

Aus dem Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Jörg Timm

TTV als prognostischer Marker für die Immunrekonstitution bei therapienaiven Menschen mit HIV-1 aus Kamerun

Dissertation

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

vorgelegt von

Eva Rebecca Stieb

2026

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Timm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Torsten Feldt

Zusammenfassung Deutsch

Das Torque-Teno-Virus (TTV) ist ein unbehülltes DNA-Virus aus der Familie der Anelloviridae, welches sich weltweit mit hohen Prävalenzen in humanen Kohorten nachweisen lässt. Nach aktuellem Kenntnisstand gilt es als nicht humanpathogen, da aus einer Infektion keine klinisch manifeste Erkrankung resultiert. Aufgrund der engen Wechselwirkung zwischen individueller TT-Viruslast und dem Immunsystem des Wirts wird TTV seit mehreren Jahrzehnten als potenzieller Marker der Immundefizienz diskutiert. Insbesondere im Bereich der soliden Organ- und Stammzelltransplantation, sowie im Kontext von viralen Infektionen, beispielsweise mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) scheint eine Anwendung als Immunmarker möglich und könnte einen Beitrag zu einer individualisierten Therapie leisten.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, ob die im Blutplasma gemessene TT-Viruslast bei Personen mit HIV-1 eine Vorhersage der Immunrekonstitution unter Therapie ermöglicht. Ergänzend zu bereits publizierter Literatur soll dadurch die Bedeutung der TTV-Plasmakonzentration als potenzieller Immunmarker weiter exploriert werden. Hierfür wurden 120 Plasmaproben von Personen mit HIV-1 aus Kamerun analysiert, welche vor Beginn einer antiretroviralen Therapie entnommen wurden. Die TTV-Plasmakonzentration wurde mittels Real-Time-PCR quantifiziert und anschließend zusammen mit klinisch-immunologischen Parametern der Proband:innen in verschiedenen Regressionsmodellen ausgewertet, um die prädiktive Aussagekraft für die Immunrekonstitution zu beurteilen.

Es zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der absoluten CD4⁺-T-Zellzahl vor Therapiebeginn. Höhere Viruslasten waren hierbei mit niedrigen Zellzahlen assoziiert. Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation der TT-Viruslast und der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr unter antiretroviraler Therapie. Die TT-Viruslast und die CD4⁺-Zellzahl-Zunahme nach einem Jahr korrelierten hingegen nicht signifikant. Abseits von den genannten Korrelationen konnte keine prädiktive Aussagekraft der TT-Viruslast für den Verlauf der Immunerholung beobachtet werden. Weder die Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr noch die Vorhersage der CD4⁺-Zellzahl-Zunahme war anhand der TT-Viruslast in dieser Kohorte möglich. Auch konnte keine CD4⁺-Zellzahl-Subgruppe identifiziert werden, in welcher die TT-Viruslast ein signifikanter, prognostischer Marker wäre. Basierend auf den Ergebnissen dieser Kohorte scheint ein potenzieller Nutzen der TT-Viruslast als prognostischer Immunmarker im Kontext einer HIV-1 Infektion fraglich. Dennoch kann ein Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der Immunrekonstitution bei Personen mit HIV nicht sicher ausgeschlossen werden und sollte in künftigen Studien weiter untersucht werden.

Zusammenfassung Englisch

The Torque-teno-virus (TTV) is a non-enveloped DNA virus from the Anelloviridae family, which can be detected worldwide with high prevalence in human cohorts. According to current knowledge, it is not considered to be pathogenic to humans, as infection does not result in any clinically manifest disease. Since the individual TT-viral load interacts closely with the host's immune system, TTV has been discussed for several decades as a potential marker of immune function. Particularly in the field of solid organ and stem cell transplantation, as well as in the context of viral infections, such as the Human Immunodeficiency Virus (HIV), its use as an immune marker seems possible and could contribute to individualized therapy.

Against this background, this dissertation investigated whether the TT-viral load measured in blood plasma in individuals with HIV-1 can predict immune reconstitution during therapy. In addition to previously published literature, the aim is to further explore the significance of TTV plasma concentration as a potential immune marker. To this end, 120 plasma samples from individuals with HIV-1 in Cameroon, taken before the start of antiretroviral therapy, were analyzed. The TTV plasma concentration was quantified using real-time PCR and then assessed in various regression models together with immunological parameters of the participants in order to evaluate the predictive value for immune reconstitution.

