

# Böbrek Nakil Hastalarında Sitomegalovirusa Özgül CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T Hücre Yanıtının Sitokin Akım Sitometri Yöntemiyle İzlemi\*

## Monitoring of Cytomegalovirus-Specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Responses by Cytokine Flow Cytometry in Renal Transplant Recipients

Hafize KILINÇKAYA DOĞAN<sup>1</sup>, Esvet MUTLU<sup>2</sup>, Sadi KÖKSOY<sup>2</sup>, Vural T. YILMAZ<sup>3</sup>, Hüseyin KOÇAK<sup>3</sup>, Dilek ÇOLAK<sup>4</sup>, Derya MUTLU<sup>4</sup>, Filiz GÜNSEREN<sup>5</sup>, Ayhan DİNÇKAN<sup>3</sup>, İbrahim ALİOSMANOĞLU<sup>3</sup>, Gültekin SÜLEYMANLAR<sup>3</sup>, Meral GÜLTEKİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>1</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

<sup>2</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Antalya.

<sup>2</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Immunology, Antalya, Turkey.

<sup>3</sup> Akdeniz Üniversitesi Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Merkezi, Antalya.

<sup>3</sup> Akdeniz University Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Transplantation Center, Antalya, Turkey.

<sup>4</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji Bilim Dalı, Antalya.

<sup>4</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Virology, Antalya, Turkey.

<sup>5</sup> Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

<sup>5</sup> Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Antalya, Turkey.

\* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (No: 2011.04.0103.039) tarafından desteklenmiş ve 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (10-13 Kasım 2013, Antalya) ve 18<sup>th</sup> Symposium on Infections in the Immunocompromised Host (15-17 Haziran 2014, Berlin, Almanya) Sempozyumunda poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 29.12.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.02.2016

### ÖZ

Solid organ transplant (SOT) alıcılarında, immün süpresyon ve geniş çaplı profilaksinin sağladığı klinik iyileşmeye rağmen, insan sitomegalovirus enfeksiyonu (CMV) morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. CMV replikasyonunun kontrolünde hücrel immün yanıt önemli bir rol oynamaktadır. CMV'ye özgül T hücre yanıtının izlemi, CMV hastalığı gelişme riski yüksek olan bireyleri önceden belirlemede kullanılabilir. Bu çalışmada, böbrek transplant alıcılarında, nakil öncesi ve sonrası, CMV'ye özgül interferon (IFN)- $\gamma$  üreten CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit düzeylerinin sitokin akım sitometri yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, CMV seropozitif 21 böbrek transplant alıcısı

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Meral Gültekin, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 249 6909, **E-posta (E-mail):** mgultekin@akdeniz.edu.tr

(14 erkek, 7 kadın; yaş aralığı: 18-66 yıl, ortalama yaş:  $34.5 \pm 9.9$ ) değerlendirilmiş; nakilden önce ve nakilden sonraki 1., 3. ve 6. aylarda olgulardan kan örnekleri alınmıştır. CMV seropozitif sağlıklı böbrek vericileri (n= 20) ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Uygulanan prosedürün ana basamakları; tam kandan periferik kan mononükleer hücrelerinin izolasyonu, örneklerin dondurulması ve saklanması, daha sonra örneklerin çözülmesi, CMV peptid havuzu kullanarak lenfositlerin *ex vivo* uyarımı, son olarak da yüzey ve hücre içi boyamalardan sonra CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  üreten CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin akım sitometri yöntemiyle sayılmasıdır. Hastalarda viral yük (CMV-DNA) izlemi, ilk 3 ayda 10 günlük aralarla, takiben 6. aya dek 3 haftada bir COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV test sistemi (Roche Diagnostics, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Hastaların transplantasyon öncesi CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  üreten CD8<sup>+</sup> T hücre sayısı ( $3.53 \pm 4.35/\mu\text{l}$ ) kontrol grubundakinden ( $4.52 \pm 5.17/\mu\text{l}$ ) farklı bulunmamıştır (p= 0.266). Hasta ve kontrol grubunun CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T hücre sayıları ise sırasıyla;  $8.84 \pm 9.56/\mu\text{l}$  ve  $8.23 \pm 11.98/\mu\text{l}$  olarak bulunmuş, aradaki fark anlamlılık düzeyinde sınırdaki sonuç vermiştir (p= 0.057). Hastaların yaşı, cinsiyeti ve uygulanan antiviral profilaksi protokollerinin [valgansiklovir (n= 4); valasiklovir (n= 17)], CMV'ye özgül hücrel immünite (CMV-HI) üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır (p> 0.05). Dört hastaya uygulanan indüksiyon tedavisinin CMV-HI'yi etkilemediği belirlenmiştir (p> 0.05). Farklı immün süpresyon protokolleri uygulanan [takrolimus + mikofenolat mofetil (MMF) + steroid (n= 17); siklosporin + MMF + steroid (n= 2); mTOR inhibitör + MMF + steroid (n= 2)] hastaların CMV'ye özgül immün yanıtları arasında da farklılık gözlenmemiştir (p> 0.05). Tüm hastalarda, CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T hücre sayısının, nakil sonrası 3. ayda, 1. aya göre anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiş (p= 0.003), bu durumun immün süpresif tedavinin süresiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Hastalardan birinde, nakil öncesinde virusa özgül sitotoksik T hücrelerinin (CD8<sup>+</sup> T = %0.6) varlığına rağmen, özgül CD4<sup>+</sup> T hücre yanıtının olmadığı saptanmış; bu hastada izlem sırasında CD4<sup>+</sup> T hücre yanıtının geliştiği (1., 3. ve 6. aylarda sırasıyla; %1.4, %1.5 ve %0.5) ve reaktivasyonun olmadığı görülmüştür. İki hastada ise nakil sonrası 3. ayda CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri saptanmamış; bunların birinde 6. ayda düşük düzeyde viremi (150 kopya/ml) ortaya çıkmıştır. Bu hastada, nakil sonrası 6. aydaki CMV-HI düzeyinin (CD4<sup>+</sup>T + CD8<sup>+</sup> T= %0.9), nakil öncesinden (CD4<sup>+</sup> T + CD8<sup>+</sup> T= %0.5) daha yüksek düzeye ulaştığı izlenmiş; hastada viremi kendiliğinden temizlenmiş ve antiviral tedavi gerekmemiştir. Sonuç olarak, SOT hastalarında transplantasyon öncesi ve sonrası süreçte, viral yük izleminin yanı sıra, CMV'ye özgül T hücre yanıtı izleminin, CMV hastalığının kontrolünde yararlı olacağı düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Sitomegalovirus enfeksiyonu; CMV; hücrel immün yanıt; böbrek transplantasyonu; immünolojik izlem; akım sitometrisi.*

