

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Timm

**TTV als prognostischer Marker für asymptomatische mit HIV
infizierte Patienten zur Vorhersage der Immunrekonstitution unter
antiretroviraler Therapie**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Livia Schmidt

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolai Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Jörg Timm

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Für meinen Opa Hans

Zusammenfassung

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert CD4+ T-Zellen, wodurch diese zerstört werden und somit eine Immundefizienz induziert wird. Die Routinediagnostik umfasst vor allem die Messung der HIV-RNA als Marker für die Aktivität der Virusreplikation und die Bestimmung der CD4+ T-Zellzahl im Blut als Marker für den Immunstatus. Eine zuverlässige Vorhersage der Immunrekonstitution (IR) von HIV-Infizierten nach Beginn einer kombinierten antiretroviralen Therapie (cART) ist bisher nicht möglich, könnte aber bei der Erstellung individueller Behandlungskonzepte und bei der Risikoabschätzung für die Entwicklung eines Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) hilfreich sein.

Zur Vorhersage des Verlaufs der Immunrekonstitution (IR) bei HIV-1-infizierten PatientInnen nach Beginn einer cART könnte die Plasmakonzentration des Torque-Teno-Virus (TTV) als möglicher prädiktiver Marker genutzt werden.

Das Torque Teno Virus (TTV) ist ein unbehülltes, einzelsträngiges und zirkuläres DNA-Virus mit einer weltweit hohen Prävalenz ohne Hinweise auf eine klinische Manifestation. Eine Bestimmung der TTV-Plasmakonzentration (TTVL) konnte bereits im Bereich der Transplantationsmedizin als prädiktiver Marker für die Risikobewertung einer Organabstoßung bei immunsupprimierten PatientInnen nach Transplantationen beschrieben werden.

Ziel der Studie war es daher, die mögliche Verwendung von TTV-Plasmaspiegeln bei HIV-infizierten PatientInnen für die Vorhersage von IR während der cART zu untersuchen. Dafür wurde die TTV-DNA retrospektiv im Blutplasma von 301 asymptomatischen, therapienaiven HIV-1-infizierten PatientInnen quantifiziert und mit immunologischen, virologischen und physiologischen Parametern korreliert.

TTV-DNA war mit einer medianen TTV-Plasmakonzentration von 5,37 log₁₀ Kopien/ml in 96 % der Patientenplasmaproben nachweisbar. Die initiale CD4+-Zellzahl korrelierte negativ mit der TTV-Plasmakonzentration ($p = 0,003$). Bei PatientInnen mit einer CD4+-Zellzahl < 50 Zellen/ μ l war die mediane TTV-Plasmakonzentration signifikant höher als bei Patienten mit einer CD4+-Zellzahl > 200 CD4+-Zellen/ μ l. Die TTV-Plasmakonzentration in Kombination mit der initialen CD4+-Zellzahl korrelierte signifikant mit der CD4+-Zellrekonstitution ($p = 0,004$). Für alle anderen untersuchten Parameter, wie das Alter, das Geschlecht oder der Nachweis der Herpesviren CMV, EBV und HHV-8 konnte keine signifikante Korrelation mit der Rekonstitution der CD4+-Zellen gezeigt werden.

Innerhalb der untersuchten Kohorte deutete die signifikant erhöhte TTV-Plasmakonzentration bei PatientInnen mit verminderter CD4-Zell-Regeneration auf einen schwereren Immundefekt hin. Die TTV-Plasmakonzentration in Kombination mit der initialen CD4+-Zellzahl waren hier prädiktiv für den Verlauf der Immunrekonstitution bei HIV-1-infizierten PatientInnen mit schwerer Immundefizienz.

Summary

The human immunodeficiency virus (HIV) infects CD4⁺ T cells, damaging them and thus inducing immunodeficiency. Routine diagnostics primarily include the quantification of HIV RNA as a marker for the activity of viral replication and the determination of the CD4⁺ T cell count in the blood as a marker for the immune status. A valid prediction of the immune reconstitution (IR) of HIV-infected persons after the start of combined antiretroviral therapy (cART) is not yet available but could be beneficial in the development of individual treatment regimens and in the risk assessment for the occurrence of immune reconstitution syndrome (IRIS).

The plasma concentration of the Torque Teno Virus (TTV) could be used as a potential predictive marker for predicting the course of immune reconstitution (IR) in HIV-1-infected patients after starting cART.

Torque teno virus (TTV) is a non-enveloped, single-stranded and circular DNA virus with a high prevalence worldwide and no evidence of clinical manifestation. A determination of the TTV plasma concentration (TTVL) has already been described in the field of transplantation medicine as a predictive marker for the risk assessment of organ rejection in immunosuppressed patients after transplantation.

The aim of the study was therefore to investigate the potential use of plasma TTV levels in HIV-infected patients for the prediction of IR during cART. To achieve this, TTV DNA was retrospectively quantified in the blood plasma of 301 asymptomatic, treatment-naïve HIV-1-infected patients and correlated with immunological, virological and physiological parameters.

TTV DNA was detectable with a median TTV plasma concentration of 5.37 log₁₀ copies/ml in 96 % of the patient plasma samples. The initial CD4⁺ cell count correlated negatively with the TTV plasma concentration ($p = 0.003$). In patients with a CD4⁺ cell count < 50 cells/ μ l, the median TTV plasma concentration was significantly higher than in patients with a CD4⁺ cell count > 200 CD4⁺ cells/ μ l. The TTV plasma concentration in combination with the initial CD4⁺ cell count correlated significantly with CD4⁺ cell reconstitution ($p = 0.004$). No significant correlation with CD4⁺ cell reconstitution could be shown for any of the other parameters investigated, such as age, gender or the detection of the herpes viruses CMV, EBV and HHV-8.

Within the cohort studied, the significantly increased TTV plasma concentration in patients with reduced CD4 cell reconstitution indicated a more severe immunodeficiency. The TTV plasma concentration in combination with the initial CD4⁺ cell count was predictive of the course of immune reconstitution in HIV-1-infected patients with profound immunodeficiency.

Liste der verwendeten Abkürzungen

AIDS	Akquiriertes Immundefizienz-Syndrom
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
cART	Kombinierte antiretrovirale Therapie
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
CMV	Zytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HIVL	Humanes Immundefizienz Viruslast
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IRIS	Immunrekonstitutionsentzündungssyndrom
kb	Kilobasen
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
ORF	<i>Open reading frames</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RESINA	<i>Primary drug Resistance in treatment naive HIV-infected patients</i>
RKI	Robert Koch Institut

RNA	Ribonukleinsäure
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SOT	<i>Solid organ transplantation</i>
TTV	Torque Teno Virus
TTVL	Torque Teno Viruslast
UTR	<i>Untranslated Region</i>

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	- 1 -
1.1.	Definition Torque Teno Virus	- 1 -
1.1.1.	Taxonomie, Morphologie und Genomaufbau	- 1 -
1.1.2.	Vorkommen.....	- 2 -
1.1.3.	Transmission	- 2 -
1.1.4.	TTV als prädiktiver Marker	- 3 -
1.2.	Humanes Immundefizienz Virus (HIV)	- 4 -
1.2.1.	Hintergrund	- 4 -
1.2.2.	Das HIV-Genom und der Replikationszyklus	- 5 -
1.2.3.	Die kombinierte antiretrovirale Therapie	- 8 -
1.2.4.	Übertragung und Klinik	- 9 -
1.2.5.	CDC-Stadien.....	- 9 -
1.2.6.	Besondere Subgruppen von HIV-positiven Menschen und klinische Herausforderungen ...	- 10 -
1.2.7.	Diagnostik.....	- 11 -
1.3.	Ethikvotum	- 11 -
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	- 11 -
2	PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT	- 13 -
2.1	Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV- infected patients	- 13 -
3	DISKUSSION.....	14
4	VERZEICHNISSE.....	18
4.1	Tabellenverzeichnis.....	18
4.2	Abbildungsverzeichnis.....	18
4.3	Literaturverzeichnis.....	18

5	DANKSAGUNG.....	24
----------	------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1. Definition Torque Teno Virus

1.1.1. Taxonomie, Morphologie und Genomaufbau

Das Torque Teno Virus (TTV) wurde im Jahr 1997 erstmalig bei PatientInnen mit Hepatitis nach dem Erhalt von Bluttransfusionen (post transfusionem) beschrieben [1], was ihm den inzwischen obsoleten Namen *Transfusion Transmitted Virus* verlieh. Taxonomisch ist das Virus der Familie der Anelloviren zuzuordnen sowie der Gattung der Alphatorqueviren [2, 3].

„Anello“, italienisch für Ring, beschreibt die ringförmige Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure (DNA) des TTV und ist so für die aktuelle Bezeichnung namensgebend. Das virale Genom ist ein nicht-umhülltes, zirkuläres und einzelsträngiges DNA-Molekül mit einer Größe von 3,8 Kilobasen (kb) [4, 5]. Das Virus ist in nicht codierende Bereiche, die vermutlich regulatorische Elemente (untranslatierte Region (UTR): 1,2 kb) zur viralen Replikation enthalten und in mindestens zwei codierende Bereiche mit offenen Leserastern (ORF (*Open reading frames*) 1 und 2) unterteilt (siehe Abbildung 1) [6].

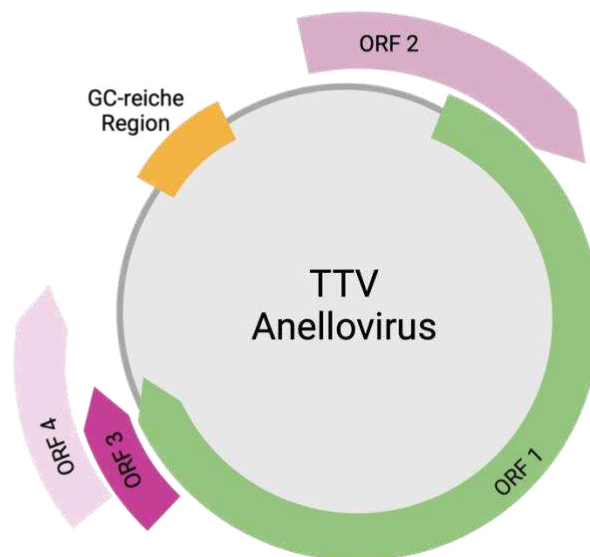


Abb. 1: Aufbau TTV: 3,8 kb großes zirkuläres Genom mit mindestens zwei kodierenden Regionen (ORF1, ORF2) und einer konservierten untranslatierten Region (UTR), die in 5' bzw. 3' GC-reichen Regionen liegt.

Abbildung erstellt mit BioRender.com

1.1.2. Vorkommen

Der Nachweis von TTV DNA erfolgt molekular mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) [6, 7]. Sie kann in fast allen Organen, Geweben und sonstigen biologischen Proben (wie beispielsweise Blut, Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Sperma, usw.) nachgewiesen werden [8-11]. Peripheres Blut dient als Reservoir für TT-Viren [12, 13] und replikative Virus-DNA wurde in Knochenmarkszellen sowie der Leber nachgewiesen [14, 15]. Im Blut beschränkt sich das Vorkommen von TTV nicht auf einen speziellen Zelltyp. Es konnte in B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, sowie in neutrophilen Killerzellen nachgewiesen werden, jedoch (bisher) nicht in Erythrozyten oder Thrombozyten [6, 16]. Das Virus repliziert zwar in den zuvor genannten Zellen, jedoch erfolgte der Nachweis aus Plasmablutproben. TTV DNA konnte außerdem in Tumorgeweben nachgewiesen werden [17], unter anderem in Hirntumoren wie Astrozytomen, Medulloblastomen und Ependymomen [18]. Viele Studien zeigen, dass TTV sowohl bei verschiedenen erkrankten PatientInnen, also auch bei gesunden Menschen mit einer sehr hohen Prävalenz vorkommt [19, 20]. Dabei gibt es auch geographische Unterschiede: während die Rate von TTV-positiven Seren in Brasilien nur bei etwa 5 % liegt [21], findet man in Russland, Japan und Pakistan eine Prävalenz von circa 90% [22-24]. Durchschnittlich kann von einer Prävalenz von über 50% der gesamten Weltbevölkerung in den frühen 2000ern ausgegangen werden [25-27]. Die höchste Prävalenz wurde bei mehrfach transfundierten Thalassämie-PatientInnen, sowie Hämodialyse-PatientInnen und NutzerInnen von intravenösen Drogen gefunden. Aber auch Virusinfektionen wie HIV (Humanes Immundefizienz Virus) oder HCV (Hepatitis-C-Virus) erhöhen die Prävalenz im Vergleich zur Normalbevölkerung [15].

1.1.3. Transmission

TTV kann ubiquitär in menschlichen Körperflüssigkeiten vorkommen. Der initial nachgewiesene Transmissionsweg von TTV war über Blut. Dies betrifft also PatientInnen, die mit TTV infiziertem Blut und / oder Blutprodukten ausgesetzt sind (z.B. Transfusionen oder Hämodialyse), sowie Menschen mit intravenösem Drogengebrauch [28, 29]. Nichtsdestotrotz trägt auch Speichel als Virusträger zur weltweiten Verbreitung bei. Ein weiterer Grund für das ausgedehnte globale Vorkommen sind außerdem fäkal-orale Transmissionsrouten und strukturelle Ähnlichkeit zu enterischen Viren. Daraus abgeleitet kann TTV als Indikator für virale Kontamination genutzt werden [30].

Die weite Verbreitung macht TTV zu einem allgegenwärtigen Virus in der Bevölkerung und es scheint ihm oftmals möglich, sich der Immunabwehr des Wirtes zu entziehen [31]. Da bisher keine direkte Pathogenität nachgewiesen werden konnte, wurden keine gezielten Maßnahmen zur Unterbindung der Transmission ergriffen.

