρατήρηση ενός παρόμοιου κυτταροπαθολογικού αποτελέσματος κατόπιν λοιμώξεων από ιό του απλού έρπητα, οδήγησε τον Lipschutz κι αργότερα άλλους να επισημάνουν ότι αυτές οι κυτταρικές αλλοιώσεις ήταν μια συγκεκριμένη αντίδραση του ξενιστή στη λοίμωξη με κάποιον ιό.⁶

Η παρατήρηση από τους Cole και Kuttner ότι κύτταρα σιελογόνων αδένων με έγκλειστο από ηλικιωμένα ινδικά χοιρίδια που ήταν μολυσματικά μετά από εμφύτευση κατά προτίμηση στα νεότερα ζώα κατόπιν διόδου τους μέσα από ένα φίλτρο Berkefeld N, οδήγησε στη μετονομασία αυτών των παραγόντων σε: «ιοί των σιελογόνων αδένων».⁷ Οι κυτταρικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν σε ιστοτεμάχια ασθενών με θανατηφόρα λοίμωξη, οδήγησε στη χρήση του όρου: «Νόσος των

μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων» πολύ πριν προσδιοριστεί ο αιτιολογικός παράγων. Η πρώτη απόδειξη ότι ιογενής λοίμωξη σιελογόνων αδένων ήταν σχετικά συχνή και πιθανώς υποκλινική ήρθε από δημοσίευση των Farber και Wolbach. Αυτοί απέδειξαν τυπικά κύτταρα με κυτταρομεγαλικά εγκλείστα σε ένα ποσοστό 12% από 183 νεογνά που πέθαναν από μια ποικιλία μη σχετιζόμενων ασθενειών.⁸

Το 1954, η Margaret Smith πέτυχε να αναπαράγει τον CMV των ποντικών καλλιεργώντας θρεπτικά υλικά με εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικών (murine CMV), χρησιμοποιώντας ένα στέλεχος του ιού που φέρει το όνομά της.⁹

Η χρήση παρόμοιων τεχνικών οδήγησε στην απομόνωση του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus- hCMV) από τρία διαφορετικά εργαστήρια, τους Smith, Rowe, Weller και συνεργάτες τους.^{10,11,3} Η Smith απομόνωσε τον παράγοντα από δύο νεογνά, όπου το ένα πέθανε από γενικευμένη CID. Ο Rowe απομόνωσε 3 είδη CMV από αδενοειδή ιστό παιδιών μετά από εκτομή αδενοειδών εκβλαστήσεων. Το κοινώς χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό στέλεχος (AD 169) προέρχεται από αυτές τις μελέτες. Ο Weller, ανακάλυψε τον ιό σε ούρα και ήπαρ ζωντανών βρεφών με γενικευμένη νόσο κυτταρομεγαλοϊκών εγκλείστων (CID). Ο όρος «κυτταρομεγαλοϊός» προτάθηκε το 1960 από τον Weller και τους συνεργάτες του και αντικατέστησε τους όρους: «νόσος των κυτταρομεγαλοϊκών εγκλείστων» (cytomegalic inclusion disease-CID) και «ιός των σιελογόνων αδένων» οι οποίοι συχνά παραπλανούσαν, μιας και ο ιός συχνά προσβάλλει και άλλα όργανα.¹²

Ακολούθως, χρησιμοποιώντας διάφορες εξετάσεις οι Weller, Hanshaw, και Scott πρώτοι απέδειξαν αντιγονική ετερογένεια ανάμεσα σε στελέχη του hCMV.¹²

Πολλές πληροφορίες που προέρχονται από εργασίες για την απομόνωση του ιού και τη βοήθεια ορολογικών εξετάσεων περιγράφουν την λοίμωξη με hCMV ως μία κοινή, συνήθως υποκλινική λοίμωξη, με αυξημένη συχνότητα σε πολύ νέους, ηλικιωμένους και ανοσοκατασταλμένους. Η περιγραφή δε ότι ο CMV είναι ένας ιός με μεγάλο δεσοξυριβονοκλεϊκό οξύ (DNA) με παρόμοια μορφολογία με τους άλλους ερπητοϊούς, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οδήγησε στην ταξινόμηση του σαν ένα μέλος της οικογένειας των ερπητοϊών.

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (human Cytomegalovirus-hCMV), ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών (Herpes Viridae).

Η οικογένεια Herpesviridae περιλαμβάνει περίπου 100 είδη ιών, μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι περιέχουν δίκλωνο DNA, το δε νουκλεοκαψίδιό τους έχει κυβική συμμετρία και περιβάλλεται από λιποπρωτεϊνικό φάκελο, που προέρχεται από την πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή.^{13,14,15,16} Οκτώ ερπητοϊοί είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο. Στην ίδια οικογένεια περιλαμβάνονται και ιοί παθογόνοι για τα ζώα: τους πιθήκους, από τους οποίους ο Herpes B σπάνια προκαλεί νόσο και στον άνθρωπο, τα βοοειδή, τους χοίρους, τις όρνιθες, τα άλογα και τους ποντικούς. Μερικοί από αυτούς προκαλούν λοιμώξεις με σημαντική οικονομική επιβάρυνση για την κτηνοτροφία και την πτηνοτροφία.¹⁷

Η οικογένεια Herpesviridae διαιρείται σε τρεις υποοικογένειες: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae και Gammaherpesvirinae (Πίνακας 1). Η διάκρισή τους βασίζεται σε βιολογικές ιδιότητες, όπως το φάσμα των ξενιστών και ο τύπος των κυττάρων στα οποία οι ιοί αυτοί κατά κανόνα αναπαράγονται, καθώς και στις φυσικοχημικές διαφορές της δομής και διάταξης των νουκλεοτιδίων του DNA τους.^{13,14}

Τα μέλη της υποοικογένειας Alphaherpesvirinae προκαλούν λοιμώξεις των βλεννογόνων σε ευρύ φάσμα ξενιστών. Μετά τον τοπικό πολλαπλασιασμό τους, οι ιοί αυτοί προσβάλλουν τους αισθητικούς νευρώνες και παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση στα γάγγλια της περιοχής της αρχικής λοίμωξης. Οι ιοί της υποοικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται για τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους (<24 h) σε ευαίσθητα κύτταρα, καθώς και για την πειραματική μόλυνση και άλλων ζώων, εκτός των φυσικών ξενιστών τους. Συχνή είναι η προσβολή από αυτούς του ΚΝΣ. Η υποοικογένεια περιλαμβάνει τα γένη: Simplexvirus (HSV-1, HSV-2, circopithecine herpesvirus 1, bovine mammillitis virus) και Varicellovirus (varicella-zoster virus, pseudorabies virus και equine herpesvirus 1). Αυτοί έχουν το μικρότερο γονιδίωμα.

Η υποοικογένεια Betaherpesvirinae παρουσιάζει ένα πολύ στενό φάσμα ξενιστών. Η πειραματική μόλυνση μη φυσικών ξενιστών είναι πολύ δύσκολη, αν όχι αδύνατη. Ο κύκλος πολλαπλασιασμού τους είναι μεγάλος (1-3 εβδομάδες). Οι ιοί αυτοί αναπτύσσονται “in vitro” κυρίως σε ινοβλάστες που προέρχονται από το φυσικό ξενιστή τους. Η κυτταροπαθογόνος δράση τους είναι χαρακτηριστική

παρουσιάζοντας μεγάλα ενδοπυρηνικά έγκλειστα. Η παραμονή τους σε λανθάνουσα κατάσταση εντοπίζεται στους σιελογόνους αδένες, τα λεμφοκύτταρα, τα νεφρά και άλλους ιστούς. Συνήθως οι ιοί της υποοικογένειας αυτής δεν προσβάλλουν το ΚΝΣ. Στην υποοικογένεια *Betaherpesvirinae* ανήκουν τα γένη *Cytomegalovirus*, *Roseolovirus* και *Muromegalovirus*.^{13,18} Αυτοί έχουν το μεγαλύτερο γονιδίωμα. Οι κυτταρομεγαλοϊοί (*cytomegaloviruses*) περιλαμβάνουν τον ανθρώπινο (*human-hCMV*), του χιμπατζή (*chimpanzee-CCMV*), και τον ρέζους (*rhesus-RhCMV*). Οι *Muromegaloviruses*, περιλαμβάνουν του ποντικού (*mouse-MCMV*) και του ινδικού χοιριδίου (*rat-RCMV*), και οι λιγότερο στενά σχετιζόμενοι *roseoloviruses* περιλαμβάνουν τους ανθρώπινους ερπητοϊούς 6 A, 6B και 7 (*HHV-6A*, *HHV-6B* και *HHV-7*).

Το μέγεθος του γονιδιώματος των β-ερπητοϊών που έχει αποκρυπτογραφηθεί κυμαίνεται από 241 kbp για *chimpanzee cytomegalovirus (CCMV)* ως 145 kbp για τον *HHV-7 roseolovirus*. Το γονιδίωμα του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (*hCMV*) είναι 235.000 bp.¹⁹

Σε αρκετά είδη β-ερπητοϊών η αλληλουχία γονιδίων έχει προσδιοριστεί και είναι διαθέσιμη σε “Genbank” βάσεις δεδομένων.¹⁹ Στον πίνακα 2, φαίνονται αυτά τα είδη των β-ερπητοϊών

Η υποοικογένεια *Gammaherpesvirinae* χαρακτηρίζεται επίσης από ένα πολύ στενό φάσμα ξενιστών. Τα μέλη της πολλαπλασιάζονται κυρίως στα λεμφοκύτταρα και σε ορισμένες περιπτώσεις σε επιθηλιακά ή ινοβλαστικά κύτταρα. Στα λεμφοκύτταρα (B- ή T-λεμφοκύτταρα), ο πολλαπλασιασμός των ιών σταματά σε μια φάση που προηγείται της λύσης τους. Έτσι ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση μέσα στα λεμφοκύτταρα. Η υποοικογένεια αυτή περιλαμβάνει δύο γένη: *Lymphocryptovirus* (*Epstein-Barr virus*) και *Rhadinovirus* [*herpesvirus ateles* και *herpesvirus saimiri* (κερκοπίθηκος)]. Αυτοί έχουν ενδιάμεσο γονιδίωμα.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση και μορφολογία των ερπητοϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο.¹³

Κοινή ονομασία	Άλλη ονομασία	Υπο-οικογένεια	Μέγεθος Γονιδιώματος (kbp)	Νο γονιδιακών ισομερών	Ποσοστό Γουανοσίνης - Κυτοσίνης (%)
Ιοί ανθρώπου					
Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)	Human herpesvirus 1	A	152	4	68,3
Herpes simplex virus type 2 (HSV-2)	Human herpesvirus 2	A	154	4	70,4
Varicella-zoster virus (VZV)	Human herpesvirus 3	A	125	4	46
Epstein-Barr virus (EBV)	Human herpesvirus 4	Γ	172	1	60
Cytomegalovirus (CMV)	Human herpesvirus 5	B	235	1	57,5
Human herpesvirus 6 (HHV6)	-	B	162	1	42,4
Human herpesvirus 7 (HHV7)	-	B	145	1	35,3
Human herpesvirus 8 (HHV8)	Kaposi's sarcoma herpesvirus	Γ	137	1	53,5
Ιοί πιθήκου					
Herpes B virus	Herpesvirus simiae; Cercopithicine herpesvirus 1	A	150	4	74

Πίνακας 2 Μέλη της υποοικογένειας των Β-ερπητοϊών που η αλληλουχία του γονιδιώματός τους έχει αποκρυπτογραφηθεί.¹⁹

Ιοί	Γένος	Γονιδίωμα Τύπος/Μέγεθος(kbp)	Αριθμός σε Βάση Δεδομένων (Gen Bank)
Viruses of humans			
Human herpes Virus 5 (human cytomegalovirus)	Cytomegalovirus	E/~235	AD169:X17403 AC146999 Towne:AC146851 Towne:AY315197 Toledo:AC146905 FIX:AC146907 TR:AC146904 PH:AC146904 Merlin:AY446894
Human herpes virus 6A	Roseolovirus	A/~165	X83413
Human herpes virus 6B	Roselovirus	A/~165	AB021506 AF157706
Human herpes virus 7	Roselovirus	A/~145	AF037218 U43400
Viruses of nonhuman primates			
Chimpanzee cytomegalovirus	Cytomegalovirus	E/~241	AF480884
Rhesus cytomegalovirus	Cytomegalovirus	F/~221	AY186194 DQ120516
Tree shew herpesvirus	Unassigned	F/~196	AF281817
Viruses of rodents			
Mouse cytomegalovirus	Muromegalovrus	A/~235	U68299
Rat cytomegalovirus	Muromegalovirus	A/~230	AF232689

3. ΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. Μορφολογία- Δομή

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (hCMV) έχει τυπική δομή ερπετοϊού και κουβαλά ένα μεγάλο γραμμικό DNA διπλής έλικας. Το πλήρες σωματίδιο του ιού ονομάζεται βίριο (virion) και αποτελείται από μέσα προς τα έξω: από έναν πυρήνα ή πυρηνικό οξύ (core) που περιέχει το DNA, ένα εικοσάεδρο καψίδιο ή πρωτεϊνικό περίβλημα (capsid) με διάμετρο 100 nm περίπου, που περιβάλλεται από ένα περίβλημα που ονομάζεται καλυπτήρια στοιβάδα ή μεμβράνη (tegument). Αυτά τα συστατικά περιπλέκονται σε έναν λιποειδικό φάκελο ή περίβλημα (envelope) που μεταφέρει ένα νούμερο ικά κωδικοποιημένων γλυκοπρωτεϊνών. Το πυρηνικό οξύ με το καψίδιο που το περιβάλλει συνιστούν το νουκλεοκαψίδιο.²⁰ (Εικόνα1,2)

Ο φάκελος αποκτάται κατά πάσα πιθανότητα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής διαδικασίας μέσω της πυρηνικής μεμβράνης, μέσα σε ένα κυτταροπλασματικό κενोटόπιο το οποίο εμπεριέχει τα πρωτεϊνικά συστατικά του φακέλου. Οι ώριμοι λοιμώδεις παράγοντες εξέρχονται των κυττάρων με μια διαδικασία παρόμοια με την αναστροφή πινοκύττωση. Όταν ο CMV αναπαράγεται in vitro, διάφορες μορφολογικά ελλειπείς μορφές του CMV, μπορούν να εμφανιστούν στο κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων κυττάρων, όπως επίσης και στο εξωκυττάριο μέσο. Η γνωστότερη μορφή είναι η καλούμενη «πυκνά σωματίδια» (dense bodies) ενώ η δεύτερη πιο γνωστή και καλά μελετημένη ονομάστηκε «μη λοιμώδη τμήματα περιβαλλόμενα από φάκελο» (non infections enveloped particles). Αυτές οι μορφές, μπορούν να διαχωριστούν από τα βίρια (virions) με την εμφάνιση ή μέσω βιοχημικών δοκιμασιών.²⁰

Τα πυκνά σωματίδια (dense bodies) παράγονται σε νούμερα ισοδύναμα με βίρια. Δεν έχουν καθόλου νουκλεοκαψίδιο και πολλές μελέτες αναφέρουν πως δεν έχουν καθόλου ιικό DNA.²¹

Τα μη λοιμώδη τμήματα περιβαλλόμενα από φάκελο (non infections enveloped particles), μορφολογικά διακρίνονται από τα βίρια στο ότι αποτελούνται από ένα άδειο καψίδιο, περιβαλλόμενο από ένα λιπιδιακό φάκελο.²²

Διάφοροι τύποι ενδοκυτταρικών καψιδίων και νουκλεοκαψιδίων, (λέγονται A, B, και C καψίδια) έχουν περιγραφεί και πιστεύεται αντιπροσωπεύουν φάσεις στην μορφογένεση του βιρίου. Τύπου A καψίδια έχουν έλλειψη DNA, ενώ τύπου B καψίδια περιέχουν ιικό DNA και βρίσκονται στον πυρήνα αλλά δεν είναι ακόμα σε φάκελο.

Τύπου C καψίδια είναι πλήρη νουκλεοκαψίδια. Όλοι αυτοί οι τύποι καψιδίων και τα πυκνά σωμάτια, έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με hCMV.²⁰

Καψίδιο (capsid): Το καψίδιο είναι εικοσαεδρικό και με την ίδια περίπου διάμετρο όπως αυτό του HSV (≈ 110 nm) και παρόμοια αρχιτεκτονική. Προσαρμογή ενός μεγαλύτερου DNA σε ένα καψίδιο παρόμοιας διαμέτρου επιτυγχάνεται περιορίζοντας την ώριμη πρωτεάση (pUL80a) από το εσωτερικό των CMV καψιδίων.^{23,24}

Το καψίδιο συντίθεται από τέσσερις πλήρεις πρωτεΐνες που είναι οργανωμένες σε 162 καψομερίδια και 320 τριπλέτες που είναι τοποθετημένες ανάμεσα στα καψομερίδια.²² (Εικόνα1,2)

Για τον hCMV, οι τέσσερις αυτές πρωτεΐνες είναι: η βασική πρωτεΐνη καψιδίου (major capsid protein-MCP:UL86), η ελάχιστη πρωτεΐνη καψιδίου (minor capsid protein-mCP:UL85), η ελάχιστη πρωτεΐνη καψιδίου- συνδεδεμένη πρωτεΐνη (minor capsid protein-binding protein: mC-BP:UL46) και η μικρότερη πρωτεΐνη καψιδίου (smallest capsid protein SCP:UL48A).²¹

Σε αναλογία με τον HSV-1, μία από τις θέσεις των πενταμερών μοιράζεται ή καταλαμβάνεται από ένα πυλαίο σύμπλοκο που αποτελεί ένα εξειδικευμένο πεντάνιο και χρησιμοποιείται για ενθυλάκωση του DNA του ιού.

Τα βασικά συστατικά του καψιδίου είναι τα καψομερίδια (capsomeres) που αποτελούνται από πεντόνια και εξόνια. Αυτές οι μεγάλες δομές συντίθενται από 5 ή 6 αντίγραφα από την MCP. Συνολικά, υπάρχουν 150 εξόνια που καταλαμβάνουν θέσεις στην τοπική συμμετρία και 12 πεντόνια που είναι τοποθετημένα στην κορυφή της εικοσαδρικής συμμετρίας.²⁰

Καλυπτήρια στοιβάδα ή μεμβράνη (Tegument): Φαίνεται να είναι μια σχετική άμορφη περιοχή που βρίσκεται μεταξύ του καψιδίου και του φακέλου. Περιέχει τις περισσότερες από τις ιικές πρωτεΐνες, καθώς και μια επιλογή ιικού και κυτταρικού RNA και αντιπροσωπεύει περίπου το 40% της συνολικής ιικής μάζας, όπως επίσης και τη συντριπτική πλειοψηφία της μάζας των πυκνών σωμάτων. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται εδώ πραγματοποιούν ένα εντυπωσιακά ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων κατά τη διάρκεια της λοίμωξης και τείνουν να είναι φωσφορυλιωμένες και άκρως ανοσοποιητικές. Η φωσφορυλίωση μπορεί να διευκολύνει τη σταθερή σύνδεση και ενσωμάτωση σε αυτό το διαμέρισμα το ιού.²¹

Σύνδεση με RNA δεσμευτικές πρωτεΐνες,²⁵ όπως επίσης και αρνητικό φορτίο, προφανώς παίζουν ρόλο για την ένταξη του RNA στην καλυπτήριο μεμβράνη, ένα

κοινό στοιχείο και σε άλλους ερπετοϊούς.²⁶ Πολλά από τα συστατικά που εντοπίζονται σε αυτό το διαμέρισμα δεν έχουν υποβληθεί σε ενδελεχείς αναλύσεις. Αρκετές ερπετοϊικές βασικές και συγκεκριμένες δομικές πρωτεΐνες θεωρούνται συστατικά καλυπτήριας μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στην καλυπτήρια μεμβράνη είναι η πρωτεΐνη pp65(προϊόν γονιδίου UL83) σε 15%, ο ιϊκός διαενεργοποιητής (virion transactivator-VTA) pp71(προϊόν γονιδίου UL32) σε 9%, η πρωτεΐνη ωρίμανσης πυρήνα του ιού pp150 (προϊόν γονιδίου UL32) σε 9%, καθώς και η μεγαλύτερη πρωτεΐνη καλυπτήριας μεμβράνης (Large Tegument Protein-LTP) (προϊόν γονιδίου UL48) στο 9% της μάζας του ιοσώματος.²⁷ Η πιο μεγάλη οικογένεια γονιδίων που εκπροσωπούνται στην καλυπτήρια μεμβράνη είναι η US22 οικογένεια, ενώ UL23, UL24, UL36, UL43, IRS1, US22, TRS1 γονιδιακά προϊόντα, είναι όλα σχετιζόμενα με την καλυπτήρια μεμβράνη. Ένα σημαντικό ιικό ένζυμο, η ιϊκή πρωτεΐνη κινάση (Viral Protein kinase-VPK), (προϊόν γονιδίου UL97), είναι μία μικρή πρωτεΐνη καλυπτήριας μεμβράνης.²¹ Τα πολύ χαλαρά κριτήρια και η άμορφη εμφάνιση όπως φαίνεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αποδεικνύει ότι η καλυπτήρια μεμβράνη δεν είναι ιδιαίτερα δομημένη. Τα συστατικά της καλυπτήριας μεμβράνης εφάπτονται σε συγκεκριμένα σημεία με το καψίδιο, το φάκελο, καθώς και μεταξύ τους. Ωστόσο, ορισμένες μεγάλες πρωτεΐνες καλυπτήριας μεμβράνης φαίνεται να μη παίζουν διαρθρωτικό ρόλο και μπορεί να διαγραφούν με μη εμφανή επίδραση στην ιϊκή αντιγραφή ή στην οργάνωση της καλυπτήριας μεμβράνης. Πράγματι, διαγραφή του σημαντικότερου συστατικού, UL83-κωδικοποιημένη pp65, δεν μεταβάλλει την ιϊκή μορφολογία ή το σχηματισμό άλλης πρωτεΐνης της καλυπτήριας μεμβράνης, αλλά εξαλείφει τον σχηματισμό πυκνού σώματος.²¹ Αυτή η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο παρόν ιικό διαμέρισμα χωρίς να υπηρετεί τον πυρήνα ή να συμβάλει στην οργάνωση της καλυπτήριας μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες της καλυπτήριας μεμβράνης που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την είσοδο ή την ωρίμανση, εμπίπτουν σε δύο λειτουργικές κατηγορίες, οι οποίες δεν είναι απαραίτητο να αλληλοαποκλείονται. Η πρώτη τάξη παίζει διαρθρωτικούς ρόλους και είναι σημαντική για τη συναρμολόγηση των ιοσωμάτων και την αποσυναρμολόγηση του σωματιδίου κατά την είσοδο. Αυτές οι υπηρεσίες μπορούν να συμμετέχουν από τα πρώτα κιόλας βήματα της μη επικάλυψης και της απελευθέρωσης του ιϊκού γονιδιώματος στον πυρήνα ή στα τελευταία στάδια της αναπαραγωγής για ενθυλάκωση (encapsidation) των απογόνων του DNA του ιού, την έξοδο από τον πυρήνα και κυρίως την τελική επικάλυψη και έξοδο από το κυτταρόπλασμα. Η

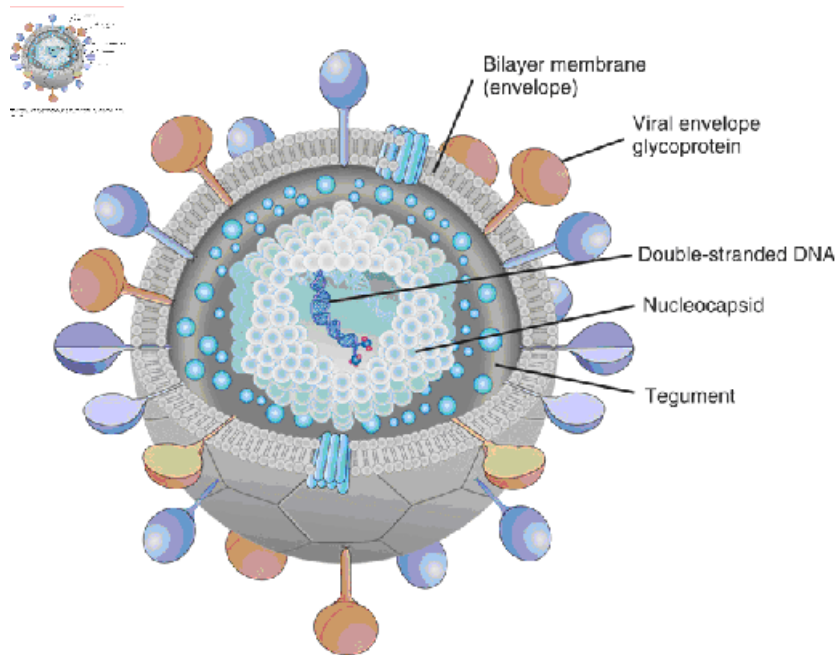
δεύτερη κατηγορία προσαρμόζει την κυτταρική απάντηση του ξενιστή στην μόλυνση, αδρανοποιώντας τους κυτταρικούς μηχανισμούς μεταγραφής του ξενιστή, κλειδώνοντας την εγγενή άμυνα του ξενιστή, αλλοιώνοντας το κύτταρο ξενιστή και βελτιστοποιώντας το ενδοκυτταρικό περιβάλλον για την αναπαραγωγή του ιού.^{28,29,30,31,32}

Φάκελος ή περίβλημα (Envelope): Η τελική πηγή του φακέλου του ιού ή του πυκνού σωματίου είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο. Πολλά γονίδια του hCMV κωδικοποιούν γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης. Λίγες όμως έχουν ταυτοποιηθεί ως στοιχεία του βιρίου. Οι πιο κρίσιμες λειτουργικά hCMV γλυκοπρωτεΐνες φακέλου αποτελούν τρία ξεχωριστά συγκροτήματα και έχουν ονομαστεί gCI, gCII, και gCIII.²⁰

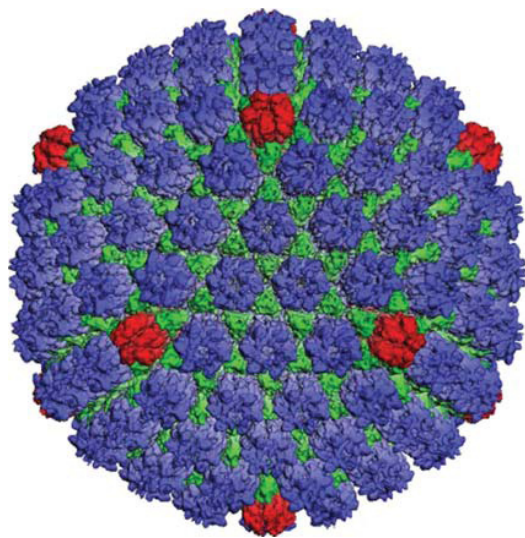
gCI συντίθεται από ομοδιμερή της γλυκοπρωτεΐνης B (gB:UL55), έναν τύπο I πλήρη μεμβρανική πρωτεΐνη. Η gB διαιρείται από την φουρίνη σε δύο μέρη (gp55 και gp116), που παραμένουν σχετιζόμενες. Η gB, που υπάρχει ως δισουλφίδιο-συνδεδεμένο ομοδιμερές στον φάκελο, είναι μια από τις πιο βασικές πρωτεΐνες. Συμβάλλει ουσιαστικά στην αρχική αλληλεπίδραση με ηπαρινούχο θειικό άλας, καθώς και στα μεταγενέστερα στάδια κατά τη δέσμευση και είσοδο των ιών, στην κύτταρο με κύτταρο μεταφορά και στη σύντηξη κυττάρων που έχουν μολυνθεί. Η gB αποτελεί μείζονα στόχο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων και έχει μελετηθεί ως υπομονάδα υποπήφια για εμβόλιο.^{21,33,34,35}

gCII περιλαμβάνει δύο πρωτεΐνες: gM (UL100), έναν τύπο III πρωτεΐνη μεμβράνης και gN (UL73), έναν τύπο I πρωτεΐνη μεμβράνης.²⁰ Το γεγονός ότι και τα δύο γονίδια είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή υποδηλώνει ότι αυτό το σύμπλοκο μπορεί να συνεισφέρει στην αρχική αλληλεπίδραση του ιοσώματος με την κυτταρική επιφάνεια. Η gM αποτελεί ως και το 10% της μάζας του ιοσώματος, καθιστώντας την ως την πιο άφθονη πρωτεΐνη του φακέλου ενώ η gN είναι παρούσα μόνο στο 1% των gM επιπέδων, γεγονός που υποδηλώνει ότι το περισσότερο gM είναι μη συνδεδεμένο.^{36,37} Μεγάλα τμήματα της gM μεμβράνης που εκτείνονται σε πολλαπλά πολυπεπτίδια είναι περιττά για το σχηματισμό του συμπλόκου gM:gN.³⁷

gCIII περιλαμβάνει ένα σύμπλοκο της gH (UL75) και gL (UL115). Αυτό εμφανίζεται σε όλους τους ερπητοϊούς και έχει αναφερθεί ότι παίζει ρόλο στη σύντηξη. Η gH απαιτεί την gL ως συνοδό για να μεταφραστούν σωστά εντός των κυττάρων. Επίσης, ένα σύμπλοκο από αυτές τις πρωτεΐνες μαζί με ένα τρίτο συστατικό, το gO(UL74), φαίνεται να παίζει ένα μικρό ρόλο στην ιϊκή αντιγραφή σε ινοβλάστες.²¹

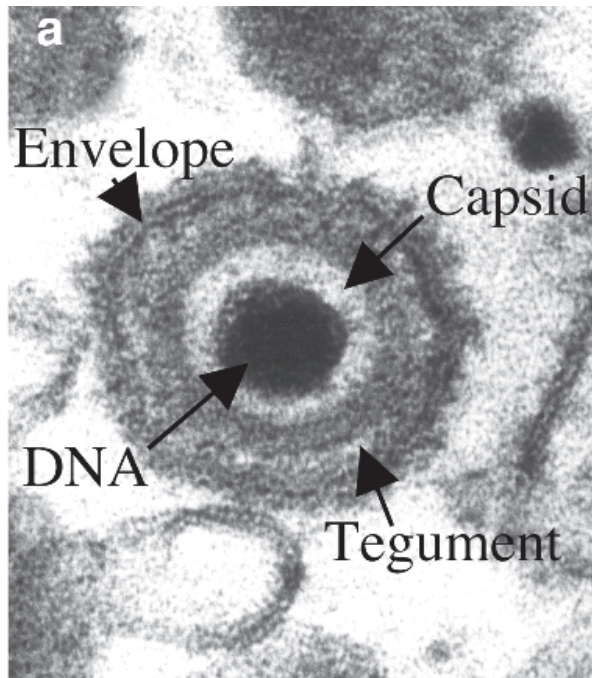


Σχηματική παράσταση Βιρίου. Διπλής έλικας DNA (Double-stranded DNA) στο κέντρο του σωματιδίου, περικλείεται από ένα εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid). Πρωτεΐνες της καλυπτήριας στοιβάδας (tegument), βρίσκονται ανάμεσα στο καψίδιο και στην μεμβράνη, ενώ ιικές γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου (viral envelope glycoprotein), προέρχονται από την λιπιδική μεμβράνη του βιρίου.³⁸

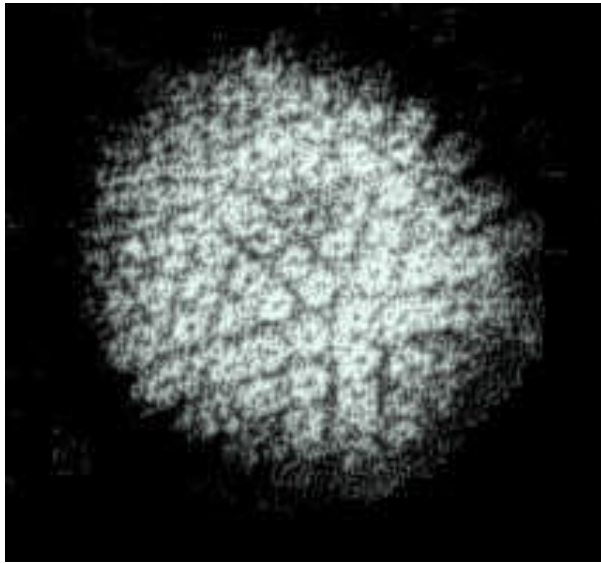


Σχηματική παράσταση καψιδίου, όπως περιγράφεται στο κείμενο (Μπλε: εξαμερή, κόκκινα: πενταμερή, πράσινα: τριπλέτες).³⁹

ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική απεικόνιση Βιρίου-Καψιδίου hCMV.



Πλήρες σωματιδίου του ιού hCMV (βίριο).²²



Νουκλεοκαψιδίου hCMV²⁰

ΕΙΚΟΝΑ 2: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του hCMV

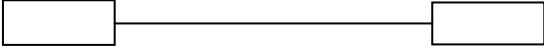
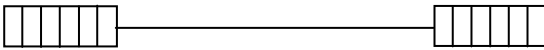
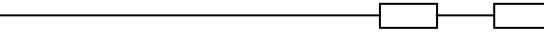
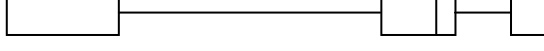
4. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

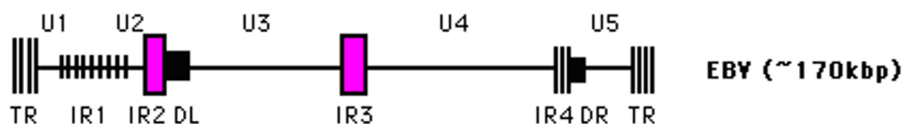
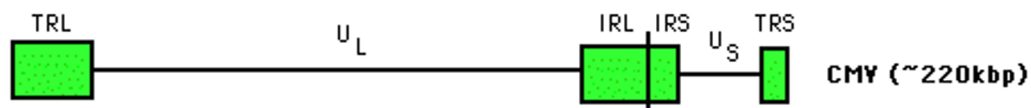
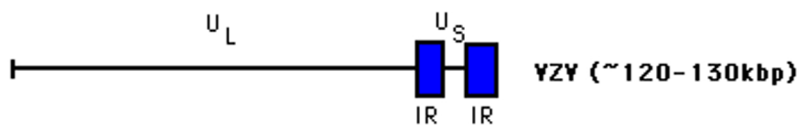
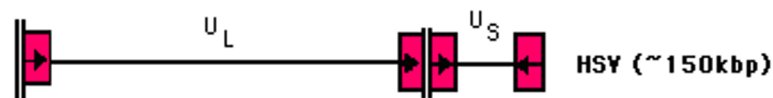
Η δομή του γονιδιώματος των ερπητοϊών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μοναδικών αλληλουχιών (unique sequences) και αντίστροφων, συμπληρωματικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repeated sequences), ανάλογα με τις οποίες οι ανθρώπινοι ερπητοϊοί μπορούν να διαιρεθούν σε πέντε ομάδες Α έως Ε (Εικόνα 3,4)¹⁴

- Η **ομάδα Α** παρουσιάζει μια μόνο ομάδα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα δύο άκρα του DNA διατεταγμένη με την ίδια φορά (HHV6 και HHV7).
- Η **ομάδα Β** παρουσιάζει πολλές επαναλήψεις μιας ομάδας αλληλουχιών στα δύο άκρα του DNA διατεταγμένων με την ίδια φορά (HHV8).
- Η **ομάδα C** παρουσιάζει πολλές επαναλήψεις μιας ομάδας αλληλουχιών στα άκρα του DNA διατεταγμένων με την ίδια φορά, καθώς και ποικίλο αριθμό επαναλήψεων διαφορετικών αλληλουχιών στο εσωτερικό του DNA διατεταγμένων με την ίδια φορά, όπως και οι αλληλουχίες των άκρων (EBV).
- Η **ομάδα D** παρουσιάζει μια μόνο ομάδα τελικών αλληλουχιών επαναλαμβανόμενη αντίστροφα και συμπληρωματικά στο εσωτερικό του DNA και πιθανόν, μια υπο-ομάδα τελικών αλληλουχιών επαναλαμβανόμενη στα δύο άκρα του DNA διατεταγμένη με την ίδια φορά (VZV).
- Η **ομάδα Ε** παρουσιάζει μια μόνο ομάδα τελικών αλληλουχιών στα δύο άκρα και αντίστροφα συμπληρωματικών στο εσωτερικό του DNA (HSV-1 και -2, CMV)

ΕΙΚΟΝΑ 3: Οργάνωση του DNA των πέντε γονιδιακών τύπων των ανθρώπινων ερπητοϊών.

Τα ορθογώνια επισημαίνουν τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και οι γραμμές τις μοναδικές αλληλουχίες. Μερικές από τις επαναλαμβανόμενες περιοχές αποτελούνται από πολλαπλά αντίγραφα της ίδιας αλληλουχίας, όπως αυτό επισημαίνεται με τα κάθετα μοιρασμένα ορθογώνια.¹⁴

Γονιδιακός Τύπος	Οργάνωση DNA	Είδος ερπητοϊού
A		HHV6 & HHV7
B		HHV8
C		EBV
D		VZV
E		HSV-1, -2 & CMV

**ΕΙΚΟΝΑ 4: Οργάνωση και μέγεθος του DNA των γονιδιακών τύπων των σημαντικότερων ανθρώπινων ερπητοϊών.**

Οργάνωση του DNA των γονιδιακών τύπων των σημαντικότερων ανθρώπινων ερπητοϊών. Τα ορθογώνια επισημαίνουν τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και οι γραμμές τις μοναδικές αλληλουχίες. Μερικές από τις επαναλαμβανόμενες περιοχές αποτελούνται από πολλαπλά αντίγραφα της ίδιας αλληλουχίας, όπως αυτό επισημαίνεται με τις κάθετες επαναλαμβανόμενες γραμμές (www.CMV.genome.images).

4.1. Γονιδίωμα ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (hCMV)

Το γονιδίωμα του hCMV αποτελείται από ένα γραμμικό, διπλής έλικας DNA (235 kbp στον άγριο τύπο), το μεγαλύτερο ανάμεσα σε ανθρώπινους ερπητοϊούς και επίσης μεγαλύτερο κατά 50% από ότι αυτό του ιού του απλού έρπητος τύπου 1 (HSV-1).

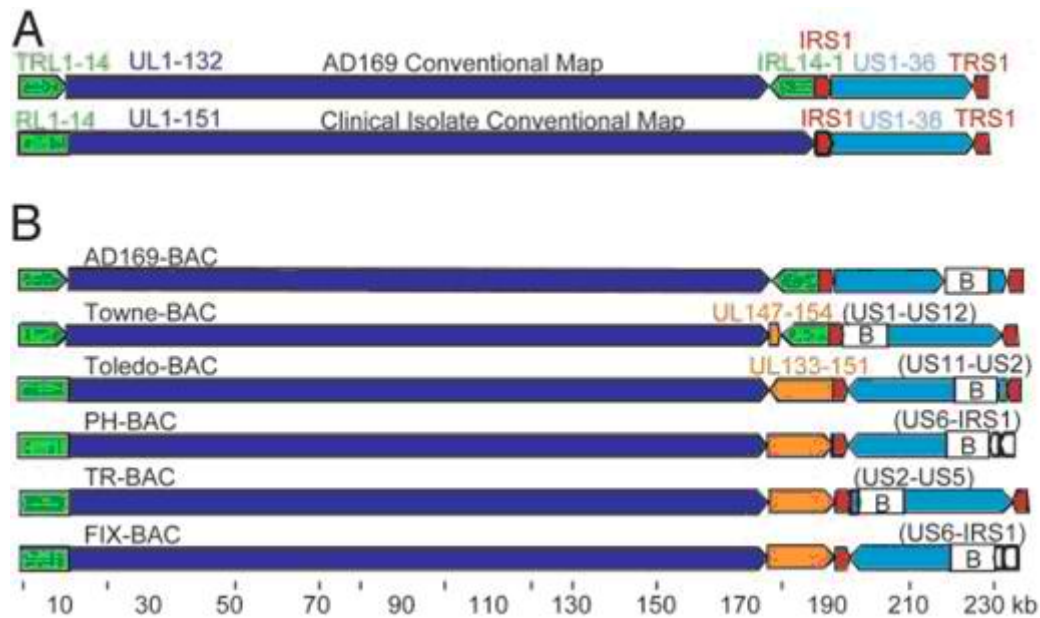
Το γονιδίωμα του hCMV έχει μια οργάνωση τάξης E, όπως ονομάζεται, με δύο περιοχές που μπορούν να αναστραφούν σχετικά μεταξύ τους, παρέχοντας ίσα ποσά από 4 γονιδιακά ισομερή, που μπορούν να απομονωθούν από ιικά σωματίδια.¹⁸ Οι δύο περιοχές είναι γνωστές ως μεγάλη και μικρή περιοχή (Long and Short). Η κάθε περιοχή αποτελείται από μία κεντρική μοναδική περιοχή μεγάλη (Unique long, UL) και μικρή (Unique short, US), οι οποίες συνδέονται με εσωτερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (internal repeat sequences, IRL και IRS). Στα άκρα των μοναδικών περιοχών βρίσκονται οι τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (terminal repeats, TRL και TRS). Συνολικά το γονιδίωμα του hCMV έχει τη γενική οργάνωση: TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS.¹⁹ (Εικόνα 5,6)

Η περιοχή TRL συντίθεται από a_{π} και b αλληλουχίες, η περιοχή IRL-IRS περιέχει τις αλληλουχίες $b' a_{\pi} c'$ και η περιοχή TRS περιέχει τις αλληλουχίες c και a_{π} . Έτσι, οι επαναλήψεις οργανώνονται ως εξής: $a_{\pi} b$ -UL- $b' a_{\pi} c'$ -US- $c a_{\pi}$. Οι τελικές αλληλουχίες a_{π} μπορούν να ανασυνδυαστούν με εσωτερικές αλληλουχίες a_{π}' παρέχοντας τον ισομερισμό του hCMV γονιδιώματος. Η χρησιμότητα του ισομερισμού δεν είναι ακόμα κατανοητή.¹⁹

Τα γονιδιώματα των κυτταρομεγαλοϊών περιέχουν *cis*- ενεργά στοιχεία που απευθείας αντιγράφουν, πακετάρουν και μεταγράφουν DNA. Για τον hCMV, η αντιγραφική αρχή *ori*lt έχει βρεθεί ότι είναι μια περιοχή 1500bp που βρίσκεται περίπου στο μέσο της UL περιοχής.⁴⁰ Μέχρι τώρα αντίστοιχες μεταγραφικές περιοχές σχετιζόμενες με τη λανθάνουσα κατάσταση δεν έχουν βρεθεί. Είναι πιθανό ότι το κυκλικό DNA σε λανθάνουσα κατάσταση αντιγράφεται μηχανικά ξεκινώντας σε τυχαία σημεία του γονιδιώματος, ή να μην αντιγράφεται καθόλου κατά τη λανθάνουσα κατάσταση.¹⁹

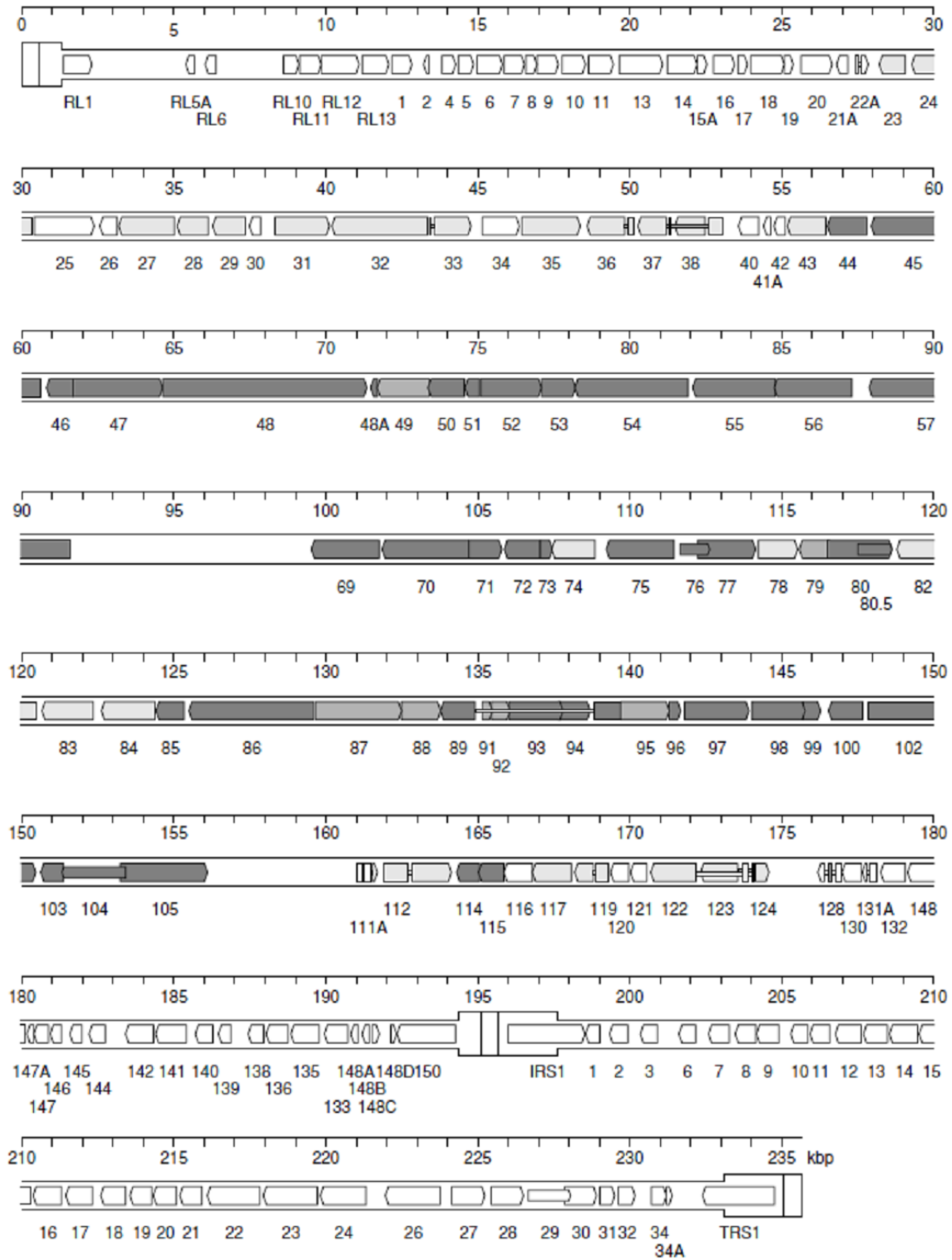
Τα α τμήματα του hCMV συντίθενται από πολλαπλές επαναλήψεις των α αλληλουχιών που περιέχουν δύο *cis*- ενεργά τμήματα για τη συσκευασία (packaging), τα *pac1* και *pac2*. Ο αριθμός των α επαναλήψεων ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα στελέχη. Μια ποικιλία μεταγραφικών περιοχών έχει περιγραφεί για το γονιδίωμα του

hCMV, με σημαντικότερες την μεγάλη (large) περιοχή και το μέγιστο σύμπλοκο ενίσχυσης των άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών (immediate early proteins, IE). Αυτό βρίσκεται στην UL περιοχή και φαίνεται να παίζει ένα ρόλο στην έκφραση των ιικών γονιδίων στην αρχή της λοίμωξης.¹⁹