## ABSTRACT

In spite of the improvements in the clinical management of solid organ transplant (SOT) recipients provided by immunosuppression and universal prophylaxis, human cytomegalovirus (CMV) infections continue to be one of the most leading causes of morbidity and mortality. Cell-mediated immunity specific to CMV (CMV-CMI) plays an important role in the control of CMV replication. Therefore, monitoring of CMV-specific T-cell response can be used to predict individuals at increased risk of CMV disease. The aim of this study was to investigate the levels of CMV-specific interferon (IFN)- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in kidney transplant recipients before and after the transplantation, by cytokine flow cytometry. A total of 21 kidney transplant recipients (14 male, 7 female; age range: 18-66 years, mean age:  $34.5 \pm 9.9$ ) who were all CMV seropositive have been evaluated in the study. Blood samples from the patients were obtained before and at the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> months after transplantation. CMV seropositive healthy kidney donors (n= 20) constituted the control group. The main stages of our procedure were as follows; isolation of peripheral blood mononuclear cells from whole blood, freezing and storing of the samples, later on thawing the samples, *ex vivo* stimulation of lymphocytes with pooled CMV peptides and counting CMV-specific IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by flow cytometry following surface and intracellular cytokine staining. Monitoring of the viral load (CMV-DNA) was performed in 10 days intervals in the first 3 months followed by 3 week intervals until 6 months using COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV test system (Roche Diagnostics, USA). The frequencies of pretransplant CMV-specific IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup>

T cells in patient ( $3.53 \pm 4.35/\mu\text{l}$ ) and control ( $4.52 \pm 5.17/\mu\text{l}$ ) groups were not statistically different ( $p=0.266$ ). The difference between the number of virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients ( $8.84 \pm 9.56/\mu\text{l}$ ) and those in the control group ( $8.23 \pm 11.98/\mu\text{l}$ ) was at the borderline of significance ( $p=0.057$ ). The age and gender of the patients and type of antiviral prophylaxis protocols [valgancyclovir ( $n=4$ ); valacyclovir ( $n=17$ )] did not have any significant effect on CMV-CMI ( $p>0.05$ ). Similarly, induction therapy administered to four patients did not show any effect on CMV-CMI ( $p>0.05$ ). CMV-specific immune responses of patients who received different immunosuppression protocols [tacrolimus + mycophenolate mofetil (MMF) + steroid ( $n=17$ ); cyclosporine + MMF + steroid ( $n=2$ ); mTOR inhibitor + MMF + steroid ( $n=2$ )] were not different ( $p>0.05$ ). The number of CMV-specific CD4<sup>+</sup> T cells in all patients were significantly decreased in the 3rd month compared to the 1st month after the transplantation ( $p=0.003$ ), indicating a relationship with the period of immunosuppressive therapy. In one of the patients who did not have CMV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response but had cytotoxic T-cells (CD8<sup>+</sup> T= 0.6%) before transplantation, CD4<sup>+</sup> T-cell response have developed during monitorization (1.4%, 1.5% and 0.5% in 1st, 3rd and 6th months, respectively), and no viral reactivation was detected. Out of the two patients who had no CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell response in the 3rd month, one of them developed low level viremia (150 copies/ml) in the 6th month. In this patient the level of CMV-CMI in the 6th month (CD4<sup>+</sup>T + CD8<sup>+</sup>T= 0.9%), have reached higher values than the values obtained before the transplantation (CD4<sup>+</sup>T + CD8<sup>+</sup>T= 0.5%). The viremia was cleared spontaneously in this patient and no antiviral therapy was required. In conclusion, our results suggested that pretransplant and posttransplant monitoring of CMV-specific T-cell responses might be helpful as well as viral load in the clinical management of CMV infection in SOT patients.

**Keywords:** Cytomegalovirus infection; CMV; cell-mediated immunity; renal transplantation; immunologic monitoring; flow cytometry.

## GİRİŞ

Solid organ transplantasyonu (SOT) hastalarında, sitomegalovirus (CMV) enfeksiyonu ve hastalığı insidansında son yıllarda azalma kaydedilmesine karşın, günümüzde hala transplantasyon alanında enfeksiyon ile ilişkili morbidite ve önlenebilir mortalitenin önemli etkenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Antiviral profilaksi ve preemptif tedavi yaklaşımları ile sağlanan başarı; yüksek mortalite, organ kaybına neden olabilen geç dönem CMV hastalığı ve gansiklovir direnci sorunlarını da beraberinde getirmiştir<sup>1</sup>. Kendisi de immünojen olan CMV'nin konak tarafından kontrolü, doğal ve edinsel bağışık sistemin yanıt verdiği kompleks bir süreçtir. Toll-benzeri reseptör 2 ve 4 polimorfizmi; mannoz bağlayıcı lektin ve fikolin 2 genlerinde tek nükleotid polimorfizmi ile CMV hastalığı gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>2,3</sup>. Doğal öldürücü (NK) hücreler de böbrek nakil hastalarında primer veya tekrarlayan CMV enfeksiyonlarının kontrolünde rol oynarlar<sup>4</sup>. Hümorale immün yanıt, primer olarak glikoprotein B, glikoprotein H ve pentamerik glikoprotein H/gL/UL128/UL130/UL131 kompleksini hedef alan antikör sentezi sonucunda, hücre dışı virus nötralizasyonu ile virusun kontrolüne katkı sağlarsa da, transplantasyon laboratuvarında CMV serolojisi, esas itibarıyla alıcı ve vericide nakil öncesi CMV IgG taraması ile risk grubunun belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır<sup>1,5</sup>. Diğer herpesviruslar ile benzer bir şekilde CMV, primer enfeksiyonun ardından makrofaj, nötrofil, fibroblast, endotel ve epitelyal hücreler gibi çeşitli hücrelerde yaşamaya devam eder. CMV, çeşitli stratejilerle immün sistemden kaçtığı için konak tarafından yok edilemez, ancak sağlıklı bireylerin bağışık sistemi virüsü hastalık ve komplikasyonlar