1.1.4. TTV als prädiktiver Marker

Das ubiquitäre Vorkommen von TTV und eine bisher nicht nachgewiesene Pathogenität bilden eine Grundvoraussetzung, um als möglicher prädiktiver Marker bei Erkrankungen oder Therapien fungieren zu können. Die Höhe der Torque Teno-Viruslast (TTVL) spiegelt dabei vermutlich den Immunstatus des Einzelnen wider. So konnte bereits gezeigt werden, dass Immunsupprimierte höhere TT-Viruslasten aufweisen als Immunkompetente [32]. TTV verfügt über eine hohe und dynamische Replikationsrate in vivo. Die Kinetik der Viruslast und -elimination unter Interferon-Therapie zeigt eine sehr aktive chronische Infektion, wobei 90% der Virionen täglich im Körper abgebaut und erneuert werden [33]. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die Replikation des TTV Genoms auch durch das Immunsystem des Wirts kontrolliert wird, da höhere TTV-Titer bei PatientInnen mit Immundefizienz wie beispielsweise dem „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ (AIDS) [32, 34] im Rahmen einer HIV-Infektion und anderen chronischen Erkrankungen [35] nachgewiesen wurden.

Neben der Untersuchung von TTV im Rahmen von Infektionserkrankungen, vor allem bei HIV-Infektionen, stellen viele Studien zu TTV als Biomarker in SOT (*Solid organ transplantation*) [36, 37] und HSCT (Hämatopoetische Stammzelltransplantation) [38, 39] ein weiteres wichtiges Themenfeld dar. BehandlerInnen sind auf der Suche nach einem Instrument zur gleichzeitigen Erkennung von Über- und Unterimmunsuppression, welches routinemäßig nach Transplantationen zum optimalen Monitoring der immunsuppressiven Medikamente verwendet werden kann. Auch hier ist das Ziel, diese Medikamente auf individueller Ebene zu steuern und dabei ihre Wirksamkeit, bei gleichzeitiger Minimierung von Nebenwirkungen, zu optimieren [36]. Das Virus bleibt durch herkömmliche antivirale Arzneimitteltherapien unbeeinflusst [40] und zeigt eine hohe Resistenz gegenüber Inaktivierungsverfahren [41]. Die TTVL zeigte eine Verbindung mit Abstoßung und Infektionen bei Empfängern von Transplantaten fester Organe, die möglicherweise auf eine unzureichende Immunsuppression zurückzuführen ist. Für Lungen- sowie Nierentransplantationen wurden spezifische Cutoff-Werte vorgeschlagen, um das Risiko solcher Ereignisse zu stratifizieren. Die Messung der TTVL erlaubt bisher keine sichere Diagnose von Abstoßung und Infektion, kann aber RisikopatientInnen definieren. Dabei reflektieren höhere TTV-DNA-Spiegel eine stärkere

Immunsuppression, während eine Abnahme der TTVL auf eine Abstoßungsreaktion Hinweis gibt [42].

Erwähnenswert ist außerdem, dass ein Zusammenhang zwischen der TTVL und der Reaktion auf die Impfung gegen SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) bei EmpfängerInnen von Nierentransplantaten und in der Normalbevölkerung nachgewiesen werden konnte; womöglich der Beginn eines weiteren Anwendungsgebietes für TTV-DNA als prädiktiver Marker [43, 44]. Mendes-Correa et al. konnten zeigen, dass die sequenzielle TTV-Messung im Speichel nützlich sein kann, um die Wahrscheinlichkeit des Abklingens der Symptome bei SARS-CoV-2-positiven Personen zu beurteilen und die Prognose der Krankheitsverlaufes vorherzusagen [45]. So könnte eine Bestimmung der TTVL auch bei anderen Erkrankungen respektive Infektionen genutzt werden. Relevant wäre hier, ob Veränderungen der TTVL bei HIV-Infizierten auch im Falle zusätzlicher Erkrankungen genutzt werden kann, um PatientInnen mit erhöhtem Risiko für einen komplikationsreichen Verlauf frühzeitig zu identifizieren [46, 47].

1.2. Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

1.2.1. Hintergrund

Vor über 30 Jahren wurden erstmals PatientInnen mit dem Erworbenen Immun-Defizienz-Syndrom (AIDS) in Kliniken in den US-amerikanischen Städten New York und Kalifornien beobachtet. Aufgrund des damals neuartigen Symptomkomplexes der Immunsuppression mit Pneumonien und tödlichen verlaufenden Pilzinfektionen, begann weltweit eine Suche nach dem Auslöser. Schließlich konnten Luc Antoine Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi das Humane Immundefizienz Virus (HIV) bei PatientInnen mit AIDS isolieren [48]. Seit 1981 haben sich nach Angaben von UNAIDS mehr als 78 Millionen Menschen mit HIV infiziert und bei 35 Mio. Menschen hatte die Infektion einen letalen Verlauf. UNAIDS schätzt, dass allein im Jahr 2022 39 Millionen Menschen mit HIV leben, wovon 1,3 Millionen Neuinfektionen und 630 Tsd. Todesfälle sind. Trotz großer Bemühungen und immer besser verfügbarer Tests kennen weiterhin nur gut dreiviertel der Betroffenen ihren positiven HIV-Status [49].

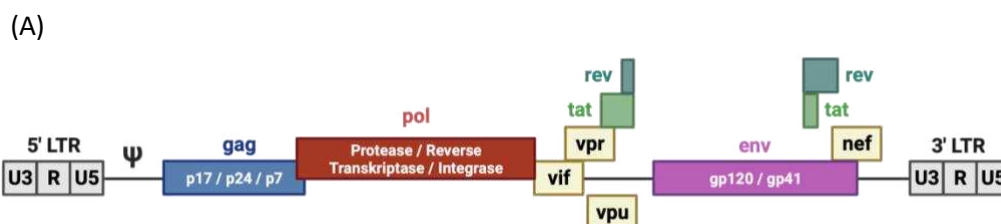
Dank umfassender Forschung wurden seit Beginn der Epidemie mehr als 40 antiretrovirale Medikamente zur Kontrolle der Virusvermehrung entwickelt [50]. Diese werden standardmäßig in Kombinationstherapien, der sogenannten kombinierten antiretroviralen Therapie (cART), verabreicht [50]. Abgesehen von der großen Zunahme an Infizierten, die

Zugang zur cART haben, waren im Jahr 2021 nichtsdestotrotz noch immer 26% der HIV-positiven Menschen ohne Zugang zu lebensrettenden bzw. -verlängernden Therapien [49].

Seit 1996 hat der Einsatz der cART zu einer Stabilisierung des Immunstatus und einer drastischen Reduktion von Morbidität und Mortalität bei HIV-Infizierten geführt. Heutzutage haben PatientInnen mit HIV nur eine etwas geringere Lebenserwartung als Nichtinfizierte - auch dank der intensiven medizinischen Kontrollen [51-53]. Nichtsdestotrotz ist die Resistenzentwicklung des HI-Virus ein fortwährendes Problem in der Versorgung der PatientInnen. In diesem Zusammenhang wurde Anfang der 2000er das prospektive Projekt RESINA (primary drug RESistance in treatment Naive HIV-infected patients) initiiert, welches vor Therapiestart die übertragenen Resistenzen bei HIV und die Resistenzentwicklung bei jedem Therapiewechsel beobachtet [54]. Die RESINA-Studie umfasst knapp 4000 PatientInnen und bietet eine umfassende Datenlage aus klinischen und virologischen Parametern. Aufgrund ihrer Größe durch die Teilnahme von zum jetzigen Zeitpunkt 37 HIV-Zentren aus NRW in Zusammenarbeit mit dem RKI (Robert Koch Institut) gelten die Ergebnisse dieser Population als repräsentativ für die in Nordrhein-Westfalen lebende HIV-Kohorte [55].

1.2.2. Das HIV-Genom und der Replikationszyklus

Das HIV-Genom besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA (Ribonukleinsäure)-Molekülen, die im Kern des Viruspartikels eingeschlossen sind. Das Genom des HIV-Provirus, auch als provirale DNA bezeichnet, entsteht durch die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms in DNA, den Abbau der RNA und die Integration der doppelsträngigen HIV-DNA in das menschliche Genom.



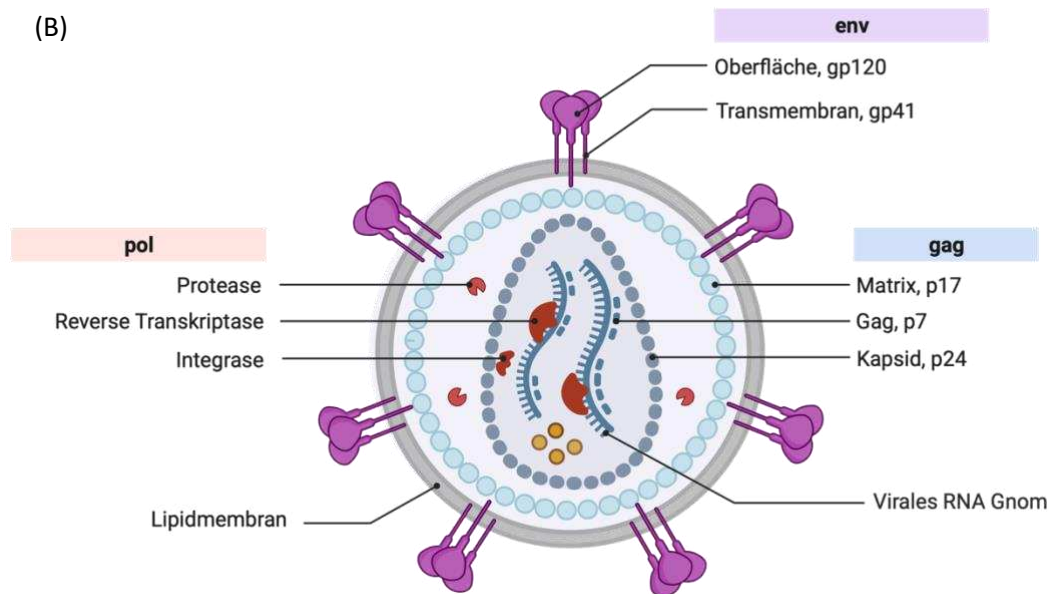


Abb. 2: (A) Das HIV-Genom, (B) Struktur eines HIV-Viruspartikels mit antiretroviralen Zielstrukturen:

Das DNA-Genom wird an beiden Enden von LTR-Sequenzen (Long Terminal Repeat) umgeben. Die 5'-LTR-Region kodiert den Promotor für die Transkription der viralen Gene. In Richtung 5' bis 3' folgt das Leseraster des gag-Gens, das für die Proteine der äußeren Kernmembran (p17), das Kapsidprotein (p24), das Nukleokapsid (p7) kodiert. Auf das gag-Leseraster schließt sich das pol-Leseraster, das für die Enzyme Protease (p12), Reverse Transkriptase (p51) und RNase H (p15) und Integrase (p32) kodiert. An das pol-Gen knüpft sich das env-Leseraster an, von dem sich die beiden Hüllglykoproteine gp120 (Oberflächenprotein) und gp41 (Transmembranprotein) ableiten. Neben den Strukturproteinen kodiert das HIV-Genom auch für mehrere regulatorische Proteine: Tat (Transaktivatorprotein) und Rev (RNA-Spleißregulator) sind für die Initiierung der HIV-Replikation notwendig [56, 57] Angepasst von „HIV-1 Genome and Structure“, von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Die Kenntnis des HIV-Replikationszyklus ist für das Verständnis der Wirkungsweise sowie für die Entwicklung von neuen antiretroviralen Medikamenten von entscheidender Bedeutung (siehe Abbildung 2).

Der erste Schritt im HIV-Replikationszyklus ist die Interaktion zwischen dem Oberflächenglykoprotein gp120 des reifen HIV-Partikels und spezifischen Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle (CD4-Rezeptoren). Zusätzlich zu CD4 benötigt das humane HIV einen Co-Rezeptor für den Eintritt in die Zielzellen. Nach der Bindung an das CD4-Molekül über die C4-Domäne von gp120 kommt es zu einer Konformationsänderung von CD4 und gp120, die eine zusätzliche Stelle für gp120 öffnet, um die Bindung an einen Co-Rezeptor

auf der Zelloberfläche zu ermöglichen [58, 59]. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 sind die wichtigsten Korezeptoren für den Eintritt von HIV in seine Zielzellen. Die Bindung von HIV an Co-Rezeptoren führt zu einer erneuten strukturellen Veränderung in den Hüllproteinen, die schließlich zu einer Fusion der Virushülle mit der Cytoplasmamembran der Zielzelle führt. Durch die Fusion entsteht eine Eintrittspore, durch die das virale Kapsid in die Zelle gelangt. Nach dem Eintritt in die Zelle katalysiert das virale Enzym Reverse Transkriptase die Umwandlung der viralen RNA in provirale DNA. Diese provirale DNA gelangt in den Zellkern und wird als Integrationsschritt in die chromosomale DNA der Wirtszelle eingebaut, was die Basis der Chronifizierung der Infektion bildet. Die Expression der viralen Gene führt zur Produktion von viralen Vorläuferproteinen. Diese Proteine und die virale RNA werden an der Zelloberfläche zu neuen Viruspartikeln zusammengebaut (*Assembly*) und werden anschließend freigesetzt (*Budding*). Währenddessen erhalten sie die äußere Schicht und die Hülle. In diesem Stadium spaltet das Enzym Protease die viralen Vorläuferproteine in ihre reifen Produkte und der Replikationszyklus kann von vorne beginnen (siehe Abbildung 3) [60-62].

HIV ist ein behülltes Retrovirus mit großer genetischer Variabilität. Diese Diversität ist eine Folge der hohen Replikations- und hohen Mutationsrate [63-65]. So führt dies zur Entstehung von verschiedenen HIV-Varianten bei einem einzigen infizierten Menschen im Verlauf eines einzigen Tages, der sogenannten Quasispezies [63].