ΕΙΚΟΝΑ 5: Σχηματική απεικόνιση γονιδιώματος διαφόρων τύπων hCMV

Γονιδίωμα διαφόρων τύπων hCMV όπου φαίνεται η τάξης E οργάνωση και η διαφορά στο μέγεθος του γονιδιώματος του κάθε είδους.⁴¹



ΕΙΚΟΝΑ 6: Γονιδίωμα άγριου τύπου hCMV

Γενετικό περιεχόμενο άγριου τύπου hCMV βασισμένο στην αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος του στελέχους Merlin.⁴² Οι ανεστραμμένες επαναλήψεις TRL/IRL και TRS/ IRS απεικονίζονται ως ορθογώνια και πιο παχιές από ότι τα τμήματα UL και US.²⁰

5. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η αναπαραγωγή του hCMV μοιάζει πολύ με την αναπαραγωγή του ιού του απλού έρπητος με μόνη διαφορά ότι είναι πολύ πιο αργή και περιλαμβάνει έξι στάδια: την προσρόφιση, τη διείσδυση, την απέκδυση, τη σύνθεση, τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση.^{21,15}

Κατά το στάδιο της προσρόφισης, ο ιός προσκολλάται με τις γλυκοπρωτεΐνες της επιφανείας του σε ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι υπάρχουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Οι κυτταρικοί αυτοί υποδοχείς δεν είναι γνωστοί, όπως είναι για τον ιό Epstein-Barr (EBV), που συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα του C3d κλάσματος του συμπληρώματος.⁴³ Για τον ιό του hCMV οι γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας gB, gH:gLπιθανώς με gO και gM:gN φαίνεται να παίζουν ρόλο στην είσοδό του στα κύτταρα ξενιστές.²¹

Μετά την προσκόλληση στους ειδικούς υποδοχείς, η διείσδυση του ερπητοϊού στο κύτταρο επιτυγχάνεται με τη σύντηξη του ελύτρου του με την κυτταρική μεμβράνη. Το νουκλεοκαψίδιο απελευθερώνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα (στάδιο απέκδυσης) και το νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ακολουθεί το στάδιο της σύνθεσης. Προϊόντα των γονιδίων του hCMV UL47, UL48 και SCP ίσως μεσολαβούν κατά την μεταφορά σε μικροσωληνάρια, χτυπώντας στους πυρηνικούς πόρους και απελευθερώνοντας το ιϊκό DNA στον πυρήνα. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την αναπαραγωγή του πυρηνικού οξέος, που γίνεται στον πυρήνα, και τη σύνθεση των πρωτεϊνών του ιού, που γίνεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν, ανάλογα με το χρόνο σύνθεσής τους, σε τρεις ομάδες: α, β και γ. Η σύνθεσή τους είναι ρυθμισμένη κατά συντονισμένο τρόπο και χρονικά διατεταγμένη υπό μορφή καταρράκτη (cascade fashion).^{13,14}

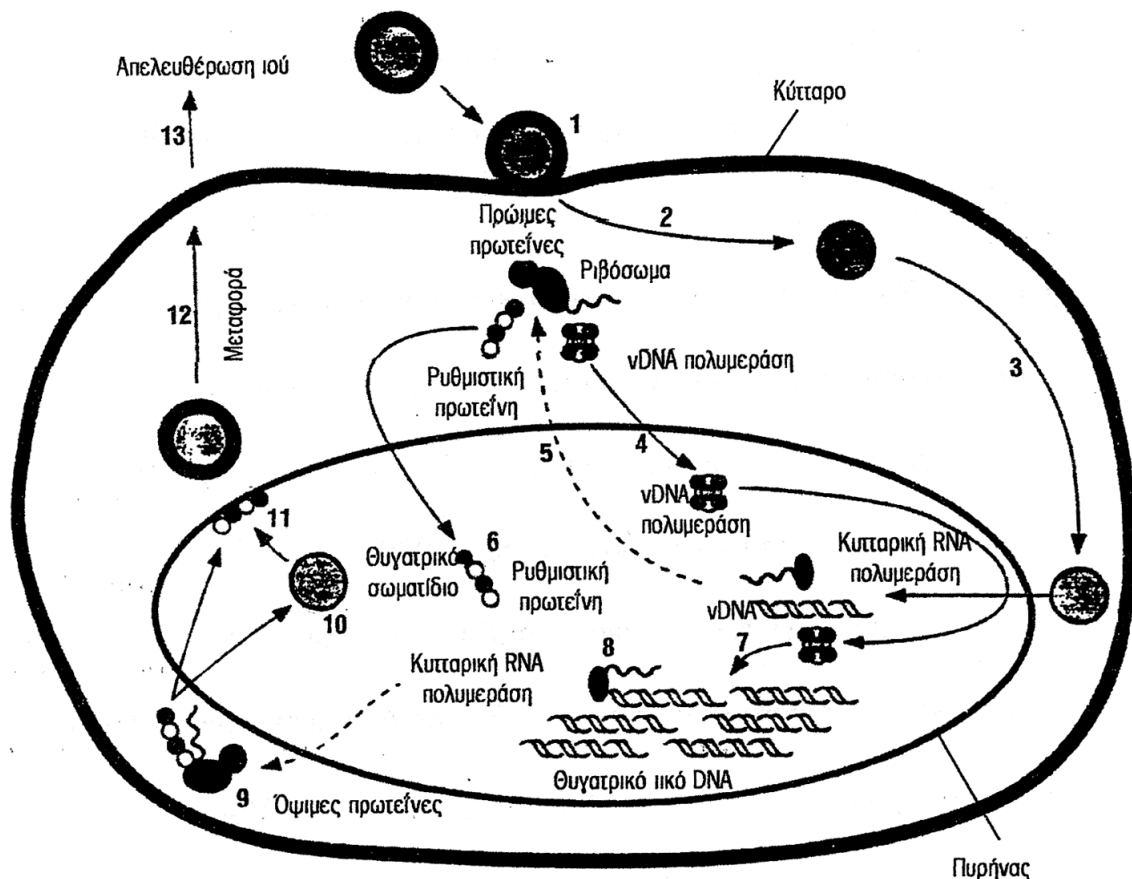
Η μεταγραφή του DNA αρχίζει με τις κυτταρικές DNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και το mRNA μεταναστεύει στο κυτταρόπλασμα όπου μεταφράζεται. Αρχικά, ένα μέρος του ιϊκού γονιδιώματος μεταγράφεται και μεταφράζεται για την παραγωγή των α ή άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών (immediate early proteins, IE). Πρόκειται για πρωτεΐνες ρυθμιστικές, οι οποίες αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού DNA και των κυτταρικών πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα προάγουν τη σύνθεση των β πρωτεϊνών και ασκούν αρνητικό έλεγχο στη δική τους σύνθεση. Το μέγιστο της σύνθεσης των α πρωτεϊνών τοποθετείται 2-4 ώρες μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή.

Οι β ή πρώιμες πρωτεΐνες (delayed early proteins, DE) απαιτούν για τη βιοσύνθεσή τους την παρουσία στα μολυσμένα κύτταρα λειτουργικών α πρωτεϊνών. Η σύνθεσή τους ξεκινά σε 6 ώρες και συνεχίζεται ως 18-24ώρες μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Αυτές αναστέλλουν τη σύνθεση των α και προάγουν τη σύνθεση των γ πρωτεϊνών.²¹

Τέλος, οι γ ή όψιμες πρωτεΐνες (late proteins, L) αποτελούν τις δομικές πρωτεΐνες του βιρίου. Η μετάπτωση της σύνθεσης από β σε γ πρωτεΐνες απαιτεί την μεταγραφή του ιικού DNA με την παρουσία λειτουργικών α και β πρωτεϊνών. Οι γ πρωτεΐνες παράγονται μετά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Η σύνθεσή τους ξεκινά 24-36 ώρες μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή με μέγιστα επίπεδα σε 72-96 ώρες. Μια ρυθμιστική πρωτεΐνη του πυρήνα (UL69) και διάφορες ειδικές πρωτεΐνες στο βίριο (προϊόντα γονιδίων UL82, UL36, TRS1/IRS1) εκφράζονται ως άμεσα πρώιμες (immediate early proteins, IE) ή ως πρώιμες (delayed early, DE) στο βίριο (προϊόντα γονιδίων, UL34, UL35, UL112-113), και εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταγραφής. Η αναδίπλωση του DNA (DNA replication) εξαρτάται από διάφορες πρωτεΐνες του πυρήνα (προϊόντα γονιδίων UL44, UL54, UL57, UL70, UL102, UL105, UL96, UL114, UL84) Η συναρμολόγηση των νουκλεοκαψιδίων γίνεται στον πυρήνα. Η συναρμολόγηση του καψιδίου (capsid assembly), χρησιμοποιεί λειτουργίες του πυρήνα (MCP, TRII, TR12, SCP, PORT και paP). Τα προσχηματισμένα καψίδια μετατοπίζονται σε θέση αναδίπλωσης του DNA όπου διάφορες πρωτεΐνες (προϊόντα γονιδίων UL51, UL56, UL77, UL80.5, UL85, UL89, UL93, UL95, UL97, UL103) είναι πιθανό να συμμετέχουν στην ενκαψίδωση του DNA (DNA encapsidation). Τα νουκλεοκαψίδια περιβάλλονται από έλυτρο κατά την εκβλάστησή τους μέσω των πετάλων της πυρηνικής μεμβράνης. Έξοδος από τον πυρήνα (Nuclear egress) ελέγχεται από τα γονιδιακά προϊόντα UL50 και UL53. Η πορεία των ιών συνεχίζεται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων ή με τη συσκευή του Golgi προς τον εξωκυττάριο χώρο. Κατά την πορεία αυτή, το βίριο καθώς διέρχεται μέσω των ανωτέρω μεμβρανών συμπληρώνει την απόκτηση του λιπογλυκοπρωτεϊνικού του ελύτρου και απελευθερώνεται στο περιβάλλον με ανάστροφη φαγοκύτωση ή με τη συσκευή του Golgi.^{13,14,21} Κυτταροπλασματική έξοδος και δευτεροπαθής (τελική) φακελοποίηση (envelopment) ελέγχεται από τα γονιδιακά προϊόντα UL47, UL48, UL71, UL88, UL94, UL97, UL99. (Εικόνα 7,8).²¹

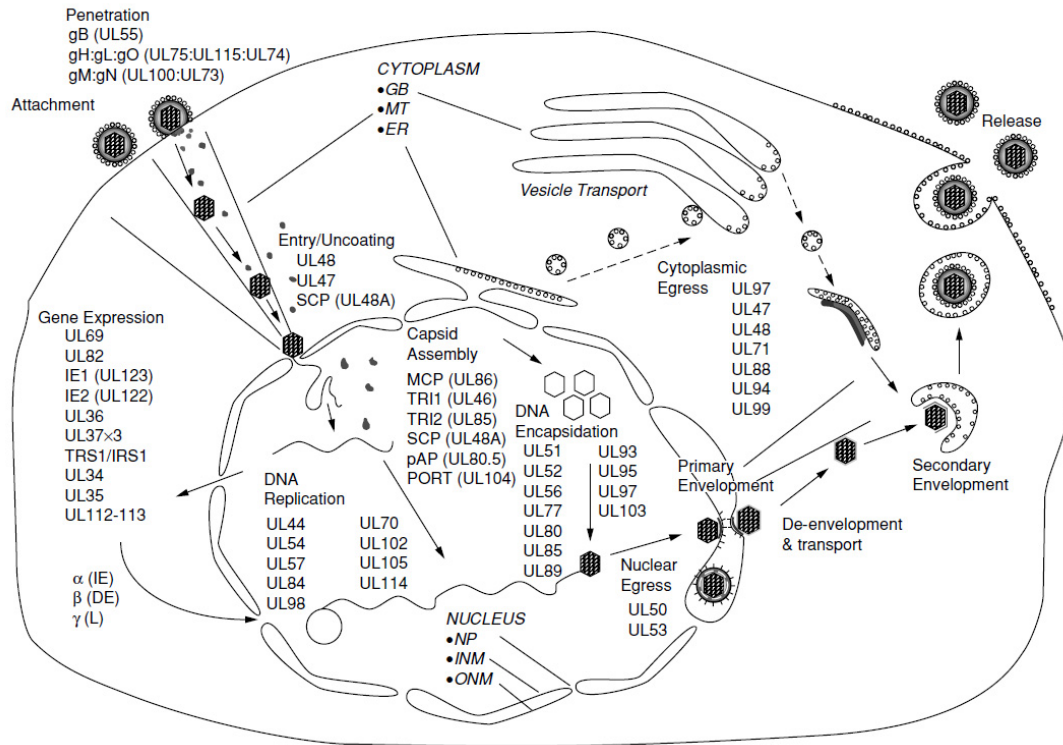
6. ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Ο ιός είναι ευαίσθητος στα απολυμαντικά όπως: υποχλωριώδες νάτριο 1%, φορμαλδεΰδη 2%, γλουταραλδεΰδη 2% και αιθανόλη 70%. Επίσης αδρανοποιείται στους 50-60 °C μετά από έκθεση για τουλάχιστον 30 min, στην υπεριώδη ακτινοβολία, στο χαμηλό pH και σε μερικούς κύκλους επαναλαμβανόμενης κατάψυξης-απόψυξης. Στη θερμοκρασία δωματίου παραμένει σταθερός για λίγες ημέρες.⁴⁴



ΕΙΚΟΝΑ 7: Σχηματική παράσταση κύκλου αναπαραγωγής ερπητοϊού.

Μετά την προσρόφηση στο κύτταρο ξενιστή (1), ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο (2). Το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρεται στην πυρηνική μεμβράνη (3) και το ιικό νουκλεϊκό οξύ (DNA) απελευθερώνεται στον πυρήνα, όπου αρχίζει η μεταγραφή του από την κυτταρική DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (4). Μετάφραση του γονιδιώματος οδηγεί στο σχηματισμό των πρώιμων πρωτεϊνών (5). Ακολουθεί σύνθεση θυγατρικών DNA αλυσίδων (6, 7, 8). Μέρος του θυγατρικού DNA μεταφράζεται σε όψιμες πρωτεΐνες (9), που χρησιμοποιούνται για τη συναρμολόγηση του θυγατρικού ιικού σωματιδίου (10), το οποίο εκβλαστώνει δια μέσου της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης (11), αποκτώντας φάκελο. Ακολουθεί μεταφορά του ώριμου πλέον ιικού σωματιδίου στο κυτταρόπλασμα (12) και απελευθέρωση του (13).^{15,16}



ΕΙΚΟΝΑ 8: Κύκλος αναπαραγωγής του hCMV με τα διάφορα γονιδιακά προϊόντα

Στο σχήμα φαίνεται η λειτουργία της αναπαραγωγής, όπως περιγράφεται στο κείμενο, με τα διάφορα γονιδιακά προϊόντα. Η προσκόλληση και διείσδυση (Attachment and Penetration) στο κύτταρο γίνεται με την βοήθεια των gB (UL 55), gH:gL:gO (UL 75:UL 115:UL 74) και gM:gN (UL 100:UL73). Τα γονιδιακά προϊόντα UL 48, UL 47 και SCP (UL 48A) ίσως μεσολαβούν κατά την μεταφορά στον πυρήνα σε μικροσωληνίσκους. Μια ρυθμιστική πρωτεΐνη (UL 69) και διάφορες ειδικές πρωτεΐνες (UL 82, UL 36, TRS 1/IRS1) εκφράζονται ως άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες (immediate early, IE) (HCMV IE1, IE2, UL37X3 γονιδιακά προϊόντα) ή εκφράζονται ως πρώιμες (delayed early, DE) (UL 34, UL 35, UL 112-113 γονιδιακά προϊόντα) και εμπλέκονται στην μετάφραση. Η αναδίπλωση του DNA (DNA replication) εξαρτάται από διάφορες πρωτεΐνες (UL 44, UL 54, UL 57, UL 84, UL 98, UL 70, UL 102, UL105, UL 114 γονιδιακά προϊόντα). Η συναρμολόγηση του καψιδίου (Capsid Assembly) χρησιμοποιεί λειτουργίες του πυρήνα MCP, TR11, TR12, SCP, pAP, PORT. Προσχηματισμένα καψίδια μετατοπίζονται σε θέση αναδίπλωσης του DNA, όπου διάφορες πρωτεΐνες (UL51, UL52, UL56, UL77, UL 80, UL85, UL89, UL93, UL 95, UL97, UL103 γονιδιακά προϊόντα) είναι πιθανό να συμμετέχουν στην encapsidation του DNA (DNA Encapsidation). Έξοδος από τον πυρήνα (Nuclear Egress) ελέγχεται από τα γονιδιακά προϊόντα UL 50, UL 53. Κυτταροπλασματική έξοδος (Cytoplasmic Egress) και δευτεροπαθής (τελική) φακελοποίηση (Secondary Envelopment) ελέγχεται από τα γονιδιακά προϊόντα (UL 97, UL 47, UL 48, UL 71, UL 88, UL 94, UL 99)²¹

7. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

7.1. Επιπολασμός και Δημογραφικά

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (hCMV) είναι αυστηρά “ειδικός” στο είδους του και πιστεύεται ότι ο άνθρωπος είναι “αποθήκη” του.

Οροεπιδημιολογικές μελέτες έχουν εντοπίσει λοιμώξεις με CMV σε κάθε ανθρώπινο πληθυσμό που έχει ελεγχθεί ανά τον κόσμο. Ο Πίνακας 3 παραθέτει στοιχεία για τον επιπολασμό της CMV λοίμωξης από επιλεγμένες μελέτες γυναικών σε αναπαραγωγική ηλικία στην Ευρώπη, Βόρεια και Νότια Αμερική, Αφρική και Ασία. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες του CMV έχουν επικεντρωθεί σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας λόγω της σημασίας για τη δημόσια υγεία. Μελέτες που έχουν περιληφθεί και τα δύο φύλα δείχνουν ποσοστά έκθεσης που είναι ελαφρώς υψηλότερα στις γυναίκες από ό,τι στους άνδρες.⁴⁵ Αν και ο επιπολασμός της CMV λοίμωξης αυξάνεται με την ηλικία για κάθε ομάδα που μελετήθηκε, ο συνολικός επιπολασμός της λοίμωξης και η ηλικία κατά την αρχική εμφάνιση του ιού διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τις συνθήκες διαβίωσης. Στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη ο επιπολασμός της CMV λοίμωξης είναι μεγαλύτερος στα χαμηλότερα κοινωνικοοικονομικά στρώματα, μεταξύ των μη λευκών και των μεταναστών από τις αναπτυσσόμενες χώρες.²¹ Παρόλο που ποσοστά CMV λοίμωξης είναι υψηλότερα σε μη λευκούς από ό,τι σε λευκούς, οι φυλετικές διαφορές πιθανότατα σχετίζονται με τις συνθήκες διαβίωσης. Εποχιακή διακύμανση στην εκδήλωση της CMV λοίμωξης δεν έχει παρατηρηθεί. Επιδημίες δεν έχουν περιγραφεί, εκτός από κάποια υψηλά ποσοστά μόλυνσης που έχουν περιγραφεί σε πληθυσμούς ιδρυμάτων, όπως τα κέντρα ημερήσιας φροντίδας (βρεφικοί σταθμοί). Σχεδόν όλες οι οροεπιδημιολογικές μελέτες έχουν βασιστεί σε ειδικές κατηγορίες πληθυσμού, όπως ασθενείς ιδρυμάτων υγειονομικής περίθαλψης, αιμοδότες, εργαζόμενοι νοσοκομείων και βρεφικών σταθμών, και συνεπώς δεν παρέχουν μια ακριβή εκτίμηση για τον επιπολασμό του CMV στον γενικό πληθυσμό. Πρόσφατα ολοκληρώθηκε μια έρευνα του επιπολασμού του CMV με βάση τον γενικό πληθυσμό χρησιμοποιώντας ορούς και δεδομένα που συλλέχθηκαν μεταξύ 1988 και 1994 από ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα του αμερικανικού πληθυσμού.⁴⁶ Ο συνολικός επιπολασμός της λοίμωξης CMV για τις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν 58,9%. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν υψηλότερο επιπολασμό στις γυναίκες (63,5%) σε σύγκριση με τους άνδρες (54,1%),

και υψηλότερο σε μη Ισπανόφωνους μαύρους (75,8%) και Αμερικάνους του Μεξικού (81,7%) σε σχέση με μη Ισπανόφωνους λευκούς (51,2%). Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τον υψηλότερο επιπολασμό της CMV λοίμωξης αποτελούν: το χαμηλότερο επίπεδο εκπαίδευσης, η κατοικία στις Νότιες πολιτείες των ΗΠΑ, η μεγαλύτερη οικογένεια, καθώς και η γέννηση εκτός των Ηνωμένων Πολιτειών. Στην Ελλάδα σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαφόρων οροεπιδημιολογικών ερευνών η συχνότητα οροθετικών ατόμων κυμαίνεται από το 78% έως το 90%.^{47,48}

7.2. Οριζόντια μετάδοση

Ο τρόπος μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο δεν είναι πλήρως κατανοητός και διάφορα στοιχεία της λοίμωξης με CMV κάνουν δύσκολη τη μελέτη της μετάδοσης.

Για τους περισσότερους ανθρώπους, η λοίμωξη με CMV είναι υποκλινική, συμπεριλαμβανομένων και των λοιμώξεων που συμβαίνουν στην ενδομήτριο και την περιγεννητική περίοδο.

Οι προσβεβλημένοι με CMV μεταδίδουν διαρκώς τον ιό σε άλλους ευαίσθητους οργανισμούς. Είναι φανερό ότι μια μεγάλη “αποθήκη” του CMV υπάρχει ανά πάσα ώρα και στιγμή στον πληθυσμό. Μετάδοση του ιού πάντως φαίνεται να απαιτεί άμεση επαφή με μολυσματικό υλικό. Εξάπλωση δια του αέρος ή μέσω σταγονιδίων δεν παρουσιάζεται. Μετά την αρχική απόκτηση του CMV, ο ιός ανιχνεύεται σε ούρα, σάλιο, δάκρυα, σπέρμα, και τις εκκρίσεις του τραχήλου της μήτρας για μήνες έως χρόνια. Δεν αποτελούν έκπληξη τα υψηλά ποσοστά της λοίμωξης από CMV σε καταστάσεις όπου υπάρχει στενή επαφή με σωματικά υγρά, όπως μεταξύ ερωτικών συντρόφων, μεταξύ των παιδιών σε βρεφικούς σταθμούς, καθώς και στους επαγγελματίες υγείας. Δύο είναι οι τύποι έκθεσης που συνδέονται κυρίως με οριζόντια μετάδοση του CMV: η σεξουαλική δραστηριότητα και η επαφή με τα μικρά παιδιά. Ο hCMV αποβάλλεται σε κολπικές εκκρίσεις καθώς και στο σπέρμα. Ο επιπολασμός της λοίμωξης CMV είναι υψηλότερος σε άτομα με δείκτες αυξημένης σεξουαλικής δραστηριότητας, όπως ο αυξημένος αριθμός συντρόφων και η ύπαρξη σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων.⁴⁹ Υψηλά ποσοστά περιστατικών CMV λοίμωξης κατά συνέπεια έχουν αναφερθεί σε κλινικές για σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα καθώς και μεταξύ των σεξουαλικά ενεργών εφήβων.⁵⁰ Ανάλυση περιοριστικών ενζύμων του DNA σε CMV στελέχη από συντρόφους έχει αποδείξει ταυτόσημα περιοριστικά μοτίβα θραύσματος ταυτόχρονα και στους δύο

συντρόφους, επιβεβαιώνοντας τη μετάδοση του ιού. Εξάπλωση του CMV επίσης παρουσιάζεται συχνά σε χώρους συνάθροισης μικρών παιδιών. Μελέτες και ανάλυση των περιοριστικών ενζύμων των CMV στελεχών αναφέρουν ότι τα παιδιά σε βρεφικούς σταθμούς συχνά μεταδίδουν τον ιό μεταξύ τους.²¹ Εκείνα που έχουν μολυνθεί από τον ιό, είτε από μητρική πηγή είτε στον βρεφικό σταθμό, αποβάλλουν τον ιό στο σάλιο και στα ούρα για χρόνια, αποτελώντας έτσι “πηγή” συνεχούς εξάπλωσης στους συμμαθητές, τους γονείς, ή στους εργαζόμενους στο βρεφικό σταθμό. Μετάδοση που αναμφίβολα ενισχύεται από τη συχνή επαφή των χεριών και των παιχνιδιών με το στόμα στην προσχολική ηλικία και από τη σχεδόν αναπόφευκτη επαφή με τα σωματικά υγρά που παρουσιάζεται από τη φροντίδα των παιδιών αυτής της ηλικίας. Καλλιέργειες σε βρεφικούς σταθμούς(κέντρα ημερήσιας φροντίδας) εντόπισαν CMV στα παιχνίδια, πιθανό «όχημα» μετάδοσης του ιού, στις επιφάνειες και στα χέρια των εργαζομένων. Εργαζόμενοι σε βρεφικούς σταθμούς έχουν αυξημένα ποσοστά της CMV λοίμωξης, που κυμαίνονται από 7% έως 20% ανά έτος, σε σύγκριση με το 2% ανά έτος που εμφανίζεται στους ενήλικες.⁵¹ Οι γονείς των μικρών παιδιών που παρίστανται σε βρεφικούς σταθμούς διατρέχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο για CMV λοίμωξη, όπως και οι γονείς των πρόωρων μωρών που απέκτησαν CMV ενδονοσοκομειακά. Εδώ, ο κίνδυνος μόλυνσης με CMV προφανώς σχετίζεται με την αποβολή του ιού από το παιδί. Ένα ποσοστό ορομετατροπής 45% ανά έτος διαπιστώθηκε στους γονείς των νηπίων που αποβάλλουν CMV, σε σύγκριση με το 0% αυτών των οποίων τα παιδιά δεν αποβάλλουν τον ιό.⁵² Ανάλυση περιοριστικού ενζύμου του DNA του ιού εργαστηριακά επιβεβαίωσε μετάδοση του CMV από παιδί σε γονέα και από παιδί σε εργαζόμενους σε βρεφικό σταθμό. Αν και η αποβολή CMV είναι κοινή μεταξύ των ασθενών που νοσηλεύονται, εργαζόμενοι σε νοσοκομείο δεν φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από CMV. Μελέτες σε νοσηλευόμενους ασθενείς έχουν διαπιστώσει ότι 1% έως 30% από αυτούς αποβάλλουν CMV στα ούρα ή στο σάλιο. Μια ανασκόπηση δημοσιευμένων μελετών που αφορούσε εργαζόμενους σε νοσοκομείο απέδειξε ότι έξι από τις επτά μελέτες δεν ανέφεραν αύξηση ποσοστών CMV λοίμωξης σε σχέση με την φροντίδα του ασθενούς και μια μετα-ανάλυση των έξι μελετών δεν ανέφερε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών σε νοσηλευτές παιδιατρικής κλινικής και ομάδων ελέγχου. Η έλλειψη στοιχείων για αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης CMV σε εργαζόμενους νοσοκομείων δείχνει ότι η μόλυνση ελέγχεται από τις καθημερινές διαδικασίες (π.χ., πλύσιμο χεριών και αποφυγή της επαφής με τα σωματικά υγρά) που είναι ο

συνηθισμένος τρόπος αποφυγής όλων των νοσοκομειακών λοιμώξεων και είναι εξίσου αποτελεσματικός και στην πρόληψη της μετάδοσης του CMV. Οριζόντια μετάδοση CMV επίσης παρουσιάζεται μέσω μετάγγισης ή μεταμόσχευσης και, κυρίως, κατά η μεταμόσχευση οργάνων από δότες οροθετικούς.²¹

7.3. Κάθετη μετάδοση

Η μετάδοση του hCMV από τη μητέρα στο έμβρυο ή στο νεογέννητο είναι συνήθης. Ο CMV μπορεί να μεταδοθεί με τρεις οδούς: συγγενώς, περιγεννητικά, και μέσω θηλασμού.

Συγγενείς λοιμώξεις συμβαίνουν σε γυναίκες που μολύνθηκαν πριν από τη σύλληψη (επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις), καθώς και σε εκείνες που έχουν την πρωταρχική CMV λοίμωξη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο ρόλος της επαναλαμβανόμενης μητρικής λοίμωξης ως πηγή εμβρυϊκής CMV λοίμωξης είχε αρχικά προταθεί από την εμφάνιση συγγενούς λοίμωξης σε συνεχόμενες γεννήσεις της ίδιας μητέρας. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά συγγενούς CMV λοίμωξης τείνουν να είναι υψηλότερα σε πληθυσμούς στους οποίους ο επιπολασμός μητρικών αντισώματων είναι υψηλός. Η επιβεβαίωση του ρόλου των επαναλαμβανόμενων μητρικών λοιμώξεων προήλθε από μια ομάδα μελέτης πληθυσμού με χαμηλό οικονομικό επίπεδο. Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις έχουν αποδοθεί σε επανενεργοποίηση λανθάνοντος ιού.⁵³ Αν και βλάβη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) σε συγγενή CMV λοίμωξη είναι συνήθως το αποτέλεσμα πρωτοπαθούς λοίμωξης, έχει επίσης αναφερθεί και μετά από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις μητέρας.^{54,55,56,57} Το ποσοστό της πρωτοπαθούς λοίμωξης της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης κυμαίνεται από 0,7% έως 4,1%, με υψηλότερα ποσοστά να σημειώνονται σε μικρές, ανύπαντρες γυναίκες με χαμηλή κοινωνικοοικονομική θέση.^{55,56} Το ποσοστό της διαπλακουντιακής μετάδοσης CMV στο έμβρυο από μητέρα με πρωτοπαθή λοίμωξη κατά την κύηση κυμαίνεται από 20% ως 40%.^{55,56} Δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να δείχνουν επίδραση της ηλικίας κύησης στην πιθανότητα μετάδοσης.

Περιγεννητική μετάδοση του CMV συνδέεται με τοπική αποβολή του ιού. Περίπου 10% των γυναικών αποβάλλει CMV από τον κόλπο ή τον τράχηλο. Κατά τη στιγμή του τοκετού, ποσοστά του 2% έως 28% έχουν αναφερθεί. Αποβολή μέσω της γεννητικής οδού είναι πιο κοινή στις νεότερες γυναίκες και λιγότερο συχνή μετά την

ηλικία των 30 ετών. Σε περίπτωση παρουσίας του ιού στο γεννητικό σύστημα της μητέρας κατά τη στιγμή του τοκετού, το ποσοστό μετάδοσης στο νεογέννητο είναι περίπου 50%.²¹ Τα νεογέννητα που αποκτούν CMV κατά τη διάρκεια της γέννησης είναι ιικά αρνητικά κατά τη διάρκεια των 3 πρώτων εβδομάδων της ζωής και συνήθως αρχίζουν να αποβάλλουν τον ιό μετά από διάστημα περίπου 6 εβδομάδων.

Η πιο συνηθισμένη διαδρομή για μετάδοση CMV από τη μητέρα στο βρέφος είναι **μέσω θηλασμού**. Σε μελέτη βρεφών οροθετικών μητέρων για CMV, λοίμωξη δεν εντοπίστηκε σε αυτά που θήλασαν για λιγότερο από 1 μήνα, ενώ το ποσοστό λοίμωξης ήταν 39% σε βρέφη που θήλασαν για περισσότερο από 1 μήνα.²¹ CMV απομονώθηκε στο γάλα 30% των οροθετικών γυναικών μετά από επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες. Συνολικά, το 25% των βρεφών που θήλασε από CMV οροθετικές μητέρες απέκτησε CMV κατά το πρώτο έτος της ηλικίας του. Όταν ο CMV μπορούσε να ανιχνευθεί στο μητρικό γάλα με απομόνωση του ιού, το 69% των βρεφών ήταν μολυσμένα, σε σύγκριση με το 10% των βρεφών που θήλασαν από οροθετικές μητέρες στων οποίων το γάλα δεν απομονώθηκε ο ιός. Πιο πρόσφατες μελέτες με τη χρήση PCR, αναφέρουν ανίχνευση CMV DNA σε περισσότερο από 95% των δειγμάτων γάλακτος από οροθετικές μητέρες,^{58,59,60} μελέτες που επιβεβαιώνουν την ισχυρή σχέση μεταξύ της παρουσίας του ιού (ή DNA του ιού) στο γάλα και τη μετάδοση του CMV στο βρέφος. Το ποσοστό των βρεφών που αποκτούν CMV κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής τους είναι άμεσα συνδεδεμένο με τον επιπολασμό της μητρικής λοίμωξης και το ποσοστό των μητέρων που θηλάζουν τα βρέφη τους.⁶¹ Σε χώρες όπου σχεδόν όλες οι γυναίκες είναι οροθετικές και ο θηλασμός σχεδόν καθολικός, περίπου το 50% των βρεφών θα αποκτήσει CMV πριν το πρώτο έτος της ηλικίας του. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 10% των βρεφών έχει αποκτήσει CMV από μητρική πηγή. Βρέφη που αποκτούν CMV από μητρική πηγή συνήθως αποβάλλουν τον ιό για χρόνια αποτελώντας σημαντική πηγή μετάδοσης για άλλα παιδιά και ενήλικες.²¹

7.4. Μοριακή επιδημιολογία

Το μεγάλο μέγεθος του hCMV γονιδιώματος και η παρουσία μιας σειράς γονιδίων με σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των στελεχών επέτρεψαν την διάκριση ιογενών απομονώσεων που βασίζονται σε γενετικές διαφορές.⁶² Διάφορες μοριακές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδιακής ετερογένειας.

Αυτές περιλαμβάνουν περιορισμό θραύσματος μήκους με πολυμορφισμό ολόκληρου του γονιδιώματος ή την σύγκριση πιο αναλυτικών τμημάτων του γονιδιώματος ή συγκεκριμένων γονιδίων, ιδίως ακολουθίες γνωστές που εμφανίζουν σημαντική μεταβλητότητα.^{62,63} Όλες αυτές οι προσεγγίσεις έγιναν με βάση τη γενική παραδοχή ότι επιδημιολογικά συνδεόμενες απομονώσεις του ανθρώπινου CMV μοιράζονται εκτεταμένη νουκλεοτιδική ομόλογη αλληλουχία και αντιστρόφως, απομονώσεις που δεν σχετίζονται επιδημιολογικά έχουν αλληλουχία πολύμορφη που είναι εύκολα ανιχνεύσιμη.

Μοριακές έρευνες των απομονώσεων CMV απέδειξαν εργαστηριακά τα εξής: κάθετη μετάδοση επανενεργοποιημένου ενδογενούς ιού, μετάδοση του CMV από παιδί σε παιδί και από παιδί σε γονιό, εξάπλωση του ιού από τα παιδιά σε εργαζόμενους σε βρεφικούς σταθμούς, εξάπλωση του ιού από το παιδί στη μητέρα και στο έμβρυο, νοσοκομειακή εξάπλωση CMV, απόκτηση στελεχών του δότη σε λήπτη μοσχεύματος. Έχουν επίσης επιβεβαιώσει επαναμόλυνση από νέα στελέχη σε ασθενείς με διαταραχές του ανοσοποιητικού, σε υγιή παιδιά, σε σεξουαλικά ενεργείς γυναίκες και στις μητέρες των νεογέννητων με συγγενή CMV λοίμωξη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα μοριακά εργαλεία απέδειξαν την μη εξάπλωση του CMV από μια ύποπτη πηγή σε νοσοκομείο.²¹

Ένας αριθμός μελετών έχουν χωρίσει συγκεκριμένα hCMV γονίδια σε γονότυπους και επιχείρησαν να συνδέσουν αυτά με κλινικές καταστάσεις ή την έκβαση της νόσου.⁶² Οι προσπάθειες αυτές δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα, λόγω του υψηλού βαθμού μεταβλητότητας του hCMV γονιδιώματος, τον σχεδόν άπειρο αριθμό των πιθανών συνδυασμών γονιδίων και ενδεχόμενη ενδογονιδιακή μεταβλητότητα.⁶⁴ Αμφιλεγόμενο ζήτημα παραμένει αν κάποιος συγκεκριμένος hCMV γονότυπος είναι συνδεδεμένος με την εμφάνιση ή την έκβαση της νόσου hCMV. Μέχρι σήμερα, κανένας hCMV γονότυπος δεν σχετίζεται με γεωγραφική θέση. Σύγκριση 223 στελεχών που μελετήθηκαν από όλο τον κόσμο δεν έδειξε σαφή σύνδεση μεταξύ γονότυπου και γεωγραφικής προέλευσης.⁶²

Πίνακας 3: Επιπολασμός του hCMV σε διάφορες περιοχές⁴⁸

ΠΟΛΗ(CITY)	ΧΩΡΑ(COUNTRY)	%
Φράμπουργκ(Freiburg)	Γερμανία(Germany)	48
Άλμπανι(Albany)	ΗΠΑ(Νέα Υόρκη)(USA: New York)	45
Παρίσι(Paris)	Γαλλία(France)	47
Μελβούρνη(Melbourne)	Αυστραλία(Australia)	54
Μπολόνια(Bologna)	Ιταλία(Italy)	70
Μαδρίτη(Madrid)	Ισπανία(Spain)	63
Αθήνα(Athens)	Ελλάδα(Greece)	78
Μπουένος Άιρες(Buenos Aires)	Αργεντινή(Argentina)	81
Ιερουσαλήμ(Jerusalem)	Ισραήλ(Israel)	85
Παντζάμπ (Panjab)	Ινδία(India)	87
Χονκ Κόνγκ (Hong Kong)	Κίνα(China)	94
Εσπερίτο Σάντο (Esperito Santo)	Βραζιλία(Νοτιο-Ανατολική)(Brazil:South-Eastern)	98
Μανίλα(Manila)	Φιλιππίνες(Philippines)	100
Εντέμπα(Entebba)	Ουγκάντα(Uganda)	100

8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ hCMV

Ο hCMV μεταδίδεται συγγενώς και εμφανίζει ηπιότερη συμπτωματολογία σε επανενεργοποίηση λανθάνουσας λοίμωξης από ότι σε πρωτοπαθή λοίμωξη. Ο hCMV μεταδίδεται με αναπαραγωγή του ιού και μεταφορά μέσω του πλακούντα,^{65,66} καθώς και μέσω άμεσης επαφής με σωματικές εκκρίσεις. Η επαναλαμβανόμενη απόπτωση με το σάλιο είναι μια κοινή πηγή του ιού σε ενήλικες και η επίμονη απόπτωση στα ούρα είναι μια σημαντική πηγή μετάδοσης μεταξύ των παιδιών και από τα παιδιά στους ενήλικες.^{67,68}

Επιπλέον, το μητρικό γάλα έχει θεωρηθεί ως σημαντική πηγή μετάδοσης του ιού και κολπικές ή σπερματικές εκκρίσεις συμβάλλουν στη σεξουαλική μετάδοση του ιού.

Η ανοσολογική απάντηση του hCMV σε υγιείς ανθρώπους είναι εντυπωσιακά ευρεία. Υψηλά επίπεδα απάντησης ανιχνεύονται ως και χρόνια μετά την πρωτογενή λοίμωξη.^{69,71} Φυσική ανοσία έναντι hCMV δεν εμποδίζει επαναμόλυνση, παρόλο που προϋπάρχουσα κυτταρική ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της οξείας νόσου.^{70,71} Λοίμωξη με hCMV είναι μία κλασσική ευκαιριακή λοίμωξη όπου η νόσος ακολουθεί πρωτοπαθή λοίμωξη ή επανενεργοποίηση λόγω έλλειψης επαρκούς ανοσίας. Η νόσος εκδηλώνεται σε καταστάσεις όπου η ανοσολογική απάντηση είναι πολύ χαμηλή (π.χ. AIDS) ή απουσιάζει (π.χ. συγγενής λοίμωξη), καθώς και σε καταστάσεις όπου για να μην υπάρξει αλλογενής απόρριψη απαιτείται ανοσοκαταστολή (π.χ. μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων και μυελού των οστών).

Σύμφωνα με τις τελευταίες διαθέσιμες πληροφορίες, η παθογένεση της CMV λοίμωξης φαίνεται να είναι μια “λυτική” ιική λοίμωξη, αποτέλεσμα αποτυχίας του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή να ελέγξει ικανοποιητικά την αντιγραφή και εξάπλωση του ιού. Αυτό το μοντέλο της CMV παθογένειας προκύπτει από το μέγεθος του ιικού φορτίου όπως μετράται με PCR, ή την απομόνωση του ιού σε οξεία λοίμωξη⁷². Οι περισσότερες ασθένειες τελικού οργάνου από CMV σε ανοσοκατασταλμένους προκαλούνται από ιογενή εξάπλωση σε πολλαπλά όργανα. Ο κίνδυνος για CMV νόσο συνδέεται με υψηλό ιικό φορτίο, όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975 από τον Stagno και τους συνεργάτες του.⁷³ Αυτοί συνέκριναν ιουρία σε νεογνά με συγγενή συμπτωματική, συγγενή ασυμπτωματική και νεογνά με περιγεννητική λοίμωξη και βρήκαν ότι τα νεογνά με νόσο CMV εμφάνισαν μεγαλύτερη ιουρία, όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Αυτή η παρατήρηση βοήθησε στην

κατανόηση της παθογένειας και στην στοχευμένη αντική θεραπεία. Επόμενες μελέτες, με τη βοήθεια ποσοτικής PCR (quantative PCR-QPCR) στο αίμα,⁷⁴ σε μεταμοσχευμένους νεφρού, ήπατος ή μυελού των οστών έδειξε μεγαλύτερο ιικό φορτίο σε κάθε περίπτωση.^{75,76,77} Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η σχέση μεταξύ αυξανόμενου ιικού φορτίου και νόσου δεν είναι γραμμική. Εμφανίζεται ένα καθοριστικό σημείο συσχέτισης με νόσο CMV που υποδηλώνει ότι χαμηλά ιικά φορτία είναι ανεκτά από τον ξενιστή χωρίς να προκαλούν νόσο,^{75,76} όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.

Συνοπτικά, αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα είναι ότι κύτταρα μολυσμένα από τον ιό σε ένα περιφερικό όργανο (όπως νεφρός ή σιελογόνος αδένας) παράγουν CMV βιρία. Ο αριθμός τους μπορεί να ελεγχθεί από τοπική ανοσολογική απάντηση, αλλά αν αυτή είναι ανεπαρκής ο αριθμός των βιρίων θα αυξηθεί. Αν υπερκαλύψουν την τοπική ανοσολογική απάντηση, τα βιρία θα μετακινηθούν στην συστηματική κυκλοφορία προκαλώντας ιαμμία. Το ίδιο μετά επαναλαμβάνεται στο όργανο στόχο (π.χ. ήπαρ, αμφιβληστροειδής), όπου τοπική ανοσολογική απάντηση ίσως είναι ικανή να εμποδίσει ιικό φορτίο να φτάσει σε κρίσιμα επίπεδα που απαιτούνται για να προκληθεί νόσος. Αυτό εξηγεί το ότι η ιαμμία είναι ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για νόσο CMV, αν και αυτό δεν είναι βέβαιο ότι θα συμβεί.^{78,79}

Η ποσότητα του ιού που χρειάζεται για να προκαλέσει νόσο ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από τον παθογενετικό μηχανισμό. Ο ανοσοπαθολογικός μηχανισμός για παράδειγμα μπορεί να ενεργοποιηθεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα ιού και επομένως ακόμα και μικρές ποσότητες ιικού φορτίου μπορεί να προκαλέσουν νόσο. Σε άλλες περιπτώσεις, ο παθογενετικός μηχανισμός είναι η άμεσα τοξική δράση του ιού, οπότε πολύ μεγάλες ποσότητες ιικού φορτίου χρειάζονται για να καταστρέψουν τα κύτταρα πάνω στα οποία δεσμεύεται ο hCMV.

Έτσι, η μέτρηση του ιικού φορτίου εξηγεί πολλά για την παθογένεση της νόσου CMV και είναι σημαντική για την κατανόηση της νόσου, την ανάπτυξη αντικών φαρμάκων, την επιτυχία της αντικής θεραπείας και την πρόληψη της ανάπτυξης αντοχής στα αντικά φάρμακα.^{79,21}

Όμως, είναι σχεδόν βέβαιο ότι ο CMV δρα και μέσω μη λυτικών μηχανισμών. Αυτοί ίσως περιλαμβάνουν τροποποίηση κυτταρικής λειτουργίας του φυσιολογικού ξενιστή με περιορισμένη έκφραση του γονιδιώματος του. Έτσι ίσως επηρεάζονται

γειτονικές κυτταρικές λειτουργίες με τη βοήθεια χυμοκίνης και την παραγωγή κυτοκινών.

Άλλα μονοπάτια βλάβης του κυττάρου-ξενιστή, ίσως περιλαμβάνουν την γέννηση ανοσολογικών απαντήσεων που επηρεάζουν τον ξενιστή. Ένας τέτοιος μηχανισμός εξηγεί την σχέση ανάμεσα σε CMV και σε ασθένειες όπως αθηροσκλήρωση⁸⁰ καθώς και σοβαρή πνευμονία που σχετίζεται με CMV λοίμωξη σε αλλογενείς λήπτες μυελού των οστών.