oluşmaksızın 'latent' tutmayı başarır. CMV seropozitif SOT hastalarında, nakledilen yabancının (doku, organ) konak tarafından reddini önlemek amacıyla uygulanan immün süpresyon tedavisi, latent virusun reaktivasyonuna ve viremiden yaşamı tehdit eden invazif enfeksiyonlara uzanan bir yelpazede CMV hastalığı gelişimine neden olabilir. CMV enfeksiyonunda konak-virus etkileşiminin konak aleyhine bozulmamasında anahtar mekanizma virusa özgül hücresel bağışık yanıtıdır<sup>1,6</sup>.

Viral enfeksiyonlara karşı erken ve geç dönem immün yanıtta, bellek T hücrelerinin önemi uzun yıllardır bilinmektedir<sup>7</sup>. İmmün süpresyon ile baskılanmış olan CMV'ye özgül T hücre yanıtının yeniden yapılanması, enfeksiyonun kontrolünde çok önemli olup, bu durum kök hücre alıcılarına CMV'ye özgül CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücre klonlarının transfer edildiği klinik araştırmalarda gösterilmiştir<sup>8</sup>. Son 20 yılda gerek SOT, gerekse kök hücre alıcılarında akım sitometrisi, ELISPOT ve Quantiferon yöntemleriyle hem virolojik hem de immünolojik izlem yapılarak, CMV enfeksiyonunun önlenmesi, kontrolü ve tedavisinde daha etkin yaklaşımlar hedeflenmektedir<sup>6,9,10</sup>. Kaynak taramamıza göre, ulaşılabildiği kadarıyla, yurdumuzda klinik örneklerde CMV hücresel immünite araştırması daha önce yapılmamıştır. Bu çalışmada, böbrek nakli planlanan hastalarda nakil öncesi ve sonrası 1, 3 ve 6. aylarda sitokin akım sitometri yöntemiyle, CMV'ye özgül interferon (IFN)- $\gamma$  üreten CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit düzeylerinin araştırılması ve hücresel immün yanıtların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## HASTALAR ve YÖNTEM

### Olgular

Akdeniz Üniversitesi Prof. Dr. Tuncer Karpuzoğlu Organ Nakli Merkezi tarafından canlı vericiden böbrek nakli planlanan 21 hastadan (Tablo I) Aralık 2012- Ağustos 2013 tarihleri arasında nakil öncesi (0. ay) ve sonrası (1, 3, 6. aylar), sodyum heparinli tüplere 5 ml venöz kan örnekleri alındı. Hastalar ve vericiler CMV seropozitif idi (R+/D+). Kontrol grubu olarak sağlıklı 20 vericiden örnek toplandı. Virolojik izlem protokolü uyarınca, hastalarımızda nakil sonrası ilk 3 ay 10 günde bir, 6. aya kadar 3 haftada bir CMV-DNA PCR çalışıldı.

Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 03.01.2012/10 tarih/sayıli etik kurul onayı ile gerçekleştirildi ve hastaların yazılı onamları alındı.

### CMV-DNA düzeyinin kantitasyonu

Plazma örneklerinden CMV-DNA kantitasyonu için COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV test sistemi, üretici firmanın (Roche Diagnostics, ABD) önerileri doğrultusunda uygulandı. Ekstraksiyon için, manyetik partiküller kullanan silika tabanlı bir yöntem; amplifikasyon ve saptama için, CMV DNA polimeraz genini (UL54) hedef alan primer çifti ve çift işaretli Taqman hidroliz problemleri kullanıldı. Aynı zamanda PCR inhibitörlerinin varlığını saptamak amacıyla, ekstraksiyon karışımı içerisine eklenen internal kontrol DNA'sı, hedef amplifikasyonunda kullanılan primer çifti kullanılarak çoğaltıldı ve internal kontrol DNA'sına özgü, farklı bir hidroliz probu kullanılarak saptandı.

**Tablo 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri**

<b>Değişkenler</b>	
<b>Cinsiyet; Erkek/Kadın (n)</b>	14/7
<b>Yaş ortalaması; yaş aralığı (yıl)</b>	34.5 ± 9.9; 18-66
<b>Etiyoloji (n)</b>	
Kronik böbrek yetmezliği	14
Polikistik böbrek	2
Nefrotik sendrom	1
Kronik piyelonefrit	1
Veziköüretal reflü	1
Nörojenik mesane	1
IgA nefropatisi	1
<b>Ek sistemik hastalık (n)</b>	
Hipertansiyon (HT)	12
DM (Diabetes mellitus) Tip 2	2
HL (Hiperlipidemi)	1
HT + DM Tip 2 + HL	1
HT + DM Tip 2 + Tirotoksikoz	1
<b>İmmün süpresyon protokolü (n)</b>	
Takrolimus + mikofenolat mofetil (MMF) + Steroid	17
Siklosporin + MMF + Steroid	2
mTOR inhibitörü + MMF + Steroid	2
<b>Monoklonal antikor ile indüksiyon (n)</b>	
Uygulanan	4
Uygulanmayan	17
<b>Antiviral profilaksi (3 ay) (n)</b>	
Valgansiklovir	4
Valasiklovir	17

### **CMV'ye özgül IFN- $\gamma$ üreten CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin kantitasyonu**

Yöntem standardize olmadığından ve laboratuvarımızda ilk kez çalışacağımızdan, öncelikle optimizasyon çalışmaları, ardından gün içi ve günler arası kesinlik değerleri ile laboratuvar validasyonu yapıldıktan sonra kontrol ve hasta örneklerinin çalışılmasına başlandı. Yöntemin ana basamakları; tam kandan periferik kan mononükleer hücre (PKMNH) izolasyonunun ardından, lenfositlerin CMV peptidleri ile *ex vivo* olarak uyarılması ve CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  üreten T lenfositlerinin yüzey antijenleri ve hücre içi sitokin boyama sonucunda akım sitometride fonksiyonel ayırım yaparak sayılmasıdır<sup>6,9,10</sup>.