There was a significant negative correlation between TT viral load and absolute CD4⁺ T cell count prior to initiation of therapy. Higher viral loads were associated with low cell counts. In addition, there was a significant correlation between TT viral load and absolute CD4⁺ cell count after one year of antiretroviral therapy. However, there was no significant correlation between TT viral load and CD4⁺ cell count increase after one year. Apart from the correlations mentioned above, no predictive significance of TT viral load for the course of immune recovery could be observed. Neither the prediction of the absolute CD4⁺ cell count after one year nor the prediction of the CD4⁺ cell count increase was possible based on the TT viral load in this cohort. Furthermore, no CD4⁺ cell count subgroup could be identified in which the TT viral load would be a significant prognostic marker. Based on the results of this cohort, the potential benefit of TT viral load as a prognostic immune marker in the context of HIV-1 infection appears questionable. Nevertheless, a link between TT viral load and immune reconstitution in individuals with HIV cannot be ruled out with certainty and should be further investigated in future studies.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
ART	Antiretrovirale Therapie
allo-HSCT	<i>Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i> , allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
BL	Baseline
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMV	Cytomegalievirus, Zytomegalievirus
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drug
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> , Graft-versus-Host-Erkrankung
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i> , hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Ig	Immunglobulin
IQR	<i>Interquartile range</i> , Interquartilsabstand
IRIS	<i>Immune reconstitution inflammatory syndrome</i> , Immunrekonstitutionssyndrom
kb	Kilobasenpaare
Kopien/ml	Viruskopien pro Milliliter
M6	Monat 6
M12	Monat 12
NK-Zelle	<i>Natural killer cell</i> , natürliche Killerzelle
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offener Leserahmen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PLWH	<i>People living with HIV</i> , Menschen die mit HIV leben

qRT-PCR	quantitative Realtime-Polymerase Chain Reaction
TE	TRIS EDTA
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TTMV	Torque-Teno-Mini-Virus
TTMDV	Torque-Teno-Midi-Virus
TTV	Torque-Teno-Virus
UTR	<i>Untranslated region</i> , untranslatierte Region
RCM	<i>Rolling Circle Mechanism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SCT	<i>Stem Cell Transplantation</i> , Stammzelltransplantation
SOT	<i>Solid organ transplantation</i> , Transplantation solider Organe
Zellen/μl	Zellen pro Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung Deutsch	I
Zusammenfassung Englisch	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	7
1.1 Das Torque-Teno-Virus.....	7
1.1.1 Virusaufbau und Taxonomie	7
1.1.2 Diagnostik.....	9
1.1.3 Prävalenzen, Viruslast und Übertragungswege	9
1.1.4 Zielzellen und Replikationsvorgang.....	11
1.1.5 Erkrankungen	13
1.2 TTV als Biomarker der Immunfunktion	14
1.3 TTV im Kontext von HIV	17
1.4 Ziele der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Humane Plasmaproben.....	23
2.1.2 Ethikvotum	24
2.1.3 Material DNA-Extraktion	24
2.1.4 Material TTV-Realtime-PCR.....	25
2.1.5 Plastik- und Verbrauchsmaterialien	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Extraktion der DNA.....	27
2.2.2 Quantifizierung der DNA-Menge.....	27
2.2.3 Statistische Auswertung.....	28
3 Ergebnisse	32
3.1 Charakteristika der Studienkohorte	32

3.2 Entwicklung der CD4 ⁺ -T-Zellzahlen, der HI-Viruslast und der TT-Viruslast im Verlauf unter ART	33
3.3 Korrelationen zwischen TT-Viruslast, HIV-RNA-Konzentration und CD4 ⁺ -Status	36
3.4 Bewertung der prognostischen Aussagekraft der TT-Viruslast zur Vorhersage der Immunerholung nach einem Jahr unter ART	39
3.4.1 Vorhersage der absoluten CD4 ⁺ -Zellzahl nach einem Jahr	39
3.4.2 Vorhersage der CD4 ⁺ -Zellzahl-Zunahme nach einem Jahr.....	40
3.4.3 Vorhersage der CD4 ⁺ -T-Zell-Erholungsgruppen nach einem Jahr.....	41
3.4.4 Überprüfung von Interaktionseffekten zwischen der CD4 ⁺ -Zellzahl und TTV	42
4 Diskussion.....	44
4.1 Interpretation der Ergebnisse.....	44
4.2 Limitationen.....	48
4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	51
Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52
Abbildungsverzeichnis.....	66
Tabellenverzeichnis.....	67
Anhang	68