Πειραματικά μοντέλα φαίνεται να δείχνουν επηρεασμένη λειτουργία του ξενιστή σε έκφραση μορίων όπως προσκολλητίνες, επηρεασμό στην έκφραση χυμοκίνης και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως NF-KB που φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο στην απάντηση του ξενιστή σε μολυσμένα κύτταρα από τον ιό. Τέτοιοι μηχανισμοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν την σχέση μεταξύ CMV λοίμωξης και έκφραση ικόν γονιδίων σε νόσους όπως δυσλειτουργία αλλογενούς μοσχεύματος και απόρριψη μοσχεύματος. Είναι δύσκολο όμως να αποδειχτεί η ανοσοποιητική διαφοροποίηση μέσω μη λυτικών μηχανισμών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης λόγω δευτεροβάθμιας τυχαίας μετάλλαξης που προφανώς μπορεί να συμβεί στους ιούς που έχουν μελετηθεί. Ως παράδειγμα, US28 είναι μεταξύ των πιο ενεργών υποδοχέων χυμοκίνης και US28 μετάλλαξη του ιού έχει αποδειχτεί ότι διαφοροποιεί την κυτταρική συμπεριφορά με ποικίλους τρόπους.^{81,82,83,80} Άλλα hCMV γονιδιακά προϊόντα, όπως η ιογενής IL-10, εκφράζεται ως μια μορφή (CMV IL-10) κατά τη διάρκεια αναπαραγωγής^{84,85} και ως μία άλλη μορφή (LACMV IL-10) κατά τη διάρκεια λανθάνουσας κατάστασης,⁸⁶ ενώ και οι δύο μορφές έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν T-κυτταρική συμπεριφορά.⁸⁷ Αυτά τα ιικά γονίδια μπορεί να είναι αναγκαία για να μπορέσει να αναπαραχθεί hCMV σε μια πύλη εισόδου βλεννογόνιου ιστού, να διανεμηθεί αιματογενώς προς τα λεμφογενή όργανα, τους νεφρούς ή τους σιελογόνους αδένες και να αποβληθεί με τις σωματικές εκκρίσεις ως μέσο μετάδοσης. Αυτά μπορεί επίσης να βοηθήσουν τον ιό να ξεκινήσει μια μακροχρόνια επίμονη ή λανθάνουσα λοίμωξη.²¹

Η ανεπάρκεια του μυελού μετά από hCMV λοίμωξη σε ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού προκαλείται από την απελευθέρωση κυτοκινών από τα μολυσμένα στρωματικά κύτταρα. Η παρουσία αυτών των κυτοκινών δημιουργεί ένα περιβάλλον αρνητικό για την αιμοποίηση.

Η hCMV αμφιβληστροειδοπάθεια εμφανίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με AIDS, ίσως λόγω παρατεταμένης έκθεσης σε υψηλά επίπεδα του ιού. Η

αρχική εστία λοίμωξης μπορεί να επεκταθεί και να μολύνει γειτονικά κύτταρα δημιουργώντας περιφερικά μια λευκή νεκρωτική εστία.⁸⁸

Η hCMV εγκεφαλοπάθεια μπορεί να ξεκινάει κατά τη συστηματική φάση της ιαμίας, οπότε μολύνονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου, και κατόπιν κατά συνέχεια ιστού μεταδίδεται η λοίμωξη στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Μπορεί όμως να ξεκινάει και από λοίμωξη στα ενδοθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος, με περαιτέρω λοίμωξη του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και κατάληξη τελικά σε νεκρωτική κοιλιακή εγκεφαλίτιδα.

Παθολογικά ευρήματα CMV λοίμωξης αφορούν παρουσία ιικής λοίμωξης σε όλα σχεδόν τα οργανικά συστήματα, ενώ ιστολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν μεγάλα κύτταρα με ενδοπυρηνικά έγκλειστα που χαρακτηριστικά αναφέρονται ως «μάτι κουκουβάγιας».

8.1. Σημασία της ανοσολογικής απάντησης

Η κυτταρική ανοσία του οργανισμού είναι αυτή που κατεξοχήν μπορεί να περιορίσει την hCMV λοίμωξη, χωρίς όμως να μπορεί να την εξαλείψει πλήρως από τον οργανισμό. Η χυμική ανοσία επίσης μπορεί μόνο να περιορίσει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού του hCMV. Προηγηθείσα ανοσία στην έγκυο μητέρα που επαναμολύνεται με κάποιο στέλεχος του HCMV, μπορεί να ελαττώσει σημαντικά το ιικό φορτίο στο οποίο θα εκτεθεί το έμβρυο και έτσι ο κίνδυνος για το έμβρυο να είναι σημαντικά ελαττωμένος.⁵³

Ειδικά για μεταμοσχευμένους ασθενείς υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να συμβεί μεταφορά της χυμικής ανοσίας από ένα δότη σε ένα δέκτη. Ανάμεσα σε οροθετικούς δέκτες μυελού, αυτοί που λαμβάνουν μυελό από άνοσους δότες έχουν μικρότερο κίνδυνο για νόσο.^{79,89}

8.2. Μορφές της hCMV λοίμωξης: Πρωτοπαθής λοίμωξη, Λανθάνουσα λοίμωξη, Επανενεργοποίηση του ιού. Επαναλοίμωξη από άλλο στέλεχος του ιού.

Η πρωτοπαθής λοίμωξη σε ένα άτομο μπορεί να είναι συμπτωματική ή ασυμπτωματική. Ο ιός εξακολουθεί να υπάρχει στον οργανισμό και μετά την αποδρομή της πρωτοπαθούς λοίμωξης η οποία μπορεί να ήταν συμπτωματική ή ασυμπτωματική υπό λανθάνουσα μορφή. Ο λανθάνων ιός μπορεί να

επανενεργοποιηθεί σε καταστάσεις stress, ανοσοκαταστολής, συν-λοίμωξης με άλλους ιούς. Και κατά τη φάση της πρωτοπαθούς λοίμωξης, και κατά τη φάση της επανενεργοποίησης, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί κατά την οριζόντια (από άτομο σε άτομο) και κατά την κάθετη κατεύθυνση (από τη μητέρα στο παιδί).^{89,21}

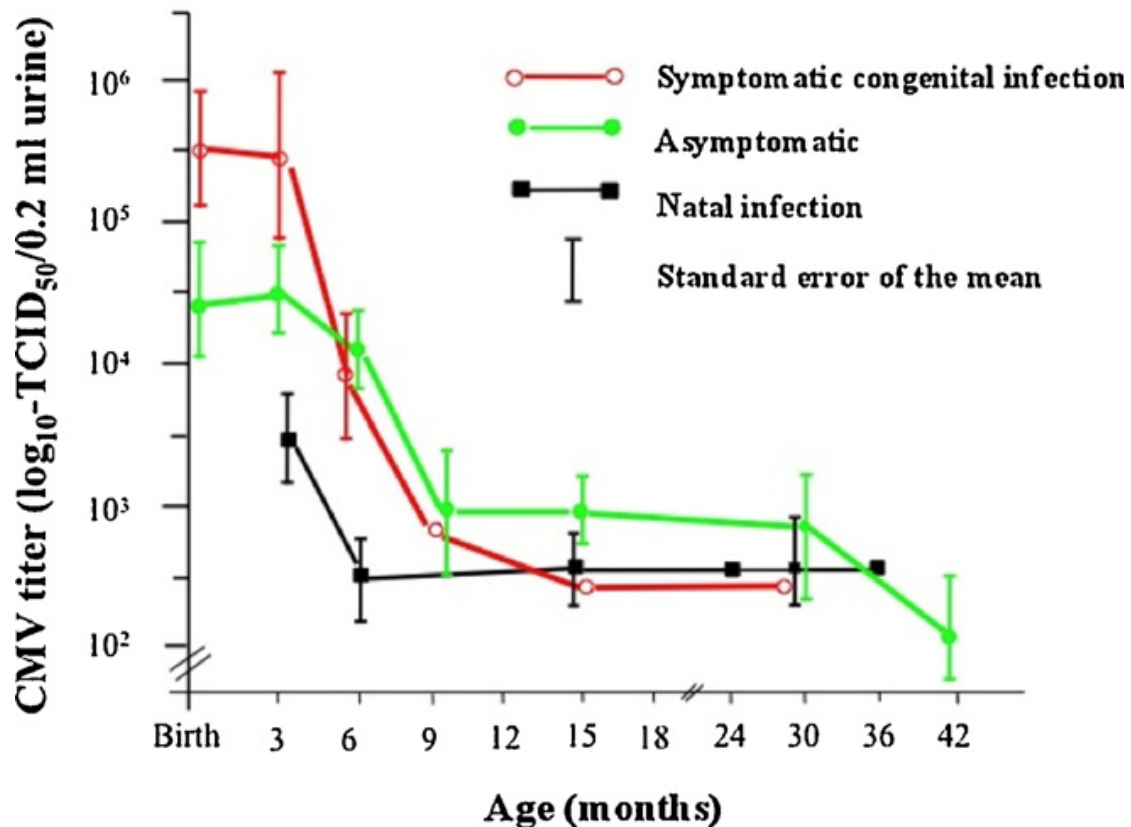
8.3. Σημασία της ανεύρεσης του ιού στα ούρα και της ιαιμίας-Στρατηγικές θεραπείας:

Σε ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού ή συμπαγών οργάνων η ανίχνευση hCMV σε δείγματα ούρων διπλασιάζει τον κίνδυνο για μελλοντική νόσο από hCMV, ενώ η ανίχνευση του hCMV στο αίμα επταπλασιάζει τον αντίστοιχο κίνδυνο.^{90,91}

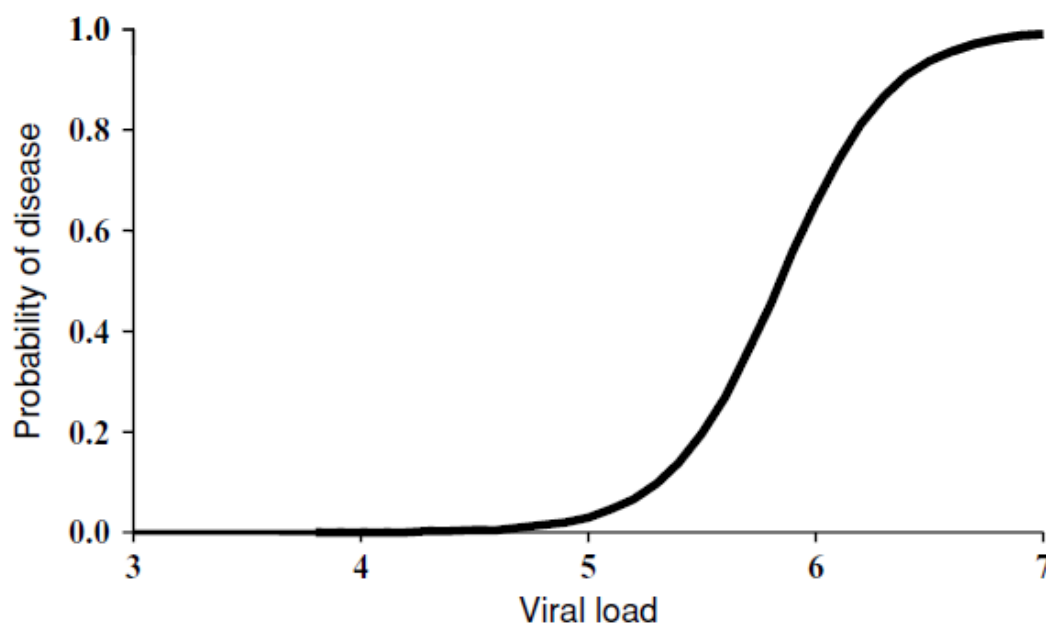
Η παρουσία ιαιμίας είναι το αποτέλεσμα διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής του ιού και ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού. Κατά τη φάση της ιαιμίας ο ιός μπορεί να μολύνει πολλά όργανα.

Η ποσότητα του ιού που χρειάζεται για να προκαλέσει νόσο ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από τον παθογενετικό μηχανισμό και την υποκείμενη κατάσταση του κάθε ασθενούς.

Σε ασθενείς με ανίχνευση του ιού μόνο στα ούρα χρησιμοποιείται ο όρος κατασταλτική (suppressive) θεραπεία, ενώ σε ασθενείς με ιαιμία χρησιμοποιείται ο όρος προληπτική ή προεπιθετική (preemptive) θεραπεία. Αυτοί οι όροι χρησιμοποιούνται για να διαχωριστούν αυτές οι στρατηγικές θεραπείας από την προφυλακτική θεραπεία και την καθεαυτό θεραπεία (όταν πλέον οι κλινικές εκδηλώσεις της hCMV νόσου έχουν ήδη εμφανιστεί). Οι όροι προφυλακτική, κατασταλτική και προληπτική-προεπιθετική θεραπεία χρησιμοποιούνται πριν την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων της hCMV νόσου.^{89,21}



ΕΙΚΟΝΑ 9: Συσχέτιση ανάμεσα στο ιικό φορτίο στα ούρα νεογνών με Συγγενή (Συμπτωματική ή Ασυμπτωματική) και περιγεννητική λοίμωξη κατά τους πρώτους 42 μήνες της ζωής τους. Η διαφορά στο ιικό φορτίο που ανιχνεύτηκε στα νεογνά με Συμπτωματική Συγγενή λοίμωξη τους πρώτους 3 μήνες είναι χαρακτηριστική.⁷⁹



ΕΙΚΟΝΑ 10: Σχεδιάγραμμα που φαίνεται η συσχέτιση ανάμεσα στο ιικό φορτίο (Viral load) και την πιθανότητα να προκληθεί νόσος (Probability of disease), όπου φαίνεται ότι η σχέση ιικού φορτίου και νόσου δεν είναι γραμμική και ότι χαμηλά ιικά φορτία είναι ανεκτά από τον ξενιστή.⁷⁹

9. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

9.1. Λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή

Επίκτητη CMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή διαδράμει κατά κανόνα ασυμπτωματικά. Εντούτοις μπορεί να προκαλέσει οξεία εμπύρετη νόσο με χαρακτηριστικά συνδρόμου μονοπυρήνωσης. Σε σπάνιες περιπτώσεις ενδέχεται να είναι σοβαρή, λόγω συστηματικής νόσου ή επιπλοκών σε συγκεκριμένα όργανα. Μελέτες που αποσκοπούν σε ανίχνευση πρωτοπαθούς CMV λοίμωξης σε έγκυες γυναίκες, δείχνουν ότι περίπου το 90% των λοιμώξεων διαδράμει ασυμπτωματικά. Σύνδρομο CMV μονοπυρήνωσης εμφάνισαν 3 από 63 γυναίκες με πρωτοπαθή CMV λοίμωξη που παρουσιάστηκε σε μια μελέτη με 5199 οροαρνητικές έγκυες γυναίκες. Επιπλέον 3 εμφάνισαν ήπια πυρετική κίνηση και 1 είχε πάρεση προσωπικού που θα μπορούσε να έχει προκληθεί από CMV. Σε μια άλλη μελέτη με 10847 έγκυες γυναίκες, εντοπίστηκαν 58 πρωτοπαθείς CMV λοιμώξεις, εκ των οποίων 2 ήταν συμπτωματικές. Παρόλο που ο CMV μεταδίδεται συχνά από την μητέρα στο βρέφος κατά την γέννηση ή μέσου θηλασμού, η νόσος διαδράμει συνήθως ασυμπτωματικά σε υγιή νεογνά, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ηπατομεγαλίας, ήπιας αύξησης ηπατικών ενζύμων και πνευμονία.²¹ Επίσης σε παιδιά προσχολικής ηλικίας σε βρεφικούς σταθμούς και σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς που απέκτησαν CMV με μετάγγιση, οι περισσότερες λοιμώξεις είναι κλινικά σιωπηλές.^{92,93}

9.2. Σύνδρομο CMV μονοπυρήνωσης

Όταν CMV λοίμωξη παρουσιάζεται σε ανοσοεπαρκή ξενιστή, η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με την κλινική εικόνα που παρουσιάζεται σε λοίμωξη από EBV. Υποστηρίζεται ότι ο CMV ευθύνεται για το 20% ως 50% των ετερόφιλων αρνητικών συνδρόμων μονοπυρήνωσης και για το 8% του συνόλου των συνδρόμων μονοπυρήνωσης.²¹ Η κλινική εικόνα παρουσιάζεται ως εμπύρετος κατάσταση (39° C - 40° C) για περισσότερο από 10 ημέρες, κακουχία, μυαλγίες, κεφαλαλγία και κόπωση. Σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, αδενοπάθεια, και εξάνθημα παρουσιάζονται σε ορισμένους μόνο ασθενείς. Συγκριτικά με τον EBV, φαρυγγίτιδα, αδενοπάθεια, και σπληνομεγαλία εμφανίζονται λιγότερο συχνά. Ο εργαστηριακός έλεγχος παρουσιάζει λεμφοκυττάρωση με διεγερμένα ή άτυπα λεμφοκύτταρα, και αύξηση των ηπατικών ενζύμων. Αύξημένη χολερρυθρίνη ορού και ίκτερος εμφανίζονται

λιγότερο συχνά.⁹³ Σύνδρομο CMV μονοπυρήνωσης εκτός από τους ενήλικες μπορεί να εμφανιστεί και σε παιδιά. Μια συγκριτική μελέτη ενηλίκων και παιδιών, αναφέρει ότι τα παιδιά είναι λιγότερο πιθανό να εμφανίσουν πυρετό (43% έναντι 94%) αλλά είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν ηπατομεγαλία (100% έναντι 53%) και σπληνομεγαλία (86% έναντι 53%).²¹

9.3. Σοβαρή CMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή

Σπάνια, CMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή έχει σοβαρές επιπλοκές, που μπορεί να γίνουν ακόμη και απειλητικές για την ζωή του ασθενούς.^{94,95,96} Πολλές μελέτες με μικρό αριθμό όμως ασθενών περιγράφουν εικόνα σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς με σοβαρή CMV λοίμωξη που είναι παρόμοια με αυτή σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως: εντερίτιδα,^{97,98,99} θρομβωτική νόσος,¹⁰⁰ αιμολυτική αναιμία,³⁶ θρομβοκυτοπενία,^{101,102} εγκεφαλίτιδα,^{103,104} νευροπάθειες,^{105,106} μυοκαρδίτιδα,¹⁰⁷ και οφθαλμολογική νόσος.¹⁰⁸

9.4. Συγγενής CMV λοίμωξη

Περίπου 10% των νεογνών εμφανίζουν συγγενή CMV λοίμωξη.⁴ Όταν συγγενής CMV λοίμωξη είναι κλινικά εμφανής (ονομάζεται συμπτωματική) τα νεογνά εμφανίζουν σημάδια και συμπτώματα στη γέννηση που θα οδηγήσουν κάποιον να υποψιαστεί τη λοίμωξη. Τα κυριότερα κλινικά ευρήματα είναι: ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία, ίκτερος, πετέχιες και ένα εξάνθημα που παρατηρείται μερικές φορές. Επιπρόσθετα εμφανίζεται ως μικροκεφαλία με ή χωρίς εγκεφαλικές αποτιτανώσεις, ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης και προωρότητα. Αιμολυτική αναιμία, πνευμονία, ακουστικές διαταραχές και χοριοαμφιβληστροειδίτιδα μπορεί επίσης να εμφανιστούν. (Εικόνα 11) Μια μελέτη σε 106 νεογνά με συγγενή συμπτωματική CMV λοίμωξη ανέφερε ότι τα 2/3 είχαν συμμετοχή του Κ.Ν.Σ. όπως μικροκεφαλία, λήθαργο, γενικευμένη υποτονία ή επιληπτικές κρίσεις. Αξονικές τομογραφίες εγκεφάλου ήταν παθολογικές στο 75% των νεογνών με την περικοιλιακή ασβεστοποίηση να είναι το συχνότερο εύρημα. Απώλεια ακοής είναι κοινό σύμπτωμα σε νεογνά με συμπτωματική λοίμωξη. Αν και ίκτερος, ηπατοσπληνομεγαλία, πετέχιες, θρομβοπενία συνήθως θεραπεύονται σε λίγες εβδομάδες ως λίγους μήνες από τη γέννηση, τα νεογνά μπορεί να έχουν σοβαρή ασθένεια, με αποτέλεσμα να

παρατείνεται η νοσηλεία και η υποστηρικτική αγωγή και να παρουσιάζεται νεογνικός θάνατος σε περίπου 10% των συμπτωματικών νεογνών.²¹ Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη συχνότητα όσο και την έκβαση συγγενούς CMV λοίμωξης, έχει εκτιμηθεί ότι είναι η κύρια αιτία νευροαισθητήριας απώλειας ακοής.¹⁰⁹ Συνέπειες από το Κ.Ν.Σ. μπορεί να προκύψουν και σε νεογνά με συγγενή CMV λοίμωξη που είναι ασυμπτωματικά κατά τη γέννηση. Περίπου 7% ως 25% των νεογνών με ασυμπτωματική CMV λοίμωξη θα εμφανίσουν συμπτώματα από το Κ.Ν.Σ., κυρίως νευροαισθητήρια απώλεια ακοής.^{110,111} Χαρακτηριστικά που συνδέονται με την έκβαση της συγγενούς CMV λοίμωξης περιλαμβάνουν ηλικία κύησης της μητέρας κατά την στιγμή της μόλυνσης,^{112,34,35} τύπος λοίμωξης της μητέρας (πρωτοπαθής ή επανενεργοποίηση λανθάνουσας λοίμωξης),^{21,113} ειδικά κλινικά ευρήματα που εμφανίζει το νεογνό, όπως χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, μικροκεφαλία, παθολογική νευρολογική εξέταση, παθολογική αξονική τομογραφία εγκεφάλου,¹¹⁴ καθώς και ιικό φορτίο.^{115,116,117} Παρόλο που η σύνδεση μεταξύ του χρόνου κύησης και της έκβασης της λοίμωξης δεν είναι τόσο ισχυρή για τον CMV όπως για την ερυθρά, πρωτοπαθής μητρική λοίμωξη σε πρώιμο στάδιο κύησης είναι πιο πιθανό να οδηγήσει σε επακόλουθη σοβαρή λοίμωξη.^{21,114}

9.5. Περιγεννητική CMV λοίμωξη

Περιγεννητική λοίμωξη μπορεί να υπάρξει κατά τον τοκετό από την έκθεση στον ιό που βρίσκεται στο γεννητικό σύστημα της μητέρας, από το μητρικό γάλα^{59,118,119,120} ή μέσω πολλαπλών μεταγίσεων αίματος.⁴ Για να θέσουμε τη διάγνωση της περιγεννητικής CMV λοίμωξης θα πρέπει πρώτα να αποκλειστεί η συγγενής λοίμωξη έχοντας ως απόδειξη την απουσία ιογενούς έκκρισης κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων εβδομάδων της ζωής.

Η μεγάλη πλειοψηφία των νεογνών με φυσικά αποκτηθείσες περιγεννητικές λοιμώξεις παραμένουν ασυμπτωματικά.⁴ Παρόλα αυτά, επίκτητη CMV λοίμωξη μεταξύ πρόωρων βρεφών εμφανίζεται ως ένα κλινικό σύνδρομο ηπατοσπληνομεγαλίας, άτυπης λεμφοκυττάρωσης, θρομβοπενίας, επιδείνωσης του αναπνευστικού και σηπτικής εικόνας, γεγονός που υποδηλώνει συστηματική νόσο. Άλλες ανωμαλίες που μπορεί να παρατηρηθούν είναι: λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία, επηρεασμένη ηπατική λειτουργία και αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.^{121,60} Αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης φαίνεται να εμφανίζουν τα νεογνά με

πολύ χαμηλό βάρος γέννησης που προέρχονται από οροαρνητική μητέρα (έλλειψη επίκτητων μητρικών αντισωμάτων).²¹

9.6. CMV λοίμωξη σε ανοσοκατεσταλμένο ξενιστή

Ο CMV είναι από τα πιο κοινά, δύσκολα και ευκαιριακά παθογόνα που δυσχεραίνουν την περίθαλψη των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Η λοίμωξη είναι συχνή, διότι συμβαίνει από αναζωπύρωση ιού σε λανθάνουσα κατάσταση, επαναμόλυνση ασθενών που είχαν στο παρελθόν λοίμωξη και πρωτοπαθή λοίμωξη. Ιατρικές πράξεις (π.χ. μεταγγίσεις αίματος ή μεταμόσχευση οργάνων) μπορούν να μεταδώσουν τον ιό τη στιγμή που ο ασθενής είναι εντελώς ανοσοκατεσταλμένος. CMV λοιμώξεις στους ασθενείς αυτούς είναι δύσκολες γιατί η διάγνωση δεν απαιτεί μόνο την ανίχνευση του ιού, αλλά και τη διαπίστωση κατά πόσο ο CMV προκαλεί ασθένεια. Αποβολή CMV και ιαιμία είναι κοινή σε ασθενείς με διαταραχή της κυτταρικής ανοσίας, ακόμη και χωρίς νόσο που προκαλείται από CMV²¹. Επιπλέον, οι προληπτικές και θεραπευτικές επιλογές είναι λίγες και δεν είναι τελείως αποτελεσματικές. Οι πιο σοβαρές λοιμώξεις παρατηρούνται σε λήπτες αλλογενών αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (stem cells) και σε ασθενείς με AIDS με πολύ χαμηλό αριθμό CD₄ κυττάρων. CMV ασθένεια παρατηρείται επίσης σε μεταμοσχευμένους συμπαγών οργάνων, σε ασθενείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία για νεοπλασματικές νόσους ή νόσους του κολλαγόνου, καρδιαγγειακές παθήσεις και σε συγγενείς ανοσοανεπάρκειες. Η λοίμωξη είναι συχνά κλινικά σιωπηλή και όταν υπάρχει νόσος παρουσιάζεται από ένα σύντομο αυτοπεριοριζόμενο εμπύρετο μέχρι πολυσυστηματική ασθένεια που μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή του ασθενούς. Εκτός από την κλινική σημασία της CMV λοίμωξης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, οι λοιμώξεις έχουν παράσχει πολύτιμη εμπειρία για την φύση της νόσου και την παθογένεση της hCMV λοίμωξης. Για παράδειγμα, η επαναμόλυνση με νέα στελέχη του ιού, η σημασία των αντισωμάτων στην άμυνα του ξενιστή, ο βασικός ρόλος των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, η κλινική αποτελεσματικότητα ενός εμβολίου για CMV μελετήθηκαν σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς²¹. Η ανάπτυξη αντικών φαρμάκων για CMV λοίμωξη, μελέτες που οδήγησαν σε καθορισμό μοριακής βάσης για αντική αντοχή^{122,123} και η ανάπτυξη μεθόδων για ποσοτικό προσδιορισμό του CMV έγιναν κυρίως από την ανάγκη διαχείρισης λοιμώξεων σε αυτούς τους ασθενείς.^{124,72}

9.7. CMV και Μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων

Η διαχείριση της CMV λοίμωξης είναι σημαντική για την παροχή περίθαλψης και για την μείωση του συνολικού κόστους των μεταμοσχεύσεων συμπαγών οργάνων. Μελέτες από τις Ηνωμένες Πολιτείες, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη Γαλλία,^{125,126,127} αναφέρουν ότι οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς με νόσο CMV απαιτούν περισσότερες ημέρες παραμονής στο νοσοκομείο και σημαντικά υψηλότερο κόστος περίθαλψης.^{128,129} Η υποψία για CMV λοίμωξη πρέπει να τεθεί για κάθε ασθενή με μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου. Οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να εμφανιστούν: α) ως οξεία συστηματική, εμπύρετος νόσος (αναφέρεται ως σύνδρομο CMV) β) με επιπτώσεις σε συγκεκριμένα όργανα, γ) με έμμεσες επιπτώσεις.¹³⁰ Κύρια σημεία και συμπτώματα του συνδρόμου CMV περιλαμβάνουν πυρετό και αδιαθεσία, αρθραλγίες και ένα εξάνθημα που παρατηρείται μερικές φορές. Εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν ουδετεροπενία, θρομβοπενία και αυξημένα ηπατικά ένζυμα. Παρόλο που αυτά τα μη ειδικά σημεία μπορούν να προκύψουν και από άλλες αιτίες, η ανίχνευση CMV στο αίμα (με pp65 αντιγοναιμία ή PCR) αποτελεί ισχυρή ένδειξη παρουσίας του CMV. Όσον αφορά για επιπτώσεις σε συγκεκριμένα όργανα, ασθένεια τελικού οργάνου που αποδόθηκε σε CMV περιλαμβάνει: πνευμονίτιδα, γαστρεντερικές διαταραχές, κολίτιδα, ηπατίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα, παγκρεατίτιδα, μυοκαρδίτιδα και σπανιότερα εγκεφαλίτιδα ή περιφερική νευροπάθεια. Τέλος, οι κύριες έμμεσες επιπτώσεις της CMV λοίμωξης σε λήπτες μοσχευμάτων συμπαγών οργάνων περιλαμβάνουν απόρριψη, αθηροσκληρώση στεφανιαίας αρτηρίας μυοκαρδίου (σε καρδιακή μεταμόσχευση) καθώς και αυξημένο κίνδυνο μυκητιασικών και βακτηριακών λοιμώξεων. Πρωτοπαθής CMV λοίμωξη σε μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου συνδέεται με δυσλειτουργία του μεταμοσχευμένου οργάνου: νεφρική ανεπάρκεια σε λήπτες νεφρών, ηπατίτιδα σε λήπτες ήπατος, στένωση στεφανιαίας αρτηρίας ή απόρριψη μοσχεύματος σε λήπτες καρδιάς, και πνευμονίτιδα σε λήπτες πνεύμονα ή καρδιάς-πνευμόνων. Συσχέτιση μεταξύ CMV λοίμωξης (ιδίως πρωτοπαθούς λοίμωξης) και αυξημένος κίνδυνος ευκαιριακών λοιμώξεων έχει αναγνωρισθεί εδώ και 30 περίπου χρόνια και έχει επιβεβαιωθεί σε πρόσφατες μελέτες. Για παράδειγμα, μια μελέτη σε μεταμοσχευμένους ήπατος βρήκε ότι βακτηριακές και μυκητιασικές λοιμώξεις συμβαίνουν στο 60% των ασθενών με CMV νόσο σε σύγκριση με 24% σε ασθενείς που παραμένουν CMV αρνητικοί.¹³¹ Μια κλινική δοκιμή που συνέκρινε valacyclovir

από το στόμα με εικονικό φάρμακο για πρόληψη νόσου CMV σε μεταμοσχευμένους νεφρού, βρήκε σημαντική μείωση στους ασθενείς που πήραν θεραπεία σε σχέση με το εικονικό φάρμακο, τόσο της νόσου CMV, όσο και των λοιμώξεων από candida και σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων.¹³²

Η έναρξη CMV λοίμωξης παρουσιάζεται συνήθως 4 έως 8 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση με κλινικά σημεία συνήθως να εμφανίζονται τότε. Η στιγμή εμφάνισης λοίμωξης και νόσου ωστόσο ποικίλλει. Μπορεί να είναι μικρότερη σε βαθιά ανοσοκαταστολή ή να καθυστερήσει εφόσον αντική προφύλαξη χρησιμοποιείται άμεσα μετά τη μεταμόσχευση. Η πηγή της λοίμωξης μπορεί να είναι η επανενεργοποίηση στον λήπτη λανθάνοντος ιού, ή ιός στο μόσχευμα ή να είναι μέσω μετάγγισης. Πρωτοπαθής λοίμωξη από το μόσχευμα είναι γενικά πιο σοβαρή από επανενεργοποίηση ή επανамόλυνση, αν και αυτό ποικίλει, ανάλογα με το όργανο και το βαθμό ανοσοκαταστολής. Αν και αντική προφύλαξη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για την πρόληψη της νόσου CMV και ενώ αντικό φάρμακο χορηγείται, πολλές μελέτες περιγράφουν όψιμη εμφάνιση CMV νόσου μετά την αντική προφύλαξη.^{133,134,135,136,137} Ο κίνδυνος CMV νόσου και οι εκδηλώσεις της νόσου ποικίλλουν ανάλογα με το είδος της μεταμόσχευσης, καθώς και την προσέγγιση για την διάγνωση και διαχείριση της νόσου που ακολουθείται από τα διάφορα μεταμοσχευτικά κέντρα.^{138,139,140,141}

9.8. CMV και Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Αν και CMV νόσος τους πρώτους μήνες μετά από αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών σε μεγάλο βαθμό ελέγχεται με τη χορήγηση αντικών φαρμάκων, εντούτοις εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα γιατί εμφάνιση της νόσου σε υψηλού κινδύνου ασθενείς, όψιμη εμφάνιση της νόσου καθώς και έμμεσες επιπτώσεις επηρεάζουν δυσμενώς την έκβαση. Συγκριτικά με 25 χρόνια πριν, όπου το 25% περίπου των ληπτών ανέπτυξε CMV νόσο (συνήθως πνευμονίτιδα) με θνησιμότητα περίπου 85%, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος.²¹ Μελέτες από μεταμοσχευτικό κέντρο στην Σουηδία μεταξύ 1975 ως το 1985 και 1992 ως το 1994 δείχνουν ότι τα ποσοστά της CMV νόσου μειώθηκαν από 13% σε 2,2% και οι θάνατοι που αποδόθηκαν σε CMV από 13% σε 0%. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε Αμερικανικό Μεταμοσχευτικό κέντρο όπου η συχνότητα CMV νόσου τις πρώτες 100 μέρες μετά την μεταμόσχευση μειώθηκε από 38% σε 5% σε

διάστημα 10 ετών. Παράγοντες που συμβάλλουν στην μείωση της νόσου είναι: πρόληψη της νόσου μέσω μεταγγίσεων σε οροαρνητικούς ασθενείς, καλύτερες μέθοδοι για ταχεία διάγνωση των ασθενών που βρίσκονται σε κίνδυνο, ύπαρξη αποτελεσματικών αντικών φαρμάκων και χρησιμοποίηση αντιικών παραγόντων για πρόληψη της νόσου.²¹ Οι συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις που εμφανίζουν οι ασθενείς αυτοί είναι πνευμονίτιδα και νόσος της γαστρεντερικής οδού. CMV πνευμονίτιδα προκαλεί αναπνευστική δυσφορία και υποξαιμία.¹³⁰ Η νόσος της γαστρεντερικής οδού συνήθως περιλαμβάνει φλεγμονή του βλεννογόνου και μπορεί να συμβεί οπουδήποτε από τον οισοφάγο ως το παχύ έντερο. Σε μια μελέτη από την Σουηδία σε ένα χρονικό διάστημα 20 ετών όπου έγιναν 384 μεταμοσχεύσεις, CMV νόσο ανέπτυξαν 33 ασθενείς (8,6%). Μεταξύ αυτών, 21 (63,6%) είχαν πνευμονία, 3 (9,1%) πνευμονία και νόσο της γαστρεντερικής οδού, 6 (18,2%) γαστρεντερική νόσο και από μία περίπτωση ηπατίτιδα, εγκεφαλίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα. Με την χρήση προληπτικής ή προφυλακτικής αντικής αγωγής η συχνότητα της νόσου CMV τους πρώτους 3-4 μήνες έχει μειωθεί σε λιγότερο από 5%. Όψιμη εμφάνιση ωστόσο, σε περισσότερο δηλαδή από 100 μέρες μετά την μεταμόσχευση, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα. Σε μια μελέτη CMV ασθενών που έλαβαν γκανσικλοβίρη (είτε προφυλακτικά, είτε προληπτικά), όψιμη εμφάνιση της νόσου εμφανίστηκε στο 17,8% περίπου 5,5 μήνες μετά την μεταμόσχευση.^{142,143} Η θνησιμότητα στους ασθενείς με όψιμη εμφάνιση της νόσου ήταν 46%. Εκτός από πνευμονία, νόσο της γαστρεντερικής οδού ή άλλες κλινικές εκδηλώσεις η CMV νόσος έχει και έμμεσες συνέπειες. Έτσι, αυξημένη εμφάνιση ευκαιριακών μυκητιασικών και βακτηριακών λοιμώξεων έχει αναφερθεί.¹⁴⁴ Κύριες κλινικές μεταβλητές που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο για CMV νόσο περιλαμβάνουν: CMV ανοσολογική κατάσταση δότη και λήπτη, ιστοσυμβατότητα δότη-λήπτη, το σχήμα αγωγής, καθώς και το είδος της ανοσοκαταστολής που χρησιμοποιείται μετά τη μεταμόσχευση.^{142,143,145} Παρά το γεγονός ότι η προσέγγιση για τη διάγνωση, την πρόληψη και θεραπεία διαφέρει μεταξύ διάφορων κέντρων μεταμόσχευσης, η γενική αρχή είναι ότι η επιτυχής διαχείριση της CMV νόσου απαιτεί προμεταμοσχευτικό έλεγχο του δότη και του λήπτη, πρόληψη μέσω μεταγγίσεων, ιολογική και κλινική εξέταση για νόσο μετά τη μεταμόσχευση και αποτελεσματική χρήση αντικών φαρμάκων.

9.9. CMV νόσος και σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS)

Πριν τη χρήση της υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκής θεραπείας (Highly Active AntiRetroviral Therapy-HAART), περίπου 20% με 40% των ενηλίκων με AIDS ανέπτυσαν CMV νόσο.²¹ Μεταξύ των HIV(+) ατόμων, ο κίνδυνος για νόσο CMV εξαρτάται από τη λειτουργία του ανοσοποιητικού και σχετίζεται με χαμηλό αριθμό CD₄ κυττάρων. Μια μελέτη με περισσότερους από 1000 ενήλικες με αριθμό CD₄ κυττάρων λιγότερο από 250/ mm³ που έπαιρναν ζιδοβουδίνη διαπίστωσε ότι 109 ανέπτυξαν CMV νόσο. Οι ασθενείς που είχαν λιγότερα από 100 CD₄ κύτταρα/ mm³ ανέπτυξαν CMV νόσο σε ποσοστό 21,4% εντός 2 ετών, ενώ αυτοί που είχαν περισσότερα από 100 CD₄ κύτταρα /mm³ σε ποσοστό 10,3%. Οι κλινικές εκδηλώσεις μεταξύ των 109 ασθενών ήταν: αμφιβληστροειδίτιδα 85,3%, οισοφαγίτιδα 9,2%, κολίτιδα 7,3%, και τα δύο αμφιβληστροειδίτιδα και οισοφαγίτιδα 2,7%. (Εικόνα12) Λιγότερο συχνές κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν: εγκεφαλίτιδα, περιφερική νευροπάθεια, πολυριζονευρίτιδα, πνευμονίτιδα, γαστρίτιδα και ηπατίτιδα.¹⁴⁶ Η χρήση της HAART έχει συμβάλει ουσιαστικά στην ανοσοποιητική λειτουργία σε HIV(+) ασθενείς και έχει μειώσει δραστικά την εμφάνιση ιαιμίας και νόσου CMV.^{147,148} Παρόλα αυτά, ο CMV παραμένει σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας σε HIV(+) ασθενείς με σημαντική δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και οι κατευθυντήριες γραμμές για πρόληψη CMV νόσου εστιάζονται σε ασθενείς με CD₄ κύτταρα λιγότερα των 50/mm³.¹⁴⁹

9.10. Ενδεχόμενη συσχέτιση με χρόνιες αγγειακές νόσους

Ο CMV έχει αναφερθεί ως πιθανή αιτία ή σημαντικός συμπαράγοντας σε αθηροσκληρωτική αγγειακή νόσο και σε αυτοάνοσες αγγειίτιδες. Ο CMV ως αιτιολογικός παράγοντας σε συστηματική σκλήρυνση προτάθηκε με βάση τα υψηλότερα επίπεδα CMV IgG σε ασθενείς με σκληρόδερμα σε σχέση με ομάδα ελέγχου.¹⁵⁰ Πιθανός ρόλος του CMV σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις όπως οζώδης πολυαρτιρίτιδα, συστηματική νεκρωτική αγγειίτιδα,¹⁵¹ συστηματικός ερυθηματώδης λύκος,¹⁵² σύνδρομο Sjogren, έχει επίσης προταθεί¹⁵³ με αδύναμα όμως αποδεικτικά στοιχεία. Ο ρόλος του CMV στην αθηροσκλήρωση επίσης έχει μελετηθεί, αλλά τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα. Μελέτες έχουν συνδέσει την παρουσία και το ποσό των CMV IgG αντισωμάτων με επαναστένωση των στεφανιαίων αγγείων μετά από αθηρεκτομή. Μελέτες σε μεταμοσχευμένους καρδιάς, εμπλέκουν την

CMV λοίμωξη ως σημαντικό παράγοντα για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου που ακολουθεί τη μεταμόσχευση.¹⁵⁴ Άλλοι όμως δεν έχουν αναφέρει ανάλογα αποτελέσματα.^{155,156,157,158} Περαιτέρω μελέτες λοιπόν απαιτούνται για την αξιολόγηση του ρόλου του CMV στην ενδεχόμενη συσχέτιση με χρόνιες αγγειακές νόσους.



ΕΙΚΟΝΑ 11: Κλινική εμφάνιση και ακτινολογικά ευρήματα νεογνών με συγγενή λοίμωξη κυτταρομεγαλοϊού.

- Νεογνό με σοβαρή συγγενή CMV λοίμωξη με πετεχειακό εξάνθημα, μικροκεφαλία, ίκτερο και παθολογική στάση των άνω άκρων ως αποτέλεσμα βλάβης του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.)
- Αξονική τομογραφία από ένα νεογνό με βλάβη του Κ.Ν.Σ., αποτέλεσμα συγγενούς CMV λοίμωξης με σοβαρές περικοιλιακές αποτιτανώσεις και μεγέθυνση των κοιλιών του εγκεφάλου.³⁸



ΕΙΚΟΝΑ 12: Εικόνα χοριοαμφιβληστροειδίτιδας σε HIV (+) ασθενή με CMV νόσο¹⁵⁹

10. ΔΙΑΓΝΩΣΗ CMV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

Είναι σχετικά εύκολο να απομονωθεί ο ιός και να καλλιεργηθεί ή να ανευρεθούν συγκεκριμένα αντισώματα έναντι του ιού. Στην κλινική πράξη όμως είναι γενικά δύσκολο να αποδειχτεί ότι ο ιός προκαλεί συγκεκριμένα συμπτώματα ή κλινικές εκδηλώσεις. Συχνά απαιτείται βιοψία και ιστολογική εξέταση, που σε πολλές περιπτώσεις δεν μπορεί να αξιολογηθεί ως παθολογική εξαιτίας του ιού. Για παράδειγμα σε πολλούς ασθενείς, ακόμα και σε εκείνους με συγγενή λοίμωξη ο ιός εκκρίνεται στα ούρα για χρόνια, χωρίς καμία κλινική εκδήλωση. Επίσης σε ασθενείς με CMV πνευμονία, ο ιός δεν ανευρίσκεται πολύ συχνά στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και πρέπει να γίνει λήψη πνευμονικού ιστού που ενδεχομένως να βοηθήσει περισσότερο στη διάγνωση. Η προηγούμενη επαφή του ιού με τον ασθενή μπορεί να διαγνωστεί πολύ εύκολα με απλή ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό έναντι του CMV. Αντίθετα η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού για τη διάγνωση πρόσφατης λοίμωξης έχει πολύ μικρή χρησιμότητα στην καθημερινή κλινική πράξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να δώσει διαγνωστική λύση ο ποσοτικός προσδιορισμός των ιικών πρωτεϊνών ή του ιικού DNA.

Συχνά η CMV λοίμωξη προκαλείται από την ενεργοποίηση ιού που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση. Έτσι ένας ασθενής μπορεί να παρουσιάζει είτε πρωτογενή CMV λοίμωξη αν μολυνθεί για πρώτη φορά, είτε CMV λοίμωξη μετά από ενεργοποίηση λανθάνουσας CMV μόλυνσης. Η διάκριση μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων έχει προγνωστική σημασία, διότι οι πρωτογενείς λοιμώξεις είναι κλινικώς πιο σοβαρές, ενώ σε νεογνώντα μπορούν να προκαλέσουν συμπτωματική νόσο. Σε μερικές περιπτώσεις όπως για παράδειγμα σε μεταμοσχεύσεις οργάνων επιβάλλεται ο έλεγχος των οροαρνητικών ασθενών έτσι ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος να λάβουν μόσχευμα από οροθετικό δέκτη και να παρουσιάσουν πρωτογενή λοίμωξη. Σε μη ανοσοκατεσταλμένους, φαινομενικά υγιείς, μπορεί η πρωτογενής λοίμωξη από CMV να εκδηλώνεται ως σύνδρομο αυτοπεριοριζόμενης μονοπυρήνωσης. Όπως και στην περίπτωση της EBV μονοπυρήνωσης, τα συμπτώματα οφείλονται στην παρουσία κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων που προσπαθούν να εξοντώσουν τα CMV μολυσμένα κύτταρα.^{160,161,21,162}

10.1. Διαφορική Διάγνωση

Συμπτωματική CMV λοίμωξη σε φυσιολογικό ξενιστή θα πρέπει να διαφοροδιαγνώσκεται από άλλα ιογενή και μη ιογενή αίτια που χαρακτηρίζονται από σχετικά παρατενόμενο εμπύρετο (συχνά >10 ημέρες) και αίσθημα κακουχίας. Άλλοι μολυσματικοί παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν σύνδρομο μονοπυρήνωσης ή παρόμοια νόσο (π.χ. Epstein-Barr Virus, *Toxoplasma gondii*, HIV, ηπατίτιδα A, B,C) θα πρέπει να μπαίνουν στη διαφορική διάγνωση. Ορολογικός έλεγχος μπορεί συχνά να επιβεβαιώσει ή να αποκλείσει πρωτοπαθή CMV λοίμωξη.²¹

Συγγενής CMV λοίμωξη δεν μπορεί να διαφοροδιαγνωσθεί κλινικά από συγγενή λοίμωξη που προκαλείται από άλλους παράγοντες όπως *Toxoplasma gondii*, σύφιλη, ή ερυθρά. Επίσης κάποια νεογέννητα με μεταγεννητική βακτηριακή σήψη, εμφανίζουν ηπατομεγαλία ή σπληνομεγαλία, πετέχιες, υπερχολυρεθριναιμία, θρομβοπενία και νευρολογικά συμπτώματα παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται σε νεογνά με συγγενή CMV λοίμωξη. Ακόμη, νεογέννητα με μη μολυσματικές ασθένειες όπως εμβρυϊκή ερυθροβλάστωση και μεταβολικές ασθένειες μπορεί να εμφανίζουν παρόμοια συμπτωματολογία. Ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις για την απομόνωση ή ανίχνευση CMV θέτουν τη διάγνωση στα νεογνά γρήγορα και αξιόπιστα.