PKMNH izolasyonu, venöz kan örneği alınmasını takip eden 4 saat içerisinde gerçekleştirildi ve hücreler, stok besiyeri ile süspansedilerek kriyoviyallere aktarıldı. Önce -80°C'de, ertesi gün sıvı azot tankına alınarak saklandı. Dondurulmuş örnekler, çalışılacağı

zaman 1 ml çözdürme solüsyonu [%88:%1 L-Glutaminli RPMI 1640, %1 steril -ısı ile inaktive edilmiş- fetal dana serumu (FBS), %1 Na-piruvat, %1 penisilin-streptomisin) ile çözdürüldükten sonra, 1 ml çalışma besiyeri (%90: %1 L-Glutaminli RPMI 1640, %10 steril -ısı ile inaktive edilmiş- FBS) ile süspansen edilen pellette %0.4'lük tripan mavisi ile (Sigma Trypan blue solution %0.4, St. Louis, USA) Neubauer lamında hücre sayımı yapılarak 50 µl'de  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ihtiyaç duyulan çalışma besiyeri miktarı hesaplandı ve nihai hücre izolasyonu tamamlandı<sup>11</sup>.

CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit sayımları için negatif kontrol, pozitif kontrol ve CMV peptid etiketlemesi yapılarak her bir örnek için altı ayrı falkon tüpü hazırlandı. Tüm tüplere 50 µl hücre içeren solüsyon konarak; negatif kontrol tüplerine 100 µl çalışma besiyeri, pozitif kontrol tüplerine 100 µl *pokeweed* (GenID GmbH, Almanya), CMV peptid tüplerine ise 100'er µl CMV peptid (GenID GmbH, Almanya), 1'er µl CD28/CD49d (BD FastImmune, ABD) ilave edildi. CMV peptid ve pozitif kontrol tüplerine inkübasyonun 2. saati dolduğunda 1.5 µl *golgi stopper* (BD Golgi Plug, ABD) konuldu. Sekiz saatlik inkübasyonun ardından IFN-γ/CD69/CD4/CD3 (BD FastImmune, ABD; Cat. No: 337184) veya IFN-γ/CD69/CD8/CD3 (BD FastImmune, ABD; Cat. No: 346048) antikoları kullanılarak boyama aşamalarına geçildi. Akım sitometri (BD FACSCanto II, ABD) cihazında, toplam lenfositler içindeki aktive olmuş CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T lenfositlere ve onların içindeki CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN-γ T lenfositlere kapı alındı. % *parent* (%p) ve % *grandparent* (%gp) değerleri bulundu. %gp değerleri kullanılarak eş zamanlı çalışılmış olan lenfosit sayıları ile oranlayarak CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin sayısal değerlerine ulaşıldı<sup>9,12-14</sup>.

### İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen veriler PASW 18 (SPSS/IBM, Chicago, ABD) kullanılarak analiz edildi. Parametrik test varsayımlarının sağlandığı durumlarda Student t testi, iki eş arası fark testi, varyans analizi, parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda ise Mann-Whitney U, Wilcoxon işaretli sıra ve Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki durumu Spearman korelasyon katsayısı, kategorik veriler ise ki-kare anlamlılık testi ile incelendi.

### BULGULAR

Hasta ve kontrol grubunun CMV'ye özgül hücrel immün yanıt değerleri Tablo II'de verilmiştir. Kontrol grubunda bir örnekte CMV'ye özgül CD8<sup>+</sup> T hücre yanıtı saptanamamıştır, ancak CMV peptidleri ile CD4<sup>+</sup> T lenfosit uyarımı mevcuttur (%0.6) (Tablo III). Hastalardan birinde ise nakil öncesi CMV'ye özgül sitotoksik T hücre varlığına rağmen (CD8<sup>+</sup> T = %0.4), CD4<sup>+</sup> T hücresi saptanamamıştır (Tablo III). Bu hastada nakil sonrası 1, 3 ve 6. aylarda CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T ve CD8<sup>+</sup> T hücre yüzdeleri sırasıyla; %1.4 ve %0.3, %1.5 ve %0.3, %0.5 ve %0.1 değerlerinde saptanmıştır.

Kontrol ve hasta grubu arasında nakil öncesi, CMV'ye özgül CD8<sup>+</sup> IFN-γ T lenfosit ve CD4<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup> IFN-γ T lenfosit sayıları arasında anlamlı fark saptanamamıştır (Mann-Whitney U testi, p= 0.266, p= 0.088). CD4<sup>+</sup> IFN-γ T lenfosit düzeyleri açısından ise kontrol ve

**Tablo II.** CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  sentez eden CD4<sup>+</sup>T ve CD8<sup>+</sup>T lenfosit değerleri