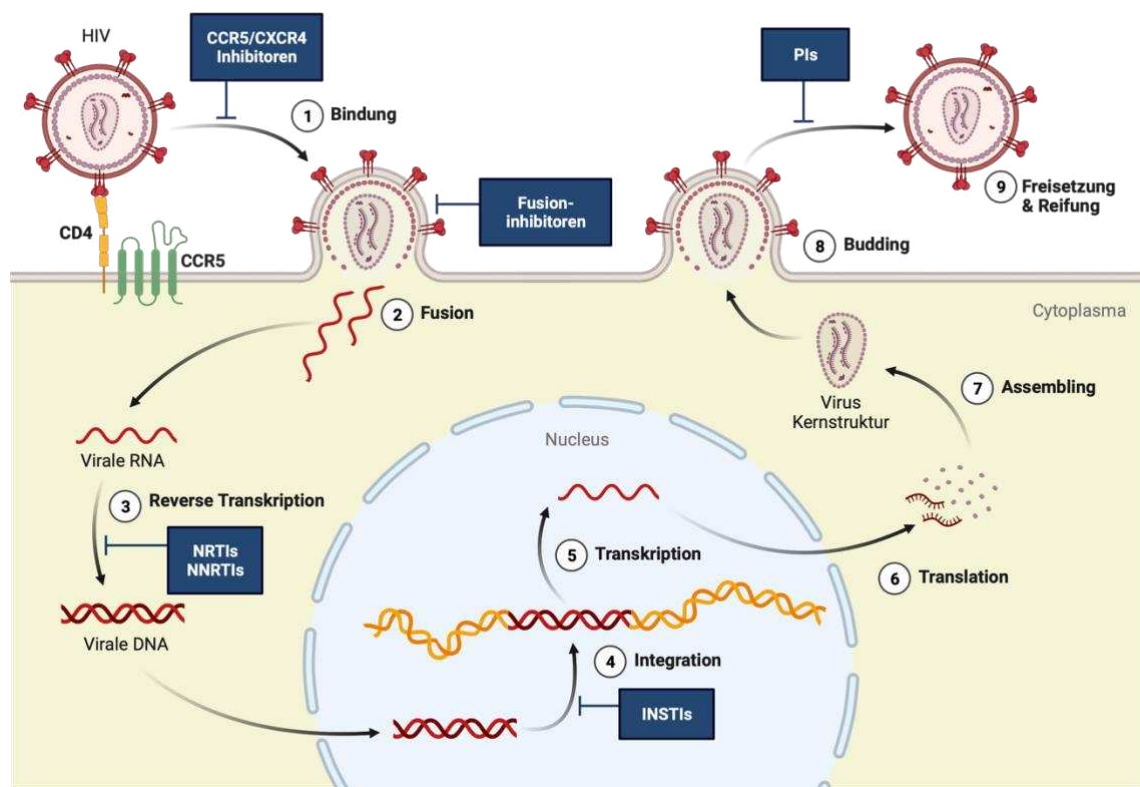


Abb. 3: HIV-Replikationszyklus: Die Phasen des Replikationszyklus als Angriffsstellen der cART. Angepasst von "HIV Site for Therapeutic Intervention", von BioRender.com (2024). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.2.3. Die kombinierte antiretrovirale Therapie

Die kombinierte antiretrovirale Therapie beschreibt die Behandlung mit einer Reihe von Substanzklassen an HIV-Medikamenten zur Kontrolle der Infektion. Menschen unter cART haben trotz der chronischen Infektion eine hohe Lebenserwartung, außerdem reduziert die cART das HIV-Transmissionsrisiko, führt jedoch nicht zu einer Ausheilung [66].

Die cART sollte unabhängig von Immunstatus und Plasmaviruslast gemäß der aktuellen AWMF-Leitlinie (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.) in Deutschland und Österreich dauerhaft bei einer HIV-Infektion eingeleitet werden [67]. In den ersten Jahren der Verfügbarkeit der cART fluktuieren die Kriterien zur cART-Initiation stark v.a. in Abhängigkeit der CD4-T-Zellzahl [68]. Ein frühzeitiger Start der cART ist wichtig, da so das Risiko von AIDS-definierenden oder opportunistischen Erkrankungen reduziert wird [67].

Ziel der HIV-Medikamente ist es, die Vermehrung von HIV im menschlichen Organismus zu verhindern. In der antiretroviralen Therapie werden verschiedene Medikamentenklassen eingesetzt, im Allgemeinen nach der Phase des HIV-Lebenszyklus eingeteilt, die sie hemmen.

1.2.4. Übertragung und Klinik

HIV wird hauptsächlich durch Blut aber auch durch andere infektiöse Körperflüssigkeiten übertragen, wie Sperma, Vaginal- und Darmsekret. Der häufigste Übertragungsweg ist ungeschützter Geschlechtsverkehr, wobei die Infektiosität von der Art des Kontaktes respektive den beteiligten Schleimhäuten sowie Körperflüssigkeiten, aber auch von der HI-Viruslast des Übertragenden abhängt. Weitere Wege sind der gemeinsame Gebrauch von Spritzen und deren Zubehör bei DrogenkonsumentInnen sowie die peripartale Transmission unter der Geburt [69].

Die Klinik und damit der natürliche Verlauf einer Infektion mit HIV gliedern sich in 3 Phasen: akute Infektion, chronisch / latente Phase und schließlich das AIDS-Stadium. Nach einer Inkubationszeit von ein bis sechs Wochen beginnt die akute Phase, die vor allem durch eine sehr hohe Infektiosität gekennzeichnet ist. Hier können sich symptomatische und beschwerdefreie Phasen abwechseln. Man spricht daher vom Bild einer intermittierenden Symptomatik. Insgesamt nimmt der zelluläre Immundefekt langsam zu und HIV-assoziierte Erkrankungen treten auf. Jedoch zeigen die PatientInnen noch keine sog. AIDS-definierenden Erkrankungen. Sofern auch im Stadium der Latenz keine Diagnosestellung und folglich Therapieinitiierung stattgefunden hat, kommt es im Median nach acht bis zehn Jahren zum AIDS [70]. Dies ist durch die AIDS-definierenden Erkrankungen abgegrenzt, die vor allem eine Vielzahl an Infektionen sowie Krebserkrankungen beinhalten und damit jede für sich einen potenziell letalen Ausgang haben können.

1.2.5. CDC-Stadien

Zur Stadieneinteilung bei Erstdiagnose sowie im Falle eines Krankheitsprogresses werden die von der US-amerikanischen Organisation *Centers for Disease Control and Prevention* etablierten sog. CDC-Stadien verwendet (siehe Tabelle 1) [71, 72]. Dabei fließen das Alter der untersuchten Person zum Zeitpunkt der Untersuchung sowie die absolute Zahl an CD4+-T-Lymphozyten / μ l (Mikroliter) oder falls nicht vorhanden der prozentuale Anteil CD4+-T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten im Blut ein. So wird neben den AIDS-definierenden Erkrankungen eben auch der Immunstatus berücksichtigt, die Zuordnung kann in der Tabelle abgelesen werden (siehe Tabelle 1) [73].

Tabelle 1: CDC-Stadien (2014): Stadium der HIV-Infektion auf der Grundlage der altersspezifischen CD4+ T-Lymphozytenzahl oder des prozentualen Anteils der CD4+ T-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten

Stadium	Alter zum Zeitpunkt der CD4+-T-Lymphozyten-Messung
---------	--

	< 1 Jahr		1-5 Jahre		≥ 6 Jahre	
	Zellen / μl	%	Zellen / μl	%	Zellen / μl	%
1	≥1.500	≥34	≥1.000	≥30	≥500	≥26
2	750–1.499	26–33	500–999	22–29	200–499	14–25
3	<750	<26	<500	<22	<200	<14

1.2.6. Besondere Subgruppen von HIV-positiven Menschen und klinische Herausforderungen

Eine besondere Gruppe an PatientInnen stellen die sogenannten *Late Presenter* dar. Sie zeichnen sich durch eine sehr späte Erstvorstellung zur HIV-Versorgung aus. Per Definition wird hier die HIV-Diagnose erst bei einer CD4-Zahl von weniger als 350 Zellen/ μL gestellt oder es sind bereits AIDS-definierende Ereignisse, unabhängig von der CD4-Zellzahl, aufgetreten [74]. Gerade bei diesem PatientInnenkollektiv sollte eine cART zeitnah begonnen werden, sodass z.B. opportunistische Erkrankungen schneller abklingen können [75]. Allerdings birgt dies u.a. das Risiko eines sogenannten Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS). Dabei kommt es zu einer dysregulierten Immunantwort, die nach Beginn der cART einsetzt und durch eine paradoxe Verschlechterung der Infektion gekennzeichnet ist [76]. Folglich ist hier eine intensive Therapie unter engmaschiger medizinischer Kontrolle indiziert. Gerade bei diesem vulnerablen Kollektiv wäre daher ein weiterer Surrogatparameter zur Vorhersage von schlechter Immunrekonstitution oder Komplikationen wünschenswert.

So liefern bestimmte PatientInnengruppen wie auch die Late Presenter eindruckliche Beispiele dafür, wie das Immunsystem die virale Vermehrung ohne antiretrovirale Medikamente hemmen kann, jedoch sind die genauen Mechanismen weiterhin ungeklärt. Da diese Subgruppen aber im Alltag der BehandlerInnen relevant sind, könnte die Analyse von TTVL helfen, eine frühere und bessere Zuordnung oder Risikoeinschätzung der PatientInnen vorzunehmen.

Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass die klinischen Verläufe bei HIV-Infizierten sehr heterogen sein können. In der vorliegenden Studie lag der Fokus auf der Vorhersage des immunologischen Ansprechens auf eine cART. Obwohl dies ein bedeutender Aspekt der HIV-Behandlung ist, bleibt die Komplexität der klinischen Verläufe weiterhin von großem Interesse der klinischen BehandlerInnen. Neben der immunologischen Reaktion wären Prognosen hinsichtlich der Infektionsverläufe ebenso von höchster Relevanz. Das Verständnis der

individuellen Entwicklung einer jeden HIV-Infektion kann TherapeutInnen dabei helfen, gezieltere und personalisierte therapeutische Entscheidungen zu treffen und somit eine optimale Versorgung für PatientInnen zu gewährleisten.

1.2.7. Diagnostik

Die initiale HIV-Diagnostik erfolgt in einem zweistufigen Testverfahren (Screening- und Bestätigungstest) [77]. Im Verlauf sowie zur Kontrolle des Therapieansprechens der cART dient die HI-Viruslastbestimmung mittels PCR zusammen mit der Messung von CD4+-T-Zellen als sehr wichtiger Parameter. Die Viruslast beschreibt dabei virale Replikation, wohingegen die CD4+-T-Zellzahl Aufschluss über den aktuellen Status des Immunsystems geben kann. Eine erfolgreiche cART reduziert die Viruslast und stabilisiert das Immunsystem. So sind zur Sicherstellung einer optimalen Therapie regelmäßige diagnostische Kontrollen dieser Parameter essenziell [70, 71, 78].

1.3. Ethikvotum

Ein gültiges Ethikvotum vom 07.11.2016 mit der Referenznummer 2014042307 und der internen Studiennummer 4862R liegt vor.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die HIV-RNA Konzentration im Blutplasma gilt als Marker für die Aktivität der viralen Replikation, während die CD4+ T-Zellen den aktuellen Immunstatus widerspiegeln. Jedoch ist eine genaue Vorhersage bezüglich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Immunrekonstitution nach Beginn der cART derzeit nicht möglich. Da derzeit spezifische Parameter für eine präzise Prognose fehlen, basieren die Einschätzungen auf dem aktuellen Zustand der PatientInnen sowie der klinischen Erfahrung des Behandelnden.

So hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, die TT-Virämie bei asymptomatischen HIV-infizierten PatientInnen vor Therapiestart als möglichen zusätzlichen prognostischen Marker zur Vorhersage der Immunrekonstitution unter antiretrovirale Therapie zu untersuchen. Es sollte analysiert werden, inwiefern TTV neben der CD4-Zellzahl als Standardparameter zur Überwachung des Immunstatus genutzt werden könnte, um den Verlauf der HIV-Infektion genauer zu erfassen. Dies könnte dazu beitragen, individuelle Therapiepläne besser zu erstellen und potenzielle Komplikationen wie IRIS oder Folgen der persistierenden Virusinfektion (z.B. opportunistische Infektionen, AIDS-definierende Erkrankungen, Einschränkung von Lebensqualität und -erwartung) besser zu prognostizieren. Im Rahmen der Immunrekonstitution kann es zu einer Reaktivierung persistenter Viren mit

immunsuppressiven Aktivitäten wie den Herpesviren kommen. Daher sollte auch die Quantifizierung von replizierenden Herpesviren CMV (Zytomegalievirus), EBV (Epstein-Barr-Virus) und HHV-8 (Humanes Herpesvirus 8) neben HI-Viruslast, und Geschlecht auf signifikante Zusammenhänge untersucht werden. Die Bestimmung der Immunrekonstitution vor Therapiestart könnte helfen, die genannten Risiken zu minimieren und so eine optimale personalisierte Versorgung der PatientInnen zu gewährleisten.

2 Publierte Originalarbeit

2.1 Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients

Infection (2021) 49:501–509
<https://doi.org/10.1007/s15010-020-01573-7>

ORIGINAL PAPER



Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients

L. Schmidt¹ · B.-E. O. Jensen² · A. Walker¹ · V. Keitel-Anselmino² · V. di Cristanziano³ · M. Böhm³ · E. Knops³ · E. Heger³ · R. Kaiser³ · A. de Luca⁴ · M. Oette⁵ · D. Häussinger² · J. Timm¹ · A. Fuchs⁶ · N. Lübke¹

Received: 15 June 2020 / Accepted: 30 December 2020 / Published online: 3 February 2021
 © The Author(s) 2021

Abstract

Purpose To predict the course of immune recovery (IR) in HIV-1-infected patients after initiation of combined antiretroviral therapy (cART) by determination of the plasma concentration of Torque Teno Virus (TTV).