Σε λήπτες μοσχευμάτων τα συμπτώματα της CMV λοίμωξης είναι μη ειδικά. Πολλές ιογενείς (κυρίως EBV και HHV-6 πέρα από τη CMV) και μη ιογενείς λοιμώξεις, καθώς και επεισόδια απόρριψης μπορεί να προκαλέσουν πυρετό, λευκοπενία, κακουχία, ηπατίτιδα, πνευμονίτιδα, εντερίτιδα ή μειωμένη λειτουργία μοσχεύματος. Σε ασθενείς με AIDS η CMV λοίμωξη συνήθως εμφανίζεται ως αμφιβληστροειδίτιδα, εντερίτιδα ή οισοφαγίτιδα. Ως ηπατίτιδα, εγκεφαλίτιδα, πνευμονίτιδα, περιφερική νευροπάθεια ή πολυριζοπάθεια εμφανίζεται λιγότερο συχνά. Παρόλο που η αμφιβληστροειδίτιδα διαγιγνώσκεται με μια οφθαλμολογική εξέταση με ικανοποιητική ακρίβεια, πολλοί άλλοι ιοί, βακτήρια και μύκητες μπορούν να προκαλέσουν παρόμοια συμπτώματα με τον CMV σε ασθενείς με AIDS.²¹

10.2. Εργαστηριακή διάγνωση CMV λοίμωξης

10.2.1. Κλινικά Δείγματα

Ο CMV μπορεί να απομονωθεί από όλα σχεδόν τα βιολογικά υγρά. Ειδικά για τα ούρα ο έλεγχος θα πρέπει να περιλαμβάνει περισσότερα του ενός, διαδοχικά δείγματα, διότι ο ιός εκκρίνεται διακοπτόμενα στα ούρα.

Όσον αφορά δείγματα αίματος στην περίπτωση αξιολόγησης ενεργούς λοίμωξης, ιδιαίτερα με μοριακές τεχνικές πρέπει να αποφεύγεται η παρατεταμένη ψύξη του δείγματος αίματος κάτω από τους 4° C, διότι με την καταστροφή των λευκοκυττάρων σε αυτές τις θερμοκρασίες απελευθερώνεται το γονιδίωμα του ιού που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση και επηρεάζει ειδικά τη μέτρηση του ιικού φορτίου. Να σημειωθεί δε ότι ο ιός χάνει μεγάλο μέρος της μολυσματικότητάς του σε συνθήκες απλής ψύξης, ενώ απενεργοποιείται πλήρως σε θερμοκρασίες κάτω των -20° C.^{160,161,21,162}

Για τον ορολογικό έλεγχο ασθενών ή σε περιπτώσεις μαζικού screening αρκεί ένα και μόνο δείγμα ορού αίματος. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον στον έλεγχο δοτών οργάνων και δοτών παραγώγων αίματος. Για τη διάγνωση πρόσφατης περίπτωσης μόλυνσης από τον ιό απαιτείται εξέταση δείγματος ορού αίματος εις διπλούν. Στην περίπτωση που αναζητούνται IgM αντισώματα το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται με την έναρξη των συμπτωμάτων, ενώ όταν ο στόχος είναι η αναζήτηση IgG αντισωμάτων το δείγμα πρέπει να συλλέγεται με καθυστέρηση τουλάχιστον 2 εβδομάδων.²¹ Τελευταία κερδίζει έδαφος ο έλεγχος για αντισώματα, ειδικά σε περιπτώσεις παιδιών, σε δείγμα σάλιου, ενώ σε νευρολογικούς ασθενείς συστήνεται, εκτός από έλεγχο για αντισώματα στον ορό του αίματος, έλεγχος στο ENY το οποίο συλλέγεται την ίδια μέρα.

10.2.2. Εργαστηριακοί μέθοδοι διάγνωσης του CMV

Τα κλινικά δείγματα ούρων, σάλιου, αίματος και βιοψιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση του ιού με τις παρακάτω εργαστηριακές μεθόδους:

10.2.2.1. Ιστολογικός έλεγχος

Στην περίπτωση λήψης βιοψιών αναζητούνται τα χαρακτηριστικά μεγάλα κύτταρα (κυτταρομεγαλικά) που εμπεριέχουν βασεόφιλα ενδοπυρηνικά έγκλειστα, και σε ορισμένες περιπτώσεις, ηωσινοφιλικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Τα πυρηνικά έγκλειστα εμφανίζονται δίκην «ματιού κουκουβάγιας», ενώ αποκαλύπτονται με χρώσεις Wright-Giemsa, αιματοξυλίνης-ηωσίνης, και χρώση Παπανικολάου. Εντούτοις το ποσοστό εμφάνισης τέτοιων χαρακτηριστικών κυττάρων παραμένει χαμηλό και γενικά συστήνεται ταυτόχρονος ορολογικός ή μοριακός έλεγχος.^{78,160}

10.2.2.2. Κυτταρολογικός έλεγχος

Σε ένα 20 με 50% των περιπτώσεων συμπτωματικής συγγενούς λοίμωξης από CMV μπορεί να αποβεί θετικός ο έλεγχος με κυτταρολογικές τεχνικές. Αποπίπτοντα κύτταρα από το ουροποιητικό μπορούν να συλλεγούν και να εξεταστούν για την ύπαρξη ενδοπυρηνικών εγκλείστων. Η ίδια μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση κυττάρων από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και κολπικές εκκρίσεις.^{78,160}

10.2.2.3. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Ο ιός μπορεί να αποκαλυφθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε δείγματα ούρων ή στοματικά δείγματα βρεφών με συγγενή CMV λοίμωξη. Ο ιός μπορεί να παρατηρηθεί μόνο όταν η συγκέντρωσή του υπερβαίνει τα 10^4 αντίγραφα/ml δείγματος. Η μέθοδος είναι σχετικά γρήγορη ενώ δίνει καλά αποτελέσματα σε περιπτώσεις επιμολυσμένων δειγμάτων. Στα αρνητικά της συγκαταλέγονται η σχετικά μικρή ευαισθησία και η ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό και ακριβό εξοπλισμό.^{78,160}

10.2.2.4. Κυτταροκαλλιέργεια

Ο ιός του CMV μπορεί να καλλιεργηθεί σε ανθρώπινους ινοβλάστες όπως WI-38, MRC-5, IMR-90 in vitro ικανοποιητικά και σε μικρότερο βαθμό σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.^{163,161,21,78} Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενοφθαλμισμό του καλλιεργήματος δείγματα από το αναπνευστικό, βιοψίες από οποιοδήποτε όργανο ή ιστό, ούρα, ακόμα και περιφερικό αίμα. Η δοκιμασία

αποβαίνει θετική όταν μετά από περίπου 5 μέρες εμφανιστούν κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις στους καλλιεργούμενους ινοβλάστες. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, ο χρόνος καλλιέργειας των ινοβλαστών μπορεί να φτάσει τις 4 εβδομάδες ή ακόμα και 6 εβδομάδες όταν εξετάζονται λευκοκύτταρα από περιφερικό αίμα. Ο χρόνος εμφάνισης κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων είναι αντιστρόφως ανάλογος του ιικού φορτίου του δείγματος. Έτσι δείγμα με υψηλό αριθμό κυκλοφορούντων ιικών σωματιδίων εμφανίζουν κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις σε μικρότερο χρόνο και αντιστρόφως. Πάντως ο μέσος χρόνος φτάνει περίπου στις 2 εβδομάδες. Η χρήση της τεχνικής αυτής εκτός του ότι απαιτεί καλά οργανωμένα εργαστήρια με εμπειρία στις καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων και σχετικά υψηλούς χρόνους αναμονής του αποτελέσματος, έχει και ορισμένα πλεονεκτήματα. Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι με την καλλιέργεια του ιού επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός του καθιστώντας εφικτή την ανίχνευσή του σε δείγματα με πολύ χαμηλό ιικό φορτίο. Επιπλέον με συνδυασμένη χρήση της κυτταροκαλλιέργειας με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω και ιδιαίτερα με τη χρήση των μοριακών τεχνικών μπορεί κανείς να αυξήσει περισσότερο την ευαισθησία ανίχνευσης του CMV.^{160,161,21,162,78}

10.2.2.5. Ταχεία καλλιέργεια DEAFF (DEAFF test: Detection of early antigen fluorescent foci).

Το κλινικό δείγμα εμβολιάζεται σε κυτταροκαλλιέργεια που εξετάζεται μετά από 24 ώρες με ανοσοφθορισμό για την παρουσία πρώιμων πρωτεϊνών του CMV. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την έγκαιρη διάγνωση της CMV λοίμωξης και επιδεικνύει παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα με τη συμβατική κυτταροκαλλιέργεια. Σύμφωνα με διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου όταν εφαρμόζεται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς είναι 78% και 100% αντίστοιχα.^{78,163}

10.2.2.6. Ανοσοφθορισμός

Φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CMV μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση ανίχνευση αντιγόνων του ιού σε δείγματα βιοψιών. Επίσης κατάλληλα δείγματα για την μέθοδο αυτή αποτελούν το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος και ούρα. Η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με χρήση μίγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το πλεονέκτημα

της μεθόδου έγκειται στην ταχύτητα της εξέτασης, ενώ παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο της κυτταροκαλλιέργειας.^{160,161,21,78}

10.2.2.7. Δοκιμασία Αντιγοναιμίας CMV-pp65

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως για την άμεση ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του CMV σε περιφερικά λευκοκύτταρα. Η μέθοδος διαθέτει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ βοηθά στην έγκαιρη διάγνωση της CMV λοίμωξης πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η δοκιμασία βασίζεται στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της φωσφοπρωτεΐνης pp 65 του ιού στον πυρήνα περιφερικών λευκοκυττάρων με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτής και δευτερογενών αντισωμάτων σημασμένων με υπεροξειδάση ή φλουρεσίνη. Μετά από παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο θετικά θεωρούνται τα κύτταρα που αναπτύσσουν καφέ-κόκκινο χρωματισμό ή πράσινο φθορισμό. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός των προσβεβλημένων κυττάρων στο σύνολο των λευκοκυττάρων. Η δοκιμασία εντούτοις είναι σχετικά χρονοβόρα, ενώ απαιτεί και εξειδικευμένο προσωπικό.^{21,160,161,78}

10.2.2.8. Υβριδισμός

In situ υβριδισμός, με μοριακούς ανιχνευτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση του CMV σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη. Κατάλληλα δείγματα είναι ο πνευμονικός ιστός, ιστός από σάρκωμα Kaposi, και φυγοκεντρημένο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Η μέθοδος είναι ταχεία και εύκολη στην αξιολόγηση με απλό φωτονικό μικροσκόπιο, ενώ υπολείπεται σε ευαισθησία.⁷⁸

10.2.2.9. Ορολογικές Τεχνικές

Ποικιλία ορολογικών μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για την οροδιάγνωση της CMV λοίμωξης. Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται κυρίως για το μαζικό έλεγχο ασθενών ή φορέων του ιού, καθώς επίσης και για τον προ και μετα-μεταμοσχευτικό έλεγχο ασθενών και δοτών οργάνων.²¹

10.2.2.9.1. EIA (enzyme immunoassays)-Ενζυμικές ανοσοτεχνικές

Πρόκειται για ταχείες, ευαίσθητες και ειδικές μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του CMV. Το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι μπορούν να εξετασθούν πολλά δείγματα ταυτόχρονα, ενώ ο έλεγχος πλέον διεξάγεται από αυτοματοποιημένα συστήματα. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση IgG αντι-CMV αντισωμάτων.^{160,78,21,161,162}

10.2.2.9.2.Δοκιμασίες Latex

Ταχύτατες μέθοδοι ανίχνευσης IgG και IgM αντι-CMV αντισωμάτων, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο δοτών αίματος. Το μειονέκτημά τους είναι ότι δεν μπορούν να διαχωρίσουν τις δύο τάξεις ανοσοσφαιρινών, οπότε παρέχουν μια αδρή άποψη για το ανοσολογικό προφίλ του εξεταζόμενου.^{160,78,21,161,162}

10.2.2.9.3.ACIF test και IFA

Πρόκειται για μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού με χρήση ανοσοφθορισμού μετά από επώαση του ορού με CMV μολυσμένους ινοβλάστες (ACIF) ή μετά από επώαση του ορού με μολυσμένα κύτταρα σε γυάλινο μικροπλακίδιο (IAF). Και οι δύο μέθοδοι απαιτούν 2 με 3 ώρες, αλλά μειονεκτούν στον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να εξετασθούν ταυτόχρονα, και επιπλέον συχνά παρατηρούνται ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Με όλες τις παραπάνω μεθοδολογίες είναι δυνατός ο εντοπισμός και η ποσοτική μέτρηση των IgM αντισωμάτων με χρήση ειδικών αντι-IgM αντισωμάτων. Η μέτρηση των IgM αντι-CMV αντισωμάτων έχει αποβεί χρήσιμη για τη διάγνωση πρόσφατης πρωτογενούς ή επανενεργοποιημένης λανθάνουσας λοίμωξης. Εντούτοις η μέτρηση παρουσιάζει αρκετά ψευδώς θετικά αποτελέσματα ιδιαίτερα επί υπέρβασης στον ορό του ρευματοειδούς παράγοντα ο οποίος αντιδρά με τα IgG αντισώματα που κυκλοφορούν. Επίσης αρκετά συχνά μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ειδικά επί περιπτώσεων υψηλών τίτλων IgG αντισωμάτων, τα οποία συναγωνίζονται και μπλοκάρουν τη σύνδεση με τα IgM αντισώματα.²¹

Εκτός της διάγνωσης ενεργούς-πρόσφατης λοίμωξης η αξιολόγηση της μέτρησης των IgM αντισωμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή. Σε περιπτώσεις

νεογέννητων και μόνο μια θετική δοκιμασία αξιολογείται ως αποδεικτικό ενεργούς λοίμωξης, διότι τα IgM από τη μητέρα δεν περνούν τον πλακούντα. Ωστόσο μπορεί η παραγωγή IgM σε νεογέννητα να έχει καθυστερήσει. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις IgM αντισώματα ανιχνεύονται και σε ενεργείς και σε λανθάνουσες λοιμώξεις, γεγονός που υποδεικνύει παρατεταμένη παραγωγή και παραμονή IgM αντισωμάτων στον ορό. Στις περιπτώσεις αυτές η αξιολόγηση περιπλέκεται, ειδικά όταν η μητέρα είναι IgM θετική²¹.

Πρόσφατα, ο προσδιορισμός της λειτουργικής συγγένειας των IgG αντισωμάτων (IgG avidity) συνέβαλλε σημαντικά στη διαφορική διάγνωση της πρωτοπαθούς CMV λοίμωξης από την επαναλοίμωξη. Αυτές οι δοκιμές πρέπει να εφαρμόζονται σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό των τίτλων των IgG και IgM αντισωμάτων.

Όπου είναι δυνατόν, ο ορολογικός έλεγχος πρέπει να συνδυάζεται με κυτταροκαλλιέργεια, ειδικά στην περίπτωση που οι ασθενείς βρίσκονται σε κατάσταση ανοσοκαταστολής οπότε αποτυγχάνουν να αναπτύξουν ανοσιακή απάντηση.^{163,78,161,21}

10.2.2.10. Μοριακές Τεχνικές

Στις μέρες μας η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) προσφέρει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό του DNA του CMV. Διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που ανιχνεύουν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων του CMV (immediate-early antigen-1, major immediate early antigen, glycoprotein B, H, EcoRI D fragment, Hind III X fragment, pp65, pp67, major capsid protein). Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει με την χρήση 2 ζευγαριών εκκινητών (φωλιασμένη PCR) από τα παραπάνω γονίδια-στόχους.^{160,78,161,21,162} Επίσης η μέθοδος δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη περισσότερων του ενός γονοτυπικά διαφορετικά ιών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε κλινικό δείγμα, στην διάγνωση βρεφών με συγγενή λοίμωξη, καθώς επίσης στην ποσοτική της μορφή για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Ωστόσο τίθεται από πολλούς σε αμφιβολία η χρησιμότητα των μοριακών τεχνικών για την απλή ανίχνευση του ιού. Και αυτό διότι η ποιοτική PCR δεν μπορεί να διαχωρίσει την παλαιά-λανθάνουσα λοίμωξη από την πρόσφατη-ενεργό λοίμωξη, λόγω της κυκλοφορίας στο αίμα λευκοκυττάρων που φέρουν το γονιδίωμα του ιού χωρίς αυτό

να εκφράζεται. Έτσι είναι πολύ συχνή η ύπαρξη θετικών δειγμάτων σε ασυμπτωματικούς φορείς του ιού. Στο πρόβλημα αυτό δίνει απάντηση η ποσοτική μέτρηση η οποία καταδεικνύει τον αριθμό των κυκλοφορούντων ιικών σωματιδίων. Εντούτοις η ποιοτική μέτρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς πρόβλημα σε περιπτώσεις ενεργών λοιμώξεων, όπως σε CMV εγκεφαλίτιδες με έλεγχο εγκεφαλονωτιαίου υγρού, σε περιπτώσεις συγγενούς CMV λοίμωξης με έλεγχο αμνιακού υγρού, ούρων ή εμβρυϊκού αίματος, καθώς και στις περιπτώσεις ελέγχου οροαρνητικών δεκτών που δέχτηκαν μόσχευμα από οροθετικό δότη. Τέλος η χρήση ποσοτικής PCR μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας ασθενών με CMV λοίμωξη, κυρίως ανοσοκατεσταλμένων, όπως επίσης και στην πρόγνωση κινδύνου ανάπτυξης CMV λοίμωξης σε ασθενείς με AIDS.²¹.
(Εικόνες: 13,14,15,16,17)

11. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ CMV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η πιο ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για τη διάγνωση της συγγενούς CMV λοίμωξης είναι η απομόνωση του ιού από τα ούρα, τις αναπνευστικές εκκρίσεις ή άλλα βιολογικά υγρά τις πρώτες 3 εβδομάδες μετά τη γέννηση με μοριακές τεχνικές. Προτιμάται δείγμα ούρων διότι περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα του ιού, επομένως ο ιός μπορεί να καλλιεργηθεί με ευχέρεια. Επίσης μπορεί να γίνει προσπάθεια απομόνωσης του ιού από δείγματα αίματος ή άλλων ιστών. Τελευταία υπάρχουν ενδείξεις ότι το DNA του ιού μπορεί επίσης να ανιχνευθεί με πολύ καλή ευαισθησία και σε δείγματα σάλιου του νεογνού. Οι ορολογικές διαδικασίες είναι λιγότερο χρήσιμες διότι θα ανιχνευθούν IgG αντισώματα από τη μητέρα, ενώ IgM είναι πολύ πιθανόν να μην ανιχνεύονται. Κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης μια ορομετατροπή στη μητέρα από αρνητικά IgG σε θετικά IgG είναι ενδεικτική πρωτογενούς λοίμωξης, εφόσον υπάρχουν και κλινικά συμπτώματα. Η συγγενής λοίμωξη μπορεί να αποδειχθεί και στην περίπτωση βρεφών με κλινικά συμπτώματα και τίτλους αντισωμάτων μεγαλύτερων αυτών της μητέρας. Αρνητικοί IgG τίτλοι τόσο στο παιδί όσο και στην μητέρα αποκλείουν την συγγενή λοίμωξη. Βρέφη που προηγουμένως δεν είχαν ελεγχθεί και βρέθηκαν να εκκρίνουν τον ιό τις τρεις πρώτες εβδομάδες μπορεί να έχουν συγγενή λοίμωξη ή πρόσφατη λοίμωξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο ορολογικός έλεγχος δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ των δύο περιπτώσεων.^{21,160,161,48} Μετά τον 6^ο μήνα από τη γέννηση, οπότε τα μητρικά αντισώματα εξαφανίζονται, ο ορολογικός έλεγχος στο παιδί είναι ευκολότερος. Παρουσία θετικού δείγματος μετά τη γέννηση επί αρνητικού δείγματος κατά την εγκυμοσύνη, δηλώνει πρωτογενή λοίμωξη. Στην περίπτωση που 2 διαδοχικά δείγματα παρουσιάζουν 4 φορές αύξηση του τίτλου, τότε μπορεί να υποθέσει κανείς ότι πρόκειται για ενεργοποίηση λανθάνουσας λοίμωξης. Εάν ο τίτλος αντισωμάτων παραμένει σταθερός για μεγάλο χρονικό διάστημα, υποδηλώνει παλαιά λοίμωξη.²¹

Σε περιπτώσεις μεγάλης αύξησης των τίτλων αντισωμάτων σε προηγούμενα υγιείς οροθετικούς ασθενείς και σε ανοσοκατεσταλμένους όπου η παραγωγή αντισωμάτων είναι μειωμένη, ο ορολογικός έλεγχος δεν μπορεί να είναι αποκαλυπτικός για τη διάγνωση. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητος ο μοριακός έλεγχος, που θα επιβεβαιώσει την πρόσφατη λοίμωξη.

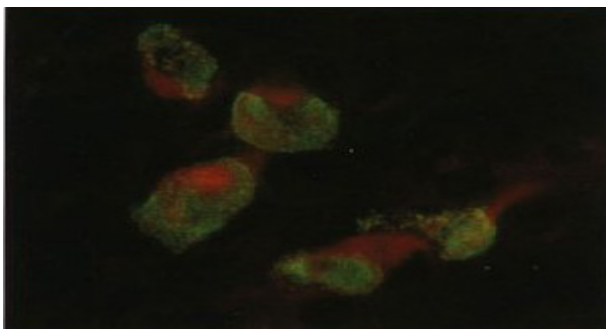
Στις περιπτώσεις ελέγχου δοτών και ληπτών οργάνων ο ορολογικός έλεγχος είναι χρήσιμος πριν από τη μεταμόσχευση. Οροαρνητικοί λήπτες οργάνων ή αίματος από οροθετικό δότη έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης CMV λοίμωξης. Έτσι, γνωρίζοντας το ορολογικό προφίλ λήπτη και δότη μπορεί με σχετική ευχέρεια να καθοριστεί το είδος της χημειοπροφύλαξης που πρέπει να χορηγηθεί. Μετά τη μεταμόσχευση όμως ο ορολογικός έλεγχος δεν έχει να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες. Σε αυτό το σημείο έρχονται να δώσουν πληροφορίες οι μοριακές τεχνικές και ενδεχομένως η κυτταροκαλλιέργεια.²¹ Έτσι μοριακή ανίχνευση του ιού στον ορό υποδηλώνει ενεργό λοίμωξη. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειώσουμε ότι πολλοί ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται ο ιός στον ορό δεν εμφανίζουν συμπτώματα ή νόσο. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να εντοπιστεί ο ιός στο κατάλληλο κλινικό δείγμα. Για παράδειγμα ανίχνευση του ιού στα ούρα υποδηλώνει λοίμωξη από CMV σε μεταμοσχευθέντες νεφρού. Σε όλες τις περιπτώσεις που υποδεικνύεται ενεργός λοίμωξη, θα πρέπει να ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου. Το ποσό του αρχικού ιικού φορτίου κατά την έγκαιρη διάγνωση της CMV λοίμωξης δίνει προγνωστικές πληροφορίες σχετικά με τη σοβαρότητα. Επίσης θα πρέπει να επαναλαμβάνεται ανά εβδομάδα για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί. Μελέτες βασισμένες σε ποσοτικές in-house PCR έχουν δείξει ότι ασθενείς με ενεργό νόσο έχουν υψηλότερα επίπεδα ιικού φορτίου (1000 μέχρι και >100.000 αντίγραφα/ml) σε σχέση με τους ασυμπτωματικούς (<400 αντίγραφα/ml).^{163,162,161,21,164}

Τέλος περιπτώσεις ανίχνευσης του ιού σε βιοψίες ήπατος ή πνεύμονα δεν θα πρέπει να εφησυχάσουν τον κλινικό ιατρό. Είναι δε πολύ πιθανό να υποκρύπτεται διπλή λοίμωξη από *Chlamydia trachomatis*, *Pneumocystis jiroveci*, ή άλλα βακτήρια ή μύκητες.^{160,21}

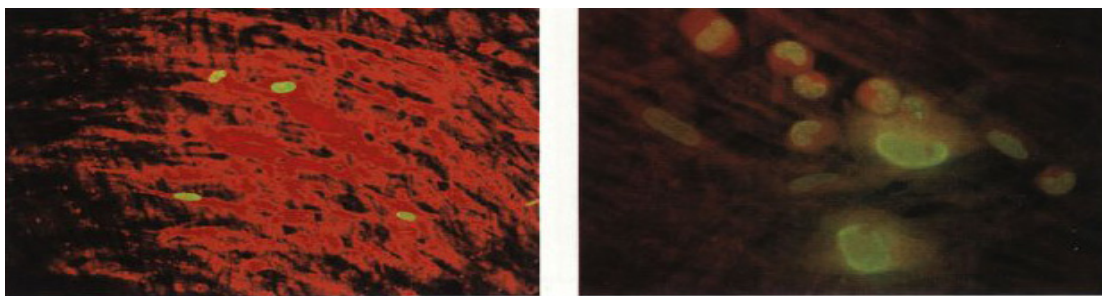
Εν κατακλείδι, η εφαρμογή μοριακών τεχνικών σε συνδυασμό με τις κλασσικές ορολογικές δοκιμασίες μπορεί σε κάθε περίπτωση να βοηθήσει στην αξιόπιστη διάγνωση της CMV λοίμωξης. Επιπλέον η σωστή και έγκαιρη χρήση των μοριακών τεχνικών μπορεί να βοηθήσει τον κλινικό ιατρό, στην έγκαιρη πρόγνωση, αλλά και στην αξιολόγηση της αντικής θεραπείας.



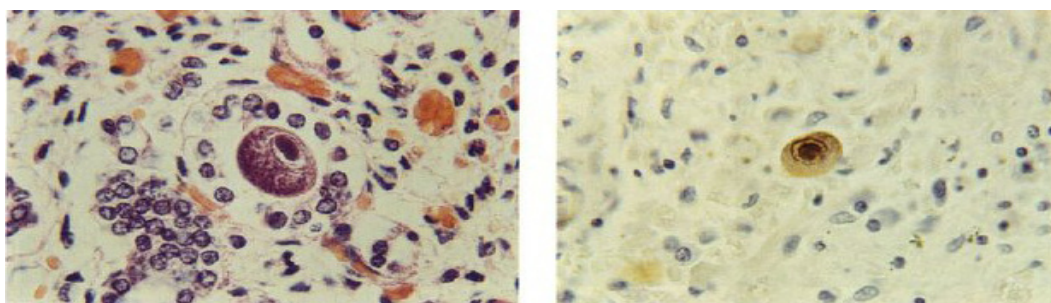
ΕΙΚΟΝΑ 13: Παρατήρηση καλλιέργειας κυτταρομεγαλοϊού (CMV), σε MRC-5 κύτταρα, με το μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (x 225). Ο CMV έχει ειδικές διατροφικές απαιτήσεις. Η καλλιέργειά του γίνεται σε διπλοειδικά κύτταρα ανθρώπου (MRC-5 ή WI-38) διαρκεί δε μέχρι 21 ημέρες επειδή η κυτταροπαθογόνος επίδραση (ΚΠΕ) του είναι ορατή μετά από 5-10 ημέρες τουλάχιστον. Η ΚΠΕ του CMV συνίσταται στην κατά τόπους παρουσία μεγάλων, αποστρογγυλεμένων, διαθλαστικών κυττάρων τα οποία διατάσσονται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα της μονοκυτταρικής στοιβάδας. Η ΚΠΕ επεκτείνεται αργά και δεν περιλαμβάνει ολόκληρη τη στοιβάδα εκτός εάν το αρχικό ιικό φορτίο είναι μεγάλο.¹⁶⁵



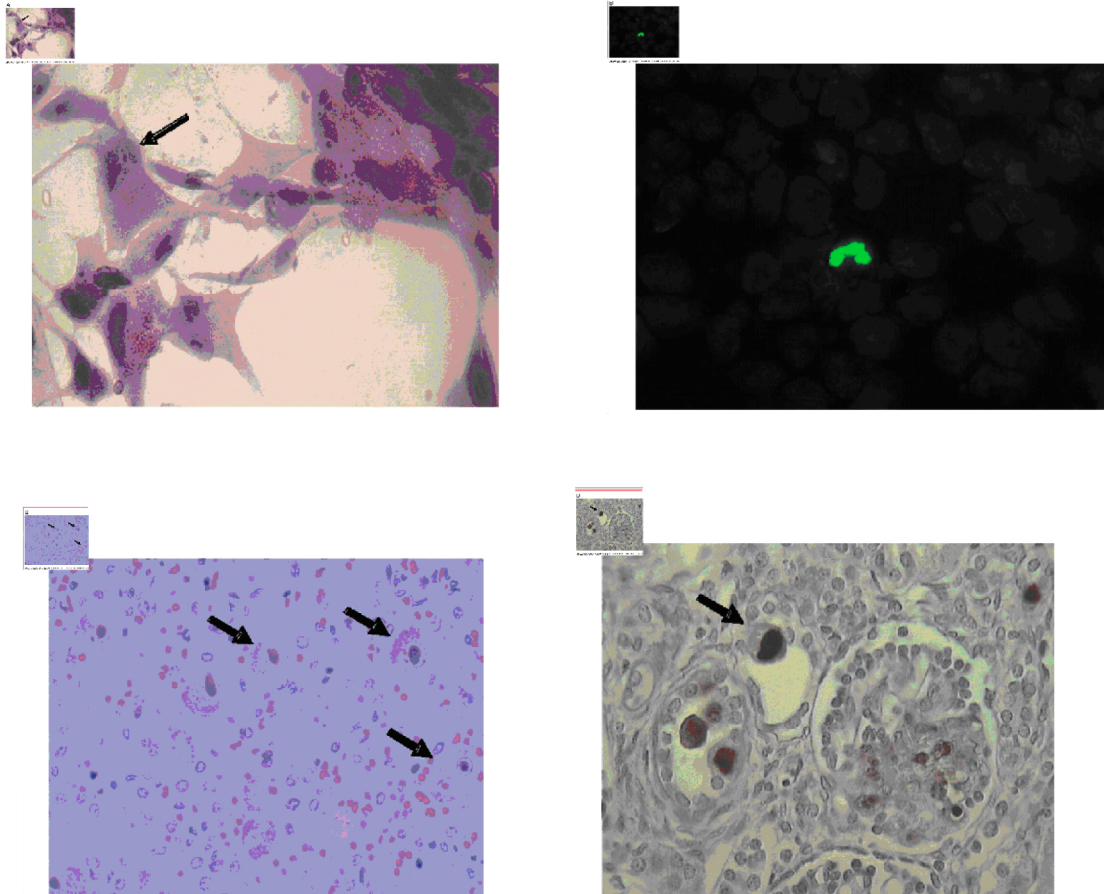
ΕΙΚΟΝΑ 14: Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του κυτταρομεγαλοϊού με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (x 500). Ως υπόστρωμα της μεθόδου χρησιμοποιείται μονοκυτταρική στοιβάδα ινοβλαστών ανθρώπου προσβεβλημένων από τον ιό. Στη στοιβάδα των κυττάρων πρέπει να περιλαμβάνονται και μη προσβεβλημένοι ινοβλάστες ούτως ώστε να διακρίνεται εύκολα η ειδική χρώση, η οποία εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα (Εικόνα), από τη μη ειδική χρώση αυτών. Αν και η εμφάνιση αντισωμάτων, μετά από προηγούμενο αρνητικό έλεγχο αυτών (ορομεταστροφή), είναι μια καλή ένδειξη πρωτοπαθούς λοίμωξης, η μεταβολή του τίτλου των αντισωμάτων θα πρέπει να αξιολογείται σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα αλλά και τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων¹⁶⁵



ΕΙΚΟΝΑ 15: Αναζήτηση του κυτταρομεγαλοϊού (CMV), μετά από καλλιέργεια σε MRC-5κύτταρα (σε σωληνάριο με καλυπτρίδα), με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού (x 500). Η καλλιέργεια κλινικού δείγματος, σε σωληνάριο με καλυπτρίδα, βοηθά στη γρήγορη ανίχνευση του CMV. Το κλινικό δείγμα ενοφθαλμίζεται στη στοιβάδα κυττάρων MRC-5 της καλυπτρίδας, φυγοκεντρείται και επωάζεται, στους 37° C, για 24-48 ώρες. Στη συνέχεια χρωματίζεται με μονοκλωνικό αντίσωμα (έναντι ενός από τα πρώιμα αντιγόνα του CMV) σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Με τη μέθοδο αυτή παρατηρείται φθορισμός του πυρήνα (Εικόνα) πριν από την εμφάνιση της κυτταροπαθογόνου επίδρασης του ιού. Εάν η χρώση καθυστερήσει μερικές ημέρες παρατηρείται φθορισμός και του κυτταροπλάσματος. Στην Εικόνα είναι εμφανής η πρόωμη κυτταροπαθογόνος επίδραση του ιού.¹⁶⁵



ΕΙΚΟΝΑ 16: Κυτταρομεγαλοϊός (CMV). Καλλιέργεια νεφρικών και πνευμονικών κυττάρων και χρώση αυτών με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και υπεροξειδάση (x 500). Η προσβολή των κυττάρων από τον CMV οδηγεί στο σχηματισμό ενδοπυρηνικών και κυτταροπλασματικών εγκλειστών. Τα πιο χαρακτηριστικά ενδοπυρηνικά έγκλειστα μοιάζουν με «οφθαλμό κουκουβάγιας» λόγω της συρρίκνωσης των ιστών γύρω από το έγκλειστο και της δημιουργίας άλω. Αντίθετα τα κοκκιώδη ηωσινοφιλικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα δεν είναι τόσο χαρακτηριστικά. Τα έγκλειστα είναι ορατά μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, αλλά η ταυτοποίηση αυτών με μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένων με υπεροξειδάση είναι πιο ευαίσθητη και ειδική μέθοδος.¹⁶⁵



ΕΙΚΟΝΑ 17: Εργαστηριακά ευρήματα λοίμωξης από κυτταρομεγαλοϊό

- Εκτενής κυτταροπαθογόνος δράση σε ανθρώπινους ινοβλάστες μολυσμένων με hCMV. Παρατηρούνται μεγάλα πυρηνικά έγκλειστα (βέλος)
- Δοκιμασία αντιγοναιμίας σε πολυμορφοπύρρηνο λευκοκύτταρο από αλλογενή μεταμόσχευση
- Πυρηνικά και Κυτταροπλασματικά έγκλειστα (βέλη) σε κυψελιδικό επιθήλιο νεογνού με συγγενή CMV λοίμωξη
- Ανοσοϊστοχημική χρώση μολυσμένων κυττάρων (βέλος) σε δείγμα βιοψίας νεφρού σε μεταμοσχευμένο νεφρό σε ασθενή με CMV λοίμωξη³⁸

12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί για την θεραπεία της νόσου CMV τέσσερις αντικοί παράγοντες που δρουν αναστέλλοντας την ιική DNA πολυμεράση. Αυτοί είναι: Ganciclovir (Cytovene), Valganciclovir (Valcyte), Foscarnet (Foscavir) και Cidofovir (Vistide). Ένα άλλο φάρμακο, το Valacyclovir, φαίνεται να καθυστερεί την εξέλιξη αμφιβληστροειδίτιδος σε ασθενείς με CMV αμφιβληστροειδίτιδα. Ένας αναστολέας του CMV, το fomivirsen, που μπορεί να ενεθεί απευθείας ενδοφθάλμια για την θεραπεία CMV αμφιβληστροειδίτιδας έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί.^{159,21,48} Αυτοί δε οι παράγοντες χρησιμοποιούνται για προφυλακτική ή προληπτική αγωγή ενεργούς λοίμωξης. Μελέτες έχουν δείξει μια περιορισμένη προφυλακτική δράση της acyclovir μετά από μεταμόσχευση οργάνου, αλλά με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα.¹⁶⁶

Οι παράγοντες αυτοί έχουν δείξει ότι μειώνουν ή εξαλείφουν την ιαιμία ή την αποβολή CMV και ελέγχουν την νόσο σε ασθενείς με ανοσοποιητικές διαταραχές. Εμφανίζουν όμως σημαντική τοξικότητα και έτσι η χρήση τους περιορίζεται σε ασθενείς με κίνδυνο για σοβαρή νόσο. Επειδή η CMV λοίμωξη σε φυσιολογικό ξενιστή διαδράμει συνήθως ήπια, αντική θεραπεία δεν ενδείκνυται. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα και σοβαρή CMV λοίμωξη συστήνεται θεραπεία, αν η ασθένεια είναι απειλητική για τη ζωή ή μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές βλάβες.⁹⁴ Αντική θεραπεία με Ganciclovir σε σοβαρή συγγενή λοίμωξη συνιστάται από ορισμένους ώστε να εμποδίσει την όψιμη έναρξη της νόσου ή την προοδευτική απώλεια της ακοής.

Έτσι, καινούριοι παράγοντες με λιγότερες παρενέργειες, καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα και έναν πιθανό άλλο μηχανισμό δράσης για αποφυγή διασταυρούμενης αντοχής απαιτούνται. Νέα φάρμακα και μηχανισμοί δράσης καθώς και μοριακοί στόχοι πρέπει να ανακαλυφθούν. Διάφοροι παράγοντες βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο, χωρίς να έχουν πάρει ακόμα έγκριση να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς με νόσο CMV όπως Leflunomide, BDCRB, maribavir, Indolocarbazoles, LFPNS, RNA αναστολείς, EGF-R και άλλοι.¹⁶⁶

12.1. Θεραπεία σε ασθενείς με AIDS

Σχεδόν όλοι οι ενήλικες ασθενείς με AIDS έχουν αντισώματα έναντι του CMV. Όσο μειώνεται η ανοσοποιητική λειτουργία, ενεργός CMV λοίμωξη (ιογενής απόπτωση, ιαιμία) εμφανίζεται. Πριν τη χρήση της υψηλής δραστηριότητας αντιρετροϊκής

θεραπείας (Highly active antiretroviral therapy, HAART) για το AIDS, το 40% των ασθενών με AIDS εμφάνιζαν νόσο CMV.¹⁴⁶ Οι περισσότεροι ασθενείς που εμφανίζουν τη νόσο έχουν CD4 T-λεμφοκύτταρα λιγότερα από 100 κύτταρα/mm³ (<http://www.cdc.gov> και <http://www.aidsinfo.nih.gov>).^{149,167,168} Προφύλαξη με ganciclovir συνιστάται για HIV οροθετικούς που είναι και CMV οροθετικοί και έχουν CD4 λιγότερα από 50 κύτταρα/mm³.¹⁴⁹ Τακτικές επισκέψεις σε οφθαλμίατρο απαιτούνται για γρήγορη διάγνωση και αντιμετώπιση CMV αμφιβληστροειδίτιδας. Διακοπή προφύλαξης θα πρέπει να γίνεται σε ασθενείς με σταθερή (πάνω από 6 μήνες) αύξηση των CD4 κυττάρων ως απάντηση της θεραπείας HAART. Βελτιστοποίηση θεραπείας του HIV με αντιρετροϊκούς παράγοντες αποτελεί πολύ σημαντικό μέτρο για πρόληψη και έλεγχο νόσου CMV.

12.2. Θεραπεία σε μεταμοσχευμένους ασθενείς

Αντιϊκά φάρμακα χρησιμοποιούνται στην μεταμοσχευτική ιατρική για την πρόληψη νόσου CMV, είτε ως προφυλακτικό καθημερινό σχήμα είτε προληπτικά, όπου το εργαστήριο χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Η διαφορά των δύο σχημάτων έγκειται στο ότι σε προφυλακτικό καθημερινό σχήμα όλοι οι ασθενείς λαμβάνουν θεραπεία για CMV ανεξαρτήτως ιικού φορτίου και κλινικής εικόνας, ενώ σε προληπτική ή προεπιθετική (preemptive) θεραπεία μετράται το ικό φορτίο του CMV και υπάρχει ένα κατώτερο σημείο (ουδός) αυτού, όπου θα ξεκινήσει η θεραπεία. Αν προκρίνεται προληπτική θεραπεία η συχνότητα παρακολούθησης (μία ή δυο φορές την εβδομάδα ή μια κάθε 15 μέρες) και το κατώτατο όριο ιαιμίας για θεραπεία ποικίλουν ανάλογα με το είδος της μεταμόσχευσης και άλλους παράγοντες κινδύνου. Λήπτες μοσχευμάτων που είναι οροαρνητικοί και λαμβάνουν ένα μόσχευμα από οροαρνητικό δότη έχουν ελάχιστο ή κανένα κίνδυνο, αν υποθεθεί ότι λοίμωξη μεταδιδόμενη με μετάγγιση δεν υπάρχει και κατά συνέπεια δεν απαιτούν προληπτική θεραπεία. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος εμφανίζεται σε οροαρνητικούς λήπτες από οροθετικούς δότες. Σε οροθετικούς λήπτες υπό έντονη ανοσοκαταστολή επίσης εμφανίζεται αυξημένος κίνδυνος. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόφαση για προληπτική θεραπεία είναι: το είδος του οργάνου που μεταμοσχεύεται, ιστοσυμβατότητα δότη-λήπτη, ανοσοκαταστολή, και υποκείμενη νόσος.²¹ Η επιλογή μεταξύ των δύο στρατηγικών (προφυλακτική έναντι προληπτικής) θα πρέπει να βασίζεται σε μία εκτίμηση των παραγόντων

κινδύνου και των πλεονεκτημάτων της κάθε προσέγγισης και εξαρτάται από τα στοιχεία του κάθε ασθενή, καθώς και την ύπαρξη ενός εργαστηρίου που μπορεί να προσφέρει γρήγορα ποσοτικό προσδιορισμό του CMV στο αίμα που είναι απαραίτητος για μια επιτυχή προληπτική προσέγγιση. Η χρήση της προφυλακτικής αντιαικής θεραπείας σημαίνει ότι όλοι οι ασθενείς υφίστανται τα μειονεκτήματα (π.χ. καταστολή μυελού, τοξικότητα, ανάπτυξη αντιαικής αντοχής) για την πρόληψη CMV ασθένειας που εμφανίζεται όμως σε λίγους ασθενείς.[http://www. CDC.gov](http://www.CDC.gov))¹⁶⁹ Αν και προληπτική θεραπεία έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική για την μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας από CMV, η νόσος εξακολουθεί να παρουσιάζεται σε ασθενείς που δεν είναι σε προληπτικό σχήμα ή ως όψιμη εμφάνιση της νόσου αρκετές μέρες (>100) μετά την μεταμόσχευση.²¹ Επίσης εμφανίζεται ως νόσος σε ένα μικρό ποσοστό αυτών που πήραν θεραπεία, ενώ σε ελάχιστους ασθενείς νόσος εμφανίζεται πριν ανιχνευθεί ο ιός στο αίμα σε ένα κατώτατο όριο που θα οδηγούσε σε θεραπεία.^{170,171} Μέτρηση του CMV στο αίμα χρησιμοποιώντας pp65 αντιγοναιμία ή ποσοτική PCR χρησιμοποιείται επίσης για να εκτιμηθεί η επιτυχία της θεραπείας.^{169,135}

12.3. Θεραπεία συγγενούς λοίμωξης

Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για θεραπεία συγγενούς CMV λοίμωξης. Μία τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη κλινική δοκιμή, συνέκρινε νεογνά με σοβαρή (με αποδεδειγμένη συμμετοχή Κ.Ν.Σ.) συμπτωματική CMV λοίμωξη υπό θεραπεία με ganciclovir και χωρίς καμία θεραπεία.¹⁷² Το ποσοστό των ασθενών με επιδείνωση της ακοής ήταν 21% όταν αντιμετωπίστηκαν με ganciclovir σε σύγκριση με 68% αυτών χωρίς θεραπεία. Αυτή ήταν μια σχετικά μικρή μελέτη (43 ασθενείς) όπου δεν χρησιμοποιήθηκε εικονικό φάρμακο. Παρά τις αδυναμίες αυτές, διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των ασθενών με θεραπεία και χωρίς θεραπεία μετρώντας ένα αντικειμενικό τελικό σημείο (ακουστικό όριο). Ουδετεροπενία εμφανίστηκε σε αρκετούς ασθενείς που έλαβαν θεραπεία και διορθώθηκε με μείωση της δόσης της θεραπείας. Καρκινογένεση και τοξικότητα που εμφανίζονται σε πειραματόζωα από τη χρήση ganciclovir πρέπει να οδηγήσει στην χρήση της στα νεογνά με πολύ μεγάλη προσοχή.²¹

12.4. Αντοχή στα αντικά

Χρόνια χορήγηση αντικών φαρμάκων συνδέεται με την εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια UL97 φωσφοτρανσφεράση και UL54 DNA πολυμεράση.¹²² Ειδικές μεταλλάξεις σχετίζονται με φαινοτυπική αντοχή αντικών φαρμάκων τόσο in vitro όσο και in vivo. Κλινικά, ανάπτυξη αντοχής σχετίζεται με αποτυχία αγωγής. Γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντοχή είναι σπάνιες σε ασθενείς πριν την αντική θεραπεία, αλλά είναι αρκετά συχνές μετά από 3 ή περισσότερους μήνες αντικής αγωγής.^{173,174,21} Αν φαινοτυπική ή γονοτυπική δοκιμή είναι διαθέσιμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κατευθύνει την επιλογή ενός εναλλακτικού σχήματος. Μπορεί επίσης να είναι αναγκαίο να υπάρξει κάποια εμπειρική αλλαγή στη θεραπεία πριν τα αποτελέσματα να είναι διαθέσιμα. Αλλαγή σε φάρμακο που ο ιός είναι ευπαθής, βελτιστοποίηση της δόσης αντικών φαρμάκων με βάση τα επίπεδα φαρμάκου κάτω από τα όρια της τοξικότητας και χρήση συνδυαστικής θεραπείας μπορεί να αποδειχθούν ευεργετικά.

13. ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΜΒΟΛΙΑ

Όσον αφορά τις λοιμώξεις της κοινότητας, η πρόληψη της μητρικής CMV λοίμωξης που οδηγεί σε συγγενή CMV λοίμωξη είναι ένας σημαντικός στόχος για τη δημόσια υγεία. Ως γνωστό, η CMV λοίμωξη είναι πολύ συχνή στην κοινότητα και σχεδόν πάντα κλινικά σιωπηλή και αυτό οδηγεί σε αποβολή του ιού για μήνες ή χρόνια. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν δύσκολο να σχεδιαστούν στρατηγικές για την πρόληψη με βάση τον περιορισμό της έκθεσης στον ιό. Αν και η έκθεση σε μικρά παιδιά και η σεξουαλική δραστηριότητα έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης CMV, είναι μάλλον απίθανο ότι η αποφυγή αυτών θα αποτελούσε ένα πρακτικό μέσο πρόληψης CMV λοίμωξης για τις γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία. Η παρατήρηση ότι οι επαγγελματίες υγείας δεν έχουν αυξημένα ποσοστά λοίμωξης CMV δείχνει ότι το πλύσιμο των χεριών και αποφυγή εκκρίσεων μπορεί να είναι αποτελεσματικά για την αποφυγή λοίμωξης. Η CDC συνιστά ότι όσοι φροντίζουν βρέφη και μικρά παιδιά θα πρέπει να ενημερώνονται για την CMV λοίμωξη. Ο τρόπος που γίνεται η εξάπλωση, μέτρα υγιεινής (π.χ. πλύσιμο χεριών) για την μείωση τη μετάδοσης και επιπλέον σύσταση σε έγκυες γυναίκες που εργάζονται με μικρά παιδιά ώστε να ενημερώνονται για τους κινδύνους CMV λοίμωξης αλλά και του ενδεχόμενου κινδύνου για το δικό τους παιδί που πρόκειται να γεννηθεί (<http://www.cdc.gov/CMV/index.htm>). Αν και η πρόληψη συγγενούς CMV λοίμωξης μπορεί να επιτευχθεί με την αναλυτική εξέταση εγκύων γυναικών για CMV αντισώματα στοχεύοντας σε πρόληψη σε εκείνες που είναι οροαρνητικές, κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμη επιτευχθεί.²¹

Οι επαγγελματίες υγείας δεν φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης. Η έλλειψη στοιχείων που να αποδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης CMV για επαγγελματίες υγείας, δείχνει ότι διαδικασίες που αποτελούν μέρος της καθημερινής φροντίδας του κάθε ασθενή (π.χ. πλύσιμο των χεριών και αποφυγή επαφής με σωματικά υγρά) είναι αποτελεσματικές για την πρόληψη νόσου CMV. Η συμβουλευτική επιτροπή του CDC συνιστά μόνο σταθερές προφυλάξεις (τις ίδιες που χρησιμοποιούνται για το σύνολο των ασθενών) και δεν συνιστά έλεγχο των επαγγελματιών υγείας για CMV αντισώματα.¹⁷⁵

Η πρόληψη της νόσου θα πρέπει να αφορά και ιατρικές πράξεις όπως μετάγγιση αίματος, μεταμόσχευση οργάνων, νοσοκομειακή διασταυρούμενη λοίμωξη, υποβοηθούμενη αναπαραγωγή κ.α.

Η μετάδοση της νόσου μέσω προϊόντων αίματος σε ασθενείς που έχουν σημαντικό κίνδυνο να αναπτύξουν ασθένεια θα πρέπει να αποφεύγεται. Ομάδες υψηλού κινδύνου για νόσο από μετάγγιση είναι: οροαρνητικά νεογνά, οροαρνητικές έγκυες γυναίκες, ασθενείς με AIDS, λήπτες μοσχευμάτων, αν και κάθε ασθενής με διαταραχές του ανοσοποιητικού θα μπορούσε να είναι σε κίνδυνο. Λοιμώξεις μεταδιδόμενες με μετάγγιση μπορούν να προληφθούν με χορήγηση προϊόντων αίματος από οροαρνητικούς δότες. Όμως, ο ορολογικός έλεγχος των προϊόντων αίματος αυξάνει σημαντικά το κόστος προετοιμασίας και μπορεί να περιορίσει τη διαθεσιμότητα των δοτών σε πληθυσμούς όπου σχεδόν όλοι οι δότες είναι οροθετικοί. Επειδή τα λευκά αιμοσφαίρια είναι η κύρια πηγή του CMV, έχουν αναπτυχθεί διαδικασίες που καταργούν τα λευκά αιμοσφαίρια από το ολικό αίμα με διήθηση. Και οι δύο μέθοδοι: “παροχή προϊόντων αίματος από οροαρνητικούς δότες” και “αναγωγή των λευκών” είναι αποτελεσματικές στην πρόληψη της νόσου, χωρίς όμως ισοδύναμη αποτελεσματικότητα.^{21,176,177} Μια μελέτη σε λήπτες μυελού των οστών (N=807) βρήκε ότι λοίμωξη που μεταδίδεται με μετάγγιση αίματος παρατηρήθηκε σε ποσοστό 1,7 % όταν μόνο οροαρνητικά προϊόντα αίματος χρησιμοποιήθηκαν σε σύγκριση με το 4% όταν χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα αίματος μετά από λευκοδιήθηση ($p < 0,05$).¹⁷⁸

Όσον αφορά στην μεταμοσχευτική ιατρική, η πιο κοινή πηγή CMV λοίμωξης σε λήπτες οργάνων είναι η επανενεργοποίηση λανθάνοντος ιού του μοσχεύματος στον λήπτη. Αν και η επιλογή δοτών για οροαρνητικούς λήπτες θα προλάμβανε πρωτογενή CMV λοίμωξη, η προσέγγιση αυτή συχνά δεν είναι δυνατή λόγω των περιορισμών αναφορικά με τη διαθεσιμότητα των δοτών. Προφυλακτικά και προληπτικά αντιικά σχήματα χρησιμοποιούνται για πρόληψη της νόσου, ενώ αποτελεί κοινή πρακτική η χορήγηση μόνο ακτινοβολημένων CMV οροαρνητικών ή φιλτραρισμένων προϊόντων αίματος σε λήπτες μεταμόσχευσης. Ακόμη, ασθενείς με σοβαρή διαταραχή του ανοσοποιητικού θα πρέπει να ενημερώνονται για τον κίνδυνο CMV λοίμωξης μέσω επαφής με μικρά παιδιά ή μέσω σεξουαλικής δραστηριότητας.²¹

Διασταυρούμενη λοίμωξη CMV σε νοσοκομείο έχει τεκμηριωθεί με την χρήση περιοριστικών ενζύμων.¹⁷⁹ Ο πιθανός μηχανισμός είναι η εξάπλωση με τα χέρια των εργαζομένων. Αυτές οι εκδηλώσεις είναι σπάνιες όμως, για αυτό μόνο σταθερές προφυλάξεις συνιστώνται για τον έλεγχο των λοιμώξεων στο νοσοκομείο.¹⁷⁵ Το ανθρώπινο γάλα είναι ένας άλλος τρόπος μετάδοσης

ενδονοσοκομειακά, όπου αποθηκευμένο ανθρώπινο γάλα παρέχεται σε νοσηλευόμενα νεογνά. Γάλα από οροθετικούς δότες δεν πρέπει να χορηγείται σε οροαρνητικά νεογνά, ειδικά πρόωρα, γιατί αυτή η κατάσταση ενέχει αυξημένο κίνδυνο για CMV ασθένεια.¹⁸⁰

Όσον αφορά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, CMV έχει ανιχνευθεί στο σπέρμα οροθετικών δοτών σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 2,9% ως 33,5% χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως: καλλιέργεια, υβριδισμό DNA ή PCR.²¹ Ο ιός μπορεί να μεταφερθεί κατά την τεχνητή γονιμοποίηση, προκαλώντας μητρική, ακόμα και εμβρυϊκή λοίμωξη. Αρκετά χρόνια πριν, η Αμερικανική Εταιρεία γονιμότητας συνέστησε ορολογικό έλεγχο (screening) σε δότες σπέρματος για CMV,¹⁸¹ ενώ πιο πρόσφατα η Βρετανική εταιρεία ανδρολογίας συνέστησε τον περιορισμό λήψης σπέρματος από οροαρνητικούς δότες με στόχο την εξάλειψη της CMV μετάδοσης,¹⁸² θέση για την οποία διατυπώνονται διάφορες απόψεις.^{183,184,185} Η Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής συνιστά έλεγχο δοτών σπέρματος για IgG και IgM αντισώματα αρχικά και μετά κάθε έξι μήνες. Ο δότης πρέπει να αποκλειστεί αν η δοκιμή για IgM αντισώματα είναι θετική, ενώ ο ορολογικός έλεγχος πρέπει να επαναλαμβάνεται πριν ένα δείγμα σπέρματος δοθεί για τεχνητή γονιμοποίηση.¹⁸⁶ Δότες που είναι IgG και IgM αρνητικοί, καθώς και εκείνοι που είναι μόνο IgG θετικοί γίνονται αποδεκτοί. Τα δεδομένα για δότες ωοκυττάρων είναι πολύ περιορισμένα.¹⁸⁷ Ωστόσο, η Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής συνέστησε την ίδια επιφυλακτικότητα στον έλεγχο δοτών ωοκυττάρων όπως για τους δότες σπέρματος.¹⁸⁶

13.1. Παθητική Ανοσοποίηση

Σκευάσματα υπεράνοσης σφαιρίνης με υψηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι CMV (CMV IG) έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη νόσου CMV σε λήπτες οργάνων, πρόωρα νεογνά και έγκυες γυναίκες. Περιορισμένα είναι τα στοιχεία από τυχαιοποιημένες, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο(placebo) κλινικές δοκιμές για την δράση CMVIG. CMVIG συνήθως χρησιμοποιείται σε μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ως τμήμα προφυλακτικής αγωγής για την πρόληψη της νόσου CMV.¹⁸⁸ Μια πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με placebo, κλινική δοκιμή σε λήπτες νεφρικών μοσχευμάτων, έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση CMV ασθένειας και ευκαιριακών λοιμώξεων, μεταξύ των ληπτών CMVIG σε σύγκριση με το εικονικό

φάρμακο. Μια παρόμοια πολυκεντρική μελέτη σε μεταμοσχεύσεις ήπατος, απέτυχε να δείξει ίδια αποτελεσματικότητα για την πρόληψη της νόσου, αν και μια γενικότερη μείωση φάνηκε, όσον αφορά σε σοβαρή ασθένεια και ευκαιριακές μυκητιασικές λοιμώξεις.²¹ Σήμερα, που σημαντικές πρόοδοι όσον αφορά τη χρήση των αντιικών φαρμάκων για την πρόληψη νόσου CMV έχουν επιτευχθεί κάνουν τον ρόλο CMVIG λιγότερο σαφή. Τα αποτελέσματα μελετών σε προφυλακτικά σχήματα συγκρίνοντας συνδυασμούς CMVIG και ganciclovir με μονή θεραπεία διαφέρουν στο κατά πόσον η προσθήκη CMVIG ήταν ανώτερη από ότι μόνη της η ganciclovir.^{189,190,191,192} Παρά το γεγονός ότι Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες γραμμές για μεταμόσχευση νεφρού του 2000 περιλαμβάνουν εβδομαδιαία ενδοφλέβια έγχυση CMVIG (χωρίς αντικό παράγοντα) για 16 εβδομάδες ως αποδεκτό σχήμα προφύλαξης, η προσθήκη αντικού παράγοντα φαίνεται να πλεονεκτεί.^{193,194,188} Μεγάλη συζήτηση υπήρξε όσον αφορά τη χρησιμότητα CMVIG σε λήπτες μυελού των οστών. Μια ομάδα εμπειρογνομόνων από το CDC, την Επιτροπή Λοιμώξεων της Αμερικής καθώς και την Αμερικανική Εταιρεία Μεταμοσχεύσεων του αιμοποιητικού δεν συμπεριέλαβε CMVIG σε κανένα σχήμα που συνιστάται για προφύλαξη CMV λοίμωξης σε λήπτες μυελού των οστών.¹⁶⁹ Όσον αφορά τα πρόωρα νεογνά, μια κλινική δοκιμή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο (placebo) αξιολόγησε τη χρήση CMVIG σε νεογνά που μεταγγίσθηκαν από δότες που δεν είχαν ελεγχθεί για CMV αντισώματα,¹⁹⁵ χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά στο συνολικό ποσοστό CMV ασθένειας.

13.2. Εμβόλια έναντι Κυτταρομεγαλοϊού

Παρότι έχουν γίνει προσπάθειες για πάνω από 25 χρόνια για την ανάπτυξη ενός εμβολίου για πρόληψη μητρικής και συγγενούς CMV λοίμωξης, το εμβόλιο δεν είναι επί του παρόντος διαθέσιμο. Η αναγνώριση του δυνητικού οφέλους για την κοινωνία και η σχέση κόστους –αποτελεσματικότητας από το εμβόλιο για CMV ωστόσο, τόνωσαν την προσπάθεια για ανάπτυξη νέων εμβολίων.^{196,197,109} Σημαντικό ρόλο επίσης έπαιξε η καλύτερη κατανόηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην πρόκληση προστατευτικής ανοσοποιητικής αντίδρασης. Διάφοροι τύποι εμβολίων έχουν αξιολογηθεί σε κλινικές δοκιμές. Αυτά περιλαμβάνουν εξασθενημένο ζωντανό ιό, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε φορέα, DNA εμβόλιο, και ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με νέο βελτιωτικό.^{21,48}

Περισσότερο από τρεις δεκαετίες πριν, το Towne στέλεχος του CMV που απομονώθηκε από ένα παιδί με συγγενή CMV λοίμωξη πέρασε από πόρο περισσότερο από 125 φορές in vitro για να επιτευχθεί εξασθένηση¹⁹⁸ και χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο σε διάφορες κλινικές δοκιμές.(<http://www.clinicaltrials.gov>)

Αργότερα, σε μια προσπάθεια να παραχθεί ένα εμβόλιο ζωντανού ιού που θα μπορούσε να είναι πιο ανοσογόνο, χμαιοϊικοί ιοί που περιλαμβάνουν τμήματα του γονιδίου Towne και τμήματα του γονιδίου Toledo είχαν παραχθεί ως δυνητικά υποψήφια εμβόλια.¹⁹⁹ Αυτά δοκιμάστηκαν σε κλινικές δοκιμές ενηλίκων. Συστηματική μόλυνση δεν εντοπίστηκε και το εμβόλιο ήταν καλά ανεκτό. Ωστόσο είναι ασαφές κατά πόσο έχουν προγραμματιστεί περαιτέρω κλινικές δοκιμές. Ένα εμβόλιο με την υπομονάδα gB σε συνδυασμό με ένα ενισχυτικό (MF 59),²⁰⁰ πρωτεΐνες gB και pp65 σε φορέα και ένα εμβόλιο με πλασμιδιακό DNA έχουν αναπτυχθεί και έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές. Πολλές άλλες προσεγγίσεις βρίσκονται σε πειραματικό ή προκλινικό στάδιο περιλαμβάνοντας υποϊικά τμήματα²⁰¹ πλασμιδιακό DNA, τμήματα του ιού π.χ. gB,²⁰² pp65,²⁰³ IE1, pp150²⁰⁴ κ.α (<http://www.clinicaltrials.gov>).^{48,21,34,35}

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και μέτρηση του ιικού φορτίου του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus- hCMV) σε δείγματα παιδιών και ενηλίκων με τη βοήθεια ποσοτικής PCR.

Στόχος επίσης της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η διαγνωστική αξία της ποσοτικής PCR για τη διάγνωση και παρακολούθηση της ενεργούς λοίμωξης με κυτταρομεγαλοϊό και η αξιολόγησή της ως μέθοδος εκλογής για την ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση των λοιμώξεων που ο ιός αυτός προκαλεί, καθώς και την παρακολούθηση της αντιϊκής θεραπείας.

Διενεργήθηκε επιπρόσθετα συγκριτική μελέτη αντισωμάτων IgM και IgG έναντι hCMV, σε σχέση με την ποσοτική PCR για την διάγνωση της νόσου.

Έγινε τέλος προσδιορισμός συνάφειας των anti-CMV IgG αντισωμάτων (CMV IgG Avidity), διαφοροποιώντας αντισώματα που παράγονται σε πρώιμα στάδια μιας πρωτοπαθούς λοίμωξης από αντισώματα μιας προγενέστερης λοίμωξης.

2. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικό

Από τον Ιανουάριο του 2007 έως το Δεκέμβριο του 2011 μελετήθηκαν συνολικά 418 δείγματα πλάσματος αίματος από 260 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, στη διαφορική διάγνωση των οποίων υπήρξε και η υποψία hCMV λοίμωξης.

Από τους ασθενείς αυτούς οι 145 ήταν άντρες και οι 115 γυναίκες, 43 παιδιά, ηλικίας από 30 ημερών έως 14 ετών και 217 ενήλικες, ηλικίας από 18 έως 88 ετών. 108 από τους ασθενείς ήταν ανοσοεπαρκείς (40 παιδιά, 68 ενήλικες), ενώ 152 βρίσκονταν σε ανοσοκαταστολή (3 παιδιά, 149 ενήλικες) όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Η κατανομή των δειγμάτων ανά το χρόνο ήταν τυχαία και ομοιόμορφη. Διερευνήθηκε επίσης, η συσχέτιση μεταξύ ιικού φορτίου, χρόνου έναρξης της νόσου, ηλικίας, κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Στοιχεία των 260 ασθενών που περιελήφθησαν στην μελέτη.

Σύνολο Ασθενών (260)	N	N
Φύλο	145	115
(Α/Γ) *		
Ηλικία		
(Π/Ε) **	43	217
Ανοσιακή Κατάσταση	108	152
(Α/ Α/μένοι) ***		

*:Α: Άνδρες, Γ: Γυναίκες, **: Π: Παιδιά (30 ημερών-14 Ετών), Ε: Ενήλικες (18 Ετών-88 Ετών), ***: Α: Ανοσοεπαρκείς (40 Παιδιά/ 68 Ενήλικες), Α/μένοι: Ανοσοκατεσταλμένοι(3 Παιδιά/ 149 Ενήλικες)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Ανίχνευση Αντισωμάτων

2.2.1.1. Ανίχνευση CMV-IgM Αντισωμάτων

Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με την χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος AxSYM (Abbott Laboratories, Abbott Park, USA).

Πρόκειται για μια δοκιμασία ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού με μικροσωματίδια (Microparticle Enzyme Immunoassay- MEIA) για την ποιοτική μέτρηση CMV IgM αντισωμάτων έναντι κυτταρομεγαλοϊού σε ορό ή πλάσμα αίματος, με σκοπό τη διάγνωση πρόσφατης λοίμωξης.

Τα μικροσωματίδια σε αυτή τη δοκιμασία καλύπτονται από καθαρά ανασυνδυασμένα CMV αντιγόνα που περιέχουν τμήματα από τις ακόλουθες ιικές πρωτεΐνες: pp150 (UL32), pp52 (UL44), pp65 (UL83) και pp38 (UL80α).

- Το κάθε δείγμα αραιώνεται με κάποιο διάλυμα (solution 4) και ένα μέρος του αραιωμένου δείγματος και μικροσωματίδια καλυμμένα με ανασυνδυασμένα αντιγόνα κυτταρομεγαλοϊού έρχονται σε επώαση.
- Το CMV αντίσωμα συνδέεται με τα μικροσωματίδια του CMV ανασυνδυασμένου αντιγόνου σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο αντιγόνου-αντίσωμα.
- Ένα αραιωτικό (Diluent) προστίθεται στο σύμπλοκο και ένα μέρος του συμπλόκου μεταφέρεται στο Matrix Cell.
- Πλύσιμο του Matrix Cell για να φύγουν μη δεσμευμένα υλικά.
- Το αντί-ανθρώπινο IgM (anti-Human IgM) Alkaline Phosphatase Conjugate προστίθεται στο Matrix Cell και συνδέεται στο σύμπλοκο αντιγόνου-αντίσωμα.
- Πλύσιμο για να φύγουν μη δεσμευμένα υλικά.
- Το υπόστρωμα (Substrate), 4-Methylumbelliferyl Phosphate (MUP) προστίθεται στο Matrix Cell και το φθορίζον προϊόν φωτομετράται.

Τα δείγματα ήταν οροί αίματος φυγοκεντρημένοι σε $\geq 10.000 \times g$ για 10 λεπτά πριν τη δοκιμασία, που δεν περιείχαν ινική, ερυθρά αιμοσφαίρια ή αλλά ιδιαίτερα σωματίδια. Αν η δοκιμασία καθυστερούσε για 7 μέρες τα δείγματα αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία 2-8° C ενώ αν καθυστερούσε πάνω από 7 ημέρες τα δείγματα

αποθηκεύονταν στους -20°C ή περισσότερο. Λιπαιμικά δείγματα, μακροσκοπικώς αιμολυμένα δείγματα ή δείγματα με προφανή μικροβιακή επιμόλυνση δεν ελεγχόταν με αυτή τη δοκιμασία.

Το σύστημα AxSYM υπολογίζει έναν Δείκτη CMV IgM (CMV IgM Index Value) που βασίζεται στον λόγο της τιμής του δείγματος (Sample Rate) προς την μέση τιμή του δείκτη του Calibrator (Index Calibrator Mean Rate), για κάθε δείγμα και control ως εξής: Δείκτης (Index Value) = Τιμή Δείγματος (Sample Rate) / Μέση Τιμή του Δείκτη του Calibrator (Index Calibrator Mean Rate).

Δείγματα με δείκτη μικρότερο από 0,399 θεωρούνται αρνητικά για IgM αντισώματα έναντι κυτταρομεγαλοϊού σύμφωνα με τα κριτήρια του πρωτοκόλλου AxSYM CMV IgM.

Δείγματα με δείκτη από 0,400 ως 0,499 θεωρούνται αμφίβολα (Γκρι ζώνη-gray zone). Αυτά, μπορεί να περιέχουν πολύ χαμηλά επίπεδα IgM αντισώματος. Για αυτά τα δείγματα, ένα δεύτερο δείγμα ελεγχόταν μετά από 7 έως 14 ημέρες. Αν και το δεύτερο δείγμα ήταν αμφίβολο, η τελική απάντηση ήταν αμφίβολο.

Δείγματα με δείκτη ισοδύναμο ή μεγαλύτερο από 0,500 θεωρούνται θετικά για IgM αντισώματα έναντι κυτταρομεγαλοϊού σύμφωνα με τα κριτήρια του πρωτοκόλλου AxSYM CMV IgM.

2.2.1.2. Ανίχνευση CMV-IgG Αντισωμάτων

Η ανίχνευση έγινε με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος AxSYM (Abbott Laboratories, Abbott Port, USA).

Πρόκειται για μια δοκιμασία ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (Microparticle Enzyme Immunoassay-MEIA) για την ημιποσοτική μέτρηση CMV IgG αντισωμάτων έναντι κυτταρομεγαλοϊού σε ορό ή πλάσμα αίματος σαν ένας δείκτης παλιάς ή πρόσφατης λοίμωξης με κυτταρομεγαλοϊό.

Τα δείγματα ήταν οροί αίματος φυγοκεντρημένοι σε $\geq 10.000 \times g$ για 10 λεπτά πριν τη δοκιμασία. Αν η δοκιμασία καθυστερούσε για 7 ημέρες τα δείγματα αποθηκευόταν σε θερμοκρασία $2-8^{\circ}\text{C}$, ενώ αν καθυστερούσε πάνω από 7 μέρες τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -20°C ή περισσότερο. Λιπαιμικά δείγματα, μακροσκοπικώς αιμολυμένα δείγματα ή δείγματα με προφανή μικροβιακή επιμόλυνση δεν ελέγχονταν με αυτή τη δοκιμασία.

Το AxSYM CMV IgG πρωτόκολλο είναι μια ημιποσοτική μέθοδος για την μέτρηση IgG αντισωμάτων έναντι κυτταρομεγαλοϊού σε ορό ή πλάσμα. Η παρουσία τουλάχιστον 15 μονάδων αντισώματος ανά ml (Antibody Units per ml- AU/ml) του δείγματος δείχνει παλιά ή πρόσφατη λοίμωξη με CMV. Επίπεδα αντισώματος λιγότερο από 15 AU/ml θεωρούνταν αρνητικά για IgG αντισώματα έναντι του CMV, σύμφωνα με τα κριτήρια του πρωτοκόλλου AxSYM CMV IgG.

2.2.1.3. Προσδιορισμός Συνάφειας των anti-CMV IgG(CMV IgG Avidity)

Ο προσδιορισμός της συνάφειας των anti-CMV IgG έγινε με την βοήθεια του αυτοματοποιημένου συστήματος mini- VIDAS (οίκος: bioMerieux, France).

Ο στόχος του προσδιορισμού της συνάφειας των anti-CMV IgG είναι να αποκτηθεί ακριβέστερη διάγνωση και να αποκλειστούν πρωτοπαθείς λοιμώξεις από CMV.

Η προσθήκη ενός παράγοντα που διασπά τον δεσμό Ag-Ab(όπως η ουρία) κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης ELISA, έχει μικρή επίδραση στον δεσμό αντισωμάτων υψηλής συνάφειας, άλλη μεγάλη επίδραση σε αυτόν των αντισωμάτων χαμηλής συνάφειας. Σύγκριση αποτελεσμάτων που προέκυψαν με ή χωρίς παράγοντες διάσπασης, αντιστοιχεί σε ένα μέτρο συνάφειας.

Το VIDAS CMV IgG Avidity είναι μια απλή τεχνική που επιτρέπει σε αντισώματα ασθενούς συνάφειας, που παράγονται στα πρώιμα στάδια μιας πρωτοπαθούς λοίμωξης, να διαφοροποιηθούν από αντισώματα υψηλής συνάφειας, που είναι χαρακτηριστικά μιας προγενέστερης λοίμωξης. Αυτό επιτρέπει τον αποκλεισμό μιας, λιγότερο από τρεις μήνες, πρόσφατης πρωτοπαθούς λοίμωξης.

Η συνάφεια αποκαλύπτει την ισχύ του δεσμού μεταξύ ενός αντισώματος και ενός πολυδύναμου αντιγόνου.

Αυτή η συνάφεια προσδιορίζεται από δύο αναλύσεις VIDAS CMV IgG

- Η πρώτη ανάλυση ήταν η αναφορά.
- Για τη δεύτερη ανάλυση, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης στην κυψέλη 4 της ταινίας του VIDAS CMV IgG αντικαθιστούταν από το ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας.

Η αρχή της ανάλυσης συνδυάζει μια ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich δύο σταδίων με μια τελική αντίγνωση φθορισμού (ELFA).

Τα δείγματα ήταν οροί αίματος. Εμφανώς αιμολυμένα, λιπαιμικά, ικτερικά ή αδρανοποιημένα δείγματα δεν ελέγχονταν με τη δοκιμασία. Αν η δοκιμασία καθυστερούσε για 5 μέρες, τα δείγματα φυλάσσονταν στους 2-8° C. Αν καθυστερούσε περισσότερο, τότε φυλάσσονταν στους -25±6° C.

Για κάθε δείγμα ασθενούς ή ορό ελέγχου, ο δείκτης συνάφειας υπολογιζόταν ως εξής:

Δείκτης = RFV (Relative Fluorescence Value-Σχετική τιμή φθορισμού) που προκύπτει για το δείγμα στην ταινία που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας / RFV (Relative Fluorescence Value-Σχετική τιμή φθορισμού) που προκύπτει για το δείγμα στην ταινία χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας.

Ένας δείκτης avidity μεγαλύτερος από ή ίσος με 0.8 αποτελούσε ισχυρή ένδειξη μιας, περισσότερο από τρεις μήνες, πρωτοπαθούς λοίμωξης.

Ένας δείκτης avidity μικρότερος από 0.2 αποτελούσε ισχυρή ένδειξη μιας, λιγότερο από τρεις μήνες, πρωτοπαθούς λοίμωξης.

Ένας δείκτης avidity μεταξύ 0.2 και 0.8 δεν επέτρεπε τη διάκριση μιας πρόσφατης λοίμωξης από μεταγενέστερη λοίμωξη.

2.2.2 Μοριακές Μέθοδοι

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού DNA του κυτταρομεγαλοϊού, χρησιμοποιήθηκε μια εμπορική ποσοτική PCR, το COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test.

2.2.2.1. Συλλογή, Μεταφορά και Αποθήκευση Δειγμάτων

Όλα τα δείγματα θεωρούνταν μολυσματικά και ο χειρισμός τους γινόταν ανάλογα. Τα δείγματα που εξετάζονταν ήταν δείγματα πλάσματος.

Το αίμα συλλεγόταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια με χρήση αντιπηκτικού EDTA. Η εξέταση μπορούσε επίσης να γίνει και σε σωληνάρια με χρήση αντιπηκτικού ACD, ενώ δείγματα που είχε χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό η ηπαρίνη δεν ενδείκνυνται για την συγκεκριμένη εξέταση. Ο διαχωρισμός του πλάσματος από το ολικό αίμα γινόταν με φυγοκέντρηση σε 800-1600 χ g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως το πλάσμα μεταφερόταν σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο πολυπροπυλενίου. Το δείγμα αποθηκευόταν στους 2-8° C

ως και για 3 ημέρες ή κατεψυγμένο σε θερμοκρασία -20°C ως -70°C έως 10 μήνες. Τα δείγματα πλάσματος μπορούσαν να καταψυχθούν και να αποψυχθούν έως και 3 φορές.

2.2.2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων και Ορών Ελέγχου(Controls)

- Προετοιμασία αντιδραστηρίου Λύσης Εργασίας. Φυγοκέντρωση CMM QS και CMM DB για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα πριν τη χρήση. Για κάθε παρτίδα που περιείχε 12 δείγματα και ορούς ελέγχου, προσθήκη 100 μl CMM QS και 100 μl CMM DB σε μια φιάλη CMM LYS και καλή ανάδευση. Δεν απαιτούνταν η μέτρηση του όγκου CMM LYS
- Προσθήκη 600 μl αντιδραστηρίου λύσης εργασίας σε κάθε επισημασμένο σωληνάριο. Έλεγχος αν το αντιδραστήριο λύσης εργασίας έχει ροζ χρώμα, για επιβεβαίωση ότι το CMM QS έχει προστεθεί στο CMM LYS.
- Προετοιμασία των Ορών ελέγχου (controls) ως εξής:
 - Φυγοκέντρωση των NHP, CMM(-) C, CMM L(+)C και CMM H(+) C για 5 έως 10 δευτερόλεπτα.
 - Προσθήκη 200 μl NHP σε κάθε ένα από τα τρία σωληνάρια ορού ελέγχου και έντονη φυγοκέντρωση για 5-10 δευτερόλεπτα
 - Προσθήκη 50 μl CMM(-)C, 50 μl CMM L(+) C και 50 μl CMM H (+) C στο αντίστοιχο σωληνάριο που περιέχει Αντιδραστήριο Λύσης Εργασίας και NHP, και έντονη φυγοκέντρωση για 5-10 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 200 μl από κάθε δείγμα ασθενή στο αντίστοιχο σωληνάριο που περιέχει Αντιδραστήριο Λύσης Εργασίας και φυγοκέντρωση έντονη για 5-10 δευτερόλεπτα.
- Σε κάθε σωληνάριο δείγματος και ορού ελέγχου προσθήκη 800 μl 100% ισοπροπυλική αλκοόλη (σε θερμοκρασία δωματίου) και έντονη φυγοκέντρωση για 5-10 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα (12500-16000 $\times g$) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με πιπέτα μεταφοράς γινόταν προσεκτική αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού από κάθε σωληνάριο, προσέχοντας να μην διασπαστεί το ίζημα (που είναι μπλε απόχρωσης). Αφαίρεση όσο περισσότερου υγρού είναι δυνατόν, χωρίς να διασπαστεί το ίζημα.

- Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 1,0 ml αιθανόλη 70% (σε θερμοκρασία δωματίου) και έντονη φυγοκέντρωση για 5-10 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (12500-16000 χ g) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με πιπέτα μεταφοράς αφαίρεση προσεκτική του υπερκείμενου υγρού, χωρίς να διασπαστεί το καθίζημα. Στο βήμα αυτό το καθίζημα είναι ορατό. Αφαίρεση όσο το δυνατόν περισσότερου υγρού. Τα υπολείμματα αιθανόλης, μπορεί να αναστείλουν την ενίσχυση.
- Προσθήκη 400 μ l CMM DIL σε κάθε σωληνάριο. Φυγοκέντρωση έντονη για 5-10 δευτερόλεπτα για να μετατραπεί σε εναιώρημα το αφαιρούμενο DNA.

Η ενίσχυση των δειγμάτων και των ορών ελέγχου που έχουν υποστεί επεξεργασία γινόταν μέσα σε 4 ώρες από την προετοιμασία. Εάν η ενίσχυση δεν μπορούσε να αρχίσει μέσα σε 4 ώρες από την προετοιμασία, τα δείγματα μπορούσαν να αποθηκευτούν ως και για 24 ώρες στους 2-8° C ή καταψυγμένα στους -20° C ως και μία εβδομάδα χωρίς να γίνει κατάψυξη-απόψυξη πάνω από μία φορά, γιατί αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια του αριθμού αντιγράφων.

- Προσθήκη 50 μ l από κάθε επεξεργασμένο δείγμα και ορό ελέγχου (control) στα κατάλληλα A-tubes που είχαν κύριο Μίγμα Εργασίας.

Το κύριο μίγμα εργασίας προετοιμαζόταν προσθέτοντας 50 μ l CMM Mg^{+2} σε ένα φιαλίδιο CMM MMX και καλή ανάδευση αναστρέφοντας το σωληνάριο 10-15 φορές (όχι σε αναδευτήρα τύπου vortex). Η ροζ χρωστική στο CMM Mg^{+2} χρησιμοποιούνταν για οπτική επιβεβαίωση ότι το CMM Mg^{+2} έχει προστεθεί στο CMM MMX. Αποθήκευση στους 2-8° C και χρησιμοποίηση μέσα σε 16 ώρες από την προετοιμασία.

Ενίσχυση και Ανίχνευση:

Έγινε με την βοήθεια του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test

2.2.2.3. Βασικές Αρχές της διαδικασίας

Το COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test βασίζεται σε τέσσερις κύριες διαδικασίες: προετοιμασία δείγματος, ενίσχυση PCR του DNA-στόχου με τη χρήση ειδικών για CMV συμπληρωματικών εκκινητών, υβριδισμός των ενισχυμένων

προϊόντων σε ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες ειδικούς για το στόχο (-ους) και ανίχνευση των δεσμευμένων στον ιχνηθέτη ενισχυμένων προϊόντων με χρωματομετρικό προσδιορισμό.

Το COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση PCR του CMV και του DNA Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV. Το αντιδραστήριο Κυρίου Μίγματος περιέχει ένα ζεύγος εκκινητών ειδικών για CMV DNA και για DNA Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV.

Η ποσοτικοποίηση του CMV DNA εκτελείται με τη χρήση του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV. Το Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV είναι ένα μη μολυσματικό DNA πλασμίδιο που περιέχει τις ίδιες ακριβώς τοποθεσίες δέσμευσης εκκινητή με το CMV DNA στόχο και μια μοναδική περιοχή δέσμευσης ιχνηθέτη που επιτρέπει το διαχωρισμό του κλώνου (amplicon) Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV από τον κλώνο (amplicon) CMV. Το Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV ενσωματώνεται σε κάθε μεμονωμένο δείγμα σε ένα γνωστό αριθμό αντιγράφων και μεταφέρεται κατά την προετοιμασία δείγματος, την ενίσχυση PCR, τον υβριδισμό και την ανίχνευση μαζί με το CMV στόχο. Ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής υπολογίζει τα επίπεδα CMV DNA στα δείγματα εξέτασης συγκρίνοντας το σήμα CMV με το σήμα του Προτύπου Ποσοτικοποίησης για κάθε δείγμα.

Το Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV αντισταθμίζει τα αποτελέσματα της αναστολής και ελέγχει τη διαδικασία ενίσχυσης έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ακριβής ποσοτικοποίηση του CMV DNA σε κάθε δείγμα.

2.2.2.3.A. Προετοιμασία δείγματος

Το CMV DNA απομονώνεται άμεσα από το πλάσμα με τη λύση των σωματιδίων του ιού με ένα χαστροπικό παράγοντα και ακολουθείται από κατακρήμνιση του DNA με αλκοόλη. Σε κάθε δείγμα εισάγεται ένας γνωστός αριθμός μορίων DNA του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV με το Αντιδραστήριο Λύσης. Το Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV περνά από τα βήματα της προετοιμασίας δείγματος, της ενίσχυσης και της ανίχνευσης και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του CMV DNA στο δείγμα της εξέτασης.

2.2.2.3.B. Ενίσχυση PCR

2.2.2.3.B.1. Επιλογή Στόχου

Η επιλογή της αλληλουχίας DNA-στόχου για τον CMV εξαρτάται από τον εντοπισμό μέσα στο γονιδίωμα του CMV περιοχών που παρουσιάζουν μέγιστο βαθμό διατήρησης αλληλουχίας. Αντίστοιχα η ορθή επιλογή εκκινητών και ιχνηθέτη είναι αποφασιστικής σημασίας για τη δυνατότητα της εξέτασης να ανιχνεύσει το γονότυπο CMV. Το COBAS AMPLICOR CMV Test χρησιμοποιεί τους βιοτινιλωμένους εκκινητές LC342C και LC383 για να καθορίσει μια αλληλουχία 362 νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου της DNA Πολυμεράσης του CMV. Η αλληλουχία του DNA-στόχου που βρίσκεται μέσα στο ανθρώπινο γονίδιο της DNA Πολυμεράσης του CMV είναι ειδική για CMV και δεν είναι ομόλογη σε άλλα μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών.

2.2.2.3.B.2. Ενίσχυση Στόχου

Τα επεξεργασμένα δείγματα προστίθενται στο μίγμα ενίσχυσης σε σωληνάρια ενίσχυσης (A-tubes) στα οποία πραγματοποιείται η ενίσχυση PCR. Το μίγμα αντίδρασης θερμαίνεται για την αποδιάταξη του DNA και την έκθεση του CMV και των αλληλουχιών στόχου Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV. Καθώς το μίγμα ψύχεται, οι βιοτινιλωμένοι εκκινητές LC342C και LC383 υβριδίζονται στον DNA-στόχο. Η θερμοσταθερή DNA Πολυμεράση *Thermus aquaticus* (Taq pol), με την παρουσία μαγνησίου (Mg^{2+}) και πλεονάσματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs), επεκτείνει τους υβριδισμένους εκκινητές κατά μήκος των προτύπων-στόχων για τη δημιουργία ενός μορίου δίκλωνου DNA 362 ζευγών βάσεων που ονομάζεται κλώνος (amplicon). Ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής επαναλαμβάνει αυτόματα τη διαδικασία αυτή για έναν καθορισμένο αριθμό κύκλων, καθένας από τους οποίους έχει ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό των κλώνων (amplicon) DNA. Η ενίσχυση πραγματοποιείται μόνο στη μεταξύ των εκκινητών περιοχή του γονιδιώματος CMV. Δεν ενισχύεται ολόκληρο το γονιδίωμα CMV.

2.2.2.3.B.3. Επιλεκτική Ενίσχυση

Η επιλεκτική ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος-στόχου από το κλινικό δείγμα επιτυγχάνεται στο COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test με τη χρήση του ενζύμου AmpErase® (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) και της τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (dUTP). Το ένζυμο AmpErase αναγνωρίζει και καταλύει τη διάσπαση των κλώνων του DNA που περιέχουν δεοξουριδίνη, αλλά όχι του DNA που περιέχει δεοξυθυμιδίνη. Η δεοξουριδίνη δεν υπάρχει στο φυσικό DNA, αλλά υπάρχει πάντοτε στον κλώνο (amplicon) λόγω της χρήσης τριφωσφορικής δεοξουριδίνης ως ενός από τα dNTPs του αντιδραστήριου Κυρίου Μίγματος. Για το λόγο αυτό, μόνο κλώνοι (amplicon) περιέχουν δεοξουριδίνη. Η δεοξουριδίνη καθιστά το μολυσματικό κλώνο (amplicon) ευαίσθητο στη διάσπαση από το ένζυμο AmpErase πριν από την ενίσχυση του DNA-στόχου. Το ένζυμο AmpErase, που περιλαμβάνεται στο αντιδραστήριο Κυρίου Μίγματος, καταλύει τη σχάση του DNA που περιέχει δεοξουριδίνη στα ιζήματα της δεοξουριδίνης ανοίγοντας την αλυσίδα της δεοξυριβόζης στη θέση C1. Όταν θερμανθεί στο πρώτο βήμα θερμοκυκλοποίησης στο αλκαλικό pH του Κυρίου Μίγματος (Master Mix), η αλυσίδα DNA του κλώνου (amplicon) διασπάται στη θέση της δεοξουριδίνης, καθιστώντας το DNA μη ενισχύσιμο. Το ένζυμο AmpErase είναι αδρανές σε θερμοκρασίες πάνω από τους 55°C, δηλαδή, σε όλα τα βήματα της θερμοκυκλοποίησης και για το λόγο αυτό δεν καταστρέφει τον κλώνο (amplicon)-στόχο. Μετά την ενίσχυση, όλα τα υπολειμματικά ένζυμα αποδιατάσσονται με την προσθήκη του διαλύματος αποδιάταξης, προλαμβάνοντας την αποικοδόμηση οποιουδήποτε κλώνου (amplicon)-στόχου. Το ένζυμο AmpErase στο COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test έχει αποδειχτεί ότι αδρανοποιεί τουλάχιστον 10^3 αντίγραφα κλώνου (amplicon)CMV που περιέχει δεοξουριδίνη σε κάθε PCR

2.2.2.3. Γ. Αντίδραση Υβριδισμού

Μετά την ενίσχυση PCR, ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής προσθέτει αυτόματα Διάλυμα Αποδιάταξης στα A-tubes για τη χημική αποδιάταξη του κλώνου (amplicon) CMV και του κλώνου (amplicon) του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV σχηματίζοντας μονόκλωνο DNA. Για την επίτευξη ποσοτικών αποτελεσμάτων σε ένα ευρύ δυναμικό εύρος, ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής αραιώνει διαδοχικά τον αποδιαταγμένο κλώνο (amplicon) στα σωληνάρια ανίχνευσης (D-cups). Ένα

εναιώρημα μαγνητικών σωματιδίων ανίχνευσης με επίστρωση ενός ολιγονουκλεοτιδικού ιχνηθέτη ειδικού για ένα κλώνο (amplicon) CMV (LC359) ή τον κλώνο (amplicon) του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV (SK535) προστίθεται σε καθεμιά από τις τέσσερις αραιώσεις του κλώνου (amplicon) CMV ή σε καθεμιά από τις δύο αραιώσεις του κλώνου (amplicon) Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV, αντίστοιχα. Ο επισημασμένος με βιοτίνη κλώνος (amplicon) υβριδίζεται στους ολιγονουκλεοτιδικούς ειδικούς για το στόχο ιχνηθέντες που είναι δεσμευμένοι στα μαγνητικά σωματίδια. Κάθε ποσοτικός προσδιορισμός απαιτεί τέσσερις ανεξάρτητες μετρήσεις απορρόφησης αντιδραστηρίου με χρήση του αιωρήματος ιχνηθέτη CMV και δύο μετρήσεις απορρόφησης με χρήση του αιωρήματος ιχνηθέτη Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV.

2.2.2.3.Δ. Αντίδραση Ανίχνευσης

Μετά την αντίδραση υβριδισμού, ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής πραγματοποιεί πλύση των μαγνητικών σωματιδίων στα D-cups για να απομακρυνθούν μη δεσμευμένα υλικά και στη συνέχεια προσθέτει συζεύκτη avidin-υπεροξειδάσης ραφανίδας. Ο συζεύκτης avidin-υπεροξειδάσης ραφανίδας δεσμεύεται στον επισημασμένο με βιοτίνη κλώνο (amplicon) που υβριδίζεται στους ειδικούς για το στόχο ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέντες που είναι δεσμευμένοι στα μαγνητικά σωματίδια. Ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής απομακρύνει το μη δεσμευμένο συζεύκτη πραγματοποιώντας πλύση των μαγνητικών σωματιδίων και στη συνέχεια σε κάθε D-cup προσθέτει διάλυμα υποστρώματος που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου και 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB). Με την παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η δεσμευμένη στο σωματίδιο υπεροξειδάση ραφανίδας καταλύει την οξείδωση της TMB για το σχηματισμό ενός έγχρωμου συμπλόκου, η απορρόφηση του οποίου μετράται σε μήκος κύματος των 660 nm από τον COBAS AMPLICOR Αναλυτή.

2.2.2.4. Ποσοτικοποίηση του CMV DNA

Το COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test ποσοτικοποιεί το CMV DNA με τη χρήση μιας δεύτερης αλληλουχίας-στόχου (Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV) που προστίθεται στο δείγμα εξέτασης σε γνωστή συγκέντρωση. Το Πρότυπο

Ποσοτικοποίησης CMV είναι ένα μη μολυσματικό, μόριο DNA πλασμιδίου 3.650 νουκλεοτιδίων με περιοχές δέσμευσης εκκινητή ίδιες με αυτές της αλληλουχίας στόχου CMV. Το Πρότυπο Ποσοτικοποίησης CMV περιέχει περιοχές δέσμευσης εκκινητή LC342C και LC383 και δημιουργεί ένα προϊόν ενίσχυσης με το ίδιο μήκος (362 βάσεις) και με ίδια σύνθεση βάσης όπως το DNA στόχο του CMV. Η περιοχή δέσμευσης ιχνηθέτη του κλώνου (amplicon) του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV έχει τροποποιηθεί για τη διαφοροποίηση του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV από τον κλώνο (amplicon) στόχου CMV.