Olgular (n)	CD4 <sup>+</sup> T lenfosit Ort. $\pm$ SS*		CD8 <sup>+</sup> T lenfosit Ort. $\pm$ SS*		CD4 <sup>+</sup> T + CD8 <sup>+</sup> T lenfosit Ort. $\pm$ SS*	
	(en düşük-en yüksek)		(en düşük-en yüksek)		(en düşük-en yüksek)	
	Hücre/ $\mu$ l	%	Hücre/ $\mu$ l	%	Hücre/ $\mu$ l	%
Kontrol (20)	8.84 $\pm$ 9.56 (1.14-45.44)	0.47 $\pm$ 0.34 (0.10-1.60)	4.52 $\pm$ 5.17 ( 0-20.41)	0.26 $\pm$ 0.28 (0.0-1.30)	13.36 $\pm$ 13.77 (3.08-62.48)	0.73 $\pm$ 0.56 (0.20-2.30)
Hasta 0.ay (21)	8.23 $\pm$ 11.98 (0-41.30)	0.70 $\pm$ 1.50 (0.0-7.0)	3.53 $\pm$ 4.35 (0-19.28)	0.23 $\pm$ 0.22 (0.0-0.80)	11.76 $\pm$ 14.8 (0.82-53.02)	0.93 $\pm$ 1.60 (0.10-7.50)
Hasta 1.ay (21)	11.42 $\pm$ 11.35 (0.11-44.10)	0.45 $\pm$ 0.41 (0.10-1.40)	5.04 $\pm$ 4.34 (0-18.8)	0.19 $\pm$ 0.14 (0.0-0.60)	16.46 $\pm$ 14.21 (0.22-53.5)	0.63 $\pm$ 0.48 (0.20-1.70)
Hasta 3.ay (21)	8.0 $\pm$ 8.9 (0-33.2)	0.37 $\pm$ 0.39 (0.0-1.50)	5.0 $\pm$ 5.8 (0-22.6)	0.22 $\pm$ 0.24 (0.0-1.0)	13.1 $\pm$ 12.3 (0-45.22)	0.59 $\pm$ 0.51 (0.0-1.80)
Hasta 6.ay (12)	12.1 $\pm$ 15.7 (0-59.5)	0.60 $\pm$ 0.65 (0.0-2.40)	6.4 $\pm$ 5.4 (1.92-17.6)	0.32 $\pm$ 0.2 (0.10-0.80)	18.49 $\pm$ 19.08 (3.8-76.9)	0.92 $\pm$ 0.79 (0.20-3.10)

\* Ort.  $\pm$  SS: Ortalama  $\pm$  Standart sapma.

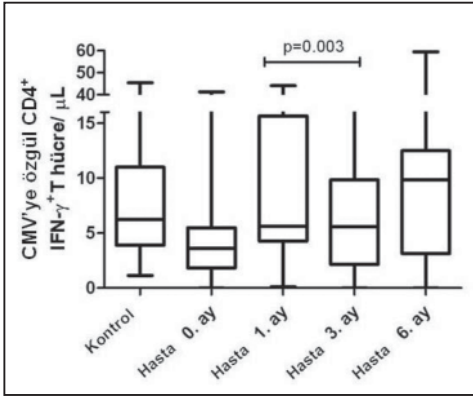
**Tablo III.** CMV'ye özgül hücrel immün yanıt saptanamayan olgular

Gruplar (n)	CD4 <sup>+</sup> T lenfosit saptanamayan olgular (n)	CD8 <sup>+</sup> T lenfosit saptanamayan olgular (n)
Kontrol (20)	-	1
Hasta 0.ay (21)	1	-
Hasta 1.ay (21)	1	1
Hasta 3.ay (21)	3	3
Hasta 6.ay (21)	1	-

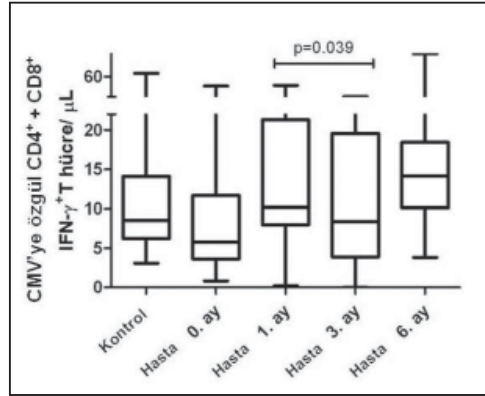
hastaların nakil öncesi değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak sınırdan bulunmuştur (p= 0.057). Nakil sonrası 3. aydaki CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  T lenfosit sayısının, 1. ay CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  T lenfosit sayısından anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlenmiştir (Wilcoxon Signed testi, p= 0.003) (Tablo II). CD8<sup>+</sup>T hücre değerleri farklı olmamasına karşın, CD4<sup>+</sup> T lenfositlerdeki bu farklılık, toplam T lenfosit sayısını -CMV'de özgül immüniteyi- etkileyerek 3. ayda 1. aya göre daha düşük bulunmuştur (Wilcoxon Signed testi, p= 0.039) (Şekil 1,2).

Tablo I'de belirtilen değişkenler ayrı ayrı değerlendirildiğinde, kontrol grubu ve hastaların nakil öncesi CMV'ye özgül hücrel immünite değerlerinin yaş ve cinsiyete göre fark göstermediği belirlenmiştir (Korelasyon ve Mann-Whitney U testi, p> 0.05). Farklı immün süpresyon protokollerinin CMV'ye özgül hücrel immünite üzerine farklı etkileri olmadığı (Kruskal-Wallis, p> 0.05); induksiyon tedavisi uygulanma ya da uygulanmamasının CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin yeniden yapılanması üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır.

İmmün süpresif tedavinin 3. ayında, iki hastamızda CMV'ye özgül her iki T lenfosit alt grubu da saptanamamıştır. Bazal değerlerine baktığımızda, nakil öncesi CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit değerlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. CMV'ye özgül hücrel immüniteleri baskılanmış olan bu hastaların birinde nakil sonrası 6. ayda düşük düzeyde viremi (150 kopya/ml) saptanmış olup CMV hastalığı



Şekil 1. CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  sentez eden CD4<sup>+</sup> T lenfosit değerleri.