TTV has been identified as marker for risk assessment in immunosuppressed patients after transplantation procedures. Here, TTV was analyzed in HIV-1-infected therapy-naïve patients to evaluate its use as predictor of the course of IR for guidance of individualized treatment.

Methods TTV DNA was quantified in plasma samples of 301 therapy-naïve HIV-1-infected patients and correlated to CD4⁺ cell count, HIV viral load, presence of the herpes viruses CMV, EBV and HHV-8, age and sex. Patients were classified according to their initial CD4⁺ cell count and to the extent of CD4⁺ T-cell increase within the first year of cART.

Results TTV DNA was detectable in 96% of the patients' plasma samples with a median TTV plasma concentration of 5.37 log₁₀ cop/ml. The baseline CD4⁺ cell count was negatively correlated with TTV plasma concentration ($p=0.003$). In patients with a CD4⁺ cell recovery < 50 cells/μl, the median TTV plasma concentration was significantly higher compared to patients with a CD4⁺ cell recovery of > 200 CD4⁺ cells/μl (5.68 log₁₀ cop/ml versus 4.99 log₁₀ cop/ml; $p=0.011$). TTV plasma concentration in combination with baseline CD4⁺ cell count were significantly correlated to CD4⁺ cell recovery ($p=0.004$). For all other parameters considered, no significant correlation for CD4⁺ cell recovery was found.

Conclusion Within the cohort, the significantly elevated TTV plasma concentration in patients with diminished CD4⁺ cell recovery indicates a more profound immune defect. Baseline TTV plasma concentrations and CD4⁺ cell count are predictive for the course of immune recovery in HIV-1-infected patients with severe immunodeficiency.

Keywords HIV infection · Torque Teno Virus · Immune recovery · Predictive marker · Individualized treatment

A. Fuchs and N. Lübke share last authorship

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01573-7>.

✉ B.-E. O. Jensen
 bjoern-erikole.jensen@med.uni-duesseldorf.de

¹ Institute of Virology, University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

² Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Hospital Düsseldorf, Heinrich-Heine-University, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

³ Institute of Virology, University of Cologne, Cologne, Germany

Introduction

HIV infection can be effectively treated leading to life expectancy comparable to the non-infected population [1]. Despite excellent therapeutic options for suppression of viral

⁴ Infectious Diseases Unit, University of Siena, Siena, Italy

⁵ Department of General Medicine, Gastroenterology and Infectious Diseases, Augustinerinnen Hospital, Cologne, Germany

⁶ Department of Infectious Diseases, Tropical Medicine, Nephrology and Rheumatology, Hospital St. Georg, Leipzig, Germany

replication, a functional cure is not expected in the near future. Thus, effective combination antiretroviral therapy (cART) remains the gold standard in HIV care. Although newly developed drug classes and substances are characterized by high potency and improved tolerability [2], side effects and limited therapeutic responses remain an issue.

Management of HIV infection and individualized treatment decisions are based on characteristics of the drugs (e.g., toxicities and pharmacokinetic profiles), the virus (e.g., viral drug resistance profile and tropism) and the patient (e.g., drug adherence, antiretroviral drug history, interactions, comorbidities, coinfections and individual differences in immune control) [3, 4]. Accordingly, multiple factors need to be considered and collectively illustrate the complexity of individualized HIV therapy. While the characteristics of drugs and the virus are well studied and mostly considered in treatment options [5, 6], host characteristics are less well understood [7].

During HIV-infection, immunodeficiency occurs and, if left untreated, finally leads to AIDS. The routine diagnostic evaluation comprises mainly of viral load measurement and the determination of the number of CD4⁺ T-cells. In absence of cART, the viral load in each patient reaches an individual set point and the time until CD4⁺ T-cells decline differs individually. While the HIV viral load is considered as a marker of the driving force of immunodeficiency, the CD4⁺ T-cell count reflects the degree of deficiency that has occurred. However, a reliable prediction of the extent and speed of recovery of the immune system after initiation of cART is not possible to date and estimates are based on the patient's current condition and the clinical experience of the practitioner. The possibility to predict the course of immune recovery (IR) could be helpful for guidance of individualized treatment concepts and risk assessment. This guidance could be applied, for example, before initiation of therapy with a two drug regimen, to monitor induction-maintenance treatment strategies, to support decisions about prophylactic treatment, to reduce drug toxicities or to decrease the risk of the development of an immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in specific risk groups by sequential or later treatment initiation [8]. We hypothesised that the Torque Teno Virus (TTV) plasma level can be used for prediction of the course or the degree of IR upon initiation of cART supporting individualized treatment strategies.

The Torque Teno virus is a small virus with a single stranded negative-sense circular DNA genome from the family of Anelloviridae and is the most abundant component of the human total blood virome. TTV is highly prevalent in humans, but to date without causal evidence for an association to specific clinical diseases [9, 10]. The reservoir of TTV replication is not fully understood, but hematopoietic stem cells and activated peripheral blood mononuclear cells seem to be involved [11–13]. TTV DNA in plasma is

detectable in up to >90% of healthy people [10, 14] with viral loads between 3 and 6 log₁₀ copies/ml. The virus concentration in blood reflects the interplay between TTV replication and antiviral immune response, with an estimated daily clearance rate of more than 90% of virions [14–17].

Up to now only a few smaller studies have been performed on TTV in HIV-infected patients. In this group of patients, a higher frequency of positive TTV-DNA plasma samples than in healthy blood donors and an inverse correlation between TTV plasma levels and the CD4⁺ T-cell count were described [18, 19]. In turn, progression towards AIDS leads to increased TTV plasma concentration in tissues of HIV infected patients [20]. In addition, successful cART with improved immune function led to a decrease of the TTV DNA plasma level [21]. Although TTV replication was detected in all studied HIV patients with efficient cART, no correlation was found between the level of TTV viremia or genotypes and the level of persistent T-cell activation [22, 23].

The idea to evaluate TTV as a predictive marker for the course of IR in HIV-infected patients is based on investigations performed in the context of organ and stem cell transplantation. In the context of HSCT, TTV has proven its potential as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease (GVHD) and as marker for functional immune competence [24, 25]. In solid organ transplant recipients, a correlation between TTV plasma levels and the intensity of immunosuppression, signs of transplant rejection and the occurrence of infection periods was shown [26–28]. In contrast, in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) TTV plasma levels themselves are not predictive for immune-related outcomes and clinical events, probably due to the complex and dynamic processes in the hematopoietic and immune systems after HSCT [25]. Since HIV infection is also leading to immunosuppression with an increased risk of opportunistic infections including reactivation of persistent viruses with immunosuppressive activities such as the herpesviruses *Cytomegalovirus* (CMV), *Epstein-Barr virus* (EBV), and *Human Herpesvirus 8* (HHV-8), the speed of IR after initiation of cART is an important information. However, its course is largely unpredictable to date.

Thus, the aim of the study was to evaluate the possible utilization of TTV plasma levels in HIV-infected patients for prediction of IR during cART assessed by CD4⁺ cell increase by measurement of TTV-DNA in blood plasma of asymptomatic therapy-naïve HIV-1 infected patients and correlation of the TTV plasma level with immunological, virological and biophysical parameters.

Methods

Study population

The analysis of TTV plasma level was performed from long-term stored blood samples of patients included in the RESINA cohort. The RESINA study is an ongoing prospective multicenter investigation with the primary goal of continuous surveillance of transmitted HIV drug resistance in therapy-naïve HIV-1 infected patients before initiation of antiretroviral therapy [29]. In total, 38 study centers (out-patient clinics and doctor's offices providing specialized HIV care) from North Rhine-Westphalia, the most populous federal state in Germany, and adjacent cities in Rhineland Palatinate, a neighboring federal state are contributing to the study which currently includes 4815 patients. Inclusion criteria for the RESINA study are documented HIV-infection, eligibility for cART and the agreement between treating physician and patient to start treatment. Exclusion criteria are prior exposure to antiretroviral drugs and unwillingness to participate. Information on CD4⁺ T-cell count and HIV plasma concentration used for interpretation of study data were available from the documented cohort information. All plasma samples collected within the RESINA cohort are stored long-term at -80°C to ensure sufficient stability of the viral nucleic acids [30–33].

Plasma sample selection and classification

The samples for this study were retrospectively selected according to the following inclusion criteria (1) cART start without AIDS event before or within the first 3 months after start of therapy, (2) CD4⁺ T-cell count $< 500/\mu\text{l}$ at start of cART and (3) HIV viral load < 200 copies/ml without virological failure defined as HIV viral load ≥ 200 copies/ml in two successive check-ups within the first 2 years after therapy initiation.

Of a total of 4815 therapy-naïve HIV-1-infected patients in the RESINA cohort, 364 fulfilled the inclusion criteria. Plasma samples for study investigations were available in 301 of those patients. These 301 patients were included in the study and classified into 3 groups according to the patients' CD4⁺ cell recovery within the first year on cART (< 50 , $50\text{--}200$ and > 200 CD4⁺ cells/ μl). This classification was chosen to differentiate between possible clinical courses with sufficient immune reconstitution resulting in very low risk for opportunistic infections after 1 year (CD4⁺ cell increase $> 200/\mu\text{l}$), possible persistence of a relevant immune deficiency (CD4⁺ cell increase $50\text{--}200/\mu\text{l}$) and poor immune reconstitution with only minor change in CD4⁺ cell count (CD4 cell increase $< 50/\mu\text{l}$) [34].

For clinical applicability, the data were additionally grouped according to the initial immune status, measured by CD4⁺ cell count. The samples were divided into four subgroups (< 100 , $100\text{--}200$, $201\text{--}350$ and > 350 CD4⁺ cells/ μl) based on the initial CD4⁺ cells. The stratification is based on the differentiation of patients with a good to moderate immune status (> 350 cells CD4⁺ cells/ μl) and the so-called late presenters (< 350 CD4⁺ cells/ μl). The late presenters were further divided according to the CD4⁺ thresholds for opportunistic infections (Table 2) [34, 35].

To investigate a possible influence of the presence of different herpesviruses on TTV plasma concentration, the plasma concentrations of CMV, EBV and HHV-8 were determined from all participants, if an adequate sample was available (283/301; 94%).

Virus quantification

The DNA extraction of the EDTA plasma samples was performed automatically using the Bio-Robot EZ1 with the EZ1[®] Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

The TTV-DNA was quantified by real-time PCR (qPCR) as previously described by Maggi et al. [36]. TTV standards were kindly provided by the Department of Virology of the Medical University of Vienna, Austria and stabilized for valid quantification results in the Institute of Virology of Cologne, Germany. Quantification was validated in a collaborative trial.

Quantification of CMV and EBV was performed as described by Schönberger et al. [37] and qPCR of HHV-8 was performed by amplification of a fragment of the HHV-8 ORF26 gene region using the TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Statistical analyses

The determined TTV DNA plasma level presented a high range in the analyzed cohort. For this reason, the unit of copies per milliliter was changed to $\log_{10}$ values to allow differences in the analyzed groups to be captured in diagrams. Using TTV plasma level by $\log_{10}$ scale, the status of the Kolmogorov–Smirnov test presented a p value greater 0.05 ($p = 0.09$), so that a Gaussian distribution can be assumed, allowing parametric tests. T -test and Mann–Whitney- U -Test were used for assessment of a possible selection bias caused by the selection process of study participants depending on sample availability.

A Pearson correlation was used to compare TTV plasma levels, CD4⁺ cell counts and presence of the *Herpesviridae* CMV, EBV, HHV-8 using a 95% confidence interval (CI). In order to analyze the differences between the three groups based on the CD4⁺ T-cell recovery within the first

year ANOVA tests were performed and post hoc tests were applied [Tukey's honest significant difference (HSD)]. In addition, ordinary linear and multiple linear regressions were used to analyze the correlation of sex, age, the presence of the *Herpesviridae* CMV, EBV, HHV-8, and the plasma concentration of HIV and TTV to CD4⁺ T-cell recovery. For all statistical analyses, *p* values < 0.05 were considered significant.

The statistical analyses were performed using SPSS Statistics 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 25.0. Armonk, NY, USA).

Results

According to inclusion criteria, 364 suitable patients were identified within the RESINA cohort. Of those, a stored plasma sample for study investigations was available in 82.7% (301/364). Comparing the mean values of the parameters considered in the two groups of patients with available and unavailable plasma samples, in which individual outliers in the distribution are also taken into account, only a difference regarding the CD4⁺ cell gain of patients was seen (178 cells/ μ l vs. 253 cells/ μ l, *p* = 0.015; Supplemental Table 1), whereas age, HIV-RNA and CD4⁺ cell count at baseline were comparable. However, when using median values, which are less influenced by outliers, this analysis showed no significant differences for all these parameters including CD4⁺ cell gain.

Within the cohort of 301 patients with available plasma samples, 78% were male and the median age was 49 years (range 25–92 years, SD = 11.8 years) (Table 1). The median HIV viral load before initiation of cART was 48,394 copies/ml with an individual range between 40 and 8,858,100 copies/ml. According to the patients' CD4⁺ cell recovery

within the first year on cART and the resulting sustained risk of opportunistic infections, they were classified into three groups [< 50 (*n* = 67), 50–200 (*n* = 115) and > 200 CD4⁺ cells/ μ l (*n* = 119), (Table 2)].

In addition, the patients were stratified according to their initial CD4⁺ cell count to allow for a clinically oriented classification: Patients with a CD4⁺ cell count > 350 cells/ μ l (*n* = 55), who had a good or only moderately compromised immune status, and patients with a more pronounced immune deficiency, the so-called late presenters with a CD4⁺ cell count < 350 cells/ μ l. These patients were additionally classified into subgroups according to their risk for opportunistic infections: < 100 (*n* = 89), 100–200 (*n* = 38) and 201–350 cells/ μ l (*n* = 119) (Table 2).