Μέσα στο γραμμικό εύρος της ανάλυσης, η απορρόφηση στα 660 nm (A_{660}) για κάθε D-cup είναι ανάλογη με την ποσότητα του κλώνου (amplicon) CMV ή του κλώνου (amplicon) του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV στο D-cup. Ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής υπολογίζει το συνολικό CMV και τη συνολική απορρόφηση του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV πολλαπλασιάζοντας την απορρόφηση κάθε D-cup με τον συντελεστή αραίωσης του κλώνου (amplicon) για εκείνο το D-cup και έπειτα επιλέγει το D-cup με τη μέγιστη συνολική απορρόφηση. Η υπολογισμένη συνολική απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του CMV DNA ή του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV του DNA που υπάρχει σε κάθε αντίδραση ενίσχυσης PCR. Η ποσότητα του CMV DNA σε κάθε δείγμα υπολογίζεται από το λόγο της συνολικής απορρόφησης CMV προς τη συνολική απορρόφηση του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV και τον εισαγόμενο αριθμό μορίων DNA του Προτύπου Ποσοτικοποίησης CMV, με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$(\text{Συνολικό CMV } A_{660}) / (\text{Συνολικό QS } A_{660}) \times \text{αντίγρ. Εισαγωγής CMV QS} / \text{PCR} \times 40 = \text{CMV DNA αντίγρ.} / \text{ml}$$

Όπου:

Συνολικό CMV A_{660} = υπολογισμένη συνολική απορρόφηση για τον κλώνο (amplicon) CMV

Συνολικό QS A_{660} = υπολογισμένη συνολική απορρόφηση για τον κλώνο (amplicon) του Προτύπου Ποσοτικοποίησης

Αντίγραφα εισαγωγής CMV QS/PCR = αριθμός αντιγράφων του Προτύπου Ποσοτικοποίησης σε κάθε αντίδραση PCR

$$40 = \text{συντελεστής για τη μετατροπή αντιγράφων} / \text{PCR σε αντίγραφα} / \text{mL}$$

2.2.2.5. Αποτελέσματα

2.2.2.5.1. Υπολογισμός Αποτελεσμάτων

Για κάθε δείγμα και ορό ελέγχου, ο COBAS AMPLICOR Αναλυτής αυτόματα:

- Επιλέγει όλες τις αραιώσεις του κλώνου (amplicon) CMV και Προτύπου Ποσοτικοποίησης που βρίσκονται εντός του γραμμικού εύρους απορρόφησης της ανάλυσης (0,2-2,0 A_{660}). Τουλάχιστον μία αραιώση κλώνου (amplicon) CMV και μία αραιώση κλώνου (amplicon) Προτύπου Ποσοτικοποίησης πρέπει να βρίσκονται εντός αυτού του γραμμικού εύρους έτσι ώστε να υπολογιστεί ένα αποτέλεσμα.
- Διορθώνει όλες τις επιλεγμένες τιμές απορρόφησης για απορρόφηση «θορύβου».
- Καθορίζει ότι η συνολική τιμή A_{660} για το **CMM QS** είναι αποδεκτή, επιβεβαιώνοντας ότι τα βήματα προετοιμασίας δείγματος ενίσχυσης και ανίχνευσης εκτελέστηκαν σωστά.
- Καθορίζει ότι όλες οι αραιώσεις στόχου του **CMM(-) C** αποδίδουν τιμές $A_{660} \leq 0,099$.
- Καθορίζει το Συνολικό CMV A_{660} και QS A_{660} για όλες τις επιλεγμένες αραιώσεις και υπολογίζει τον αριθμό αντιγράφων για τα **CMM L(+)** C και **CMM H(+)** C και για κάθε δείγμα με χρήση της μέγιστης συνολικής τιμής A_{660} .
- Καθορίζει ότι ο υπολογισμένος αριθμός αντιγράφων για τα **CMM L(+)**C και **CMM H (+)**C βρίσκεται εντός των αποδιδόμενων εύρων τους.
- Δημιουργεί μια εκτύπωση που παρέχει τις τιμές A_{660} για όλες τις αραιώσεις του CMV και του Προτύπου Ποσοτικοποίησης και τον υπολογισμένο αριθμό αντιγράφων (CMV DNA αντίγραφα/ mL) για κάθε δείγμα και ορό ελέγχου. Ο αριθμός αντιγράφων εμφανίζεται με επιστημονικό συμβολισμό κάτω από την ταυτότητα του δείγματος στην εκτύπωση αποτελέσματος.

2.2.2.5.2. Επαλήθευση Ανάλυσης

Ελέγχονταν η εκτύπωση της ανάλυσης για ενδείξεις και σχόλια για επιβεβαίωση ότι η ανάλυση είναι έγκυρη. Η ανάλυση δεν ήταν έγκυρη αν εμφανίζονταν κάποιος από τους παρακάτω ενδείκτες ή σχόλια για τους CMV MONITOR Ορούς Ελέγχου.

Ένδειξη	Σχόλιο	Ερμηνεία
Q	QS_INVALID	Η τιμή CMM QS A ₆₆₀ για οποιοδήποτε ορό ελέγχου είναι πάνω ή κάτω από ο αποδεκτό εύρος
N	NC_INVALID	Η τιμή CMM(-) C A ₆₆₀ είναι πάνω από το αποδεκτό όριο
H	HPC_INVALID	Ο αριθμός αντιγράφων CMM H (+) C είναι πάνω ή κάτω από το αποδιδόμενο εύρος.
L	LPC_INVALID	Ο αριθμός αντιγράφων CMM L(+) C είναι πάνω ή κάτω από τα αποδιδόμενο εύρος
	OD_SEQUENCE	Υποδεικνύει μια τιμή στόχου A ₆₆₀ εκτός αλληλουχίας. Δεν υπολογίστηκαν αποτελέσματα. Επαναλαμβάνονταν ολόκληρη η διαδικασία της εξέτασης συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης.
	QS_SEQUENCE	Υποδεικνύει μια τιμή στόχου QS A ₆₆₀ εκτός αλληλουχίας. Δεν υπολογίστηκαν αποτελέσματα. Επαναλαμβάνονταν ολόκληρη η διαδικασία της εξέτασης συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης.

- Εάν η ανάλυση δεν ήταν έγκυρη, επαναλαμβάνονταν ολόκληρη η εξέταση συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης. Για μια έγκυρη ανάλυση, ελεγχόταν κάθε μεμονωμένο δείγμα για ενδείξεις ή σχόλια στην εκτύπωση αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονταν ως εξής:
 - Για δείγματα χωρίς ενδείξεις ή σχόλια, αναφερόταν τα αποτελέσματα που εμφανιζόταν στην εκτύπωση.
 - Μια έγκυρη ανάλυση μπορούσε να περιλαμβάνει έγκυρα και μη έγκυρα αποτελέσματα δείγματος ανάλογα με τις ενδείξεις και/ ή τα σχόλια που λαμβάνονταν για τα μεμονωμένα δείγματα.
- Δείγματα με ενδείξεις και/ή σχόλια ερμηνεύονταν ως εξής:

Ένδειξη	Σχόλιο	Ερμηνεία
-Q-	QS-INVALID	Δεν υπάρχει αραιώση QS με τιμή A_{660} εντός του γραμμικού εύρους απορρόφησης της ανάλυσης. Το αποτέλεσμα για το συγκεκριμένο δείγμα δεν είναι έγκυρο. Τα δείγματα με μη έγκυρα αποτελέσματα επανεξετάζονταν, επαναλαμβάνοντας την προετοιμασία δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης.
	TARGETOD-LO	Η τιμή A_{660} για όλες τις αραιώσεις CMV είναι κάτω από το γραμμικό εύρος απορρόφησης της ανάλυσης. Αναφερόταν το αποτέλεσμα ως "CMV DNA Μη Ανιχνεύσιμο.
	TARGETOD-HI	Η τιμή A_{660} για όλες τις αραιώσεις CMV είναι πάνω από το γραμμικό εύρος απορρόφησης της ανάλυσης. Αναφερόταν το αποτέλεσμα ως "Μη Προσδιορισμένο". Εάν απαιτούνταν αποτέλεσμα ποσοτικού προσδιορισμού, γινόταν αραιώση 1:100 του αρχικού δείγματος με CMV-αρνητικό ανθρώπινο πλάσμα και επαναλαμβανόταν η εξέταση. Πολλαπλασιασμός του αναφερόμενου αποτελέσματος επί 100
	RESULT-LO	Τα υπολογισμένα αντίγραφα/mL είναι κάτω από το γραμμικό εύρος της ανάλυσης. Αναφερόταν το αποτέλεσμα ως "CMV DNA λιγότερο από 400 αντίγραφα/mL)".
	RESULT-HI	Τα υπολογισμένα αντίγραφα/mL είναι πάνω από το γραμμικό εύρος της ανάλυσης. Αναφερόταν το αποτέλεσμα ως CMV DNA αντίγραφα /ml $>10^5$ Εάν απαιτούνταν αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού, το αρχικό δείγμα μπορούσε να αραιωθεί με 1:100 CMV-αρνητικό ανθρώπινο πλάσμα και να επαναληφθεί η εξέταση. Πολλαπλασιασμός του αναφερόμενου αποτελέσματος επί 100
	TARG-RANGE	Δεν υπάρχουν τιμές στόχου A_{660} εντός του γραμμικού εύρους απορρόφησης της ανάλυσης. Αναφερόταν το αποτέλεσμα ως "Μη Προσδιορισμένο". Επανεξετάζονταν το αρχικό δείγμα επαναλαμβάνοντας την προετοιμασία δείγματος, την ενίσχυση και την ανίχνευση

	OD-SEQUENCE	Υποδεικνύει μια τιμή στόχου A_{660} εκτός αλληλουχίας. Δεν υπολογίστηκαν αποτελέσματα. Επαναλαμβανόταν ολόκληρη η διαδικασία εξέτασης συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης.
	QS-SEQUENCE	Υποδεικνύει μια τιμή QSA_{660} εκτός αλληλουχίας. Δεν υπολογίστηκαν αποτελέσματα. Επαναλαμβανόταν ολόκληρη η διαδικασία της εξέτασης συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυσης και ανίχνευσης.

2.2.2.6. Ποιοτικός Έλεγχος

Τουλάχιστον από ένα αντίγραφο του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR (-) Ορού Ελέγχου, του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Ορού Ελέγχου Χαμηλής (+) Συγκέντρωσης και AMPLICOR CMV MONITOR Ορού Ελέγχου Υψηλής (+) Συγκέντρωσης περιλαμβάνονταν σε κάθε ανάλυση εξέτασης.

2.2.2.6.1. Αρνητικός Ορός Ελέγχου

Από τον ορό ελέγχου COBAS AMPLICOR CMV (-) έπρεπε να προκύψει ένα “Μη Ανιχνευμένο” αποτέλεσμα δηλ, όλες οι τιμές $CMV A_{660} \leq 0,099$. Εάν ο CMV (-) Ορός Ελέγχου δεν πληρούσε αυτά τα κριτήρια, ολόκληρη η ανάλυση θεωρούνταν άκυρη. Επαναλαμβάνονταν ολόκληρη η διαδικασία (προετοιμασία δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυση και ανίχνευση).

2.2.2.6.2. Θετικοί Οροί Ελέγχου

Το αποδιδόμενο εύρος για τον COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Ορό Ελέγχου Χαμηλής (+) Συγκέντρωσης και COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Ορό Ελέγχου Υψηλής (+) Συγκέντρωσης ήταν ειδικό για κάθε παρτίδα ορού ελέγχου και αναγράφονταν στην Καρτέλα Δεδομένων του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test που παρέχονταν με την κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων. Τα εύρη αυτά εισάγονταν στον COBAS AMPLICOR Αναλυτή με χρήση του πληκτρολογίου, του

σαρωτή ανάγνωσης γραμμικού κώδικα ή του λογισμικού AMPLILINK κατά τη ρύθμιση της Λίστας Εργασιών A-ring.

Ο αριθμός CMV DNA αντιγράφων/ ml για τον COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Ορό Ελέγχου Χαμηλής (+) Συγκέντρωσης και COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Ορό Ελέγχου Υψηλής (+) Συγκέντρωσης έπρεπε να βρίσκεται εντός του εύρους που αναγραφόταν στην Καρτέλα Δεδομένων του COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test. Αν ένας ή και οι δύο COBAS AMPLICOR CMV MONITOR (+) Οροί Ελέγχου δεν πληρούσαν αυτά τα κριτήρια, ολόκληρη η ανάλυση θεωρούνταν άκυρη. Επαναλαμβάνονταν ολόκληρη η διαδικασία (προετοιμασία δείγματος και ορού ελέγχου, ενίσχυση και ανίχνευση).

2.3. Επεξεργασία Δεδομένων

Τα αποτελέσματα της PCR, συγκρίνονταν σε διάφορες κατηγορίες ασθενών, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την υποκείμενη νόσο, την έκβαση της νόσου, την ανοσοκαταστολή και την χορήγηση ή όχι θεραπείας. Έγινε σύγκριση επίσης των αποτελεσμάτων της PCR, ανάλογα με το βιολογικό υγρό που έγινε η PCR (αίμα-ούρα). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την βοήθεια του προγράμματος SPSS. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η στατιστική σημαντικότητα. Τιμές σε επίπεδο 5% ($p < 0,05$) θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν συνολικά 418 δείγματα, που προέρχονταν από 260 ασθενείς, 43 παιδιά (ηλικίας από 30 ημερών ως 14 ετών) και 217 ενήλικες (ηλικία από 18 ως 84 ετών). Από τους ασθενείς αυτούς οι 145 (145/260: 55,8%) ήταν άντρες και οι 115 (115/260: 44,2%) γυναίκες. Όλοι οι ασθενείς νοσηλεύτηκαν το Π.Π.Γ.Ν.Ι. και στην διαφορική διάγνωση υπήρξε και η υποψία της CMV λοίμωξης. Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών αυτών είναι όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, και ο μέσος όρος (median) ήταν 42 έτη με S.D.:±23.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΗΛΙΚΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

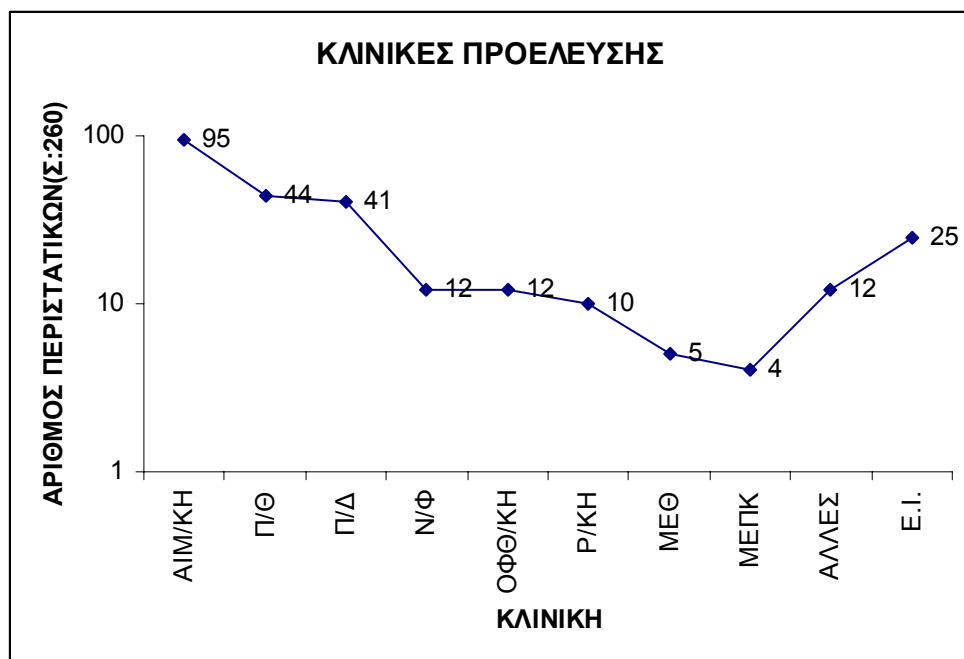
Ηλικιακή Δεκαετία	Αριθμός Ασθενών	Ποσοστό (Percentage)
0-9	21	8,1%
10-19	22	8,5%
20-29	35	13,5%
30-39	42	16,2%
40-49	35	13,5%
50-59	45	17,2%
60-69	35	13,5%
70-79	17	6,4%
80-89	8	3,1%
ΣΥΝΟΛΟ	260	100%

Από τους ασθενείς αυτούς, οι 108 ήταν ανοσοεπαρκείς (40 παιδιά, 68 ενήλικες), ενώ οι 152 βρίσκονταν σε ανοσοκαταστολή (3 παιδιά, 149 ενήλικες) με διάφορα είδη καταστολής. Στους ασθενείς αυτούς, σε 181 ζητήθηκε μόνο 1 δείγμα, σε 50 δύο δείγματα, σε 11 τρία, σε 10 τέσσερα, σε 2 πέντε, σε 2 έξι, σε 1 επτά, σε 2 εννιά δείγματα, σε 1 έντεκα και σε άλλον 1 δεκαεφτά δείγματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αριθμός Δειγμάτων ανά ασθενή.

Ασθενείς (N)	Δείγματα (N)
181	1
50	2
11	3
10	4
2	5
2	6
1	7
2	9
1	17

Από τους ασθενείς αυτούς, οι 235 νοσηλεύτηκαν σε κάποια κλινική, κυρίως στην Αιματολογική (ν = 95), την Παθολογική (ν = 44), την Παιδιατρική (ν = 41), την Νεφρολογική (ν = 12), την οφθαλμολογική (ν = 12), την Ρευματολογική (ν = 10), και λιγότερο σε άλλες κλινικές, όπως ΜΕΘ (ν = 5), ΜΕΠΚ (ν = 4), Μ.Μ.Α.(ν = 2), Μ.Ε.Ν.Ν.(ν = 2), Δερματολογική (ν = 2), Ογκολογική (ν = 2), ενώ από ένας ασθενής νοσηλεύτηκε στην Χειρουργική, την Νευρολογική, την Μαιευτική και την Γυναικολογική. Οι υπόλοιποι 25 ασθενείς ήταν ασθενείς των Εξωτερικών Ιατρείων, με την πλειοψηφία αυτών να προέρχεται από το Αιματολογικό Ιατρείο (ν = 12), και οι υπόλοιποι (ν = 13) από άλλα Εξωτερικά Ιατρεία, όπως φαίνεται στον Διάγραμμα 1.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Κατανομή των ασθενών με βάση την κλινική προέλευσης.

ΑΙΜ/ΚΗ: Αιματολογική, Π/Θ: Παθολογική, Π/Δ: Παιδιατρική, Ν/Φ: Νεφρολογική, ΟΦΘ/ΚΗ: Οφθαλμολογική, Ρ/ΚΗ: Ρευματολογική, ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, ΜΕΠΚ: Μονάδα Εντατικής Παρακολούθησης Καρδιοπαθών, ΑΛΛΕΣ: (Μ.Μ.Α.: Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, Μ.Ε.Ν.Ν.: Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών, Δ/Κ: Δερματολογική, ΟΓ/ΚΗ: ογκολογική, Χ/ΚΗ: Χειρουργική, Ν/Κ: Νευρολογική, Μ/Γ: Μαιευτική/Γυναικολογική), Ε.Ι.: Εξωτερικό Ιατρείο [Σύνολο: 25, Αιματολογικό Ιατρείο:12, Άλλα Ε.Ι.: 13]

Οι συχνότερες υποκείμενες νόσοι των ασθενών αυτών ήταν οι ακόλουθες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Για τους αιματολογικούς ασθενείς κυρίως ΧΛΛ (ν =27), ΟΛΛ (ν =16), ΟΜΛ (ν =15), Non Hodgkin Λέμφωμα (ν =12), MDS(ν = 09), ενώ σε μικρότερο βαθμό υπήρξαν ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα, Λέμφωμα Burkitt, Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ITP, Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία, ΧΜΛ, Πλασματοκύττωμα, Μεταμοσχευμένοι Μυελού οστών που παρακολουθούνταν στο ΠΓΝΙ, Αιμολυτική αναιμία, Μυελοσκλήρυνση, Απλαστική αναιμία, Λευκοκυττάρωση υπό διερεύνηση, καθώς και Πανκυτταροπενία υπό διερεύνηση.

Για τους ασθενείς της παθολογικής κλινικής κάποιο παρατεινόμενο εμπύρετο (ν =22) ήταν η συχνότερη αιτία διερεύνησης ακολουθούμενη από ασθενείς με κίρρωση ήπατος (ν =12) και μεταμοσχευμένους ήπατος (ν =3) που παρακολουθούνταν στο νοσοκομείο. Σε μικρότερο βαθμό υπήρξαν ασθενείς με νόσο “Wilson”,

κοιλιοκάκη, έρπη, νόσο Crohn, ελκώδη κολίτιδα, ηπατονεφρικό σύνδρομο και πανκυτταροπενία υπό διερεύνηση.

Στα παιδιά η κύρια αιτία αναζήτησης ικού φορτίου ήταν η ύπαρξη παρατεινόμενου εμπύρετου με συμπτώματα συνδρόμου μονοπυρήνωσης ($n=28$), ενώ σε μικρότερο βαθμό υπήρξαν παιδιά με Ρευματοειδή αρθρίτιδα, Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, νόσο Crohn, ΟΛΛ, ενώ υπήρξε και ένα παιδί 30 ημερών με νευρολογική σημειολογία που σε αξονική εγκεφάλου φάνηκαν αποτιτανώσεις και περικολιακή ασβεστοποίηση των κοιλιών του εγκεφάλου.

Οι ασθενείς της Νεφρολογικής κλινικής ήταν κυρίως Μεταμοσχευμένοι νεφρού ($n=8$), ακολουθούμενοι από ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ($n=4$). Οι ασθενείς της Ρευματολογικής κλινικής, ασθενείς με Ρευματοειδή αρθρίτιδα ($n=8$), και Σ.Ε.Λ. ($n=2$) και κλινική υποψία CMV λοίμωξης, ενώ οι ασθενείς της οφθαλμολογικής κλινικής εμφάνισαν Ραγοειδίτιδα ($n=8$) και λιγότερο συχνά κάποια έντονη επιπεφυκίτιδα ($n=4$).

Οι υπόλοιποι ασθενείς ήταν ασθενείς που εμφάνισαν εικόνα εγκεφαλίτιδας, σύνδρομο ARDS, περικαρδίτιδα, έντονη δύσπνοια, πομφολυγώδες εξάνθημα και γενικότερα μια μεγάλη γκάμα κλινικών εκδηλώσεων, που στην διαφορική τους διάγνωση ήταν και η υποψία CMV λοίμωξης. Μελετήθηκαν επίσης και 30 δείγματα υγιών ατόμων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Συχνότερες Υποκείμενες Νόσοι ασθενών.

Κλινική	Υποκείμενη Νόσος	Ασθενείς (N)
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ	Χ.Λ.Λ. ^a	27
	Ο.Λ.Λ. ^b	16
	Ο.Μ.Λ. ^c	15
	NHL ^d	12
	MDS ^e	09
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	Παρατεινόμενο εμπύρετο υπό διερεύνηση	22
	Κίρρωση Ήπατος	12
	Μεταμόσχευση Ήπατος	03
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ	Παρατεινόμενο εμπύρετο με συμπτώματα συνδρόμου μονοπυρήνωσης	28
	Μεταμόσχευση νεφρού	08
	Χ.Ν.Α. [*]	04
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ	P.A. ^{**}	08
	Σ.Ε.Λ. ^{***}	02
ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ	Ραγοειδίτιδα	08
	Έντονη Επιπεφυκίτιδα	04

*a: Χ.Λ.Λ.: Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, b: Ο.Λ.Λ.: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, c: Ο.Μ.Λ.: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, d: NHL: Non-Hodgkin's Lymphoma, e: MDS: Myelodysplastic Syndrome, *: Χ.Ν.Α.: Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, **: P.A.: Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, ***: Σ.Ε.Λ.: Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος.*

Από τους ασθενείς αυτούς, 205 (21 παιδιά, 184 ενήλικες) ήταν θετικοί για CMV-IgG αντισώματα. 33 (20 παιδιά, 13 ενήλικες) ήταν αρνητικοί, ενώ σε 22 εξ'αυτών (2 παιδιά, 20 ενήλικες), δεν ζητήθηκαν και δεν έγιναν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5. Συνολικά, IgG αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 86,1% των ασθενών. Στα παιδιά, ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 51,2%, ενώ στους ενήλικες σε ποσοστό 93,4%,

σημαντικά μεγαλύτερο, και σε συμφωνία με άλλες μελέτες στην Ελλάδα που δίνουν επιπολασμό περίπου στο 90%^{48,15,16} σε ενήλικες, παρόλο που ήταν ένα αρκετά μικρό δείγμα για αυτό το σκοπό, και δεν μελετήθηκε κάποια ειδική ομάδα. Η ανίχνευση IgG αντισωμάτων έναντι της CMV λοίμωξης αυξάνεται με την ηλικία, ενώ η σύγκριση ανάμεσα σε γυναίκες και άντρες έδειξε ελαφρώς υψηλότερη ανίχνευση στις γυναίκες (86,32%) σε σύγκριση με τους άντρες (82,8%), αποτελέσματα που έρχονται σε σχετική συμφωνία με άλλες μελέτες (όσον αφορά τον υψηλότερο επιπολασμό στις γυναίκες), σε πολύ μεγαλύτερες μελέτες στις ΗΠΑ⁴⁶.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Ανίχνευση hCMV IgG αντισωμάτων

Ασθενείς		hCMV IgG	
Σύνολο		αντισώματα	
(N)		(N)	
205	Π*	21	+
	E**	184	
33	Π	20	—
	E	13	
22	Π	2	Δ.Ε.***
	E	20	

*: Π: Παιδιά, **: E: Ενήλικες, ***: Δ.Ε.: Δεν Έγινε

Από τους ασθενείς αυτούς, αρνητικοί για CMV-IgM αντισώματα ήταν 154 (30 παιδιά, 124 ενήλικες). Θετικοί για CMV IgM αντισώματα ήταν 75 ασθενείς (10 παιδιά, 65 ενήλικες) ενώ σε 22 (2 παιδιά, 20 ενήλικες) εξ'αυτών, δεν ζητήθηκαν και δεν έγιναν CMV-IgM αντισώματα. 9 ασθενείς (1 παιδί, 8 ενήλικες) εμφάνισαν αμφίβολα αντισώματα, όπου σε 2 ενήλικες έγινε μόνο ένα δείγμα, ενώ σε 6 ενήλικες και 1 παιδί, ζητήθηκε και δεύτερο δείγμα, το οποίο εμφάνισε οριακά θετικά αποτελέσματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Ανίχνευση hCMV IgM αντισωμάτων

Ασθενείς		hCMV IgM	
Σύνολο		αντισώματα	
(N)		(N)	
75	Π*	10	+
	E**	65	
154	Π	30	—
	E	124	
9	Π	1	±
	E	8	
22	Π	2	Δ.Ε.***
	E	20	

*: Π: Παιδιά, **:E: Ενήλικες, ***:Δ.Ε.: Δεν Έγινε

Η επιβεβαίωση της CMV λοίμωξης και με τις δύο μεθόδους (ανίχνευση IgM αντισωμάτων και ιικού DNA), παρατηρήθηκε σε 19 ασθενείς (5 παιδιά, 14 ενήλικες). 39 ασθενείς ήταν θετικοί για CMV-IgM και δεν ανιχνεύτηκε σε αυτούς ιικό DNA (CMV DNA). Σε μερικούς (12/39, 30,8%) από αυτούς τους ασθενείς ανιχνεύτηκαν επίσης αντισώματα έναντι άλλων ερπητοϊών όπως HSV, VZV ή EBV, αποτελέσματα ανάλογα με άλλες μελέτες.^{205,206} Στους υπόλοιπους, υπήρξε παραμονή των IgM αντισωμάτων για μεγάλο διάστημα (ως και 9 μήνες), που επιβεβαιώθηκε και με την βοήθεια της συνάφειας των anti CMV IgG (avidity), αφού εμφάνισαν δείκτη avidity ίσο ή μεγαλύτερο από 0,8 που αποτελεί ισχυρή ένδειξη μιας περισσότερο από τρεις μήνες πρωτοπαθούς λοίμωξης, στοιχεία που έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες.^{207,161} Με την μεθοδολογία της PCR δεκαεπτά (17) επιπλέον περιπτώσεις ενεργούς λοίμωξης μπορούσαν να διαγνωστούν, για καμία από τις οποίες δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν αντισώματα έναντι του κυτταρομεγαλοϊού. Από αυτά τα δείγματα, τα 18 προερχόταν από ενήλικες ασθενείς που εμφάνισαν διάφορες κλινικές εκδηλώσεις και το άλλο από ένα παιδί ηλικίας 30 ημερών που εμφάνισε νευρολογική σημειολογία και ευρήματα σε ακτινολογικό έλεγχο που διενεργήθηκε. Αυτό

μεταφράζεται σε μια αύξηση 22,6%(17/75) στους ασθενείς που διαγνώστηκαν με ενεργό CMV λοίμωξη με την βοήθεια της ποσοτικής PCR, σε σύγκριση με την ορολογική προσέγγιση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7. Σε κανένα από τα δείγματα υγιών ατόμων που περιελήφθησαν στην μελέτη δεν ανιχνεύτηκε ιικό DNA.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Σύγκριση hCMV IgM αντισωμάτων και ιικό DNA

Ασθενείς (N)	PCR	IgM
19	+	+
39	-	+
17	+	-

Από τους 36 ασθενείς, ιικό DNA ανιχνεύθηκε σε 68 συνολικά δείγματα. Από αυτά, τα 52 δείγματα ήταν πλάσμα αίματος, ενώ σε οχτώ ασθενείς με έντονα κλινικά συμπτώματα βρέθηκαν και 14 θετικά δείγματα ούρων. Επιπλέον, σε δύο ασθενείς με θορυβώδη συμπτώματα πνευμονίτιδας, εξετάστηκαν και από ένα δείγμα βρογχικών εκκρίσεων που βρέθηκε να περιέχει ιικό DNA. Από τους 36 ασθενείς, στους 28 υπήρχε ένα θετικό δείγμα, σε 2 δύο θετικά, σε 4 τρία θετικά και σε άλλους 2 τέσσερα θετικά δείγματα πλάσματος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Αριθμός θετικών δειγμάτων πλάσματος ανά Ασθενή που ανιχνεύτηκε ιικό DNA

Ασθενείς (N)	Δείγματα (N)
28	1
2	2
4	3
2	4

Από τους 36 CMV DNA (+) ασθενείς οι 27 ήταν άνδρες (75%, 27/36), ενώ οι υπόλοιποι 9 γυναίκες (25%, 9/36). Μεταξύ αυτών υπήρχαν 6 παιδιά (16,67%) και 30 ενήλικες (83,33%). Αυτοί που βρίσκονταν σε ανοσοκαταστολή ήταν 20 ασθενείς

(55,6%), όλοι ενήλικες ενώ ανοσοεπαρκείς ήταν 16 ασθενείς (44,4%), μεταξύ των οποίων 6 παιδιά και 10 ενήλικες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Στοιχεία των 36 ασθενών στους οποίους ανιχνεύτηκε υικό DNA.

Σύνολο	N	N
Ασθενών:(36)		
Φύλο	27	9
(Α/Γ)*		
Ηλικία		
(Π/Ε)**	6	30
Ανοσιακή Κατάσταση	16 ⁺	20 ⁺⁺
(Α- Α/μένοι)***		

:Α: Άνδρες, Γ: Γυναίκες, **: Π: Παιδιά (30 ημερών-14 Ετών), Ε: Ενήλικες (18 Ετών-88 Ετών), *: Α: Ανοσοεπαρκείς, Α/ΜΕΝΟΙ: Ανοσοκατεσταλμένοι, +:[6]Παιδιά και [10] Ενήλικες, ++:όλοι Ενήλικες.*

Οι κλινικές πληροφορίες για τους 36 ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε DNA με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR, αναγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 10.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Κλινικές πληροφορίες ασθενών στους οποίους ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο με τη βοήθεια της ποσοτικής PCR

A/A	ΕΝΗΛΙΚΕΣ/ ΠΑΙΔΙΑ	ΦΥΛΟ	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ	ΚΛΙΝΙΚΗ	IgG (AU/ml)	IgM (Index)	Cobas (ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ (copies/ml)	ΔΕΙΓΜΑ ΟΥΡΩΝ (copies/ml)	BAL	ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΗ ΝΟΣΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΕΚΒΑΣΗ
1	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	98,5	-	650	-	-	ΧΛ/ΑΙΜΙΚΗ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
2	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	99,5	-	655	-	-	ΧΛΛ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
3	E	Θ	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	137	-	7.650	-	-	ΧΛΛ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
4	E	Θ	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	138	-	7.660	-	-	ΧΛΛ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
5	E	A	ΝΑΙ	Ν/Φ	139	0,803	2.930	12.400	-	ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΝΕΦΡΟΥ	ΛΕΥΚΟΠΕΝΙΑ/ΘΡΟΜΒΟΦΛΕΒΙΤΙΔΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
6	E	A	ΝΑΙ	Ν/Φ	140	0,903	2.940	12.500	-	ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΝΕΦΡΟΥ	ΛΕΥΚΟΠΕΝΙΑ/ΘΡΟΜΒΟΦΛΕΒΙΤΙΔΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
7	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	68,4	-	1.560	-	-	ΧΛΛ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
8	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	69,4	-	1.570	-	-	ΧΛΛ	ΠΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
9	Π	A	ΌΧΙ	Π/Δ	99,5	0,605	747	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
10	Π	A	ΌΧΙ	Π/Δ	100,5	0,705	752	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
11	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	151,3	-	27.900	-	-	ΧΛΛ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
12	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	152,3	-	28.000	-	-	ΧΛΛ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
13	E	A	ΌΧΙ	Π/Θ	794,3	4,89	874	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
14	E	A	ΌΧΙ	Π/Θ	715,3	4,891	879	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
15	E	Θ	ΌΧΙ	Π/Θ	707	1,043	520	-	-	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ	ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
16	E	Θ	ΌΧΙ	Π/Θ	708	1,044	525	-	-	ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ	ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	ΌΧΙ	ΚΑΛΗ
17	E	A	ΌΧΙ	Π/Θ	1571,8	4,15	4.230	-	-	ΠΕΡΙΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ SHOCK	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
18	E	A	ΌΧΙ	Π/Θ	1572,8	4,16	4.240	-	-	ΠΕΡΙΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ SHOCK	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
19	E	A	ΝΑΙ	ΟΓΚ/ΚΗ	2.500	-	622	-	-	Ca ΣΥΜΠΛΗΓΟΥΣ ΟΡΓΑΝΟΥ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
20	E	A	ΝΑΙ	ΟΓΚ/ΚΗ	2.500	-	627	-	-	Ca ΣΥΜΠΛΗΓΟΥΣ ΟΡΓΑΝΟΥ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
21	E	A	ΝΑΙ	ΑΙΜ/ΚΗ	236,8	-	3.500	-	-	ΧΛΛ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ

22	E	A	NAI	ΑΙΜ/ΚΗ	237,8	-	3.510	-	-	Χ/Λ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
23	Π	A	ΟΧΙ	Π/Δ	93,5	0,6	583	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΟΧΙ	ΚΑΛΗ
24	Π	A	ΟΧΙ	Π/Δ	94,5	0,7	588	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΟΧΙ	ΚΑΛΗ
25	Π	A	ΟΧΙ	Π/Δ	95,5	0,8	593	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΟΧΙ	ΚΑΛΗ
26	E	Θ	NAI	ΜΕΘ	2.500	3,635	31.400	138.000	1040	ΣΕΛ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΟΡΓΑΝΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
27	E	Θ	NAI	ΜΕΘ	2.500	3,635	31.300	137.000	1.030	ΣΕΛ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΟΡΓΑΝΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
28	Π	Θ	ΟΧΙ	Π/Δ	1157,9	-	-	238.000	-	ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗ	ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΕΙΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟΤΕΤΑΝΩΣΕΙΣ ΣΕ CΤ-ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
29	E	Θ	ΟΧΙ	Π/Θ	95,5	0,603	472	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΟΧΙ	ΚΑΛΗ
30	E	Θ	ΟΧΙ	Π/Θ	96,5	0,703	477	-	-	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CMV	ΕΜΠΥΡΕΤΟ	ΟΧΙ	ΚΑΛΗ
31	E	A	NAI	ΑΙΜ/ΚΗ	100	-	6.010	-	-	Χ/Λ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
32	E	A	NAI	ΑΙΜ/ΚΗ	100	-	6.020	-	-	Χ/Λ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
33	E	A	NAI	ΑΙΜ/ΚΗ	366,3	-	58.700	86.600	-	ΑΠΛΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
34	E	A	NAI	ΑΙΜ/ΚΗ	367,3	-	58.800	86.700	-	ΑΠΛΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΑΠΕΒΙΩΣΕ
35	E	A	ΟΧΙ	Π/Θ	219,6	2,722	2.410	-	-	ΚΙΡΡΩΣΗ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ
36	E	A	ΟΧΙ	Π/Θ	335,9	2,93	2.420	-	-	ΚΙΡΡΩΣΗ	ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ	ΝΑΙ	ΚΑΛΗ

Από τους 36 ασθενείς, τα 6 ήταν παιδιά (ηλικίας 30 ημερών ως 14 ετών), και οι 30 ενήλικες, 10 ανοσοεπαρκείς και 20 ανοσοκατεσταλμένοι (ηλικίας 20 έως 72 ετών).

Από τα 6 παιδιά, τα 5 εμφάνισαν εμπύρετο κατάσταση με ανορεξία, καταβολή, κακουχία, μυαλγίες, κεφαλαλγία, κόπωση και συμπτωματολογία επηρεασμένης ηπατικής λειτουργίας (ηπατομεγαλία). Ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος έδειξε επηρεασμένη ηπατική δραστηριότητα, με αύξηση των ηπατικών ενζύμων ακόμη και στο δεκαπλάσιο συγκρινόμενο με την φυσιολογική τιμή για την ηλικία. Εμφάνισαν επίσης ψηλαφητούς διογκωμένους λεμφαδένες, κυρίως στην περιοχή του τραχήλου, καθώς και λεμφοκυττάρωση με αρκετά διεγερμένα λεμφοκύτταρα σε επίχρισμα γενικής αίματος, και όλα αυτά χαρακτηρίστηκαν σαν σύνδρομο μονοπυρήνωσης (CMV mononucleosis). Το άλλο παιδί, ηλικίας 30 ημερών εμφάνισε συγγενή λοίμωξη που παρουσιάστηκε ως εμπύρετος κατάσταση, σπληνομεγαλία, μικροκεφαλία, συνοδευόμενο από νευρολογική σημειολογία που σε ακτινολογικό έλεγχο με αξονική τομογραφία εγκεφάλου εμφάνισε περικοιλιακή ασβεστοποίηση. Αυτό το παιδί προερχόταν από μητέρα με θετικά IgM αντισώματα για CMV. Η ηπατική λειτουργία αυτού ήταν καλή καθώς φάνηκε με τον εργαστηριακό έλεγχο. Το παιδί διακομίστηκε σε νοσοκομείο των Αθηνών, όπου του χορηγήθηκε γκανσικλοβίρη και επήλθε πλήρης ίαση, χωρίς να φαίνεται να έχει επηρεαστεί η εγκεφαλική λειτουργία αυτού. Σε αυτό το παιδί ανιχνεύτηκε ο ιός με μοριακές τεχνικές και σε δείγμα ούρων, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και νωρίτερα από ότι σε πλάσμα αίματος.

Η κύρια υποκείμενη νόσος συνολικά στους ενήλικες ασθενείς που ανιχνεύτηκε ιικό DNA ήταν κάποια αιματολογική νόσος, αφού αυτή υπήρχε στους 14 από του 30 (46,67%) ασθενείς. Οι υπόλοιποι εμφάνισαν σύνδρομο μονοπυρήνωσης (4/30, 13,3%) με κλινική εικόνα εμπύρετου ως 39° C, κακουχία, μυαλγίες, κεφαλαλγία, και κόπωση που υποχώρησε μετά από κάποιες μέρες με τη βοήθεια παρακεταμόλης, για να εμφανιστεί ξανά, συνοδευόμενο από διογκωμένους λεμφαδένες, κυρίως στην περιοχή του τραχήλου, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία. Σε εργαστηριακό έλεγχο σε αυτούς τους ασθενείς παρουσιάστηκε λεμφοκυττάρωση, με αρκετά διεγερμένα και άτυπα λεμφοκύτταρα σε επίχρισμα γενικής αίματος, ενώ ο έλεγχος για αντισώματα έναντι του EBV και ηπατοϊών ήταν αρνητικός, όπως και το Monotest, ενώ τα αντισώματα IgM έναντι του CMV ήταν θετικά. Σε αυτούς η κλινική εικόνα βελτιώθηκε μόνο με τη χορήγηση αντιπυρετικών (παρακεταμόλη), χωρίς να χρειαστεί να χορηγηθεί αντιική θεραπεία.

Δύο ασθενείς είχαν ως υποκείμενη νόσο κίρρωση ήπατος, δύο ηπατίτιδα από κάποιον ηπατοϊό, ενώ άλλοι δύο ήταν ογκολογικοί ασθενείς με νεοπλασία συμπαγούς οργάνου, ανοσοκατεσταλμένοι (όχι μεταμοσχευμένοι). Όλοι εμφάνισαν κλινική εικόνα συμβατή με λοίμωξη CMV που επιβεβαιώθηκε με την ποσοτική PCR, ενώ αντισώματα ανιχνεύτηκαν μόνο στους ασθενείς με την κίρρωση του ήπατος και την ηπατίτιδα, όχι όμως και στους ογκολογικούς ασθενείς.

Δύο ασθενείς νοσηλεύτηκαν στην καρδιολογική κλινική και την παθολογική κλινική του Π.Γ.Ν.Ι. για διερεύνηση περικαρδιακής συλλογής με κλινική εικόνα να εμφανίζεται ως εμπύρετος κατάσταση, συνοδευόμενη με έντονη δύσπνοια. Ακολούθησε αύξηση των ηπατικών ενζύμων, και οι ασθενείς εμφάνισαν σηπτική κατάσταση με πτώση της αρτηριακής πίεσης και μείωση της διούρησης. Για την περικαρδιακή συλλογή, οι ασθενείς έλαβαν κολχικίνη και αντιβιοτική αγωγή, ενώ CMV λοίμωξη επιβεβαιώθηκε τόσο με την ποσοτική PCR, όσο και την ανίχνευση αντισωμάτων και ξεκίνησαν αγωγή με γκανσικλοβίρη. Τελικά υποχώρησε η περικαρδιακή συλλογή και η έκβαση των ασθενών ήταν καλή.

Άλλοι δύο ασθενείς ήταν μεταμοσχευμένοι νεφρού πριν 4,5 και 5 χρόνια αντίστοιχα σε μεταμοσχευτικό κέντρο σε άλλο νοσοκομείο της χώρας. Εδώ εμφάνισαν εικόνα θρομβοφλεβίτιδας και σε τακτικό έλεγχο εμφάνισαν λευκοπενία και θετικά αντισώματα, καθώς και θετική PCR για CMV. Οι ασθενείς διακομίστηκαν στο κέντρο όπου έγινε η μεταμόσχευση, όπου χορηγήθηκε γκανσικλοβίρη και η έκβαση ήταν καλή. Σε αυτούς τους ασθενείς ανιχνεύτηκε ο ιός με μοριακές τεχνικές και σε δείγμα ούρων και μάλιστα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι σε πλάσμα αίματος.

Άλλοι δύο ασθενείς είχαν ως υποκείμενη νόσο Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο και βρίσκονταν σε ανοσοκαταστολή (κυκλοφωσφαμίδα και κορτιζόνη). Όταν έκαναν εισαγωγή στο νοσοκομείο για να πάρουν το σχήμα εμφάνισαν πυρετό και την επόμενη μέρα αναπνευστική δυσχέρεια με ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακα.

Η κατάσταση αυτή υποχώρησε, για να επανέλθει όμως μετά από τρεις μήνες, όπου έκαναν εικόνα CMV πνευμονίας (εικόνα πνευμονίας με ανίχνευση ιικού φορτίου για CMV σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα-Bronchoalveolar Lavage BAL). Τότε έλαβαν γκανσικλοβίρη για 21 ημέρες και η κατάσταση βελτιώθηκε αισθητά. Δεν ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο σε πλάσμα αίματος τότε. Μετά 2 μήνες εμφάνισαν ξανά εικόνα CMV πνευμονίας, πιο “θορυβώδη”, οπότε οι ασθενείς οδηγήθηκαν στην ΜΕΘ. Υπήρξαν και θετικές καλλιέργειες αίματος για *pseudomonas spp*, χορηγήθηκε

ξανά γκανσικλοβίρη, χωρίς σαφή βελτίωση της κλινικής εικόνας. 1 μήνα περίπου μετά τη νοσηλεία οι ασθενείς απεβίωσαν εμφανίζοντας εικόνα πολυοργανικής ανεπάρκειας, ανουρίας, και εικόνα σηπτικού shock. Σε αυτούς τους ασθενείς αρχικά ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο μόνο σε BAL, ενώ τόσο δείγμα ούρων, όσο και πλάσμα αίματος ήταν αρνητικά. Ακολούθως, όταν εμφάνισαν ξανά εικόνα CMV πνευμονίας, ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο με μοριακές τεχνικές και σε δείγμα ούρων και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι σε πλάσμα αίματος.

Από τους ασθενείς με αιματολογική νόσο, τέσσερις είχαν ως υποκείμενη νόσο Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία (ΧΛΛ) με κλινική εικόνα εμπύρετου, δύο ΧΛΛ που μετατράπηκε σε λέμφωμα υψηλής κακοήθειας, όπου χορηγήθηκαν αντικλωνικά αντισώματα και εμφάνισαν κλινική εικόνα ως παρατεινόμενο εμπύρετο, άλλοι δύο ΧΛΛ και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) με κλινική εικόνα εμπύρετου επί μακρό χρονικό διάστημα και σημειολογία από το αναπνευστικό. Άλλοι δύο είχαν απλαστική αναιμία και βρισκόταν υπό κυκλοσπορίνη και κορτιζόνη. Εμφάνισαν λεμφοπενία με αριθμό κυττάρων ως και $500 /\text{mm}^3$. 50 μέρες μετά την διάγνωση εμφάνισαν οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, και ξεκίνησαν θεραπεία με γκανσικλοβίρη. Οδηγήθηκαν στην ΜΕΘ, όπου εμφάνισαν και θετικές καλλιέργειες αίματος με *staphylococcus spp*, ενώ εμφάνισαν κυψελιδική αιμορραγία και τελικά κατέληξαν. Σε αυτούς τους ασθενείς ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο και σε δείγμα ούρων, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι σε πλάσμα αίματος. Άλλοι δύο είχαν ΧΛΛ που έκανε εκτροπή σε λέμφωμα Richter και παρουσίασαν εικόνα πνευμονίας. Αυτοί βρίσκονταν υπό χημειοθεραπεία, νοσηλεύτηκαν ακολούθως σε άλλο νοσοκομειακό ίδρυμα της χώρας και τελικά κατέληξαν. Άλλοι δύο με ΧΛΛ σε υποτροπή υπό χημειοθεραπεία (Mabthera), εμφανίστηκαν ως εμπύρετος ουδετεροπενία με κλινική εικόνα συμβατή με λοίμωξη αναπνευστικού. Χορηγήθηκε αντιική θεραπεία και η έκβαση ήταν καλή.