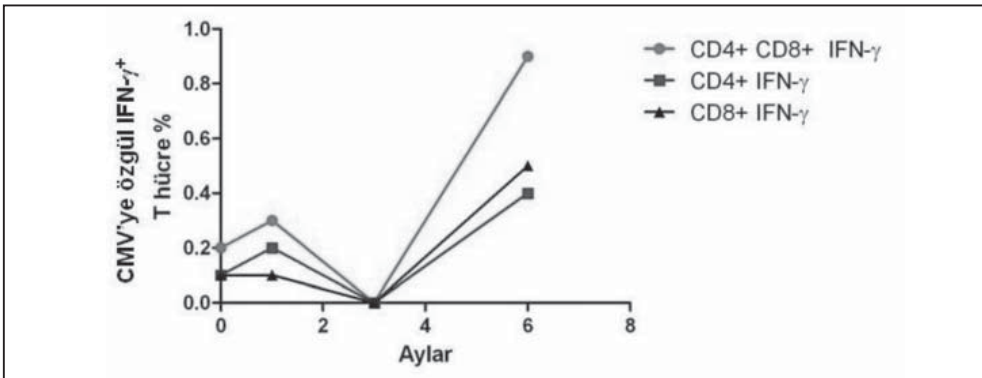


Şekil 2. CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  sentez eden CD4<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup> T lenfosit değerleri.

gelişmemiştir. Hastamızın 6. aydaki CMV'ye özgül hücrel immünite değerleri ise; CD4<sup>+</sup> T hücre %0.4 ve CD8<sup>+</sup> T hücre % 0.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

## TARTIŞMA

Hücrel immün yanıtın izleminde kullanılan yöntemlerin temeli; virusa özgül T lenfositleri ve fonksiyonlarının tanımlanması, belirlenmesi ve hücrel bağışıklığın en önemli sitokinlerinden olan IFN- $\gamma$  yanıtının ölçümüne dayanmaktadır. CMV'ye özgül immünite ölçümünde kullanılan test/yöntemler ELISPOT, QuantiFERON ve akım sitometri olup, altın standart "sitokin akım sitometri (Cytokine flow cytometry; CFC) - hücre içi sitokin boyama (Intracellular cytokine staining; ICS)" yöntemidir. ICS yönteminde; viral peptidler ile *ex vivo* olarak uyarılan lenfositler, yüzey antijenleri ve hücre içi sitokin boyama sonucunda fonksiyonlarının sitokin sentez aşamasında gösterilirler. Bu yöntem, viral peptid-MHC-tetramer kompleksine direkt olarak bağlanan epitopa özgül T lenfosit fenotiplerinin belirlendiği tetramer bazlı akış sitometrisine göre daha duyarlı ve fonksiyonel olma avantajına sahiptir<sup>10-14</sup>. Bizim çalışmamızda da, SOT hastalarında



Şekil 3. Düşük düzeyde viremi saptanan hastanın CMV'ye özgül hücrel immün yanıt kinetikleri.



CMV'ye özgül hücrel immünitenin izleminde, CMV peptidleri ile *ex vivo* uyarımın ardından viral aktivasyonun en duyarlı, özgül belirteçlerinden olan IFN- $\gamma$  sentezleyen CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfositlerinin kantitasyonu amacıyla sitokin akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Kaynak taramamıza göre, ulaşılabildiği kadarıyla, araştırmamız bu alanda yurdumuzda yapılan ilk çalışmadır.

ICS yöntemi standardize olmadığından, araştırmamızda öncelikle, her bir aşama için optimizasyon çalışmaları ve ardından test validasyonu gerçekleştirilmiştir<sup>15,16</sup>. Çalışmamızın *ex vivo* uyarım aşamasında, tam kanın direkt olarak ya da PKMNH izole edilerek yapılan çalışmanın; örneklerin dondurulup, saklanıp, çözülürülerek yapılan çalışmaya üstünlüğü olmadığı belirlenmiştir<sup>16</sup>. Ancak, test rutin uygulamaya girdiğinde ve örnek sayısı çok olduğunda, Motta ve arkadaşlarının<sup>17</sup> vurguladıkları gibi, direkt olarak tam kan uyarımının testin uygulanmasında daha pratik olduğu yorumuna katılıyoruz. Lenfositlerin *ex vivo* uyarımında, tek peptid, saflaştırılmış polipeptid, peptid kokteyli ya da virus ile enfekte hücre lizatı kullanılmaktadır. Tek peptid kullanımı durumunda, lenfosit aktivasyonu sağlanamayabilir. Viral lizat kullanımında, çok sayıda CMV protein ekspresyonu nedeniyle testin duyarlılığı artmaktadır, ancak enfekte fibroblastlardan hazırlanan lizat standardize değildir<sup>6,10,14,18,19</sup>. İmmünite araştırmalarında, *ex vivo* koşulların olabildiğince *in vivo* ortama yakın olması arzu edilir. Lozza ve arkadaşları<sup>20</sup>, endotelotropik ve dendrotropik CMV VR1814 suşu ile dendritik hücreleri enfekte ederek oluşturdukları lenfosit kültürü ile, T lenfositlerinin uyarılma aşamasının *in vivo* koşullara daha yakın olarak gerçekleştirilmesini amaçlamışlardır. Bu çeşitliliklerden dolayı, hücrel immünite araştırmaları karşılaştırılırken, lenfositlerin uyarılması aşamasında ne kullanıldığı göz önünde tutulmalıdır. Bizim çalışmamızda, lenfosit aktivasyonu için CMV peptid kokteyli; aktive olan T lenfositlerinden sentez edilen sitokinleri hücre içi saptayabilmek için de, sekresyon yolağını inhibe etmek amacıyla brefeldin A<sup>21</sup> içeren Golgi plug kullanılmıştır. T lenfosit aktivasyonu çalışmalarında kullanılan mitojen çeşidi konusunda da standardizasyon yoktur. Quantiferon yöntemi ile çalışılan seride örneklerin %29.6'sında mitojene yanıt alınamamıştır<sup>22</sup>. Bunun nedeni, yöntemde kullanılan peptid kombinasyonu ile yaygın olmayan HLA tipinde olan hastalardan yanıt alınamaması ve ICS yönteminin duyarlılığı olabilir<sup>6,10,17</sup>. Bizim serimizde, *pokeweed* mitojenine yanıt alamadığımız örnek olmaması, yöntemin duyarlılığı ile açıklanabilir.