TTV was detected in 96.0% (289/301) of the analyzed plasma samples. The median TTV plasma concentration was 5.37 log₁₀ copies/ml with a wide range between 0 and 9.30 log₁₀ copies/ml. The majority of patients presented with a baseline CD4⁺ cell count between 201 and 350 (*n* = 119; 40%, Table 1). Although the regression analysis of TTV plasma levels and baseline CD4⁺ cell counts showed a wide scattering of the TTV values, it also shows a significant negative correlation, with TTV plasma concentration being increased in samples from patients with lower CD4⁺ cell counts (*p* = 0.003; *R*² = 0.028, Fig. 1a). This is also confirmed by correlation of the TTV plasma level to the different CD4⁺ strata groups (Fig. 1b) which illustrates the significant negative correlation between the two parameters (*p* = 0.037). In detail, the correlation is particularly evident in the decline in median TTV viral loads with increasing CD4⁺ cell count at baseline.

To evaluate the potential of TTV plasma concentration as predictive marker for immune recovery, the TTV plasma levels were correlated to the CD4⁺ recovery within the first year on cART. The regression analysis shows a significant negative correlation, with patients with a poor immune recovery showing significantly higher TTV viral loads than those with a good one (*p* = 0.003; *R*² = 0.029, Fig. 2a). Looking at the regression based on the stratified groups of CD4⁺ recovery, there are clear differences

Table 1 Patients' characteristics Physiological and clinical characteristics of the patients at the time point of sample collection (*n* = 301)

Category	<i>N</i>	%
Age (median, years)	49 (range 25–92)	
Sex		
Male	234	78
Female	67	22
HIV-RNA (median, cop/ml)	48,394 (range 40–8,858,100)	
TTV-DNA (median, log ₁₀ cop/ml)	5.36 (range 0–9.3)	
CD4 ⁺ cell count at baseline (cells/ μ l)		
< 100	89	30
100–200	38	13
201–350	119	40
> 350	55	18

Table 2 Overview over baseline CD4⁺ cell counts and their gain after initiation of cART in the analysed cohort

CD4 ⁺ cell count at baseline (cells/ μ l)	CD4 ⁺ cell recovery (cells/ μ l)			
	< 50	50–200	> 200	Σ
< 100	11	41	37	89
100–200	10	14	14	38
201–350	22	48	49	119
> 350	24	12	19	55
Σ	67	115	119	301

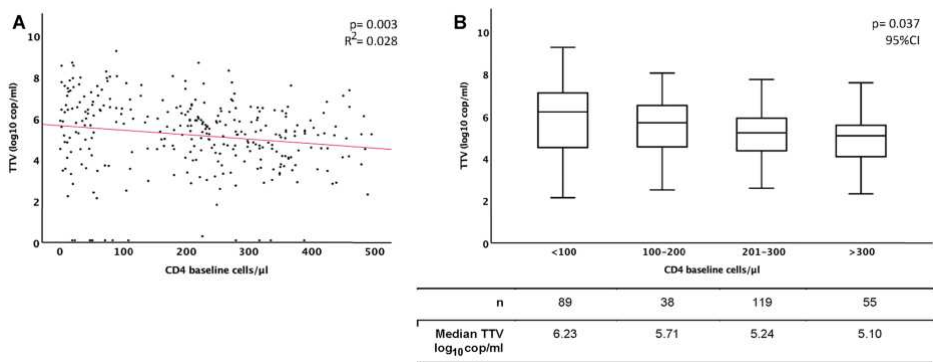


Fig. 1 TTV plasma level correlation with baseline CD4⁺ cell count Correlation between TTV-DNA plasma concentration and the CD4⁺ cell counts before initiation of cART; **a** regression analysis of log₁₀ TTV cop/ml to baseline CD4⁺ cells/μl; **b** correlation of log₁₀ TTV cop/ml to specific defined strata of baseline CD4⁺ cells/μl

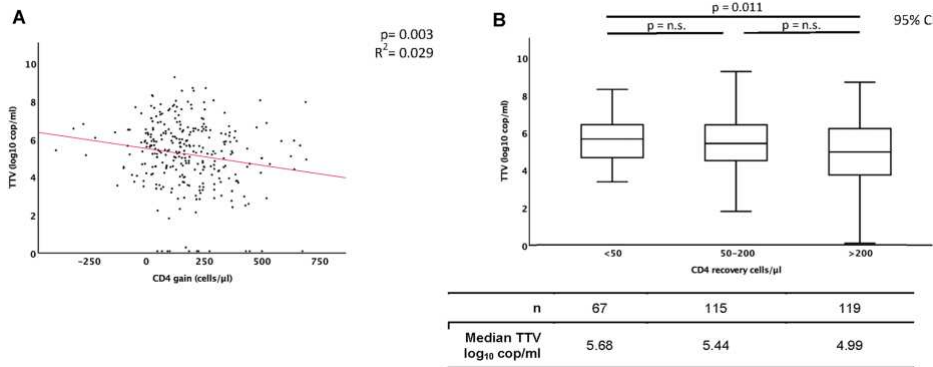


Fig. 2 TTV plasma level correlation with CD4⁺ cell recovery Correlation between TTV-DNA plasma concentration (log₁₀ cop/ml) and the CD4⁺ cell recovery within the first year of cART; **a** regression analysis of log₁₀ TTV cop/ml to gain of CD4⁺ cells/μl; **b** correlation of log₁₀ TTV cop/ml to CD4⁺ cells/μl stratified in a gain of <50, 50–200 and >200 cells/μl within the first year of cART. n.s.: not significant

between the groups (Fig. 2b). Patients with poor recovery of CD4⁺ cells (<50 CD4⁺ cells/μl) showed TTV viremia in 100%. In addition, the TTV plasma levels of patients with CD4⁺ recovery <50 CD4⁺ cells/μl were significantly higher compared to patients with CD4⁺ recovery >200 cells/μl (median 5.68 log₁₀ cop/ml versus 4.99 log₁₀ cop/ml; $p=0.011$). Thus, higher TTV plasma concentration before treatment initiation was significantly correlated to lower CD4⁺ gain within the first year on cART.

Regarding the detection of herpesvirus DNA, adequate samples of 283/301 (94.0%) study participants were available. CMV, EBV and HHV-8 were detected in 35/283 (12.4%), 74/283 (26.1%), and 29/283 (10.2%) samples, respectively. EBV and HHV-8 were not correlated with the initial immune status, whereas CMV DNA was significantly more frequently detected in patients with CD4⁺ cell counts <100 cells/μl (Supplementary Table 2). Furthermore, also the extent of CMV plasma viral load was significantly

inversely correlated with the initial CD4⁺ cell count ($p < 0.001$; Supplementary Fig. 1). A significant correlation of CMV, EBV or HHV-8 detection to TTV prevalence was not observed ($p = 0.085$, $p = 0.652$, $p = 0.277$, respectively; Supplementary Table 3).

For further evaluation of TTV plasma concentration as predictive marker for CD4⁺ recovery, regression analyses including the parameters sex, the presence of CMV, EBV and HHV-8 DNA and CD4⁺ baseline cell count were performed (Table 3). Univariate regression analysis indicated no correlation of sex or detection of CMV, EBV and HHV-8 DNA with CD4⁺ T-cell recovery, but a significant correlation between TTV plasma baseline CD4⁺ values < 100 cells/ μ l and > 350 cells/ μ l and CD4⁺ T-cell recovery within the first year on therapy (OR 0.383, 95%CI 0.190–0.773, $p = 0.006$ and OR 3.554, 95%CI 1.903–6.639, $p < 0.001$, respectively).

Table 3 Univariate regression analysis for parameters associated with CD4⁺ cell recovery within the first year of cART

Variable	N	Univariate analysis	
		OR (95% CI)	p value
Total participants	301		
CD4 ⁺ cell count at baseline (cells/ μ l)			
< 100	89	0.383 (0.190–0.773)	0.006*
100–200	38	1.262 (0.579–2.750)	0.559
201–350	119	0.729 (0.414–1.285)	0.275
> 350	55	3.554 (1.903–6.639)	< 0.001*
Sex			
Male	234	0.915 (0.816–1.107)	0.499
Female	67	1.184 (0.732–1.915)	0.503
CMV DNA positive	35	1.282 (0.506–3.252)	0.600
EBV DNA positive	74	1.019 (0.527–1.968)	0.956
HHV-8 DNA positive	29	0.790 (0.320–1.950)	0.608

Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the selected parameters CD4⁺ cell count at baseline, sex and CMV, EBV and HHV8 DNA detection in correlation to CD4⁺ cell recovery within the first year of cART (*: statistically significant correlation)

Table 4 Multiple linear regression analysis for parameters associated with CD4⁺ cell recovery within the first year of cART

	B	SD	β	p value	Cumulative adjusted R^2
TTV DNA ($\log_{10}$ cop/ml)	− 19.271	5.550	− 0.203	0.001*	
HIV RNA (cop/ml)	− 8.449E-7	< 0.001	− 0.003	0.953	
CD4 ⁺ cell count at baseline (cells/ μ l)	− 0.203	0.073	− 0.165	0.006*	
Sex	4.337	23.493	0.011	0.854	
Age	0.091	0.843	0.006	0.914	
Cumulative adjusted R^2					0.042

Non-standardized regression coefficient (B), standard deviation (SD), standardized regression coefficient beta (β) and p value. The dependent variable was CD4⁺ gain within the first year on cART. Independent variables were TTV DNA $\log_{10}$ plasma level, HIV viral load, CD4⁺ cell count at baseline, sex and age (*: significant correlation). Overall final model (5, 293) = 3.584, $p = 0.004$, $R^2 = 0.058$, adjusted $R^2 = 0.042$

Considering all variables in the multiple linear regression analysis, no association of HIV RNA, sex and age, but a significant correlation between the combination of TTV plasma levels and baseline CD4⁺ values and CD4⁺ recovery within the first year on cART was observed ($p = 0.001$ and $p = 0.006$, respectively; Table 4). In summary, a prediction of the CD4⁺ gain within the first year of cART was possible by determining TTV plasma level and CD4⁺ cell count at baseline (adjusted $R^2 = 0.042$) [38].

Collinearity between CD4⁺ cell count and TTV plasma level could be excluded with a variance inflation factor (VIF) of 1.038 for TTV and a VIF of 1.121 for CD4⁺ cells at baseline. For all other parameters considered, no significant correlation for CD4⁺ cell recovery was found.

Discussion

Currently, routine state-of-the-art monitoring of the extent of immune deficiency caused by an HIV infection usually relies on surveillance of surrogate parameters, most commonly CD4⁺ cell count, but more comprehensive determination of immune status and prediction of IR are difficult. The possibility to further assess immunocompetence and predict the course of IR after initiation of cART would help to guide individualized treatment. Thus, the plasma level of TTV DNA in plasma samples of HIV-1 infected therapy-naïve patients was evaluated for its applicability as novel parameter for the prediction of IR for improved management of personalized HIV treatment concepts.

In our study, 96% of the patients' plasma samples showed evidence for active TTV replication, confirming a high prevalence of TTV in HIV-infected patients [39]. This provides the necessary basis of TTV being a possible predictive marker for IR in HIV-infected therapy-naïve patients commencing cART. The median viral load of TTV in this cohort was 5.37 $\log_{10}$ copies/ml and is comparable to that of other high-risk cohorts [26, 39, 40], but the plasma concentration is characterized by a wide range, namely between 0 and 9.30

$\log_{10}$ copies/ml. This high variation of the TTV plasma level in HIV-infected patients as well as the negative correlation of the TTV plasma level and the baseline CD4⁺ cell count confirms the observations of previous studies [18, 20, 41].

The correlation analysis between TTV plasma level at baseline and CD4⁺ cell recovery within the first year of cART revealed significantly higher TTV loads in patients with a poor recovery (< 50 CD4⁺ cells/ μ l) compared to patients with a good recovery (> 200 CD4⁺ cells/ μ l). There was no influence of CMV, EBV and HHV-8 on TTV plasma level, as also seen in immunosuppressed patients after hematopoietic stem cell transplantation [42]. This indicates the potential of TTV as predictive marker for IR in HIV-1-infected patients.

Ordinary and multiple linear regression analyses including the parameters sex, age, HIV viral load, TTV plasma level, detection of the *Herpesviridae* CMV, EBV or HHV-8 and CD4⁺ baseline values have excluded the parameters sex, age, HIV viral load and the prevalence of herpesvirus DNA as valuable parameters for prediction of CD4⁺ cell recovery. The fact that age has no significant influence on immune reconstitution was initially surprising, as several studies have shown that immune recovery decreases with age [43–45]. Other studies confirm our observation that there is no significant correlation between age and immune recovery [46]. However, it is important to consider the age distribution in our cohort. Although a wide range is noticeable, the two quartiles from 25 to 75% only cover 41.5–56 years (median: 49 years), with a standard deviation of 11.8 years. This indicates only a small age distribution, which may be one of the reasons why no correlation was found in this study. The observation that detection of the various herpes viruses had no significant effect on immune recovery is also an important finding that favors the predictive value of TTV plasma concentration for immune recovery in HIV-infected patients, as our analysis revealed that the combination of TTV plasma level and the initial CD4⁺ cell count was predictive for IR in our cohort.

Although TTV plasma concentration alone showed also a significant correlation to immune recovery, its predictive power was not sufficient to classify IR in defined ordinal scales (< 50, 50–200 and > 200 CD4⁺ cells/ μ l), as also seen in other studies [22, 23]. The combination of TTV plasma concentration and initial CD4⁺ cell count still did not accurately predict the extent of IR, as indicated by the low determination coefficient [47], but the combined predictive power of both variables seems sufficient to provide some guidance to clinicians to predict a good vs. a poor IR, as demonstrated in our analyses.

Although a large data set was available to select suitable patients for this study, not all of the suitable patients had appropriate stored plasma samples available for study investigations (301/364). In particular, 9/76 (11.8%) patient

samples of group A (IR < 50 CD4⁺ cells/ μ l), 25/140 (17.9%) of group B (IR 100–200 CD4⁺ cells/ μ l) and 29/148 (19.6%) of group C (IR > 200 CD4⁺ cells/ μ l) were unavailable. The fact that a plasma sample was not available from all patients who met the inclusion and exclusion criteria for this analysis leads to a risk of a selection bias. When comparing the two groups of patients meeting the inclusion criteria with and without available plasma samples, no significant differences were found for the median values of the investigated parameters. Only the comparison of the mean values revealed a significant difference for the parameter immune response (CD4⁺ cell gain). After examination of the raw data, this difference could mainly be attributed to individual outliers. Therefore, we expect only a small influence of the selection bias on our results, even if it cannot be completely excluded.