Η κυριότερη κλινική εκδήλωση της νόσου ήταν συμπτωματολογία από το αναπνευστικό, κυρίως πνευμονίτιδα, που εμφανίστηκε σε ένα ποσοστό 61,1% (22/36) ακολουθούμενη σε μικρότερο ποσοστό από εικόνα εμπύρετου που περιγράφεται ως σύνδρομο CMV μονοπυρήνωσης σε ένα ποσοστό 25%(9/36). Σε μικρότερο ποσοστό υπήρχε συμπτωματολογία από το γαστρεντερικό σύστημα σε ένα ποσοστό 5,6% (2/36), εικόνα θρομβοφλεβίτιδας και λευκοπενία σε δύο ασθενείς, σε ποσοστό 5,6% (2/36) και υπήρξε και ένα περιστατικό με νευρολογική σημειολογία σε ένα ποσοστό 2,8% (1/36), όπως φαίνεται στον Πίνακα 11. Από τα έξι παιδιά, το ένα είχε εικόνα

συγγενούς λοίμωξης, με νευρολογική σημειολογία και σε αξονική τομογραφία εγκεφάλου εμφάνισε παθολογικά ευρήματα, ενώ τα υπόλοιπα πέντε εικόνα συνδρόμου μονοπυρήνωσης. Από τους ενήλικες τέσσερις εμφάνισαν εικόνα συνδρόμου μονοπυρήνωσης, 22 διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας, 2 συμπτωματολογία από το γαστρεντερικό, και 2 εμφάνισαν εικόνα θρομβοφλεβίτιδας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Κλινική Εκδήλωση Νόσου

Νόσος	Ασθενείς	Π *	Ε **
	Σύνολο		
	(N)	(N)	(N)
Αναπνευστική	22	0	22
διαταραχή			
CMV	9	5	4
Μονοπυρήνωση			
Γαστρεντερική	2	0	2
διαταραχή			
Εικόνα	2	0	2
θρομβοφλεβίτιδας			
και λευκοπενία			
Νευρολογικές	1	1	0
διαταραχές			

*: Π: Παιδιά, **: Ε: Ενήλικες

Συνλοίμωξεις με άλλους παράγοντες παρατηρήθηκαν συνολικά σε τέσσερις ασθενείς, όπου δύο παρουσίασαν και θετικές καλλιέργειες αίματος με staphylococcus spp., ενώ άλλοι δύο ασθενείς θετική καλλιέργεια αίματος με pseudomonas spp. Άρα, συνλοίμωξη παρατηρήθηκε σε ένα ποσοστό 11,1%(4/36).

Συνολικά, το μέσο ιικό φορτίο που μετρήθηκε σε πλάσμα αίματος με την βοήθεια ποσοτικής PCR σε όλους τους ασθενείς ήταν 2410 copies/ml (εύρος 472 ως 58800), ενώ σε αυτούς που εμφάνισαν εικόνα συνδρόμου μονοπυρήνωσης ήταν 593 copies/ml (εύρος 472 ως 879, S.D.: 155,787), σημαντικά μικρότερο, ενώ στους ασθενείς με

άλλη υποκείμενη νόσο, το μέσο ιικό φορτίο ήταν 3.505 (εύρος 520 ως 58.800, S.D: 17.134,014) στατιστικά σημαντικό ($p=0,004$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 12.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος ανάλογα με την υποκείμενη νόσο

	CMV Μονοπυρήνωση	Άλλη υποκείμενη νόσος
Mean	662,78	11398,04
95% C.I.*	543,03- 782,53	4477,46-18318,62
Median	593,00	3505,00
Minimum	472	520
Maximum	879	588000
S.D.**	155,787	17134,014

*: C.I.: Confidence Interval for Mean, **: S.D.: Standard Deviation, $p=0,004$

Στους ενήλικες το μέσο ιικό φορτίο σε πλάσμα αίματος ήταν 2.935 (εύρος 472 ως 58.800, S.D: 16.334,958), ενώ στα παιδιά 593 (εύρος 583 ως 752, S.D:88,545) στατιστικά σημαντικό ($p=0,004$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 13.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος ανάλογα με την ηλικία

	Ενήλικες	Παιδιά
Mean	9968,37	652,60
95% C.I.*	3868,79-16067,94	542,66-762,54
Median	2935,00	593,00
Minimum	472	583
Maximum	58800	752
S.D.**	16334,958	88,545

*: C.I.: Confidence Interval for Mean, **: S.D.: Standard Deviation, $p=0,004$

Το μέσο ιικό φορτίο, που μετρήθηκε σε δείγμα ούρων συνολικά ήταν 86700 copies/ml (εύρος 12400 ως 238000, S.D:79.101,7), ενώ μόνο στους ασθενείς που έγινε μέτρηση και σε πλάσμα αίματος και σε δείγμα ούρων, οι αντίστοιχες τιμές ήταν: πλάσμα αίματος 31350 copies/ml (εύρος 2930 ως 58800, S.D: 24962,64), δείγμα

ούρων 86700 copies/ml (εύρος 12400 ως 238000, S.D:79.101,7), σημαντικά μεγαλύτερο, όπως φαίνεται στον Πίνακα 14

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος και ούρων

	Ιικό φορτίο (copies/ ml)	Εύρος (copies/ml)	S.D. *
Δείγμα Ούρων	86.700	12.400-238.000	79.101,7
Πλάσμα Αίματος	31.350	2.930-58.8000	24.962,64

*: S.D.: Standard Deviation

Σε ανοσοεπαρκείς το μέσο ιικό φορτίο ήταν 747 copies/ml (εύρος 472 ως 4240, S.D:1329,041), ενώ σε ανοσοκατεσταλμένους 4760 copies/ml (εύρος 622 ως 58800, S.D:18.768,345), σημαντικά μεγαλύτερο και στατιστικά σημαντικό ($p=0,007$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 15.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος ανάλογα με την ανοσιακή κατάσταση.

	Ανοσοκατεσταλμένοι	Ανοσοεπαρκείς
Mean	14100,20	1354,00
95% C.I. *	5316,34-22884,06	618,00-2090,00
Median	4760,00	747,00
Minimum	622	472
Maximum	58800	4240
S.D. **	18768,345	1329,041

*: C.I.: Confidence Interval for Mean, **: S.D.: Standard Deviation, $p=0,007$

Στους ασθενείς που πήραν αντιική θεραπεία το μέσο ιικό φορτίο ήταν 3870 copies/ml (εύρος 622 ως 58800, S.D:17.548,806), ενώ σε αυτούς που δεν χρειάστηκε να χορηγηθεί θεραπεία ήταν 588 copies/ml (εύρος 472 ως 879, S.D: 150,455), σημαντικά μικρότερο και στατιστικά σημαντικό ($p=0,003$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 16.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος ανάλογα με τη χορήγηση αντιικής θεραπείας.

	Χορηγήθηκε θεραπεία	Χωρίς θεραπεία
Mean	12304,33	637,27
95% C.I.*	4894,12-19714,54	536,20-738,35
Median	3870,00	588,00
Minimum	622	472
Maximum	58800	879
S.D.**	17548,806	150,455

*: C.I.: Confidence Interval for Mean, **: S.D.: Standard Deviation, $p=0,003$

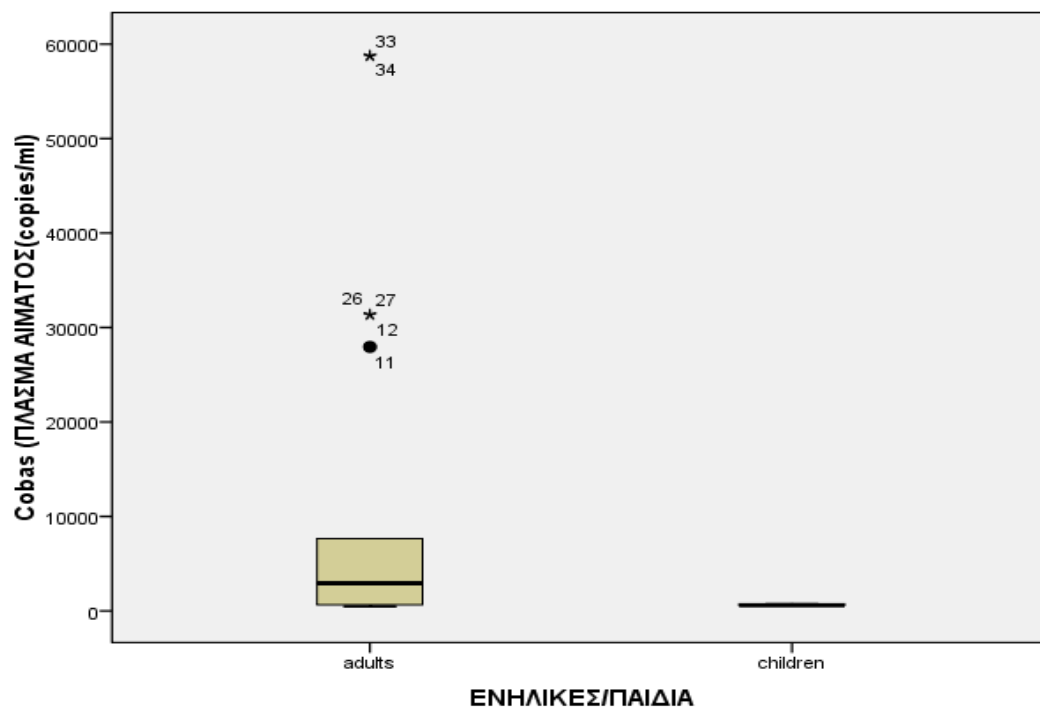
Συνολικά η θνητότητα ήταν 16,67% (6/36), και η κύρια αιτία θανάτου ήταν αναπνευστική ανεπάρκεια σε ποσοστό 66,67%(4/6), ακολουθούμενη από πολυοργανική ανεπάρκεια σε ποσοστό 33,33% (2/6). Όλοι οι ασθενείς που κατέληξαν ήταν ανοσοκατασταλμένοι, και το μέσο ικό φορτίο αυτών ήταν 31350 copies/ml (εύρος 27900 ως 58800, S.D:15.104,006), ενώ στους ασθενείς που η έκβαση ήταν καλή το μέσο ικό φορτίο ήταν 879 copies/ml (εύρος 472 ως 7660, S.D:2.227,533) στατιστικά σημαντικό ($p=0,002$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 17.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Σύγκριση ιικού φορτίου πλάσματος ανάλογα με την έκβαση της νόσου.

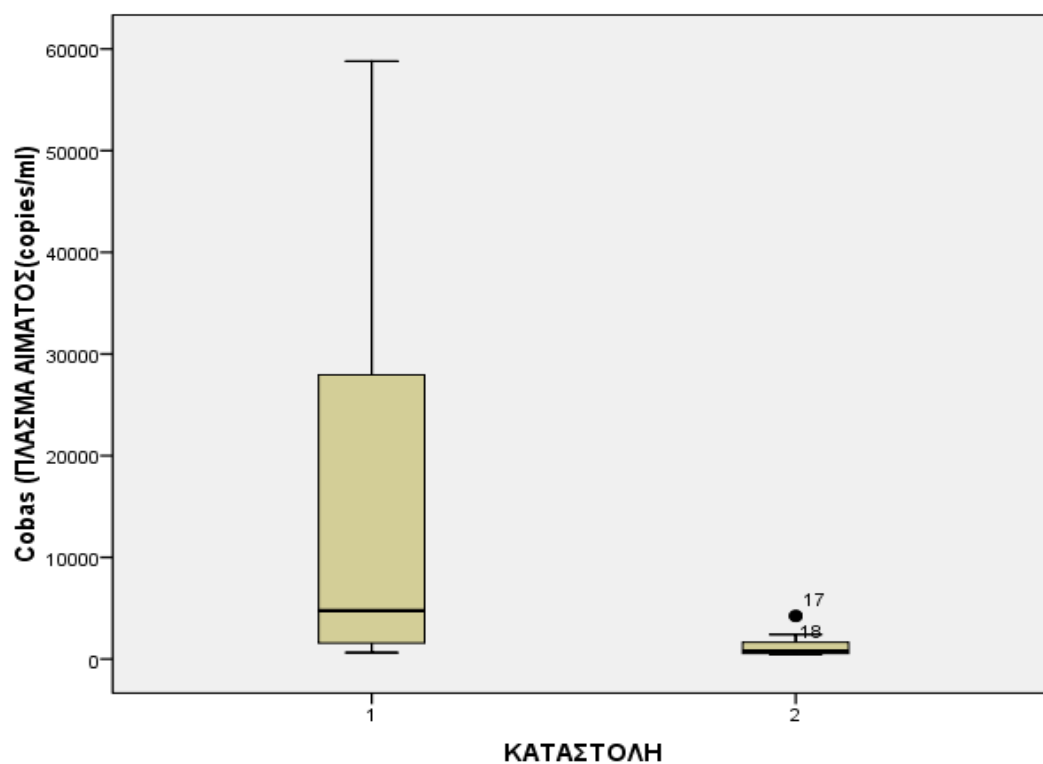
	Επιτυχής έκβαση	Θάνατος
Mean	2283,24	39350,00
95% C.I.*	1435,93-3130,55	23499,32-55200,68
Median	879,00	31350,00
Minimum	472	27900
Maximum	7660	58800
S.D.**	2227,533	15104,006

*: C.I.: Confidence Interval for Mean, **: S.D.: Standard Deviation, $p=0,002$

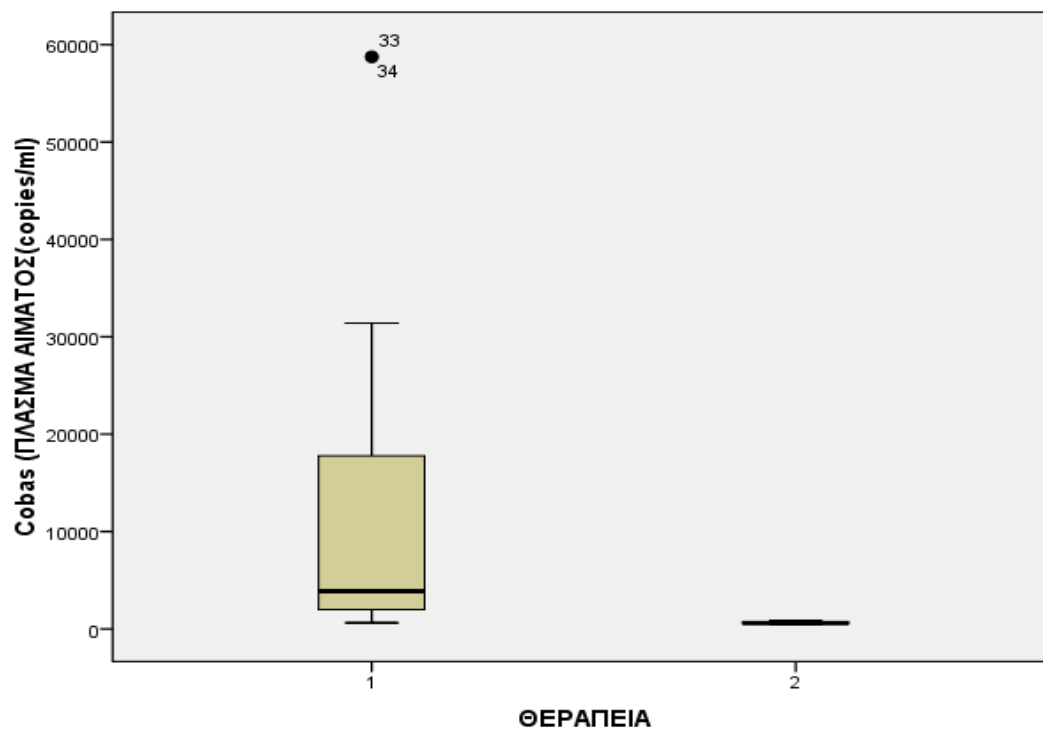
25 από τους 36 ασθενείς που ήταν θετικοί με την βοήθεια της PCR έλαβαν γκανσικλοβίρη. Η αντιική θεραπεία ξεκίνησε την ημέρα που η θετικότητα για CMV επιβεβαιώθηκε. Η αντιική θεραπεία οδήγησε σε σημαντική μείωση των αντιγράφων του ιού που ανιχνεύτηκαν μετά την PCR. Ο μέσος χρόνος για να πετύχουμε αρνητικό (Μη ανιχνεύσιμο) αποτέλεσμα μετά την έναρξη της θεραπείας ήταν 27 μέρες (εύρος 13-40 μέρες). 11 ασθενείς, δεν έλαβαν γκανσικλοβίρη για να αποφευχθούν οι παρενέργειες του αντιικού παράγοντα, γιατί δεν ήταν σε ανοσοκαταστολή και σε αυτούς ανιχνεύτηκε χαμηλό ιικό φορτίο (<879 copies/ml). Στα σχήματα από 1-6, φαίνεται η σύγκριση του ιικού φορτίου σε διάφορες κατηγορίες όπως περιγράφεται στο κείμενο.



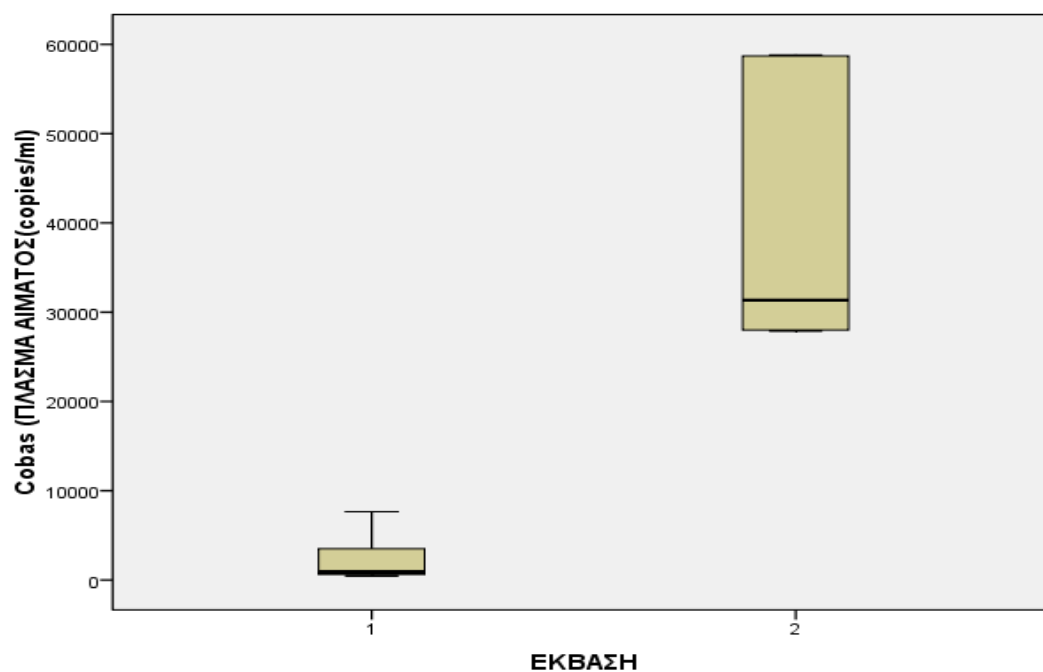
ΣΧΗΜΑ 1: Σύγκριση ιικού φορτίου σε πλάσμα αίματος σε Ενήλικες(Adults) και Παιδιά(Children)



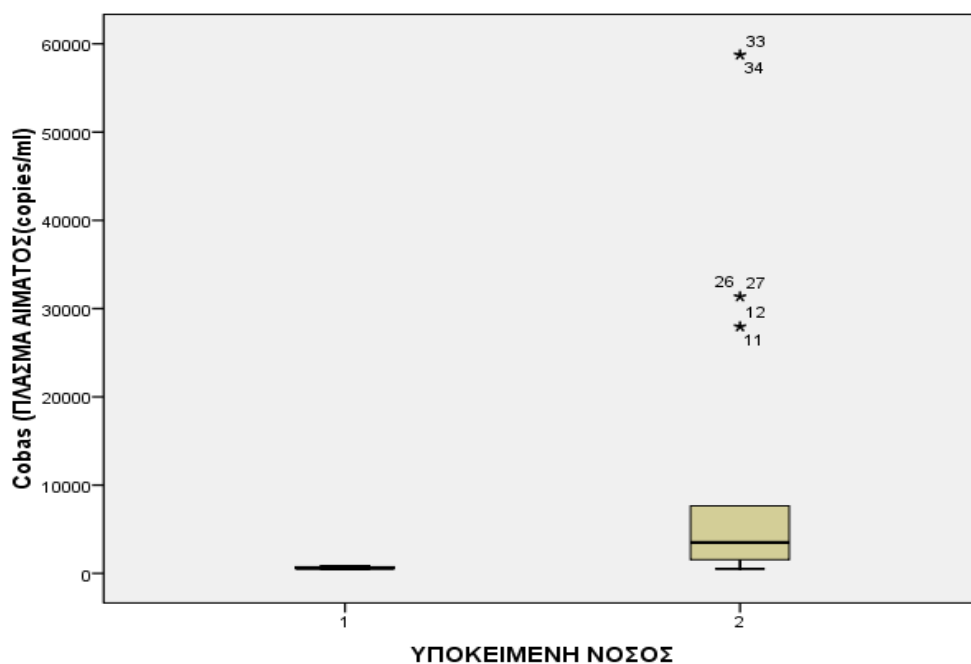
ΣΧΗΜΑ 2: Σύγκριση ιικού φορτίου σε ασθενείς σε ανοσοκαταστολή(1) και ανοσοεπαρκείς(2)



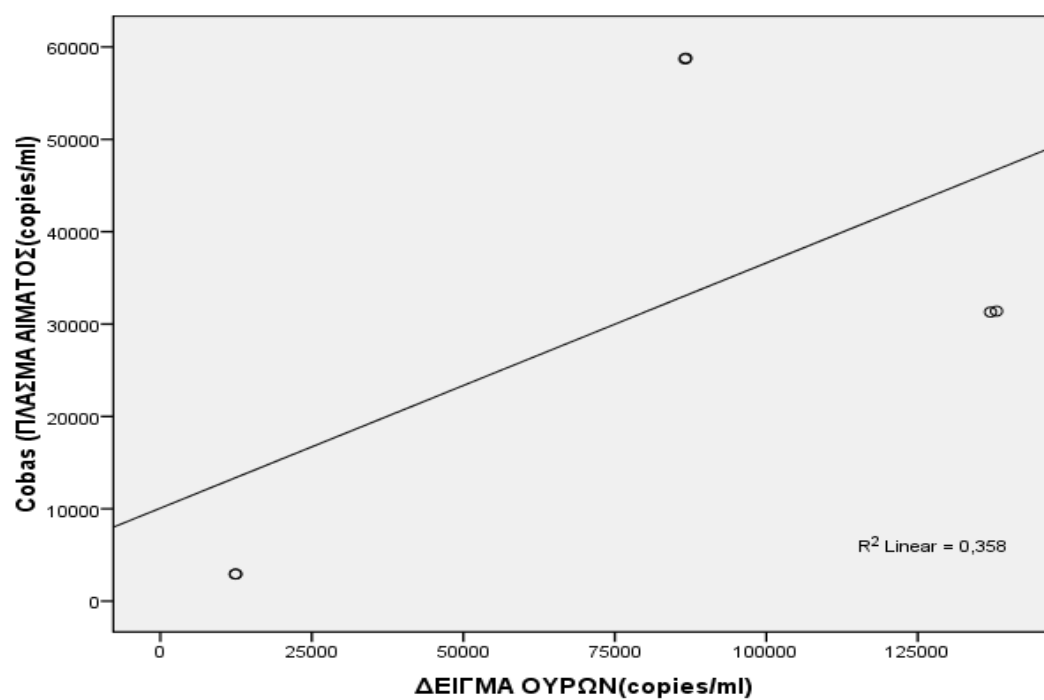
ΣΧΗΜΑ 3: Σύγκριση ιικού φορτίου σε ασθενείς που έλαβαν(1) και που δεν έλαβαν (2) αντιική θεραπεία



ΣΧΗΜΑ 4: Σύγκριση ιικού φορτίου σε ασθενείς με έκβαση καλή (1) και που απεβίωσαν (2)



ΣΧΗΜΑ 5: Σύγκριση ιικού φορτίου σε ασθενείς με υποκείμενη νόσο CMV μονοπυρήνωση (1) ή άλλη υποκείμενη νόσο (2)



ΣΧΗΜΑ 6: Σύγκριση ιικού φορτίου σε πλάσμα αίματος και δείγμα ούρων

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη περιελήφθησαν 260 ασθενείς (ανοσοεπαρκείς και ανοσοκατεσταλμένοι) που εμφάνισαν λοίμωξη, στη διαφορική διάγνωση της οποίας υπήρξε και η υποψία της hCMV λοίμωξης. Για την διάγνωση της λοίμωξης αφενός μεν χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgM με την βοήθεια του αυτοματοποιημένου συστήματος AxSYM (Abbott), καθώς και ο προσδιορισμός συνάφειας των anti-CMV IgG αντισωμάτων (CMV IgG Avidity) με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου συστήματος mini-Vidas (bioMerieux). Αφ'ετέρου δε, εφαρμόστηκε σε δείγματα των μελετηθέντων ασθενών μια μοριακή τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου του hCMV, το Cobas Amplicor CMV Monitor Test (Roche Diagnostics).

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγалоιοός (Human cytomegalovirus-hCMV) έχει υψηλό επιπολασμό, με επίπεδα που κυμαίνονται από 60% σε αναπτυγμένες χώρες μέχρι και πάνω από 95% σε αναπτυσσόμενες χώρες και ειδικά σε ομάδες με χαμηλότερο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο.²⁰⁸

Στην χώρα μας διάφορες μελέτες δίνουν τον επιπολασμό σε ενήλικες περίπου στο 90%.^{47,48,209} Στα ίδια περίπου επίπεδα ανευρίσκεται η ανίχνευση IgG αντισωμάτων και στην παρούσα μελέτη (86,1%), σε μικρό όμως αριθμό ασθενών και χωρίς να έχει μελετηθεί κάποια ειδική ομάδα.

Άλλες μελέτες στις ΗΠΑ εντοπίζουν μεγαλύτερο επιπολασμό σε ενήλικες από ότι σε παιδιά,²¹ καθώς και σε γυναίκες συγκριτικά με άντρες.⁴⁶ Στην παρούσα μελέτη, στα παιδιά η ανίχνευση IgG αντισωμάτων βρέθηκε να είναι 51,2% ενώ στους ενήλικες 93,4% σημαντικά μεγαλύτερη. Επίσης, η σύγκριση ανάμεσα σε γυναίκες και άντρες ανέδειξε ελαφρώς υψηλότερη ανίχνευση IgG αντισωμάτων στις γυναίκες (86,3%) σε σύγκριση με τους άντρες (82,8%), στοιχεία που συμφωνούν με τις ανωτέρω μελέτες.

Μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στα CD34 κύτταρα και σε μονοκύτταρα και συχνά επανενεργοποιείται.¹³⁰ Σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς πρωτοπαθής λοίμωξη και επανενεργοποίηση είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή προκαλούν πολύ ήπια συμπτωματολογία. Σε ασθενείς όμως που το ανοσοποιητικό τους σύστημα ανεπαρκεί (όπως στα νεογνά), ή βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, όπως οι λήπτες μοσχεύματος ή οι ασθενείς HIV(+), ο hCMV παραμένει ένας σημαντικός παράγοντας νοσηρότητας και θνητότητας.²⁰⁸

Στην παρούσα μελέτη, η ομάδα των ανοσοεπαρκών ασθενών (n=16) εμφάνισε ηπιότερη συμπτωματολογία συγκριτικά με τους ανοσοανεπαρκείς (n=20), αποτελέσματα που συμφωνούν με άλλες μελέτες. Επίκτητη hCMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή διαδράμει κατά κανόνα ασυμπτωματικά.^{21,93} Σπάνια hCMV λοίμωξη σε ανοσοεπαρκή ξενιστή έχει και σοβαρές επιπλοκές, που μπορεί να γίνουν ακόμη και απειλητικές για την ζωή του ασθενούς,^{94,95,96} κάτι όμως που δεν φάνηκε στην παρούσα μελέτη. Από την άλλη ο hCMV είναι από τα πιο κοινά, δύσκολα και ευκαιριακά παθογόνα που δυσχεραίνουν την περίθαλψη των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών.^{21,125,126,127,128,129,133} Επίσης και το ποσό του ιικού φορτίου, που ανιχνεύτηκε σε αυτή την ομάδα, ήταν σημαντικά μικρότερο από ότι στους ανοσοκατεσταλμένους, αφού το ποσό του ιικού φορτίου που ανιχνεύεται σχετίζεται με την υποκείμενη νόσο και το είδος ανοσοκαταστολής του κάθε ασθενούς.^{161,162,163,164}

Αναλυτικά, 25 από τους 36 ασθενείς, που ανιχνεύθηκε ιικό φορτίο με PCR, έλαβαν γκανσυκλοβίρη. Η αντιική θεραπεία οδήγησε σε σημαντική μείωση των αντιγράφων του ιού που ανιχνεύτηκαν. Έντεκα ασθενείς δεν έλαβαν αντιική αγωγή για να αποφευχθούν οι παρενέργειες αυτής. Αυτοί οι ασθενείς δεν ήταν σε καταστολή και σε αυτούς ανιχνεύθηκε μικρό ιικό φορτίο (< 879 copies/ml). Σε αυτούς τους ασθενείς, τα συμπτώματά υποχώρησαν απλά με τη χρήση αντιπυρετικών, ενώ και η έκβαση της ιαμίας ήταν καλή σε όλους τους ανοσοεπαρκείς ασθενείς, στοιχεία παρόμοια με άλλες μελέτες.^{21,93,94}

Η ενεργός hCMV λοίμωξη (πρωτοπαθής και μετά από επανενεργοποίηση) προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, από ήπια πυρετική κίνηση μέχρι πολύ σοβαρές οργανικές παθολογικές καταστάσεις.²¹⁰ Κλινικές εκδηλώσεις που σχετίζονται με hCMV λοίμωξη περιλαμβάνουν πνευμονία, γαστρεντερικές διαταραχές, ηπατίτιδα, νευροαισθητήριο απώλεια ακοής, μικροκεφαλία και αμφιβληστροειδίτιδα. Πρόσφατα, ο hCMV έχει επίσης σχετιστεί με κάποιες μορφές καρκίνου και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα.¹⁶² Επιπλέον, η λοίμωξη μπορεί να σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα έμμεσων επιδράσεων περιλαμβάνοντας οξεία και χρόνια απόρριψη μετά από μεταμόσχευση οργάνου. Εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη²¹¹ καθώς και συνλοιμώξεις με άλλα μικρόβια ή μύκητες,²¹ έχουν επίσης αναφερθεί σε διάφορους ασθενείς.

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, αφού τέσσερις ασθενείς ανοσοκατεσταλμένοι (όχι μεταμοσχευμένοι), δύο με αιματολογική

νόσο και άλλοι δύο με υποκείμενη νόσο τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο, εμφάνισαν συνλοίμωξη και θετικές καλλιέργειες αίματος με *staphylococcus spp* και *pseudomonas spp* αντίστοιχα.

Σε μια μελέτη σε ανοσοκατεσταλμένους (όχι μεταμοσχευμένους) η συχνότερη κλινική εκδήλωση της νόσου βρέθηκε να είναι πνευμονίτιδα σε ποσοστό 76,5%,²¹² αποτελέσματα που είναι παρόμοια με την παρούσα μελέτη αφού οι κλινικές εκδηλώσεις από το αναπνευστικό ήταν οι συχνότερες στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς σε ποσοστό 80%.

Όσον αφορά ασθενείς με αιματολογική κακοήθεια που λαμβάνουν συμβατική θεραπεία φαίνεται να υπάρχει αύξηση των επιπτώσεων στο γαστρεντερικό, κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, και αύξηση της hCMV πνευμονίας κυρίως σε ασθενείς με υποκείμενη νόσο το λέμφωμα και την οξεία λευχαιμία.^{213,214,215} Κάποιο αντίστοιχο συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί από την παρούσα έρευνα, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν επαρκή συγκριτικά στοιχεία αναφορικά με το τι συνέβαινε δύο δεκαετίες πριν.

Για την διάγνωση της hCMV λοίμωξης υπήρχε αρχικά η ορολογική προσέγγιση. Δεν συστήνεται όμως για την διάγνωση της νόσου σε ανοσοκατεσταλμένους.²¹⁶ Αν και η ανίχνευση hCMV-IgM αντισωμάτων είναι μια γρήγορη μέθοδος, εντούτοις η ευαισθησία και η ειδικότητα της ποικίλλουν.²⁰⁵ Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους ιούς, κυρίως τον ιό Epstein-Barr (EBV), καθώς και τον ρευματοειδή παράγοντα. Επίσης η ετερογένεια του “πάνελ” των αντιγόνων που χρησιμοποιεί το κάθε πρωτόκολλο παίζει ρόλο στην ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου.²⁰⁶ Για να υπερκεραστούν αυτά τα προβλήματα hCMV-IgM πρωτόκολλα αναπτύσσονται χρησιμοποιώντας ανασυνδιασμένα hCMV αντιγόνα,²¹⁷ όπως άλλωστε και η μεθοδολογία του AxSYM που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Παρ’όλα αυτά, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους ιούς, κυρίως με τον EBV, ακόμη και με την μεθοδολογία του AxSYM, σε υψηλό ποσοστό (27,4%) που επιβεβαιώθηκε με άλλες εξετάσεις.²¹⁸ Ανάλογα στοιχεία φαίνεται να υπάρχουν και στην παρούσα μελέτη, αφού αντισώματα έναντι άλλων ερπητοϊών ανιχνεύθηκαν σε ένα ποσοστό 30,8%. Επιπλέον, hCMV-IgM αντισώματα μπορεί να παραμένουν για 6 έως 9 μήνες.^{207,161} Βοήθεια για το διαγνωστικό αυτό πρόβλημα μπορεί να δώσει η δοκιμασία της συνάφειας των IgG αντισωμάτων (avidity), όπως άλλωστε και στην παρούσα μελέτη, όπου οι υπόλοιποι ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκαν IgM

αντισώματα και δεν ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο, εμφάνισαν ένα δείκτη avidity $>0,8$ που αποτελεί ισχυρή ένδειξη μιας περισσότερο από τρεις μήνες πρωτοπαθούς λοίμωξης. Άρα λοιπόν μια θετική δοκιμασία hCMV-IgM θα μπορούσε να θεωρηθεί μόνο ως ένα αρχικό σημείο για μια περαιτέρω διαγνωστική προσέγγιση κάποιου ασθενούς.

Εξαιτίας όλων αυτών των προβλημάτων γεννήθηκε η ανάγκη για ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του hCMV. Αν και ο hCMV είχε απομονωθεί σε κυτταροκαλλιέργειες από τα μέσα της δεκαετίας του 1950 από τους Smith, Rowe και Weller, εντούτοις η συσχέτιση ανάμεσα στο ιικό φορτίο και στην κλινική έκβαση της νόσου δεν είχε αναφερθεί μέχρι το 1975. Τότε σε μια μελέτη-κλειδί ο Stagno και οι συνεργάτες του⁷³ μέτρησαν τον τίτλο του hCMV σε ούρα νεογνών που είχαν συγγενή λοίμωξη και ήταν συμπτωματικά ή ασυμπτωματικά κατά την γέννηση ή είχαν μολυνθεί περιγεννητικά. Κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 μηνών το φορτίο στα ούρα του hCMV σχετιζόταν άμεσα με τη σοβαρότητα της νόσου, με αυξημένο ιικό φορτίο να ανιχνεύεται στα ούρα νεογνών με συμπτωματική νόσο.

Σε αυτές τις μελέτες η ποσοτικοποίηση του hCMV παρέμενε στόχος σε όλα τα εξειδικευμένα ερευνητικά εργαστήρια αν και δεν μπορούσε να εφαρμοστεί στην καθημερινή διαγνωστική. Παρόλα αυτά το ιικό φορτίο στα ούρα συνέχισε να είναι σημαντικός παράγοντας για την κλινική έκβαση της συγγενούς CMV λοίμωξης, αν και ο μεγάλος χρόνος με τις κλασσικές κυτταροκαλλιέργειες παρέμεινε ένα σημαντικό εμπόδιο. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, δύο ταχείες μέθοδοι κυτταροκαλλιιεργειών εμφανίζονται, που βασίζονταν στην ανίχνευση αντιγόνων, το πρωτόκολλο Shell Vial²¹⁹ και η δοκιμασία DEAFF (detection of early antigen fluorescent foci).²²⁰ Οι μέθοδοι αυτοί δίνουν μια ημιποσοτική μέτρηση ιικού φορτίου, αλλά γενικότερα λαμβάνονται ως ποιοτικές μέθοδοι, που είναι πιο γρήγορες και με μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 αναπτύσσονται τα πρώτα ποσοτικά πρωτόκολλα που δεν είναι κυτταροκαλλιέργειες. Η δοκιμασία “αντιγοναιμίας” αρχικά βασίστηκε στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου p72,²²¹ που ακολούθως τροποποιήθηκε ώστε να ανιχνεύει την φωσφοπρωτεΐνη pp65,²²² που είναι μια πρωτεΐνη του hCMV, αλλά και βασικός υποδοχέας για τα CD4 και CD8 κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.¹³⁰ Γρήγορα η δοκιμασία αντιγοναιμίας απέκτησε ένα ρόλο κλειδί στην διαγνωστική του hCMV. Υπήρχαν όμως περιορισμοί στην δοκιμασία, όπως η γρήγορη μεταφορά των δειγμάτων και η επεξεργασία τους, καθώς και ο περιορισμός των δειγμάτων που θα μπορούσαν να εξεταστούν ταυτόχρονα. Η

εξάρτηση της μεθόδου από ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων στο περιφερικό αίμα, περιορίζουν την εξέταση ως “ποιοτική” σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών. Τέτοιοι ασθενείς είναι οι λήπτες μυελού των οστών,¹⁶² ή άλλοι ασθενείς που αναπτύσσουν λευκοπενία λόγω ανοσοκατασταλτικής θεραπείας ή κατά την διάρκεια θεραπείας με γκανσικλοβίρη.²²³ Παρόμοια αποτελέσματα θα είχε άλλωστε η εφαρμογή της και στην παρούσα μελέτη, αφού υπήρξαν 12 ασθενείς με λευκοπενία που δεν θα μπορούσε η δοκιμασία αντιγοναιμίας να χρησιμοποιηθεί ως ποσοτική μέθοδος.

Σημαντική ώθηση στην ποσοτικοποίηση του hCMV ήρθε με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών, όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR). Οι τεχνικές αυτές προσφέρουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από ότι οι τεχνικές κυταροκαλλιέργειας και η δοκιμασία αντιγοναιμίας και συνεπώς πιο γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση ενεργούς λοίμωξης.²²⁴ Τα πρώτα πρωτόκολλα PCR ήταν κυρίως ποιοτικά. Ποσοτικές PCR τεχνικές, που βασίζονταν στην ύπαρξη ενός προτύπου ποσοτικοποίησης που πολλαπλασιάζεται μαζί με το δείγμα αναπτύχθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Αυτές χρησιμοποιήθηκαν ευρέως σε ερευνητικά εργαστήρια για την ποσοτικοποίηση ιικού φορτίου hCMV σε αίμα και ούρα και την κλινική συσχέτιση ανάμεσα στο ικό φορτίο και την έκβαση του ασθενούς, παρέχοντας σημαντική βοήθεια για την διαχείριση των ασθενών. Έτσι, ένα ευρέως διαδεδομένο πρωτόκολλο που βασίζεται σε ένα πρότυπο ποσοτικοποίησης που πολλαπλασιάζεται μαζί με το δείγμα, αναπτύχθηκε από την Roche, το “Cobas Amplicor CMV Monitor test” (ποσοτική μέθοδος),²²⁵ πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Διάφορες άλλες μοριακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί από τότε, τόσο ερευνητικές, όσο και ευρέως διαθέσιμες για διαγνωστική ρουτίνας. Από την στιγμή που η μεθοδολογία PCR μπορεί να δώσει γρήγορες απαντήσεις σε κλινικά ερωτήματα ανιχνεύοντας χαμηλά επίπεδα ιικού φορτίου και σε μικρές ποσότητες δείγματος, είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την διάγνωση.

Πλήθος μελετών δείχνουν εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα για τις μοριακές τεχνικές, σε σύγκριση με την δοκιμασία αντιγοναιμίας που χρησιμοποιούνταν ως τότε για την διάγνωση hCMV λοίμωξης. Επιπλέον, ποσοτικές μοριακές τεχνικές συστήνονται και για την παρακολούθηση της αντικής θεραπείας των ασθενών αυτών¹³⁵.

Μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο σε ασθενείς παρατηρείται μετά τη λήψη αντικής αγωγής. Το χρονικό διάστημα μη ανίχνευσης εξαρτάται από την υποκείμενη νόσο,

την ηλικία, το φύλο ή την κλινική εκδήλωση της νόσου.^{162,164} Κάτι ανάλογο φάνηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου ιικό φορτίο δεν ανιχνεύτηκε μετά από 13 έως 40 ημέρες ανάλογα με το κλινικό υπόβαθρο του κάθε ασθενή. Μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, χρειάστηκαν ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς που εμφάνισαν έντονη συμπτωματολογία. Έχει αποδειχτεί επίσης ότι ιικό φορτίο πάνω από 10.000 αντίγραφα /ml αίματος σχετίζεται με πιο αργή απάντηση στην θεραπεία και συνεπώς αποτυχία να ελεγχθεί ο αναδιπλασιασμός του ιού σε καθορισμένη χρονική περίοδο (2-4 weeks),²²⁶ σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών (μεταμοσχευμένοι). Ανάλογα αποτελέσματα υπήρξαν και στην παρούσα μελέτη σε ασθενείς ανοσοκατεσταλμένους (όχι μεταμοσχευμένους), αφού έξι ασθενείς των οποίων η έκβαση δεν ήταν καλή και απεβίωσαν, το ιικό φορτίο που ανιχνεύθηκε σε πλάσμα αίματος ήταν από 27.900 έως 58.700 copies/ml. Αντίθετα οι ασθενείς των οποίων η έκβαση ήταν καλή, το ιικό φορτίο που ανιχνεύθηκε ήταν μικρότερο από 7.650 copies/ml.

Ακόμη και αντοχή στην αντική αγωγή μπορεί να παρατηρηθεί με την μεθοδολογία της ποσοτικής PCR, κυρίως σε ασθενείς που έχουν πάρει ήδη για κάποιο διάστημα γκανσικλοβίρη (περίπου 3 μήνες).^{135,21} Αντοχή σε αντιϊκούς παράγοντες, μπορεί να αποδειχθεί γονοτυπικά σε εργαστήρια αναφοράς.²²⁷ Θα πρέπει επίσης να υπάρξει υποψία σε ασθενείς που ενώ λαμβάνουν αντική αγωγή παρουσιάζουν αύξηση του ιικού φορτίου για περισσότερο από 2 εβδομάδες,^{228,229} κάτι όμως που δεν φάνηκε στην παρούσα μελέτη. Αξιολόγηση του COBAS Amplicor hCMV Monitor test σε πλήθος μελετών καταδεικνύει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα,^{230,135,231} τόσο σε σύγκριση με τη δοκιμασία αντιγοναιμίας, όσο και συγκριτικά με άλλα μοριακά πρωτόκολλα.

Ιικό φορτίο μπορεί επίσης να ανιχνευθεί και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage BAL) ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, καθώς και κόπρανα, αν και για τα κόπρανα δεν χρησιμοποιείται ευρέως.

Μέτρηση ιικού φορτίου σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) δίνει υψηλότερα αποτελέσματα σε σύγκριση με το αίμα και φαίνεται να έχει υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα για hCMV πνευμονία.^{232,233,234} Δείγμα πλάσματος μπορεί να είναι ακόμα και αρνητικό τη στιγμή της πνευμονίας. Έτσι, ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποκλειστεί η νόσος.²³⁵ Από την άλλη, ανίχνευση hCMV DNA σε BAL σε χαμηλά επίπεδα ίσως να μην σχετίζεται με hCMV πνευμονία.²³⁶ Το όριο πάνω από το οποίο είναι πιθανό να αναπτυχθεί δεν έχει καθοριστεί ακόμη. Σημαντικό ρόλο εδώ παίζει η κλινική εικόνα και η υποκείμενη

νόσος του ασθενή, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, αφού σε ασθενείς με “θορυβώδη” εικόνα πνευμονίας ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο σε BAL πριν ανιχνευθεί σε πλάσμα αίματος. Στους ασθενείς αυτούς χορηγήθηκε αντιική αγωγή, οπότε υποχώρησε η hCMV πνευμονία, για να επανέλθει όμως μετά από δύο μήνες με ανίχνευση ιικού φορτίου και σε πλάσμα αίματος και με έντονη κλινική εικόνα.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, ασθενείς με υψηλότερα ιικά φορτία έχουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν ένα δεύτερο επεισόδιο οπότε χρειάζονται νέο σχήμα θεραπείας. Η συχνότητα υποτροπής ιαιμίας είναι περίπου 30% και έτσι η παρακολούθηση των ασθενών μετά από επιτυχή θεραπεία αρχικού επεισοδίου hCMV ιαιμίας επιβάλλεται.²³⁷

Ανίχνευση hCMV DNA στα ούρα (ιουρία) συνήθως δείχνει ιική αποβολή και έχει μικρή συσχέτιση με hCMV νόσο. Έχει όμως μεγάλη διαγνωστική αξία σε συγγενώς μολυσμένα παιδιά, όπου είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με το αίμα,²³⁸ καθώς και σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών, όπως μεταμοσχευμένοι νεφρού, ή ασθενείς με έντονη συμπτωματολογία. Αυτό αναδείχθηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου σε συγγενώς μολυσμένο παιδί, το ιικό φορτίο στα ούρα ήταν πολύ μεγαλύτερο και ανιχνεύτηκε αρκετά νωρίτερα συγκριτικά με το πλάσμα αίματος.