Araştırma grubumuzun CMV seropozitif (R<sup>+</sup>/D<sup>+</sup>) olması nedeniyle, olgularımızın bellek B hücreleri mevcuttur. Buna karşın, immün süpresif tedavide baskılanan yanıt, hücrel yanıt olduğundan, nakil hastaları seropozitif olsa dahi, CMV reaktivasyonu/hastalığının önlenmesinde CMV'ye özgül T hücrelerinin yeniden yapılanması kritik bir öneme sahiptir. Nakil öncesi CMV'ye özgül T hücrelerinin varlığı, nakil sonrası hücrel immünitenin erken dönemde yapılanmasının belirleyicisidir<sup>10,23,24</sup>. Bu nedenlerle, hastaların nakil öncesi risk durumlarını belirlemede sadece CMV IgG bakılmasının yeterli olmadığı, hücrel immünite testleri ile alınan pozitif sonuçla birlikte gerçek pozitiflikten söz edilebileceği belirtilmiştir<sup>25</sup>. Nakil öncesi CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  yanıtı saptanmayan SOT hastalarında, IFN- $\gamma$  düzeyi > 0.2 IU/ml olan hastalara göre nakil sonrası süreçte CMV replikasyon riski 10 kat daha fazla bulunmuştur<sup>23</sup>. Hastalarımızın nakil öncesi CMV'ye özgül hücrel immünitelerini değerlendirdiğimizde, CMV'ye özgül IFN- $\gamma$  sentez eden sitotoksik T lenfosit düzeyleri kontrol grubumuzdan farklı bulunmamış ve tüm

hastalarda yanıtın mevcut olduğu saptanmıştır. CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T lenfosit değerleri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %95 anlamlılık düzeyinde p= 0.057 şeklinde sınır değerdedir ve bir hastamızda nakil öncesi CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T lenfosit yanıtı mevcut değildir (Tablo I ve II). Hastamızın nakil öncesi CD8<sup>+</sup> T lenfosit düzeyi %0.4 olup, nakil sonrası CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T lenfosit düzeyleri 1, 3 ve 6. aylar için sırasıyla; %1.4 ve % 0.3, %1.5 ve %0.3, %0.5 ve %0.1 olarak belirlenmiştir. İzlem sürecinde bu hastada CMV reaktivasyonu saptanmamıştır. CMV'ye özgül sitotoksik T hücreleri, CMV replikasyonu olan konak hücreleri hedef alarak enfeksiyon kontrolünün ilk aşamasında görev yaparlar. Dolayısıyla, primer enfeksiyondan korunmada ve nakil sonrası erken dönemde sitotoksik T lenfositlerin etkin rolü önemlidir. CD4<sup>+</sup> T hücreleri ise, nakil sonrası daha uzun süreçte antiviral kontrolün sağlanmasında rol oynarlar<sup>6,10</sup>. Sester ve arkadaşları<sup>9</sup>, 76 böbrek nakil hastasının CMV'ye özgül CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin yoğun immün süpresyon döneminde progresif olarak azaldığını ve ilk bir ayda CD4<sup>+</sup> T düzeyleri ile enfeksiyöz komplikasyon gelişmesi arasında ters yönde korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Lenfosit aktivasyonunda endotelotropik CMV suşu ile enfekte dendritik hücre kültürünün kullanıldığı bir çalışmada, CD4<sup>+</sup> T ve CD8<sup>+</sup> T lenfositleri için 0.4 T hücre/μl düzeyinin, CMV enfeksiyonunu öngören bir eşik değer olduğu belirtilmiştir<sup>26</sup>. Bu çalışmada, nakil sonrası hücrel immünitenin ilk bir ayda yapılandığı hastalarda viremi kendiliğinden kaybolurken, immünitenin geç yapılandığı grupta ise CMV hastalığı gelişmiştir<sup>26</sup>.

Seropozitif SOT hastalarında latent viral reaktivasyon açısından en önemli risk faktörü, immün süpresyonun yoğunluğudur<sup>12</sup>. "İmmün süpresyon protokollerinin farklılıkları hücrel immünite üzerine etkili midir?" sorusuna yanıt aradığımızda, farklı protokollerin CMV immünitesi üzerindeki etkisi 1, 3 ve 6. aylarda ayrı ayrı değerlendirilmiş ve farklılık saptanmamıştır. İndüksiyon tedavisi alan (n= 4) ve almayan (n= 17) hastalarımızın CMV hücrel immünite değerlerinde de bir fark tespit edilmemiştir. İmmün süpresyonun yoğun olduğu ilk üç ay sonunda ise, hastalarımızın CMV'ye özgül hücrel immün yanıtları CD4<sup>+</sup> T lenfosit düzeyinde azalma ile sonuçlanmıştır. CD8<sup>+</sup> T lenfositlerde ise birinci aya göre bir farklılık gözlenmemiştir. Bu değerlendirme toplam T lenfositleri için yapıldığında da, nakil sonrası üçüncü ayda CMV'ye özgül T hücre yanıtının baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 1, 2).