One further possible limitation of this retrospective analysis is the sample distribution within the groups. Although the sample size was sufficient to ensure statistical power, there was no even sample distribution within the groups according to CD4⁺ cell gain, as a smaller number of patients with a low CD4⁺ cell gain was available to be analyzed. This distribution can be attributed to the confined number of patients with limited extent of immune reconstitution in the RESINA cohort. Other parameters possibly influencing the CD4⁺ cell recovery are the CD8⁺ cell count or the CD4⁺/CD8⁺ ratio, co-infections as Hepatitis B or Hepatitis C or the treatment regimen used to initiate cART. Unfortunately, the documentation concerning these parameters by the participating centers was quite frequently incomplete. Thus, the parameters were not analyzed systematically during this investigation. Further interesting aspects that should be considered for having a potential impact on IR are the time until viral suppression after initiation of cART or the number and frequency of blips occurring during treatment. Those parameters are to be considered during future prospective investigations to further analyze the impact of TTV plasma level as predictive marker for IR.

In conclusion, the high prevalence of TTV-DNA in blood samples of HIV-1-infected patients provides the necessary precondition for it being used as predictive marker for the recovery of immune function. In this cohort, there was a significant correlation between the baseline TTV plasma level in combination with the CD4⁺ cell count and the course of IR. The combination of a high TTV plasma concentration and low number of CD4⁺ cells before treatment initiation was associated with poor IR within the first year of cART. The determination of the baseline CD4⁺ cell count alone did not predict immune reconstitution.

This study demonstrates the potential of TTV plasma load as a predictive marker of the course of immune reconstitution and as an additional surrogate parameter potentially allowing a more detailed interpretation of retained or lost immunocompetence in HIV-1-infected patients compared to

the CD4⁺ cell count alone. In combination with the baseline CD4⁺ cell count, the TTV DNA plasma level enables clinicians to predict the course of immune reconstitution, which could help to provide guidance for individualized treatment decisions as for example planning of indication and duration of prophylactic anti-infective treatments to prevent opportunistic infections, to avoid unnecessary drug toxicity or before initiating glucocorticoids in tuberculosis patients with high risk of IRIS [48].

Acknowledgements The authors thank all contributing centers, clinicians and patients for the long-term participation in the RESINA Study.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Ethics approval The RESINA study was approved by the local ethics committees for each site. The study was registered with the internal study number 4826R and the registration ID 2014042307.

Consent to participate Written informed consent was obtained from each patient before any screening procedures.

Availability of data and material All data and material are available.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Teeraananchai S, Kerr SJ, Amin J, Ruxrungtham K, Law MG. Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Med.* 2017;18(4):256–66.
- Degli Antoni A, Weimer LE, Fragola V, Giacometti A, Sozio F. A reduction grade of lipodystrophy and limited side effects after HAART regimen with raltegravir, lamivudine, darunavir and ritonavir in an HIV-1 infected patient after six years of antiretroviral therapy. *West Indian Med J.* 2015;64(3):291–3.
- Khan NH, Kohli M, Gupta K, Das BK, Pandey RM, Sinha S. HIV drug resistance mutations in patients with HIV and HIV-TB coinfection after failure of first-line therapy: a prevalence study in a resource-limited setting. *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 2019. <https://doi.org/10.1177/2325958219849061>.
- Archampong T, Ojewale O, Bears K, Chen Y, Lartey M, Sagoe KW, et al. Brief report: relationship between ABC4 SNPs and hepatitis B virus suppression during tenofovir-containing antiretroviral therapy in patients with HIV/HBV coinfection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2019;82(4):421–5.
- Menez S, Hanouneh M, McMahon BA, Fine DM, Atta MG. Pharmacotherapy and treatment options for HIV-associated nephropathy. *Expert Opin Pharmacother.* 2018;19(1):39–48.
- Baumann A, Musaazi J, Kambugu A, Kalin M, Weissberg D, Ssemwanga D, et al. Virological outcome of patients with HIV drug resistance attending an urban outpatient clinic in Uganda: a need for structured adherence counseling and third-line treatment options. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2019;80(4):481–7.
- Dang MD, Nguyen DM, Tran HB, Pham VH, Spak D, Pham LC, et al. Clinical characteristics of pediatric HIV-1 patients treated with first-line antiretroviral therapy in Vietnam: a nested case-control study. *Int J Public Health.* 2017;62(1):113–9.
- Naidoo K, Yende-Zuma N, Padayatchi N, Naidoo K, Jithoo N, Nair G, et al. The immune reconstitution inflammatory syndrome after antiretroviral therapy initiation in patients with tuberculosis: findings from the SAPIT trial. *Ann Intern Med.* 2012;157(5):313–24.
- Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):98–113.
- Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;331:1–20.
- Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, et al. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol.* 2010;84(13):6891–3.
- Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol.* 2001;64(2):190–4.
- Mariscal LF, Lopez-Alcorrocho JM, Rodriguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolome J, et al. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology.* 2002;301(1):121–9.
- Burra P, Masier A, Boldrin C, Calistri A, Andreoli E, Senzolo M, et al. Torque Teno Virus: any pathological role in liver transplanted patients? *Transpl Int.* 2008;21(10):972–9.
- Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, Presciutti S, Marchi S, Isola P, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2001;75(24):11999–2004.
- Maggi F, Tempestini E, Lanini L, Andreoli E, Fornai C, Gianecchini S, et al. Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine. *J Med Virol.* 2005;75(2):358–65.
- Tyagi AK, Pradier A, Baumer O, Uppugunduri CR, Huezio-Diaz P, Posfay-Barbe KM, et al. Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque Teno Virus titers from plasma. *Virol J.* 2013;10:191.
- Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS.* 2001;15(5):563–70.
- Taheri M, Motamedifar M, Sarvari J, Yaghobi R, Nikouyan N, Pirbonyeh N, et al. Higher frequency of transfusion-transmitted virus (TTV) in HIV patients in comparison with healthy blood donors. *Int J High Risk Behav Addict.* 2017;6(3):e59363.
- Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque Teno Virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol.* 2007;79(1):1–7.

21. Devalle S, Rua F, Morgado MG, Niel C. Variations in the frequencies of Torque Teno Virus subpopulations during HAART treatment in HIV-1-coinfected patients. *Arch Virol*. 2009;154(8):1285–91.
22. Li L, Deng X, Da Costa AC, Bruhn R, Deeks SG, Delwart E. Virome analysis of antiretroviral-treated HIV patients shows no correlation between T-cell activation and anelloviruses levels. *J Clin Virol*. 2015;72:106–13.
23. Moen EM, Sleboda J, Grinde B. Serum concentrations of TT virus and TT virus-like mini virus in patients developing AIDS. *AIDS*. 2002;16(12):1679–82.
24. Gorzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Pre-transplant plasma Torque Teno Virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0122975.
25. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, Hopfinger G, Goerzer I, Puchhammer-Stockl E, et al. Torquetenovirus dynamics and immune marker properties in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective longitudinal study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(1):194–9.
26. Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F, et al. Torque Teno Virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis*. 2014;209(2):247–54.
27. Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of torque Teno Virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33(3):320–3.
28. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155(5):1178–87.
29. Oette M, Reuter S, Kaiser R, Lengauer T, Fätkenheuer G, Knechten H, et al. Epidemiology of transmitted drug resistance in chronically HIV-infected patients in Germany: the RESINA study 2001–2009. *Intervirology*. 2012;55(2):154–9.
30. Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallagher M, Caggana M, et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. *Epidemiology*. 2002;13(3):246–54.
31. Mohamadkhani A, Poustchi H. Repository of human blood derivative biospecimens in biobank: technical implications. *Middle East J Dig Dis*. 2015;7(2):61–8.
32. José M, Gajardo R, Jorquera JJ. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals*. 2004;33(1):9–16.
33. Baleriola C, Johal H, Jacka B, Chaverot S, Bowden S, Lacey S, et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at – 20°C and – 70°C. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3163–7.
34. Sadiq U, Shrestha U, Guzman N. HIV prevention of opportunistic infections BTI - StatPearls. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
35. Antinori A, Coenen T, Costagliola D, Dedes N, Ellefson M, Gatell J, et al. Late presentation of HIV infection: a consensus definition. *HIV Med*. 2011;12(1):61–4.
36. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol*. 2003;77(4):2418–25.
37. Schönberger S, Meisel R, Adams O, Pufal Y, Laws HJ, Enzmann J, et al. Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(10):1428–35.
38. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd ed. Hillsdale NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.
39. Garcia-Alvarez M, Berenguer J, Alvarez E, Guzman-Fulgencio M, Cosin J, Miralles P, et al. Association of Torque Teno Virus (TTV) and torque teno mini virus (TTMV) with liver disease among patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(2):289–97.
40. Kulifaj D, Dargueil-Larivière B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, et al. Development of a standardized real time PCR for Torque Teno Viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. 2018;105:118–27.
41. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, Parner J, Kaas Christensen J, Brasholt MS, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*. 2002;3(4):287–95.
42. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The value of Torque Teno Virus (TTV) as a marker for the degree of immunosuppression in adult patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(40):643–50.
43. Kaufmann GR, Bloch M, Finlayson R, Zunders J, Smith D, Cooper DA. The extent of HIV-1-related immunodeficiency and age predict the long-term CD4 T lymphocyte response to potent antiretroviral therapy. *AIDS*. 2002;16(3):359–67.
44. Lederman MM, McKinnis R, Kelleher D, Cutrell A, Mellors J, Neisler M, et al. Cellular restoration in HIV infected persons treated with abacavir and a protease inhibitor: age inversely predicts naive CD4 cell count increase. *AIDS*. 2000;14(17):2635–42.
45. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Røge B, Panos G, et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J Infect Dis*. 2001;183(1):1290–4.
46. Tumbarello M, Rabagliati R, De Gaetano DK, Bertagnolio S, Tamburrini E, Tacconelli E, et al. Older HIV-positive patients in the era of highly active antiretroviral therapy: changing of a scenario. *BMC Infect Dis*. 2003;4:46.
47. Hamilton DF, Ghert M, Simpson AH. Interpreting regression models in clinical outcome studies. *Bone Joint Res*. 2015;4(9):152–3.
48. Meintjes G, Stek C, Blumenthal L, Thienemann F, Schutz C, Buyze J, et al. Prednisone for the prevention of paradoxical tuberculosis-associated IRIS. *N Engl J Med*. 2018;379(20):1915–25.

3 Diskussion

Derzeit beruht die routinemäßige Therapiekontrolle einer HIV-Infektion, ihres Verlaufs sowie des Ausmaßes der verursachten Immunschwäche auf der Überwachung von sogenannten Surrogatparametern. Hierbei werden vor allem die Konzentration der HIV-RNA als Maß der Virusreplikation sowie die Anzahl der CD4 positiven Zellen als Marker für den Immunstatus betrachtet. Da die CD4-Zellzahl stets jedoch nur eine Art Momentaufnahme darstellt und das Ansprechen auf die cART interindividuell sehr unterschiedlich sein kann, ist die Vorhersage der Immunrekonstitution schwierig. Bei einem erhöhten Risiko für Komplikationen, im Rahmen von Ko-Infektionen und Ko-Therapien, wäre die Prognose der Immunrekonstitution jedoch besonders hilfreich und ein prädiktiver Marker wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurde retrospektiv die TTVL als möglicher prognostischer Marker für die Immunrekonstitution bei asymptomatischen HIV-infizierten PatientInnen vor Beginn einer antiretroviralen Therapie untersucht. Dabei wurde überprüft, ob TTV neben der CD4-Zellzahl als Parameter für die Überwachung des Immunstatus genutzt werden könnte.

Entsprechend definierter Einschlusskriterien konnten 364 PatientInnen aus der RESINA-Kohorte identifiziert werden, von denen 301 der Plasmaproben für die Studie zur Verfügung standen. In der analysierten Gruppe von 301 PatientInnen lag das mediane Alter der Kohorte lag bei 49 Jahren, wobei die Geschlechterverteilung 78% Männern aufwies. Diese Geschlechterverteilung ist vergleichbar mit jener in Deutschland vorherrschenden mit einem Anteil von 80% männlichen PatientInnen im Jahr 2021, wobei mit 79% homosexueller Geschlechtsverkehr der primäre Übertragungsweg ist. Infektionen im Rahmen von heterosexuellem Kontakt (13%) oder intravenösem Drogenkonsum (7%) sind deutlich seltener [79]. Im Gegensatz dazu liegt der weltweite Anteil bei Männern mit HIV bei lediglich 45,6 %. Dies ist vor allem durch die Unterschiede im Haupttransmissionsweg zu begründen, welcher beispielsweise in Subsahara-Afrika der heterosexuelle Geschlechtsverkehr ist [80]. Vor Beginn der cART betrug die mediane HIVL in unserer Studie 48.394 Kopien/ml. Dies ist vergleichbar mit medianen Viruslasten bei Therapie-naiven PatientInnen aus anderen Kohorten [81, 82].