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με το κατώτερο όριο ιαιμίας όπου χρειάζεται να ξεκινήσει αντιική θεραπεία, μιας και η θεραπεία παρουσιάζει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Δεν έχει υπάρξει όμως συγκεκριμένη απάντηση, εξαιτίας του πλήθους μεταβλητών σε διάφορους υποπληθυσμούς (π.χ. ηλικία, φύλο, υποκείμενη νόσος, είδος ανοσοκαταστολής, οροθετικότητα του κάθε ασθενή), καθώς και της ποικιλίας μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την ανίχνευση του ιού. Έτσι, το κάθε κέντρο ανάλογα με την κλινική εικόνα και την κατάσταση του ασθενούς καθορίζει το όριο που θα ξεκινήσει αντιική θεραπεία.¹⁶⁴

Όσον αφορά την ποικιλία των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως, τόσο για την διάγνωση, όσο και την παρακολούθηση της αντιικής θεραπείας, υπάρχουν αντιφάσεις για το ποιο είναι το πιο κατάλληλο δείγμα αίματος (ολικό αίμα ή πλάσμα) για την ανίχνευση του ιού, καθώς και για την ικανότητα να συγκριθούν ποσοτικές τιμές του ίδιου κλινικού δείγματος με διάφορες τεχνικές από διαφορετικά εργαστήρια²³⁹. Για την πλειάδα των μοριακών τεχνικών πλέον δεν υπάρχει μια διεθνής σταθερά για την ποσοτικοποίηση του γενώματος του hCMV, κάτι που θα επέτρεπε σύγκριση δεδομένων από διάφορα εργαστήρια και διαχείριση

των ασθενών, που διακομίζονται σε κλινικές όπου χρησιμοποιείται ένα άλλο μοριακό πρωτόκολλο. Μεγάλη διαφοροποίηση βέβαια παρατηρείται σε ιικά φορτία μικρότερα από 100 αντίγραφα./ml.^{240,241} Αυτό φαίνεται να αποτελεί έναν στόχο για το άμεσο μέλλον σε διάφορα εργαστήρια ανά τον κόσμο. Το μοριακό πρωτόκολλο Cobas Amplicor CMV MONITOR Test που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ένα μοριακό πρωτόκολλο ευρέως διαδεδομένο για την πρώιμη ανίχνευση hCMV λοίμωξης, που ως “προτυποποιημένο” πρωτόκολλο επιτρέπει τη σύγκριση αποτελεσμάτων από διάφορα ερευνητικά και διαγνωστικά κέντρα.²³⁰

Συνοψίζοντας, τα τελευταία 35 χρόνια η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του hCMV σε κλινικά δείγματα έχει μετατραπεί από μία αργή και επίπονη διαδικασία σε μια διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε λιγότερο από 2 ώρες, που είναι απολύτως ακριβής και με δυνατότητα επανάληψης εντός του εργαστηρίου. Αυτό έχει συμβάλλει σημαντικά στην διαχείριση των ασθενών. Η ανάπτυξη μιας παγκόσμιας σταθεράς για την ποσοτικοποίηση του hCMV θα σημάνει ότι πολυκεντρικές μελέτες αντικών παραγόντων και εμβολίων έναντι του hCMV δεν θα απαιτούν ένα κεντρικό εργαστήριο, κάτι που θα παρέχει στους κλινικούς ιατρούς και τους ασθενείς πολύ μεγαλύτερη ευελιξία σε χρόνο και χώρο για την ιδανική θεραπεία αυτών.¹⁶²

Η χρησιμοποιούμενη μοριακή τεχνική Cobas Amplicor CMV MONITOR Test που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη αυτή είναι μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση του hCMV γιατί είναι ταχεία, έχει υψηλή ευαισθησία και άριστη ειδικότητα. Η εφαρμογή της απαιτεί εκπαιδευμένο προσωπικό και κατάλληλους χώρους μοριακής Μικροβιολογίας για την αποφυγή επιμολύνσεων. Ο κλινικός ιατρός πρέπει να γνωρίζει ότι ο εργαστηριακός ιατρός έχει στα χέρια του ειδικές και ευαίσθητες μεθόδους μοριακής Μικροβιολογίας για την ανίχνευση του hCMV. Μέθοδοι που διασφαλίζουν την ασφαλή, ακριβή, έγκαιρη, αιτιολογική διάγνωση της νόσου καθώς επίσης και την γενικότερη παρακολούθηση της αντικής θεραπείας των ασθενών αυτών.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λοιμώξεις με ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή σχετίζονται με ήπια συμπτωματολογία. Σοβαρά προβλήματα συμβαίνουν σε έμβρυα, μεταμοσχευμένους και ασθενείς σε ανοσοκαταστολή. Λοίμωξη σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να είναι ακόμη και θανατηφόρος. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συμβολή των μοριακών τεχνικών (ποσοτική PCR) για την διάγνωση και παρακολούθηση της ενεργούς λοίμωξης με κυτταρομεγαλοϊό σε ανοσοεπαρκείς και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Συνολικά μελετήθηκαν 260 ασθενείς, 145 άνδρες και 115 γυναίκες (ηλικίας από 30 ημερών ως 88 ετών), που νοσηλεύτηκαν με κλινική υποψία CMV λοίμωξης στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο Ιανουάριος 2007 έως Δεκέμβριος 2011. Σαραντατρία παιδιά και 217 ενήλικες, 108 ανοσοεπαρκείς και 152 ανοσοκατεσταλμένοι, ελέγχθηκαν για CMV-IgM αντισώματα (AxSYM, Abbott) και CMV-DNA (Cobas Amplicor, Roche Diagnostics). Διερευνήθηκε επίσης η συσχέτιση μεταξύ υκού φορτίου και κλινικών δεδομένων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας η επιβεβαίωση της CMV λοίμωξης και με τις δύο μεθόδους (ορολογικά και PCR) έγινε σε 19 ασθενείς. Τριάντα εννιά ασθενείς ήταν θετικοί για CMV-IgM και αρνητικοί για CMV-DNA, ενώ σε 12 από αυτούς ανιχνεύτηκαν επίσης αντισώματα έναντι HSV, VZV ή EBV. Με την εφαρμογή της PCR, διαγνώστηκαν επιπλέον 17 περιπτώσεις ενεργούς λοίμωξης, στις οποίες δεν ανιχνεύτηκαν αντισώματα.

Συνολικά, οι θετικοί CMV-DNA ασθενείς ήταν 6 παιδιά και 30 ενήλικες. Αιματολογική κακοήθεια (n=14) υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία (όχι μεταμοσχευμένοι) ήταν η υποκείμενη νόσος που παρατηρήθηκε στους περισσότερους ασθενείς. Όλοι οι CMV-DNA θετικοί ασθενείς είχαν κλινική εικόνα συμβατή με ενεργό CMV λοίμωξη. Μεταξύ αυτών η πνευμονία ήταν η πιο κοινή (n=22). Συνολικά το μέσο υκό φορτίο ήταν 2410 copies/ml, ενώ σε αυτούς που εμφάνισαν εικόνα CMV συνδρόμου τύπου μονοπυρήνωσης ήταν σημαντικά μικρότερο, 593 copies /ml.

Εικοσιπέντε από τους 36 CMV PCR θετικούς ασθενείς έλαβαν γκανσυκλοβίρη και η θεραπεία ξεκίνησε την ημέρα που η θετικότητα για CMV επιβεβαιώθηκε. Η θεραπεία οδήγησε σε σημαντική μείωση του υκού φορτίου. Ο μέσος χρόνος για να

διαπιστωθεί αρνητικό (μη ανιχνεύσιμο) αποτέλεσμα με τη μεθοδολογία της PCR μετά την έναρξη της θεραπείας ήταν 27 ημέρες (εύρος 13-40 ημέρες).

Συμπερασματικά, η ποσοτική PCR είναι ευαίσθητη, ειδική και ταχεία μέθοδος για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου CMV και αποδεικνύεται χρήσιμη στη διάγνωση και διαχείριση ασθενών για πρόληψη της νόσου, καθώς και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αντιική αγωγή. Μπορεί να λειτουργήσει επιπλέον και ως ένας δείκτης-υποκατάστατο της αντιικής αντοχής και κλινικής υποτροπής σε αυτούς τους ασθενείς. Συγκρινόμενο με παραδοσιακές ορολογικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν αντισώματα έναντι του CMV, η ποσοτική PCR προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα μέσω της άμεσης ανίχνευσης ιικού φορτίου, που είναι ανεξάρτητο ενός λειτουργικού ανοσολογικού συστήματος.

SUMMARY

Infections with human cytomegalovirus (hCMV) are usually asymptomatic or related with harmless symptoms. Severe problems occur if fetuses, transplant patients, or patients under immunosuppressive therapy get infected. CMV infections in this risk group can even be fatal. The aim of this study was to investigate the impact of molecular assays (quantitative PCR) for diagnosis and monitoring of an active CMV infection in immunocompetent and immunosuppressed patients.

A total of 260 patients were enrolled in this study, 145 males and 115 females (age range, 30 days to 88 years), who were hospitalized with clinical suspicion of CMV infection, in the University Hospital of Ioannina, during the period January 2007 to December 2011. Forty three children and 217 adults, 108 immunocompetent and 152 immunosuppressed were screened for CMV-IgM antibody (AxSYM, Abbott) and CMV-DNA (Cobas Amplicor, Roche Diagnostics). The association between viral load in plasma and clinical data was also investigated.

According to our results, the confirmation of CMV infection by the two methods (immunoassay and PCR) was obtained in 19 patients. Thirty-nine patients were positive for CMV-IgM and negative for CMV-DNA, where in 12 of them, antibodies for HSV, VZV, or EBV were also detected. By performing PCR, 17 extra cases of active infection were diagnosed, for which no antibodies could be detected.

Totally, the CMV-DNA positive patients were 6 children and 30 adults. Hematological malignancies (n=14) under immunosuppressive therapy (non transplanted), was the underlying disease noted in the most patients.

All CMV-DNA positive patients had clinical presentations compatible with active CMV infection. Among them pneumonitis was the most common (n=22). Overall, the median blood CMV viral load (VL) was 2410 copies/ml, while it was much lower in them with an infection mononucleosis-like syndrome, 593 copies/ml.

Twenty five of the 36 CMV PCR positive patients received ganciclovir on the day that positivity was documented. The treatment led to a marked decrease in CMV DNA copy number. The median time interval necessary to obtain a negative result after implementation of treatment by CMV DNA PCR assay was 27 days (range, 13-40 days).

In conclusion, quantitative PCR CMV assay is sensitive, specific and rapid for quantifying CMV viral load, and it seems to be useful in the diagnosis and

management of affected patients for predicting disease and monitoring response to antiviral therapy and can serve as surrogate markers for antiviral resistance and clinical relapse in these patients. Compared with traditional serologic assays that detect antibodies to CMV, quantitative PCR offers a significant advance through the direct detection of viral DNA, which is independent of a functioning humoral immune system.

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Reddehase Matthias (2006). From protozoan to proteomics. In Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology pp: xxiiv-xxv
2. Ribbert D. Uber protozoenartige zellen in der niere eines syphilitischen neugoborenen und in der parotis von kindern. Zentralbl Allg Pathol. 1904; 15:945-8
3. Charles A. Alford and William J. Britt. Cytomegalovirus in the human herpesviruses 1993 (Raven Press).,pp: 227-228.
4. Στέφος Θ, Λώλης Δ. (1998). Κυτταρομεγαλοϊός (CMV), σελ: 43-56.
5. Goodpasture EW, Talbot FB. Concerning the nature of “proteozone-like” cells in certain lesions of infancy. American Journal of Diseases of Children 1921;21:415-21.
6. Lipschutz B. Untersuchungen uber die atiology der krankheiten der herpesgruppe (herpes zoster, herpes genitalis, herpes febrilis). Archives of Dermatology and Syphilology (Berlin) 1921; 136:428-82.
7. Cole R, Kyttner AG. A filterable virus present in the submaxillary glands of guinea pigs. The Journal of Experimental Medicine 1926; 44:855-73
8. Farber S, Wolbach SB. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (“protozoan-like bodies”) in the Salivary glands and other organs of infants. The American Journal of Pathology Child 1932; 8:123-6.
9. Smith MG. Propagation of the salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (NY) 1954; 86: 435-40.
10. Smith MG. Propagation in tissue culture of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (NY) 1956; 92: 424-30
11. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. Cytopathogenic agents resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (NY) 1956; 92:418-24.
12. Weller TH, Hanshaw JB, Scott DRE. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. Virology 1960; 12: 130-2

13. Davison Andrew (2007). Introduction: definition and classification of the human herpes viruses In: Human Herpes viruses, pp 3-9.
14. Davison Andrew (2007): Comparative analysis of the genome in Human Herpes viruses, pp: 10-26
15. Αντωνιάδης Α (1999) Αναπαραγωγή των ιών στα κύτταρα. Στο Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδ, Α. Αντωνιάδης, Γρ Αντωνιάδης, Ν Λεγάκης, Ι Τσελέντης. Τόμος Ι. 2η εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 350-357.
16. Αντωνιάδης Α (1999) Δομή του σωματιδίου των ιών. Στο Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδ, Α. Αντωνιάδης, Γρ Αντωνιάδης, Ν Λεγάκης, Ι Τσελέντης. Τόμος Ι. 2η εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ. 345-349.
17. Straus SE (2000) Introduction to Herpesviridae. In Principles and practice of infectious diseases. Eds, GL Mandell, JE Bennett, R Dolin. C. 5th ed. Churchill Livingstone, pp 1557-1564.
18. Pellett PE, Roizman B (2006). The family Herpesviridae: a brief introduction, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
19. Murphy E., Shenk T. (2008). Human Cytomegalovirus Genome In: Human Cytomegalovirus. Editors T.E. Shenk, M.F. Stinski, 2008, pp: 1-21.
20. Davison Andrew, Bhella David (2007). Comparative genome and vision structure. In: Human Herpes viruses, pp: 177-193
21. Mocarski E., Shenk T., Pass R. (2007). Cytomegaloviruses. In: fields Virology, 5th edition. Eds, Lippincott Williams @ Wilkins, pp 2702-2772.
22. Gibson W. (2008). Structure and Formation of the Cytomegalovirus Vision. In: Human Cytomegalovirus, Editors T.E. Shenk, M.F. Stinski pp: 187-205.
23. Chan CK, Brignole EJ, Gibson W (2002). Cytomegalovirus assembling (pUL80a): Cleavage at internal site not essential for Virus growth; proteinase absent from virions. Journal of Virology 76:8667-8674.
24. Loveland AN, Nguyen NL, Brignole EJ, Gibson W (2007). The amino-conserved domain of human cytomegalovirus UL80a proteins is required for key interactions during early stages of capsid formation and virus protection. Journal of Virology 81:620-628
25. Terhune SS, Schroer J, Shenk T. (2004) RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. Journal of Virology; 78(19):10390-10398.

26. Sciortino MT, Suzuki M, Taddeo B, et al. (2001) RNAs extracted from herpessimplex virus 1 virions: apparent selectivity of viral but not cellular RNAs packaged in virions. *Journal of Virology*; 75(17):8105-8116.
27. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, et al. (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *Journal of Virology*; 78(20):10960-10966.
28. McCormick AL, Mocarski ES. Viral modulation of the host response to infection. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006: 321-332.
29. Mocarski ES, Jr., Hahn G, White KL, et al. Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency. In: Reddehase, MJ, Editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press; 2006:465-482.
30. Mocarski ES. Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006: 44-58.
31. Mocarski ES. Viral genes and their functions. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006: 202-228
32. Mocarski ES, Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cellular Microbiology* 2004;6(8):707-717.
33. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, et al. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends in Microbiology* 2005; 13(4):164-174.
34. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *The New England Journal of Medicine* 2009; 360(12):1191-9.
35. Pass RF. Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B Vaccine with MF59 adjuvant. *Journal of Clinical Virology* 2009; 46(Suppl. 14):S73-6.
36. Veldhuis W, Janssen M, Kortlandt W, et al. Coombs-negative severe hemolytic anemia in an immunocompetent adult following cytomegalovirus

- infection. *European Journal of clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2004; 23:844-847.
37. Mach M, Kropff B, Kryzaniak M, et al. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *Journal of Virology* 2005; 79(4):2160-2170.
 38. Britt W. (2007). Beta herpes viruses and Gammaherpesviruses: Cytomegalovirus and Epstein - Barr virus In: *Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease*, 4th edition. Eds, Lippincott Williams @ Wilkins, pp: 415-423.
 39. John B. Carter and Venetia A Saunders in *Virology Principles and Applications*, 2007, p:125
 40. Borst EM, Messerle M. Analysis of human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements in the context of the viral genome. *Journal of Virology* 2005; 79(6):3615-3626.
 41. Murphy et al, 2003, PNAS December 9, 2003, Vol 100, no 25
 42. Dolan A., Cunningham C., Hector, R.D. et al. (2004). Genetic content of Wild type human cytomegalovirus. *The Journal of General Virology*, 85:1301-1312.
 43. Frade R, Barel M, Ehlin-Henriksson B, Klein G (1985) gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 1490-1493.
 44. Καλκάνη Μπασιάκου: Κυτταρομεγαλοϊός (CMV, Cytomegalovirus), *Ιατρική Ιολογία*, 2007, σελ.:593-600.
 45. Hecker M, Qiu D, Marquardt K, et al. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sanguinis* 2004; 86(1):41-44.
 46. Staras SAS, Dollard SC, Radford K, et al. Seroprevalence of Cytomegalovirus infection in the United States 1988-1994. *Clinical Infectious Diseases* 2006 Nov 1; 43 (9):1143-51
 47. Καραμπογιά-Καραφυλλίδη σε *Μαθήματα Ειδικευόμενων Ιατρικής Βιοπαθολογίας*, 2009
 48. Lazzarotto T. (2010). Diagnosis of maternal CMV infection. In: *ESCMID Postgraduate Education Course, Infections Diseases in Pregnant Women, Fetuses and Newborns* Beltinoro, Italy 3-7 October 2010.

49. Coonrod D, Collier AC, Ashley R, et al. Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *The Journal of Infection Diseases* 1998; 177(5):1188-1193.
50. Stanberry LR, Rosenthal SL, Mills L, et al. Longitudinal risk of herpes simplex virus (HSV) type 1, HSV type 2, and cytomegalovirus infections among young adolescent girls. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39(10):1433-1438.
51. Ford-Jones EL, Kitai I, Davis L, et al. Cytomegalovirus infections in Toronto child-care centers: a prospective study of viral excretion in children and seroconversion among day-care providers. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1996; 15(6):507-514.
52. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology* 2006; 35(2):216-220.
53. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, et al. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344(18):1366-1371.
54. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1999; 31(5):443-457.
55. Boppana S, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Jeffries, DJ and Hudson, CN, Editors. *Viral Infections in Obstetrics and Gynecology*. New York: Arnold; 1999:35-56.
56. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999; 104:55-60.
57. Casteels A, Naessens A, Gordts F, et al. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections. *Journal of Perinatal Medicine* 1999; 27(2):116-121.
58. Asanuma H, Numazaki K, Nagata N, et al. Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk. *Microbiology and Immunology* 1996; 40:201-204.

59. Jim WT, Shu CH, Chiu NC, et al. Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2004; 23(9):848-851.
60. Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, et al. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1998; 17(1):53-58.
61. Minamishima I, Ueda K, Minematsu T, et al. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection. *Microbiology and Immunology* 1994; 38(7):549-552.
62. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, et al. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews in Medical Virology* 2004; 14(6):383-410.
63. Beyari MM, Hodgson TA, Kondowe W, et al. Inter-and intraperson cytomegalovirus infection in Malawian families. *Journal of Medical Virology* 2005; 75:575-582.
64. Rasmussen L, Geissler A, Winters M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 187(5):809-819.
65. Frere P, Pereira M, Fillet G, et al. Infections after CD34-selected or unmanipulated autologous hematopoietic stem cell transplantation. *European Journal of Haematology* 2006; 76(2):102-108.
66. McDonagh S, Maidji E, Chang HT, et al. Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *Journal of Clinical Virology* 2006; 35(2):210-215.
67. Britt W. HCMV: pathogenesis and disease consequences. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006:719-745.
68. Britt W. Maturation and egress. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpes viruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006: 308-320
69. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 202(5):673-685.

70. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, et al. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus Infection limits cardiac allograft disease. *Circulation* 2006; Oct 10; 114(15) 1608-15.
71. Wills MR, Carmichael AJ, Sinclair JH, et al. HCMV: immunobiology and host response. In: Arvin, AM, Mocarski, ES, Moore, P, et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 2006: 760-774.
72. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, et al. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355(9220):2032-2036.
73. Stagno S, Reynolds DW, Tsiantos A, Fuccillo DA, Long W, Alford CA. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natively acquired cytomegalovirus infections. *The Journal of Infectious Diseases* 1975; 132(5):568-77.
74. Hassan-Walker, A.F., Kidd, I. M., Sabin, C., Sweny, P., Griffiths, P.D., and Emery, V.C. (1999). Quantity of human cytomegalovirus (CMV) DNAemia as a risk factor for CMV disease in renal allograft recipients: relationship with donor/ recipient CMV serostatus, receipt of augmented methylprednisolone and antithymocyte globulin (ATG), *Journal of Medical Virology*, 58(123), 182-187
75. Cope, A.V., Sabin, C., Burroughs, A., Rolles, K., Griffiths, P.D., and Emery, V.C. (1997a). Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (hCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(6), 1484-1490.
76. Cope, A., Sweny, P., Sabin, C., Rees, L., Griffiths, P.D., and Emery, V.C. (1997). Quantity of Cytomegalovirus Viruria is a major risk factor for Cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Journal of Medical virology* 52(2):200-5
77. Gor, D., Sabin, C., Prentice, H.G. et al (1998). Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplantation*, 21(6), 597-605.
78. Griffiths P. (2004). Cytomegalovirus In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5th edition pp: 101-110.

79. Griffiths Paul D. And Michael Boeckh, Antiviral therapy for human cytomegalovirus in Human herpes Viruses, 2007: 1192-1210
80. Streblow DN, Vomaske J, Smith P, et al. Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediated by focal adhesion kinase and Src. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278(50):50456-50465.
81. Beisser PS, Goh CS, Cohen FE, et al. Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system. CMV chemokine receptors. Current Topics in Microbiology and Immunology 2002;269:203-234
82. Boomker JM, van Luyn MJ, The TH, et al. US28 actions in HCMV, infection: lessons from a versatile hijacker. Reviews in Medical Virology 2005; 15(4):269-282.
83. Melnychuk RM, Streblow DN, Smith PP, et al. Human cytomegalovirus encoded G protein-coupled receptor US28 mediates smooth muscle cell migration through Galpha12. Journal of Virology 2004; 78(15):8382-8391.
84. Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, et al. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000; 97(4):1695-1700.
85. Lockridge KM, Zhou SS, Kravitz RH, et al. Primate cytomegalovirus encode and express an IL-10-like protein Virology 2000;268(2):272-280.
86. Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. Journal of Virology 2004; 78(3):1440-1447.
87. Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, et al. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. Journal of Virology 2002; 76(3):1285-1292.
88. Bowen EF, Wilson P, Atkins M, et al. The natural history of untreated CMV retinitis in an AIDS patient. Lancet 1995; pp: 346-1671.
89. Κοντοπούλου-Ιωαννίδου Δέσποινα, Συμβολή στη μελέτη του βαθμού μεταβλητότητας του UL37 γονιδίου του κυτταρομεγαλοϊού σε κλινικά δείγματα και βελτίωση της διάγνωσης της λοίμωξης από κυτταρομεγαλοϊό χρησιμοποιώντας νέους πιο σταθερούς στόχους για την μέθοδο PCR, p:13-16, διδακτορική διατριβή, 2000.

90. Webster A, Blizzaard B, Pillay D, et al. Value of routine surveillance cultures for detection of CMV pneumonitis following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1993;12:477
91. Kidd IM, Fox J C, Pillay D, et al. Prevision of prognostic information in immunocompromised patients by routine application of polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation* 1993; 56:867.
92. Patrone M, Secchi M, Fiorina L, et al. Human cytomegalovirus UL130protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *Journal of Virology* 2005; 79(13):8361-8373.
93. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, et al. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37(12):1603-1606.
94. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, et al. Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24:52-56.
95. Laing RBS, Dykhuizen RS, Smith CC, et al. Parenteral ganciclovir treatment of acute CMV infection in the immunocompetent host. *Infection* 1997; 25:44-46.
96. Heininger A, Jahn G, Engel C, et al. Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed critically ill patients. *Critical Care Medicine* 2001; 29:541-547.
97. Galiatsatos P, Shrier I, Lamoureux E, et al. Meta-analysis of outcome of cytomegalovirus colitis in immunocompetent hosts. *Digestive Diseases and Sciences* 2005; 50(4):609-616.
98. Maiorana A, Baccarini P, Foroni M, et al. Human cytomegalovirus infection of the gastrointestinal tract in apparently immunocompetent patients. *Human Pathology* 2003; 34:1331-1336.
99. Rongkavilit C, Bedard MP, Ang JY, et al. Severe cytomegalovirus enterocolitis in an immunocompetent infant. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2004; 23:579-581.
100. Abgueguen P, Delbos V, Chenebault JM, et al. Vascular thrombosis and acute cytomegalovirus infection in immunocompetent patients: report of 2 cases and literature review. *Clinical Infectious Disease* 2003; 36(11):E134-139.
101. Ichiche M, Fontaine C, Lacor P. Severe thrombocytopenia secondary to cytomegalovirus infection in an immunocompetent adult. *European Journal of Internal Medicine* 2003; 14:56-59.

102. Sato H, Kamoi T, Saeki T, Yamazaki H, et al. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone and thrombocytopenia caused by cytomegalovirus infection in a young immunocompetent woman. *Internal Medicine* 2004; 43:1177-1182.
103. Arribas JR, Storch GA, Clifford DB, et al. Cytomegalovirus encephalitis. *Annals of Internal Medicine* 1996; 125:577-587.
104. Studahl M, Ricksten A, Sandberg T, et al. Cytomegalovirus infection of the CNS in non-compromised patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 1994;89:451-457.
105. Fux CA, Pfister S, Nohl F, et al. Cytomegalovirus-associated acute transverse myelitis in immunocompetent adults. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9(12):1187-1190.
106. Karacostas D, Christodoulou C, Drevelengas A, et al. Cytomegalovirus associated transverse myelitis in a non-immunocompromised patient. *Spinal Cord* 2002;40(3):145-149.
107. Klauber E, Briski LE, Khatib R. Cytomegalovirus colitis in the immunocompetent host: an overview. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1998; 30:559-564.
108. Markomichelakis NN, Canakis C, Zafirakis P, et al. Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis with sectoral iris atrophy. *Ophthalmology* 2002;109:879-882.
109. Stratton K, Durch J, Lawrence R. *Vaccines for the 21st Century: A Tool for Decisionmaking*. Washington, DC: National Academy Press; 2001:165-172.
110. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, et al. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics* 1997; 130:624-630.
111. Ivarsson SA, Lernmark B, Svanberg L. Ten-year clinical, development and intellectual follow-up of children with congenital cytomegalovirus infection without neurologic symptoms at one year of age. *Pediatrics* 1997;99:800-803.
112. Liesnard C, Donner C, Brancart F, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstetrics and Gynecology* 2000; 95:881-888.

113. Gaytant MA, Rours GI, Steegers EA, et al. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *European Journal of Pediatrics* 2003; 162(4):248-253.
114. Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, et al. Early predictors of neuro developmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics* 2001; 138(3):325-331.
115. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *The Journal of Pediatrics* 2005; 146(6):817-823.
116. Bradford RD, Cloud G, Lakeman AD, et al. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 191(2):227-233.
117. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117:e76-83.
118. Meier J, Lienicke U, Tschirch E, et al. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(3):1318-1324.
119. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Do Carmo Rego MA, et al. Perinatal or early-postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants under 34 weeks gestation born to CMV-seropositive mothers within a high seroprevalence population. *The Journal of Pediatrics* 2004; 145:685-688.
120. Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, et al. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1):1333-1336.
121. Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, et al. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001; 357(9255):513-518.
122. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, et al. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 188(1):32-39.
123. Erice A, Gil-Roda C, Perez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates

- from immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases* 1997; 175(5):1087-1092.
124. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(3):1142-1148.
 125. Falagas MD, Arbo M, Ruthazer R, et al. Cytomegalovirus disease is associated with increased cost and hospital length of stay among orthotopic liver transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63(11):1595-1601.
 126. Mauskopf JA, Richter A, Annemans L, et al. Cost-effectiveness model of cytomegalovirus management strategies in renal transplantation Comparing valganciclovir prophylaxis with current practice. *Pharmacoeconomics* 2000;18:239-251
 127. Legendre CM, Norman DJ, Keating MR, et al. Valaciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in renal transplantation: an economic evaluation. *Transplantation* 2000; 70:1463-1468.
 128. Henderson R, Carlin D, Kohlhase K, et al. Multicenter US study of hospital resource utilization associated with cytomegalovirus-related readmission of renal and heart transplant patients. *Transplant Infectious Diseases* 2001; 3(S2):57-59.
 129. Paya C. Economic impact of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant Infectious Diseases* 2001; 3(S2):14-19.
 130. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34:1094-1097.
 131. Kim WR, Badley AD, Wiesner RH, et al. The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69(3):357-361.
 132. Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. The New England Journal of Medicine* 1999; 340(19):1462-1470.
 133. Akalin E, Sehgal V, Ames S, et al. Cytomegalovirus disease in high-risk transplant recipients despite ganciclovir or valganciclovir prophylaxis. *American Journal of Transplantation* 2003; 3(6):731-735.

134. Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, et al. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation* 2004;78(9):1390-1396
135. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 2002 Mar; 40(3):746-52.
136. Limaye AP. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35(7):866-872.
137. Freeman RB, Paya C, Pescovitz MD, et al. Risk factors for cytomegalovirus viremia and disease developing after prophylaxis in high-risk solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78(12):1765-1773.
138. Danziger-Isakov LA, Storch GA. Prevention and treatment of cytomegalovirus infections in solid organ transplant recipients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2002; 21(5):432-434.
139. Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2004;17(4):357-361
140. Razonable RR, Paya CV. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 2003; 10(3):60-65.
141. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, et al. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79:381-386.
142. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003; 101:407-414.
143. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, et al. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2003; 9(9):543-558.
144. Nichols WG, Corey L, Gooley T, et al. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of

- stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:273-282.
145. Castro-Malaspina H, Harris RE, Gajewski J, et al. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood* 2002; 99(6):1943-1951.
 146. Cheung TW, Teich SA. Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 1999; 66:113-124.
 147. Deayton J, Mocroft A, Wilson P, et al. Loss of cytomegalovirus (CMV) viraemia following highly active antiretroviral therapy in the absence of specific anti-CMV therapy. *AIDS* 1999; 13(10):1203-1206.
 148. O'Sullivan CE, Drew WL, McMullen DJ, Miner R, Lee JY, Kaslow RA, Lazar JG, Saag MS. Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999 Sep; 180(3):847-9.
 149. CDC. Guidelines for Preventing Opportunistic Infections Among HIV Infected Persons-2002, Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR* 2002; 51 ((No. RR-8):17-19.
 150. Niedhart M, Kuchen S, Distler O, et al. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of auto antibodies in systemic sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42:389-392.
 151. Meyer MF, Hellmich B, Kotterba S, et al. Cytomegalovirus infection in systemic necrotizing vasculitis: causative agent or opportunistic infection? *Rheumatology International* 2000; 20:35-38.
 152. Sekigawa I, Nawata M, Seta N, et al. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Experimental Rheumatology* 2001; 20:559-564.
 153. Pandey JP, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis and Rheumatism* 1998; 41:10-15.
 154. Potena L, Grigioni F, Ortolani P, et al. Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a

- prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation* 2003; 75:839-843.
155. Borgia MC, Mandolini C, Barresi C, et al. Further evidence against the implication of active cytomegalovirus infection in vascular atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2001; 157(2):457-462.
 156. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, et al. Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. *Circulation* 1998; 98(25):2796-2799.
 157. Siscovick DS, Schwartz SM, Corey L, et al. Chlamydia pneumonia, herpes simplex virus type 1, and cytomegalovirus and incident myocardial infarction and coronary heart disease death in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2000; 102:2335-2340.
 158. Witherell HL, Smith KL, Friedman GD, et al. C-reactive protein, *Helicobacter pylori*, Chlamydia pneumonia, cytomegalovirus and risk for myocardial infarction. *Annals of Epidemiology* 2003; 13:170-177.
 159. Crumpacker C., Zhang J. (2009). Cytomegalovirus In: *Principles and Practice of infections Diseases*, 7th Edition, pp: 1971-1987.
 160. Σπανάκης Ν. (2007). Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στη διερεύνηση της CMV λοίμωξης στο κλινικό εργαστήριο, σε κλινικό φροντιστήριο: Μοριακές τεχνικές στη διάγνωση των λοιμώξεων. Αθήνα, 7 Φεβρουαρίου 2007, σελ: 28-38.
 161. Halwachs-Baumann Gabriele. Recent developments in human cytomegalovirus diagnosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, June 2007, Vol. 5, No. 3, Pages 427-439
 162. Atkinson Claire, Emery Vincent C.. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimizing patient management? *Journal of Clinical Virology* 51 (2011) 219-224.
 163. Πιτυρίγκα Β. (2009). Λοιμώξεις από ερπητοϊούς σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, σε κλινικό φροντιστήριο: Μοριακή διάγνωση και παρακολούθηση των ιογενών λοιμώξεων. Αθήνα, 10-12 Δεκεμβρίου 2009, σελ: 61-64.
 164. Smith TF, Espy MJ, Mandrekar J, Jones MF, Cockerill FR, Patel R. Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant

- recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2007 Oct 15; 45(8):1056-61. Epub 2007 Sep 12. Review.
165. De La Maza L, Pezzlo M, Baron E. (2001). Ιολογία. Σε έγχρωμη Διαγνωστική Μικροβιολογία, Ιατρικές εκδόσεις Π. Πασχαλίδης. Μετάφραση Χριστάκης Γ., Επιμέλεια-πρόλογος Λεγάκης Ν. σελ: 184-185.
 166. Michel D, Mertens T. (2006). Antiviral Intervention, Resistance, and Perspectives. In: *Cytomegaloviruses Molecular Biology and Immunology*. pp: 573-587.
 167. CDC. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR* 2004; 53(No. RR-14):34-37.
 168. CDC. Treating opportunistic infections among HIV-Infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR* 2004; 53(No. RR-15):37-41
 169. CDC. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation *MMWR* 2000; 49(No. RR-10):11-14.
 170. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, et al. Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology* 2000; 11:S1-S86.
 171. Tu W, Chen S, Sharp M, et al. Persistent and selective deficiency of CD4⁺ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *Journal of Immunology* 2004; 172(5):3260-3267.
 172. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *The Journal of Pediatrics* 2003; 143(1):16-25.
 173. Biron KK. Cytomegalovirus: genetics of drug resistance. In: Mills, J, and Editor. *Antiviral Chemotherapy*. New York: Plenum Press; 1996: 135-143.
 174. Jabs DA, Dunn JP, Enger C, et al. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance. Prevalence of resistance at diagnosis, 1994. *Cytomegalovirus*

- Retinitis and Viral Resistance Study Group. Archives of Ophthalmology 1996; 114(7):809-814.
175. Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, et al. Guideline for infection control in health care personnel, 1998. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infection Control and Hospital Epidemiology 1998; 19:407-463.
 176. Hillyer CD, Emmens RK, Zago-Novaretti M, et al. Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donor units. Transfusion 1999; 34:929-934.
 177. Pamphilon DH, Rider JR, Barbara JA, et al. Prevention of transfusion transmitted cytomegalovirus infection. Transfusion Medicine 1999; 9(2):115-123.
 178. Nichols WG, Price TH, Gooley T, et al. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leuko reduced blood products. Blood 2003; 101:4195-4200.
 179. Spengler ML, Kurapatwinski K, Black AR, et al. SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. Journal of Virology 2002; 76(6): 2990-2996.
 180. Hamprecht K, Maschmann J, Muller D, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze thawing. Pediatric Research 2004; 56(4):529-535.
 181. American Fertility Society. New guidelines for the use of semen donor insemination. Fertility and Sterility 1990; 53(S1):1-7.
 182. British Andrology Society guidelines for the screening of semen donors for donor insemination. Human Reproduction 1999; 14:1823-1826.
 183. Curson R, Karakosta C. Recruitment of only cytomegalovirus (CMV) negative semen donors Human Reproduction 2000; 15(10):2247.
 184. Liesnard C, Strebelle E, Englert Y. Screening standards in assisted reproductive technologies: Is the British Andrology Society recommendation to recruit cytomegalovirus negative semen donor only, a reasonable one? Human Reproduction 2001; 16(9):1789-1791.
 185. McLaughlin EA. Recruitment of only cytomegalovirus (CMV) negative semen donors. Human Reproduction 2000; 15:2248-2249.
 186. ASRM. Guidelines for oocyte donation. Fertility and Sterility 2004; 70:5s-6s

187. Witz CA, Duan Y, Burns WN, et al. Is there a risk of cytomegalovirus transmission during in vitro fertilization with donated oocytes? *Fertility and sterility* 1999;71(2):b302-307
188. Snyderman DR. Historical overview of the use of cytomegalovirus hyperimmune globulin in organ transplantation. *Transplant Infectious Disease* 2001; 3(S2):6-13.
189. Bonaros NE, Kocher A, Dunkler D, et al. Comparison of combined prophylaxis of cytomegalovirus hyper immune globulin plus ganciclovir versus cytomegalovirus hyper immune globulin alone in high-risk hearttransplant recipients. *Transplantation* 2004;77(6):890-897.
190. Kocher AA, Bonaros N, Dunkler D, et al. Long-term results of CMV hyper immune globulin prophylaxis in 377 heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2003; 22(3):250-257.
191. Valantine HA, Luikart H, Doyle R, et al. Impact of cytomegalovirus hyperimmune globulin on outcome after cardiothoracic transplantation: a comparative study of combined prophylaxis with CMV hyperimmune globulin plus ganciclovir versus ganciclovir alone. *Transplantation* 2001; 72(10):1647-1652.
192. Weill D, Lock BJ, Wewers DL, et al. Combination prophylaxis with ganciclovir and cytomegalovirus (CMV) immune globulin after lung transplantation: effective CMV prevention following daclizumab induction. *American Journal of Transplantation* 2003; 3(4):492-496.
193. EBPG. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part1). *Nephrology Dialysis, Transplantation* 2000; 15(S7):71-74.
194. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, et al. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *American Journal Transplantation* 2005; 5(2):218-227.
195. Snyderman DR, Werner BG, Meissner HC, et al. Use of cytomegalovirus immunoglobulin in multiply transfused premature neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1995;14 (1):34-40
196. Arvin AM, Fast P, Myers M, et al. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clinical Infectious Disease* 2004; 39(2):233-239.

197. Schleiss MR, Heineman TC. Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2005; 4(3):381-406.
198. Gonczol E, Plotkin S. Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001; 1(3): 401-412.
199. Kemble G, Duke G, Winter R, et al. Defined large-scale alterations of the human cytomegalovirus genome constructed by cotransfection of overlapping cosmids. *Journal of Virology* 1996; 70(3):2044-2048.
200. Schierling K, Stamminger T, Mertens T, et al. Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *Journal of Virology* 2004; 78(17):9512-9523.
201. Pepperl-Klindworth S, Frankenberg N, Plachter B. Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *Journal of Clinical Virology* 2002;25 Suppl 2:S75-85.
202. Bernstein DI, Schleiss MR, Berencsi K, et al. Effect of previous or simultaneous immunization with canary pox expressing cytomegalovirus(CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59in healthy CMV-seronegative adults. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:686-690.
203. Berencsi K, Gyulai Z, Gonczol E, et al. A canary pox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting Tcell responses in human CMV-seronegative subjects. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 183(8):1171-1179.
204. Webster A, Lee CA, Cook DG, et al. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1989; 2:63-66.
205. Genser B, Truschnig-Wilders M, Stünzner D, Landini MP, Halwachs-Baumann G. Evaluation of five commercial enzyme immunoassays for the detection of human cytomegalovirus-specific IgM antibodies in the absence of a commercially available gold standard. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2001 Jan; 39(1):62-70.
206. Lang D, Vornhagen R, Rothe M, Hinderer W, Sonneborn HH, Plachter B. Cross-reactivity of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M antibodies

- with cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001 Jul; 8(4):747-56.
207. Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M, Landini MP. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Human Immunology*. 2004May; 65(5):410-5.
 208. Griffiths PD, Emery VC, Milne RC. Cytomegalovirus. In: Douglas D, Richmand, Whitley RJ, editors. *Clinical virology*. 3rd ed. ASM Press; 2009. p. 475–506.
 209. Στ. Αλεξίου-Δανιήλ, Α.Αντωνιάδης, Αθ. Τσακρής (2005). Ιοί της Οικογένειας Herpesviridae. Σε *Ιατρική Μικροβιολογία*, εκδόσεις Πασχαλίδη, Τόμος 2, σελ:289-293.
 210. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338(24):1741–51.
 211. Nebbia G, Emery VC. Assessing the full impact of the indirect effects of cytomegalovirus following solid organ transplantation. *Trends Transplant* 2009; 3:41–52.
 212. Chitasombat M, Watcharananan S., Chantratitaga V, Sungkaunparth S (2009). Cytomegalovirus disease among immunocompromised non-transplanted patients in 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases (ECCMID) I, 18.5.2009.
 213. Torres HA, Kontoyiannis DP, Bodey G, et al. Gastrointestinal cytomegalovirus disease in patients with cancer: A Two decade experience in a tertiary care cancer center. *European Journal of Cancer*. 2005; 41:2268-2279.
 214. Chemaly RF, Torres HA, Hachem RY, et al. Cytomegalovirus pneumonia in patients with lymphoma. *Cancer*. 2005; 104:1213-1220.
 215. Wade JC. Viral infections in patients with haematological malignancies. *Hematology American Society Hematological Education Program*. 2006: 368-74.
 216. Van der Bij W, Speich R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 2001 Jul 1; 33 Suppl 1:S32-7. Review.
 217. Maine GT, Lazzarotto T, Landini MP. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2001 May; 1(1):19-29. Review.

218. Miendje Deyi Y, Goubau P, Bodéus M False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2000 Jul; 19(7): 557-60.
219. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 19(6):917-9.
220. Griffiths PD, Panjabi DD, Stirk PR, Ball MG, Ganczakowski M, Blacklock HA, et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet* 1984; 2(8414):1242-5.
221. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(12):2681-8.
222. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30(5):1232-7.
223. Piiparinen H, Helanterä I, Lappalainen M, Suni J, Koskinen P, Grönhagen Riska C, Lautenschlager I. Quantitative PCR in the diagnosis of CMV infection and in the monitoring of viral load during the antiviral treatment in renal transplant patients. *Journal of Medical Virology* 2005 Jul; 76(3):367-72.
224. Sandin RL, Rodriguez ER, Rosenberg E, Porter-Jordan K, Caparas M, Nasim S, et al. Comparison of sensitivity for human cytomegalovirus of the polymerase chain reaction, traditional tube culture and shell vial assay by sequential dilutions of infected cell lines. *Journal of Virological Methods* 1991; 32(2-3):181-91.
225. Sia IG, Wilson JA, Espy MJ, Paya CV, Smith TF. Evaluation of the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(2):600-6.

226. Torre-Cisneros J, Caston-Osorio JJ, Martin C, Rivero A, Doblas A, Rojas R, et al. Impact of initial cytomegalovirus load on efficacy of preemptive therapy with ganciclovir in allogeneic stem cell transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:6–12.
227. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Reviews in Medical Virology* 2008;18:233-246
228. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009; 113:5711-5719.
229. Michael Boeckh. Complications, Diagnosis, Management, and Prevention of CMV Infections: Current and Future, *Hematology* 2001,p:305-309
230. Lengerke C, Ljubicic T, Meisner C, Loeffler J, Sinzger C, Einsele H, Hebart H. Evaluation of the COBAS Amplicor HCMV Monitor for early detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006 Jul; 38(1):53-60.
231. Masaoka T, Hiraoka A, Ohta K, Tatsumi N, Watanabe S, Hotta T, Yabe H, Kato S, Aikawa A, Ohara T, Hasegawa A, Tanabe K, Toma H, Yasuoka A, Oka S. Evaluation of the AMPLICOR CMV, COBAS AMPLICOR CMV monitor and antigenemia assay for cytomegalovirus disease. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2001 Feb; 54(1):12-6.
232. Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Castilla EA, Reilly A, Arrigain S, Farver C, Avery RK, Gordon SM, Procop GW. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 May; 42(5):2168-72.
233. Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Chapman J, Reilly A, Bekele BN, Gordon SM, Procop GW, Shrestha N, Isada CM, Decamp M, Avery RK. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 2005 Mar; 5(3):544-8.
234. Westall GP, Michaelides A, Williams TJ, Snell GI, Kotsimbos TC. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: a longitudinal study of lung transplant recipients. *The Journal of Infectious Diseases* 2004 Sep 15; 190(6):1076-83. Epub 2004 Aug 9.

235. Meylan PR, Zanetti G. Cytomegalovirus load in bronchoalveolar lavage fluid: a clue to the diagnosis of cytomegalovirus pneumonia? *The Journal of Infectious Diseases* 2005 Jun 15; 191(12):2153, author reply 2153-4.
236. Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Enzinger G, Eibl M, Linkesch W, Dornbusch HJ, Santner BI, Marth E, Kessler HH Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays. *Journal of Clinical Virology* 2001 Jan; 20(1-2):49-57.
237. Asberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, et al. Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 2009; 9(May (5)):1205–13.
238. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Rosegger H, Schalk A, Kessler HH, Truschnig-Wilders M. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *Journal of Clinical Virology* 2002 Dec; 25 Suppl 3:S81-7.
239. Caliendo AM, Shahbazian MD, Schaper C, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Boonyaratanakornkit J, et al. A commutable cytomegalovirus calibrator is required to improve the agreement of viral load values between laboratories. *Clinical Chemistry* 2009; 55(9):1701–10.
240. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *American Journal of Transplantation* 2009; 9(2):258–68.
241. Lilleri D, Lazzarotto T, Ghisetti V, Ravanini P, Capobianchi MR, Baldanti F, et al. Multicenter quality control study for human cytomegalovirus DNAemia quantification. *The New Microbiologica* 2009;32(3): 245–5