1 Einleitung

1.1 Das Torque-Teno-Virus

1.1.1 Virusaufbau und Taxonomie

Das Torque Teno-Virus (TTV) ist ein unbehülltes DNA-Virus aus der Familie der Anelloviridae, Gattung Alphatorquevirus. Es wurde erstmals im Jahr 1997 im Serum eines Patienten nachgewiesen, welcher nach einer perioperativen Bluttransfusion eine akute Hepatitis unklarer Ätiologie („Non-A-E hepatitis“) entwickelt hatte (Nishizawa et al., 1997). Aufgrund der Initialen des Patienten, T.T., erhielt das neu entdeckte Virus die Bezeichnung „TT-Virus“. Als alternative Interpretation dieser Abkürzung wurde der Begriff „Transfusion-Transmitted Virus“ vorgeschlagen. Mit fortschreitenden Erkenntnissen über die Struktur des Virusgenoms und die Übertragungswege, wurde 2005 durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) der Terminus „Torque Teno-Virus“ (von lat. *torques* „Kette“ und *tenuis* „dünn“) als allgemeingültige Bezeichnung festgelegt. Die Bezeichnung „Transfusion-Transmitted Virus“ wurde in diesem Zusammenhang verworfen.

Das Torque Teno-Virus besitzt ein nicht umhülltes, aus 60 Jelly-Roll-Domänen bestehendes, ikosaedrisches Kapsid, mit herausstehenden Spike-Domänen und weist eine Partikelgröße von 30-32nm auf (Maggi and Bendinelli, 2009, Liou et al., 2024). Im Jahr 2000 gelang erstmals eine Darstellung mittels Elektronenmikroskops (Itoh et al., 2000). Das Genom besteht aus einer zirkulären, single-strand-DNA mit Minuspolarität, mit einer Länge von 3,5 bis 3,9 Kilobasenpaaren (Kb), welche sich in eine untranslatierte Region (engl. *untranslated region*, UTR) und eine kodierende Region einteilen lässt (Spezia et al., 2023, Bendinelli et al., 2001). Innerhalb der kodierenden Region konnten bislang vier open-reading-frames (ORF) identifiziert werden, welche mutmaßlich für virale Proteine kodieren (Focosi et al., 2016) (*siehe Abb. 1*).

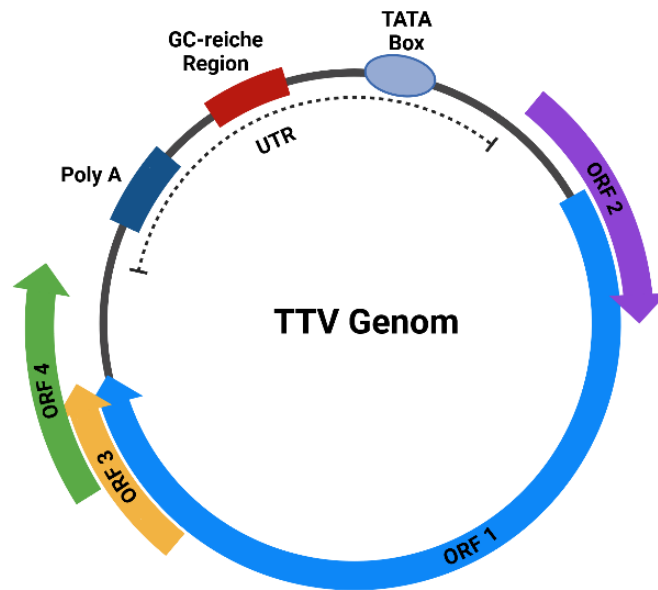


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zirkulären TTV-Genoms. GC: Guanin-Cytosin; UTR: Untranslated Region; ORF: Open Reading Frame. Diese Grafik wurde mit BioRender erstellt (BioRender.com)