TTV wurde in dieser Studie in 96,0% der analysierten Plasmaproben, die der RESINA-Kohorte entstammen, nachgewiesen. Dies steht im Einklang zur hohen weltweiten Prävalenz, der Grundvoraussetzung für einen potenziellen prädiktiven Biomarker [22, 24]. Die mediane Viruslast von TTV in dieser Kohorte war mit 5,37 log₁₀ Kopien/ml vergleichbar mit der von anderen Hochrisikokohorten [31, 34, 83], gleichzeitig ist die Plasmakonzentration in unserer Studie von minimal 0

bis maximal $9,3 \log_{10}$ Kopien/ml durch ein sehr breites Spektrum gekennzeichnet. Diese Bandbreite der TTVL ist charakteristisch für Populationen mit erhöhtem Risiko für Immundefizienz wie dies auch bei anderen Infektionserkrankungen der Fall sein kann [84-86]. Die negative Korrelation des TTV-Plasmaspiegels und der Ausgangs-CD4+ Zellzahl, wobei niedrigere CD4-Zahlen mit höheren TTV-Plasmawerten korrelieren, bestätigt die Beobachtungen aus früheren Untersuchungen [24, 26, 34, 36, 47, 87, 88]. Im Gegensatz zu anderen Studien, wurde in dieser Analyse die initiale TTVL auch in Bezug auf den longitudinalen Verlauf der CD4+-Zellen (vor Beginn der cART und nach einem Jahr) hin ausgewertet. So konnte die TTVL als Marker der Immunrekonstitution untersucht werden. Serielle Analysen mit wiederholten Messungen der genannten Parameter untermauern die inverse Korrelation zwischen TTV-Titer im Plasma von HIV-Infizierten und CD4-Zahl [34, 86, 88]. Die Arbeitsgruppe um Thom et al. [47] beschrieb höhere TTV-Titer in Knochenmark und Gewebe der Milz bei PatientInnen, deren Infektion bis zum AIDS-Stadium vorangeschritten war, im Vergleich zu PatientInnen ohne AIDS-definierende-Erkrankungen. Unklar ist jedoch, ob diese Aussagen auch auf Blutproben übertragbar sind. Daten, die dezidiert die TTVL in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten vergleichen, liegen derzeit nicht vor. Aufschlussreich wäre hier die Betrachtung der Frage, ob PatientInnen mit einem früheren Eintreten AIDS-definierender Erkrankungen bereits initial vor Therapiestart höhere TTVL haben. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2002 belegte, dass eine antiretrovirale Therapie zu einer Verbesserung der immunologischen Reaktionen führt, selbst bei PatientInnen, bei denen die Zahl der CD4+ T-Zellen im Verlauf nicht weiter ansteigt [89]. Christensen et al. [87] zeigten die Korrelation einer hohen TTVL mit einer geringeren Überlebensrate auf, wobei TTV als unabhängiger Prädiktor eingeschätzt wird; eine Vorhersage bzgl. der Immunrekonstitution wurde hier nicht getätigt.

Die Korrelation zwischen der initialen TTVL vor Therapiestart und CD4+ Rekonstitution innerhalb des ersten Jahres unter cART zeigte, dass PatientInnen mit einer verzögerten Immunrekonstitution signifikant höhere TTV-DNA Konzentrationen im Blut aufwiesen. Es wäre hilfreich, klinisch relevante Grenzwerte für die TTVL im Sinne eines Cutoffs festzulegen, die eine unmittelbare Zuordnung zu einer definierten Risikogruppe ermöglichen. Zu diesen Risikogruppen würden PatientInnen zugeordnet werden, die beispielsweise eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von IRIS aufwiesen und folglich mit direkten Handlungs- oder Therapieempfehlungen besser gescreent und therapiert werden könnten. Die Definition von Cutoff-Werten wäre eine relevante Fragestellung im Rahmen von Folgeprojekten. Als Konsequenz in der klinischen Routine könnte die in dieser Studie gezeigte Korrelation der TTVL mit der IR unter cART bedeuten, dass PatientInnen mit potenziell schlechter IR häufiger zu Zwischenuntersuchungen einbestellt werden oder individualisierte Therapie- bzw. Medikamentenkombinationen verwendet werden. Die Daten und Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, in denen der TTV-Titer als prognostischer

Surrogatparameter getestet wird [55]. Die Analyse von Honorato et al. [90] hat die TTVL in Speichel als prognostischen Marker für die IR bei PatientInnen mit HIV evaluiert.

Vorliegende Koinfektionen können sowohl einen Einfluss auf die HIV-Infektion selbst sowie auf das Immunsystem haben als auch die Immunrekonstitution beeinträchtigen [91-94]. Gleichzeitig könnten Koinfektionen aber auch die TTVL selbst beeinflussen, daher wurde dies für die Daten von CMV, EBV und HHV-8 analysiert [95]. Einen Einfluss von CMV, EBV und HHV-8 auf die TTV-Plasmaspiegel, wie er auch bei immunsupprimierten PatientInnen nach hämatopoetischen Stammzelltransplantation beobachtet wurde, konnte ausgeschlossen werden [42]. Es konnte jedoch eine inverse Korrelation zwischen der initialen CD4-Zellzahl und der CMV-Plasmaviruslast beobachtet werden. In den Analysen von Schmitz et al. [39] wurde CMV als proinflammatorisches und immunsuppressives Virus mit möglicher Modulation der TTVL beschrieben. Insgesamt ist jedoch unklar, ob es sich hier nicht eher um einen *Confounder* handeln könnte.

Vorangegangene Untersuchungen zur TTVL im Blut von HIV-Positiven wiesen breite Schwankungen auf [34, 47, 88]. Das beobachtete Spektrum ist jedoch vor allem auf die große Varianz der TTVL zurückzuführen, die sowohl inter- als auch intraindividuell in Abhängigkeit von der Immunaktivität stark differieren kann [36, 96-98]. Zum jetzigen Zeitpunkt konnte eine Vielzahl an möglichen Einflussfaktoren auf die TTVL identifiziert werden. Dabei sind vor allem patientenbezogene Variablen wie Lebensalter, Geschlecht, Adipositas oder Ko-Infektionen zu nennen, aber auch laborchemische Determinanten sind zu betrachten [39, 99, 100]. In unserer Studie konnte kein Zusammenhang von Alter oder Geschlecht zu TTVL, HIVL oder IR hergestellt werden. Die Ergebnisse zur Assoziation von Lebensalter und Geschlecht werden in der Literatur sehr heterogen dargestellt [24, 101]. Die meisten Menschen infizieren sich bereits im Kleinkindalter mit TTV, ob dies jedoch durch maternale, vertikale Transmission geschieht und ob dies einen relevanten Einfluss haben könnte, ist umstritten [102, 103].

Trotz einer vergleichsweise großen Studienkohorte, sowie einer großen Anzahl an untersuchten Parametern gibt es in unserer Studie Limitationen. 1. Eingeschränkte Verfügbarkeit von klinischen und virologischen Parametern durch das retrospektive Studiendesign: Im Rahmen eines prospektiven Studiendesigns können weitere Parameter, wie Koinfektionen, Therapieregime, Komedikationen oder Komplikationen in die Analysen eingeschlossen werden, die retrospektiv nicht dokumentiert wurden [39]. Dies könnte zu einem besseren Verständnis des Zusammenspiels von TTV-DNA Konzentrationen, Immunstatus und Behandlungseffektivität beitragen. 2. Singuläre Analyse der TTV-DNA Level: In Rahmen unseres Studiendesigns wurde die TTVL nur zu einem einzigen Zeitpunkt (vor Start der cART) analysiert. Sequenzielle Analysen unter ART könnten zu einer genaueren Vorhersage der IR beitragen. 3. TTV-Quantifizierung ohne Typisierung: Die Quantifizierung erfolge anhand eines PCR-Protokolls, welches

in einer nationalen und internationalen Kooperation erarbeitet wurden. Die vorliegende Studie beschränkt sich daher darauf, die TTV-DNA in der Kohorte zu quantifizieren, ohne zwischen verschiedenen TTV-Genotypen zu differenzieren. Die Daten von Maggi et al., zeigten jedoch, dass Personen, die mehrere TTV-Genogruppen in sich trugen, im Allgemeinen eine höhere Viruslast aufwiesen [104, 105]. Gleichzeitig beschrieb Maggi et al. in einer anderen Publikation [106], dass TTV-Infektionen mit mehreren Genotypen häufig vorkommen, wenngleich diese Beobachtung nach aktuellem Stand der Wissenschaft nicht quantifiziert wurde. Eine Längsschnittstudie bei Kindern zeigte, dass der Erwerb neuer Genotypen zu wiederkehrenden hohen Viruslasten führt [97, 107]. Eine Differenzierung der TTV-Genotypen in Bezug auf Immunrekonstitution bei HIV-Positiven könnte die Vorhersagekraft verbessern.

Zusammenfassend legt diese Studie die Grundlage für die potenzielle Verwendung des TTV-Plasmalevels als Biomarker für die IR bei HIV-Infizierten. Die gewonnen Informationen könnten dazu beitragen, personalisierte Therapiekonzepte zu entwickeln, die individuelle Behandlung zu steuern und präventive Maßnahmen zur Vermeidung opportunistischer Infektionen effektiver zu gestalten. Auch könnte die Vorhersage der IR dabei helfen, unnötige Arzneimittelnebenwirkungen zu vermeiden oder den Einsatz von Glukokortikoiden bei Tuberkulose-PatientInnen mit einem hohen Risiko für IRIS besser zu planen [76, 108].

Für eine verlässliche und standardisierte klinische Anwendung von TTV als Biomarker sind jedoch weitere Studien erforderlich. Ein prospektives Studiendesign mit einer ebenfalls großen Kohorte könnte einen klinischen Nutzen nachweisen, die Stratifizierung in Gruppen in Abhängigkeit des Komplikationsrisikos unter cART sowie die Implementierung in die klinische Praxis ermöglichen. Die Analyse von TTV könnte somit einen weiteren Beitrag zur personalisierten Versorgung von Menschen mit HIV liefern.

4 Verzeichnisse

4.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: CDC-Stadien (2014)	9
-------------------------------------	---

4.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau TTV	1
-------------------------------	---

Abbildung 2: (A) Das HIV-Genom, (B) Struktur eines HIV-Viruspartikels mit antiretroviralen Zielstrukturen	5
---	---

Abbildung 3: HIV-Replikationszyklus	8
---	---

4.3 Literaturverzeichnis

1. Nishizawa, T., et al., *A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(1): p. 92-7.
2. Giménez, E., et al., *Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. J Med Virol, 2021. **93**(8): p. 5167-5172.
3. Kraberger, S., et al., *Taxonomic updates for the genus Gyrovirus (family Anelloviridae): recognition of several new members and establishment of species demarcation criteria*. Arch Virol, 2021. **166**(10): p. 2937-2942.
4. Hino, S., *TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome*. Rev Med Virol, 2002. **12**(3): p. 151-8.
5. Abraham, P., *TT viruses: how much do we know?* Indian J Med Res, 2005. **122**(1): p. 7-10.
6. Bendinelli, M., et al., *Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(1): p. 98-113.
7. Martinez, N.M., et al., *Prevalence and viral persistence of TT virus in patients on hemodialysis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(11): p. 878-80.
8. Deng, X., et al., *Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus*. J Med Virol, 2000. **62**(4): p. 531-7.
9. Ross, R.S., et al., *Detection of TT virus DNA in specimens other than blood*. J Clin Virol, 1999. **13**(3): p. 181-4.
10. Matsubara, H., et al., *Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects*. Intervirology, 2000. **43**(1): p. 16-9.
11. Inami, T., et al., *High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2407-8.
12. Maggi, F., et al., *TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells*. J Med Virol, 2001. **64**(2): p. 190-4.
13. Okamoto, H., et al., *Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells*. J Virol, 2000. **74**(21): p. 10236-9.
14. Kanda, Y., et al., *TT virus in bone marrow transplant recipients*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2485-90.
15. Okamoto, H., et al., *Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(2): p. 657-62.

16. Takahashi, K., et al., *Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus*. Arch Virol, 2000. **145**(5): p. 979-93.
17. de Villiers, E.M., et al., *Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens*. J Mol Med (Berl), 2002. **80**(1): p. 44-50.
18. Sospedra, M., et al., *Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e41.
19. Vasconcelos, H.C., et al., *Prevalence and genetic diversity of TT virus genotype 21 (YONBAN virus) in Brazil*. Arch Virol, 2003. **148**(3): p. 517-29.
20. Kalkan, A., et al., *Prevalence and genotypic distribution of hepatitis GB-C/HG and TT viruses in blood donors, mentally retarded children and four groups of patients in eastern Anatolia, Turkey*. Jpn J Infect Dis, 2005. **58**(4): p. 222-7.
21. de Oliveira, J.C., et al., *Detection of TTV in peripheral blood cells from patients with altered ALT and AST levels*. New Microbiol, 2008. **31**(2): p. 195-201.
22. Hussain, T., et al., *Phylogenetic analysis of Torque Teno Virus genome from Pakistani isolate and incidence of co-infection among HBV/HCV infected patients*. Virol J, 2012. **9**: p. 320.
23. Ninomiya, M., et al., *Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 7): p. 1939-44.
24. Vasilyev, E.V., et al., *Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population*. Virol J, 2009. **6**: p. 134.
25. Gallian, P., et al., *TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2538-42.
26. Hafez, M.M., et al., *Prevalence of transfusion transmitted virus (TTV) genotypes among HCC patients in Qalubia governorate*. Virol J, 2007. **4**: p. 135.
27. Hsieh, S.Y., et al., *High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1829-31.
28. Alzahrani, A.J., et al., *Molecular detection of hepatitis B, hepatitis C, and torque teno viruses in drug users in Saudi Arabia*. J Med Virol, 2009. **81**(8): p. 1343-7.
29. Ataei, B., et al., *Prevalence of transfusion transmitted virus infection in hemodialysis patients and injection drug users compared to healthy blood donors in isfahan, iran*. Gastroenterol Res Pract, 2012. **2012**: p. 671927.
30. Griffin, J.S., J.D. Plummer, and S.C. Long, *Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters*. Virol J, 2008. **5**: p. 112.
31. Okamoto, H., *History of discoveries and pathogenicity of TT viruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **331**: p. 1-20.
32. Touinssi, M., et al., *TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load*. J Clin Virol, 2001. **21**(2): p. 135-41.
33. Maggi, F., et al., *Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection*. Journal of Virology, 2001. **75**(24): p. 11999-12004.
34. Shibayama, T., et al., *Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV*. AIDS, 2001. **15**(5): p. 563-70.
35. Zhong, S., et al., *Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients*. J Med Virol, 2002. **66**(3): p. 428-34.
36. Jaksch, P., et al., *Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: The Road Toward Torque Teno Virus-guided Immunosuppression*. Transplantation, 2022. **106**(10): p. 1940-1951.
37. Reza Hosseini, O., et al., *Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation*. Transplant Rev (Orlando), 2019. **33**(3): p. 137-144.
38. Focosi, D., et al., *Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution*. J Clin Virol, 2010. **47**(2): p. 189-92.