SOT hastalarında CMV hastalığı insidansının son yıllarda azalmasının en önemli nedenlerinden birisi, CMV reaktivasyonunun başarılı antiviral profilaksi uygulamaları ile kontrol altına alınmasıdır<sup>27</sup>. Antiviral profilaksinin hücrel immünite üzerine olumsuz etkisi belirlenmemiştir<sup>28</sup>. Araştırmamızda, valasiklovir ya da valgansiklovir profilaksisi alan hasta grupları karşılaştırıldığında, CMV'ye özgül hücrel immünite üzerine farklı etkilerinin olmadığını saptanmıştır. Yoğun immün süpresyonun azalmasıyla eş zamanlı profilaksi de tamamlanmaktadır. Bu dönemde hücrel immün yapılanmanın derecesi, geç CMV hastalığı için belirleyici bir değerdir. Kumar ve arkadaşları<sup>22</sup>, Quantiferon yöntemiyle izledikleri 108 SOT hastasının %64.8'inde, profilaksi bitiminde CMV'ye özgül immün yapılanmanın sağlanmadığını bildirmişler; bu grupta CMV hastalığı gelişme oranının (%22.9), CMV'ye özgül hücrel immünite saptanan hastalara (%5.3) göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Transplantasyon sonrası altıncı ayda düşük viremi saptanan hastamızın, üçüncü ayda CMV'ye özgül T hücre yanıtının olmadığı, buna karşın altıncı ayda söz konusu değerlerin

önceki aylardan da daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 3). Bu hastada, hücrel immün yanıtın düşük olduğu dönemde reaktivasyonun olduğu ve bellek hücrelerinin yanıtı sonucunda CMV replikasyonunun sınırlı kaldığı düşünülmüştür. Chierrgin ve arkadaşları<sup>29</sup>, asemptomatik CMV viremi olan hastaların CD4<sup>+</sup> T lenfosit yanıtının, semptomatik hastalara göre daha iyi olduğunu vurgulamışlardır. Radha ve arkadaşları<sup>13</sup> da, seropozitif böbrek transplantasyon hastalarında CMV enfeksiyonu geliştiğinde, CD8<sup>+</sup> T lenfosit yanıtının sağlıklı kontrollerden daha iyi olduğunu saptamışlar ve seropozitif hastaların viral replikasyonu önlemeye çalıştıkları yorumunu yapmışlardır.

Bizim düşük viremi saptanan olgumuzun üçüncü ayda hücrel yanıtının olmaması, reaktivasyon riskinin belirteci olabilir. Diğer taraftan, nakil sonrası altıncı ayda T hücre yanıtının iyi olması da hastalığın gelişimini önleyen bir faktördür. Bunde ve arkadaşları<sup>18</sup>, SOT hastalarında CMV IE-1'e özgül CD8<sup>+</sup> T hücre sayısının, nakil sonrası herhangi bir zamanda %0.4 üzerinde olmasının, CMV enfeksiyonundan korunmada eşik değer olduğunu bildirmişlerdir. Viral bağışıklığın tekrar yapılmasında, enfeksiyon/hastalığı ön görecektir 'eşik değerler' kök hücre ve SOT alıcılarında farklılık göstermektedir<sup>30</sup>. Sonuç olarak, böbrek nakli yapılan hastaların CMV enfeksiyonu açısından izleminde, sadece virus yükü değil, konağın hücrel immün yanıtı da değerlendirilmelidir. Bu alandaki verilerin artması sonucunda, profilaksi ve antiviral tedavi yaklaşımlarında, viral yükün yanı sıra CMV'ye özgül T hücre yanıtının da dikkate alındığı protokoller belirlenecektir.

## KAYNAKLAR

1. Razonable RR, Humar A; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13(Suppl 4): 93-106.
2. Cervera C, Lozano F, Saval N, et al. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation* 2007; 83(11): 1493-500.
3. Manuel O, Pascual M, Trendelenburg M, et al. Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; 83(3): 359-62.
4. Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1994; 42(2): 188-92.
5. Lilleri D, Kabanova A, Lanzavecchia A, et al. Antibodies against neutralization epitopes of human cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 complex and virus spreading may correlate with virus control in vivo. *J Clin Immunol* 2012; 32(6): 1324-31.
6. Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology* 2014; 3(2): e12.
7. Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 307(1): 7-13.
8. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333(16): 1038-44.
9. Sester M, Sester U, Gärtner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71(9): 1287-94.
10. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012; 5(12): 1678-89.

11. Maecker HT, Rinfret A, D'Souza P, et al. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol* 2005; 6: 13.
12. Sester U, Gartner BC, Wilkens H, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5(6): 1483-9.
13. Radha R, Jordan S, Puliyaanda D, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5(1): 110-7.
14. Egli A, Binet I, Binggelli S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med* 2008; 6: 29.
15. Maecker HT, Hassler J, Payne JK, et al. Precision and linearity targets for validation of an IFN $\gamma$  ELISPOT, cytokine flow cytometry and tetramer assay using CMV peptides. *BMC Immunol* 2008; 9: 9.
16. Doğan HK, Mutlu E, Köksoy S, Gültekin M. Sitokin akış cytometri yöntemi ile CMV spesifik immün yanıt ölçümünün optimizasyon ve validasyon çalışmaları. 3. Ulusal KLİMUD Kongresi, 10-13 Kasım 2013, Antalya. Kongre Kitabı, s: 390, PS451.
17. Motta VN, Martins SL. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(1): 5-11.
18. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201(7): 1031-6.
19. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001; 255(1-2): 27-40.
20. Lozza L, Lilleri D, Percivalle E, et al. Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005; 35(6): 1795-804.
21. Nylander S, Kalies I, Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999; 224(1-2): 69-76.
22. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(5): 1214-22.
23. Cantisan S, Lara R, Montejo M, et al. Pretransplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13(3): 738-45.
24. Abate D, Saldan A, Fiscon M, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 2010; 202(4): 585-94.
25. Kotton CN, Kumar D, Calliendo AM, et al. Updated international guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96(4): 333-60.
26. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(10): 2356-64.
27. Eid AJ, Brown RA, Arthurs SK, et al. A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int* 2010; 23(5): 506-13.
28. Snyder LD, Medinas R, Chan C, Sparks S, Davis WA, Palmer SM. Polyfunctional cytomegalovirus-specific immunity in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant* 2011; 11(3): 553-60.
29. Chierighin A, Gabrielli L, Zanfi C, et al. Monitoring cytomegalovirus T-cell immunity in small bowel/multivisceral transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; 42(1): 69-73.
30. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. *New Microbiol* 2011; 34(3): 229-54.