Die Gattung der Torque-Teno-Viren zeichnet sich durch eine große genetische Vielfalt aus: In der durch das ICTV veröffentlichten Taxonomie, werden aktuell 29 verschiedene TTV-Spezies unterschieden, welche in fünf Genogruppen (50 % Nukleotidsequenz-Divergenz), mit jeweils multiplen Genotypen (30 % Nukleotidsequenz-Divergenz) eingeteilt werden (Kraberger et al., 2021, Varsani et al., 2023, Albert et al., 2024). Trotz der erheblichen Sequenzdiversität zwischen den verschiedenen TTV-Genotypen weist die untranslatierte Region eine hohe Konservierung mit großen genetischen Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Isolaten auf (Gore et al., 2023, Ninomiya et al., 2008).

Im Jahr 2000 wurde das *Torque-Teno-Mini-Virus* (TTMV, Gattung Betatorquevirus) sowie im Jahre 2007 das *Torque-Teno-Midi-Virus* (TTMDV, Gattung Gammatorquevirus) isoliert, deren Genom insgesamt kleiner ist, jedoch eine ähnliche Organisation wie das TTV-Genom aufweist (Takahashi et al., 2000, Ninomiya et al., 2007). Seit 2009 werden das Torque-Teno-Virus, das Torque-Teno-Mini-Virus und das Torque-Teno-Midi-Virus in der Familie der Anelloviren (von lat. *anello* „Ring“, in Anlehnung an das ringförmige Genom) subsummiert, welche das größte Kompartiment des humanen Blutviroms ausmacht (Redondo et al., 2022, Cebriá-Mendoza et al., 2021).

1.1.2 Diagnostik

Die Diagnose einer TTV-Infektion basiert hauptsächlich auf Polymerasekettenreaktion-Verfahren (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), welche zumeist auf die untranslatierte Region abzielen, da diese aufgrund der großen genetischen Übereinstimmung zwischen den verschiedenen TTV-Isolaten eine simultane Amplifizierung aller bekannten Genotypen erlaubt. Lange standen keine standardisierten TTV-PCR-Assays zur Verfügung, so dass häufig in-house Protokolle mit unterschiedlichen Primersets verwendet wurden, die meist die variabel exprimierte „N22-Region“ innerhalb des ORF1 als Zielregion hatten. Daraus resultierend zeigen sich in früheren Untersuchungen teils große Differenzen bezüglich der Prävalenzangaben und gemessenen Viruslasten (Macera et al., 2022). Zur Standardisierung der TTV-PCR, entwickelten Kulifaj et al. im Jahr 2017 den „TTV R-GENE® Assay“ (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich), einen standardisierten Realtime PCR-Test, zum Nachweis und zur Quantifizierung von TTV-DNA in Plasma- und Vollblutproben. Der Assay wurde 2021 CE-zertifiziert (Kulifaj et al., 2018, Jaksch et al., 2022).

Obwohl TTV-spezifische Antikörper im Plasma nachweisbar sind, stehen bislang keine etablierten serologischen Tests zur Detektion viraler Antigene oder TTV-Antikörper zur Verfügung. Zudem ist eine sichere Unterscheidung zwischen einer akuten und einer zurückliegenden Infektion aufgrund der großen zeitlichen Überlappung der gebildeten IgM- und IgG-Antikörper erschwert (Rezahosseini et al., 2019). Auch die TTV-Anzucht und die Etablierung eines Zellkultursystems stellen weiterhin eine Herausforderung dar. Bisher gelang nur wenigen Forschungsgruppen eine erfolgreiche TTV-Replikation in Zellkultursystemen, weshalb die genauen Infektionsmechanismen und Replikationsabläufe nach wie vor weitgehend unbekannt sind (de Villiers et al., 2011, Desai et al., 2005).