-
39. Schmitz, J., et al., *The Value of Torque Teno Virus (TTV) as a Marker for the Degree of Immunosuppression in Adult Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2020. **26**(4): p. 643-650.
 40. De Vlaminck, I., et al., *Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy*. *Cell*, 2013. **155**(5): p. 1178-87.
 41. Focosi, D., et al., *Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside*. *Clin Microbiol Infect*, 2016. **22**(7): p. 589-93.
 42. Frye, B.C., et al., *Kinetics of Torque Teno Virus-DNA Plasma Load Predict Rejection in Lung Transplant Recipients*. *Transplantation*, 2019. **103**(4): p. 815-822.
 43. Focosi, D., et al., *TTV viral load as a predictor of antibody response to SARS COV-2 vaccination*. *J Heart Lung Transplant*, 2023. **42**(2): p. 143-144.
 44. Reindl-Schwaighofer, R., et al., *Comparison of SARS-CoV-2 Antibody Response 4 Weeks After Homologous vs Heterologous Third Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Randomized Clinical Trial*. *JAMA Intern Med*, 2022. **182**(2): p. 165-171.
 45. Mendes-Correa, M.C., et al., *Torquetenovirus in saliva: A potential biomarker for SARS-CoV-2 infection?* *PLoS One*, 2021. **16**(8): p. e0256357.
 46. Schmidt, L., et al., *Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients*. *Infection*, 2021. **49**(3): p. 501-509.
 47. Thom, K. and J. Petrik, *Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals*. *J Med Virol*, 2007. **79**(1): p. 1-7.
 48. Morrison, C.S., et al., *Plasma and cervical viral loads among Ugandan and Zimbabwean women during acute and early HIV-1 infection*. *AIDS*, 2010. **24**(4): p. 573-82.
 49. UNAIDS. *Global HIV statistics*. 2023 [cited 2024 22.01.]; Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf.
 50. Weichseldorfer, M., M. Reitz, and O.S. Latinovic, *Past HIV-1 Medications and the Current Status of Combined Antiretroviral Therapy Options for HIV-1 Patients*. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(11): p. 1798.
 51. Teeraananchai, S., et al., *Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis*. *HIV Med*, 2017. **18**(4): p. 256-266.
 52. Antiretroviral Therapy Cohort, C., *Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies*. *Lancet*, 2008. **372**(9635): p. 293-9.
 53. Patterson, S., et al., *Life expectancy of HIV-positive individuals on combination antiretroviral therapy in Canada*. *BMC Infect Dis*, 2015. **15**: p. 274.
 54. Emmelkamp, J., *Die Klinik der HIV-Infektion: Eine Analyse der RESINA-Kohorte*. 2011.
 55. Esser, P.L., et al., *Torque Teno Virus load is associated with CDC stage and CD4+ cell count in people living with HIV but unrelated to AIDS-defining events and Human Pegivirus load*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2024: p. jiae014.
 56. Kuiken C, L.T., Hahn B, Mullins J, Wolinsky S, Foley B, Apetrei C, Mizrahi I, Rambaut A, Korber B. , *HIV Sequence Compendium*. 2012, Los Alamos National Lab.
 57. Levy, J.A., *HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research*. *Adv Dent Res*, 2006. **19**(1): p. 10-6.
 58. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study*. *Science*, 1996. **273**(5283): p. 1856-62.
 59. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
 60. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(7): p. a006890.
 61. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 657-700.

-
62. Farnet, C.M. and F.D. Bushman, *HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development*. AIDS, 1996. **10 Suppl A**: p. S3-11.
 63. Robertson, D.L., B.H. Hahn, and P.M. Sharp, *Recombination in AIDS viruses*. J Mol Evol, 1995. **40**(3): p. 249-59.
 64. Rambaut, A., et al., *The causes and consequences of HIV evolution*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(1): p. 52-61.
 65. Perelson, A.S. and R.M. Ribeiro, *Estimating drug efficacy and viral dynamic parameters: HIV and HCV*. Stat Med, 2008. **27**(23): p. 4647-57.
 66. Antiretroviral Therapy Cohort, C., *Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies*. Lancet HIV, 2017. **4**(8): p. e349-e356.
 67. Eholie, S.P., et al., *Antiretroviral treatment regardless of CD4 count: the universal answer to a contextual question*. AIDS Res Ther, 2016. **13**: p. 27.
 68. Yeni, P.G., et al., *Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel*. JAMA, 2002. **288**(2): p. 222-35.
 69. Puig-Basagoiti, F., et al., *Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **23**(1): p. 89-94.
 70. Rockstroh, J.K., *Behandlung von HIV-Infektionen und AIDS*. Drug Res (Stuttg), 2016. **66**(S 01): p. S15-s16.
 71. Crowe, S., B. Bennett, and S. Fordan, *Impact of the 2014 CDC HIV testing guidelines on detection of acute HIV infections*. J Clin Virol, 2022. **146**: p. 105058.
 72. Rothman, R.E., M. Saheed, and Y.H. Hsieh, *Infectious disease/CDC update. Detection of acute HIV infection in two evaluations of a new HIV diagnostic testing algorithm--United States, 2011-2013*. Ann Emerg Med, 2014. **63**(1): p. 56-60.
 73. Goldschmidt, R.H., *CDC Releases Updated Guidelines for Postexposure Prophylaxis After Sexual, Injection Drug, or Other Nonoccupational Exposures to HIV*. Am Fam Physician, 2016. **94**(5): p. 392-3.
 74. Wojcik-Cichy, K., et al., *The high incidence of late presenters for HIV/AIDS infection in the Lodz province, Poland in the years 2009-2016: we are still far from the UNAIDS 90% target*. AIDS Care, 2018. **30**(12): p. 1538-1541.
 75. Battegay, M., et al., *Late presentation of HIV-infected individuals*. Antivir Ther, 2007. **12**(6): p. 841-51.
 76. Sharma, S.K. and M. Soneja, *HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)*. Indian J Med Res, 2011. **134**(6): p. 866-77.
 77. *Nachweis einer Infektion mit Humanem Immundefizienzvirus (HIV): Serologisches Screening mit nachfolgender Bestätigungsdiagnostik durch Antikörper-basierte Testsysteme und/oder durch HIV-Nukleinsäure-Nachweis*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2015. **58**(8): p. 877-886.
 78. Abdool Karim, Q., *The global HIV epidemic: current status and challenges*. Curr HIV/AIDS Rep, 2013. **10**(2): p. 111-2.
 79. Marcus, U., et al., *Gemeldete HIV-Erstdiagnosen 2021 – 2022*. Epidemiologisches Bulletin, 2023(35): p. 3--18.
 80. Jahagirdar, D., et al., *Global, regional, and national sex-specific burden and control of the HIV epidemic, 1990–2019, for 204 countries and territories: the Global Burden of Diseases Study 2019*. The Lancet HIV, 2021. **8**(10): p. e633-e651.
 81. Manolescu, L. and P. Marinescu, *Sex differences in HIV-1 viral load and absolute CD4 cell count in long term survivors HIV-1 infected patients from Giurgiu, Romania*. Romanian Review of Laboratory Medicine, 2013. **21**(2).
 82. Barletta, J.M., D.C. Edelman, and N.T. Constantine, *Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen*. American journal of clinical pathology, 2004. **122**(1): p. 20-27.

-
83. Maggi, F., et al., *Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 11999-2004.
 84. AbuOdeh, R., et al., *Detection and genotyping of torque teno virus (TTV) in healthy blood donors and patients infected with HBV or HCV in Qatar*. J Med Virol, 2015. **87**(7): p. 1184-91.
 85. Beland, K., et al., *Torque Teno virus load as a biomarker of immunosuppression? New hopes and insights*. J Infect Dis, 2014. **210**(4): p. 668-70.
 86. Elesinnla, A.R., et al., *Prevalence of torque viruses in HIV-infected and non-HIV-infected Nigerian subjects: analysis of near-full-length genome sequences*. Arch Virol, 2020. **165**(3): p. 571-582.
 87. Christensen, J.K., et al., *Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1796-9.
 88. Nasser, T.F., et al., *Detection of TT virus in HIV-1 exposed but uninfected individuals and in HIV-1 infected patients and its influence on CD4+ lymphocytes and viral load*. Microb Pathog, 2009. **47**(1): p. 33-7.
 89. Madsen, C.D., *TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients*. HIV clinical trials, 2002. **3**(4): p. 287-95.
 90. Honorato, L., et al., *The Torque Teno Virus Titer in Saliva Reflects the Level of Circulating CD4(+) T Lymphocytes and HIV in Individuals Undergoing Antiretroviral Maintenance Therapy*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 809312.
 91. Whitehurst, C.B., et al., *HIV Co-infection Augments EBV-Induced Tumorigenesis in vivo*. Frontiers in Virology, 2022. **2**.
 92. Rohner, E., et al., *HIV and human herpesvirus 8 co-infection across the globe: Systematic review and meta-analysis*. International Journal of Cancer, 2016. **138**(1): p. 45-54.
 93. Lichtner, M., et al., *Cytomegalovirus Coinfection Is Associated With an Increased Risk of Severe Non-AIDS-Defining Events in a Large Cohort of HIV-Infected Patients*. The Journal of Infectious Diseases, 2014. **211**(2): p. 178-186.
 94. Sulkowski, M.S., *Viral hepatitis and HIV coinfection*. Journal of Hepatology, 2008. **48**(2): p. 353-367.
 95. Albert, E., et al., *The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Bone Marrow Transplantation, 2018. **53**(2): p. 180-187.
 96. Kulifaj, D., et al., *Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring*. Journal of Clinical Virology, 2018. **105**: p. 118-127.
 97. Vaisanen, E., et al., *Torque Teno Virus Primary Infection Kinetics in Early Childhood*. Viruses, 2022. **14**(6).
 98. Uhl, P., et al., *Torque teno viral load reflects immunosuppression in paediatric kidney-transplanted patients—a pilot study*. Pediatric Nephrology, 2021. **36**(1): p. 153-162.
 99. Beland, K., et al., *Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen*. J Infect Dis, 2014. **209**(2): p. 247-54.
 100. Reza Hosseini, O., et al., *Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation*. Transplantation Reviews, 2019. **33**(3): p. 137-144.
 101. Brassard, J., et al., *Association of age and gender with Torque teno virus detection in stools from diarrheic and non-diarrheic people*. J Clin Virol, 2015. **72**: p. 55-9.
 102. Tyschik, E.A., et al., *Torque teno virus dynamics during the first year of life*. Virology Journal, 2018. **15**(1): p. 96.
 103. Tyschik, E.A., et al., *Transplacental transmission of torque teno virus*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 92.
 104. Hu, Y.W., et al., *Clinical outcome of frequent exposure to Torque Teno virus (TTV) through blood transfusion in thalassemia patients with or without hepatitis C virus (HCV) infection*. J Med Virol, 2008. **80**(2): p. 365-71.
 105. Maggi, F., et al., *Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia*. J Virol, 2010. **84**(13): p. 6891-3.

-
106. Maggi, F., et al., *Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4807-10.
 107. Gore, E.J., et al., *Understanding torquetenovirus (TTV) as an immune marker*. Frontiers in Medicine, 2023. **10**.
 108. Meintjes, G., et al., *Prednisone for the Prevention of Paradoxical Tuberculosis-Associated IRIS*. N Engl J Med, 2018. **379**(20): p. 1915-1925.

5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an alle Personen richten, die mich auf dem Weg und bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Jörg Timm, für sein Vertrauen und seine Unterstützung danken. Ohne sein Vertrauen in mich und die Bereitstellung der notwendigen Rahmenbedingungen wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön gebührt ebenfalls Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino, deren fachliche Expertise und Rückhalt mit sehr geholfen haben.

Meine Wertschätzung für deine Unterstützung, liebe PD Dr. rer-nat. Nadine Lübke, ist kaum in Worten zu fassen. Deine zahlreichen Tipps, deine Ermutigungen, deine offene Art und deine immerwährende Unterstützung haben mir größten Rückhalt geben. Das gemeinsame Streben nach wissenschaftlicher Exzellenz hat mich stets motiviert, mein Bestes zu geben. Ich hätte mir keine bessere Betreuung meiner Promotion wünschen können.

Mein Dank gilt auch der AG Timm sowie dem Diagnostikteam der Virologie am UKD, die mich mit offenen Armen empfangen haben. Eure herzliche Aufnahme hat es mir ermöglicht, mich schnell ins Arbeitsumfeld einzufinden und mich von Beginn an als Teil des Teams zu fühlen. Dabei möchte ich besonders Dr. rer.-nat. Wiebke Moskorz und Dr. rer.-nat. Tatjana Schwarz hervorheben.

Christiane Kramer danke ich für die menschliche Verbundenheit, ihre verlässliche Präsenz und ihren positiven Zuspruch zu jeder Zeit.

Besonders hervorheben möchte ich Prof. Dr. med. Ortwin Adams, dessen Rat und humorvolle Art meine Zeit in der Virologie am UKD sehr bereichert haben. Ortwin, Du fehlst.

Ich danke außerdem PD Dr. med. Björn Jensen sowie Dr. rer.-nat. Rolf Kaiser mit seiner AG für die wertvolle Unterstützung bei der Entwicklung und Umsetzung dieser Arbeit.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner möchte ich für ihre Geduld, ihre ermutigenden Worte und ihre unerschütterliche Unterstützung während meiner gesamten akademischen Reise danken. Eure liebevolle Art hat mich durch Höhen und Tiefen getragen.