1.1.3 Prävalenzen, Viruslast und Übertragungswege

Das Torque-Teno-Virus ist weltweit mit einer hohen Prävalenz, meist von über 90%, auch in der gesunden Bevölkerung, nachweisbar (Lolomadze and Rebrikov, 2020, Gore et al., 2023, Focosi et al., 2016). Frühere Studien hatten deutlich niedrigere Prävalenzen ermittelt, jedoch werden diese Angaben rückblickend aufgrund unspezifischer PCR-Primer und einer selektiven Detektion weniger TTV-Genotypen, als falsch zu niedrig bewertet. Die Erstinfektion eines Menschen mit TTV erfolgt in den meisten Fällen bereits im frühen Kindesalter, weshalb in pädiatrischen Kohorten bereits in den ersten Monaten nach Geburt ein deutlicher Anstieg der TTV-Prävalenz verzeichnet werden kann (Tyschik et al., 2018). Dieser Anstieg der TTV-Prävalenz setzt sich fort, bis sie im Laufe der ersten vier Lebensjahre „adultes“ Niveau erreicht (Väisänen et al., 2022,

Yokozaki et al., 1999). Die Erstinfektion verläuft asymptomatisch; eine Co-Infektion mit mehreren verschiedenen TTV-Genotypen ist üblich (Väisänen et al., 2022, Maggi et al., 2010, Arze et al., 2021).

Die Angaben zur durchschnittlichen Viruslast eines Individuums umfassen eine große Spanne und werden mit 10^1 bis 10^9 Kopien/ml Blut beziehungsweise 1 bis 9 $\log_{10}$ Kopien/ml Plasma beziffert. Jedoch differieren die Werte teils deutlich zwischen den einzelnen Studien (Macera et al., 2022, Rezahosseini et al., 2019, Focosi et al., 2020). Ob ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der TTV-Prävalenz und TT-Viruslast besteht, wird weiterhin kontrovers diskutiert (Focosi 2016; Redondo 2021). Einige Studien deuten auf eine höhere TTV-Prävalenz und Viruslast bei Männern hin (Focosi et al., 2020, Haloschan et al., 2014). Generell zeigen klinisch gesunde Individuen in longitudinalen Studien eine konstante Viruslast, welche mit fortschreitendem Lebensalter leicht anzusteigen scheint. Dies wird auf eine verminderte Immunaktivität und eine dadurch bedingte geringere immunologische Kontrolle zurückgeführt (Moen et al., 2003, Giacconi et al., 2018, Focosi et al., 2020). Auch im Rahmen von Erkrankungen kann ein Anstieg beobachtet werden, welcher ebenfalls auf eine Schwächung des Immunsystems zurückgeführt wird und sich meist mit immunologischer Rekonstitution wieder rückläufig zeigt. In Populationen mit anhaltend supprimierter Immunfunktion zeigen sich sowohl signifikant höhere TTV-Prävalenzen, häufig bis zu 100%, als auch höhere TT-Viruslasten im Vergleich zu immunkompetenten Populationen (Leary et al., 1999, Focosi et al., 2016, Mouton et al., 2020). Des Weiteren wird eine Beeinflussung der individuellen TT-Viruslast durch andere Virusentitäten diskutiert. So konnte eine Erhöhung der medianen TT-Viruslast bei bestehender Co-Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) beobachtet werden (Borkosky et al., 2012).

Die Virusübertragung erfolgt über mehrere, parallele Transmissionswege. Bereits durch die Erstbeschreiber wurde eine parenterale Übertragung postuliert und führte zu der Bezeichnung „transfusion transmitted virus“ (Nishizawa et al., 1997). Im Folgenden konnte in Studien an TTV-negativen Schimpansen und Rhesusaffen demonstriert werden, dass durch Infusion von humanen, TTV-positiven Seren eine Infektion stattfindet (Luo et al., 2000, Okamoto et al., 2000a, Mushahwar et al., 1999). Eine Übertragung durch Blutprodukte gilt daher als gesichert. Die hohe TTV-Prävalenz bei klinisch gesunden Individuen, welche keine medizinische Intervention erhalten haben, verdeutlicht jedoch, dass eine Infektion nicht ausschließlich parenteral erfolgt. Da TTV auch im Speichel TTV-seropositiver Personen nachgewiesen werden kann und der Titer im Speichel sowie im Nasenrachenraum, den der korrespondierenden Serumprobe deutlich übersteigt, gilt eine Tröpfcheninfektion als wahrscheinlich und könnte die hohen TTV-Durchseuchungsraten erklären (Gallian et al., 2000, Deng et al., 2000, Maggi et al., 2003, Falabello de Luca et al., 2023, Albert et al., 2018b). In Tierversuchen konnte ebenfalls eine fäkal-

orale Übertragung belegt werden (Luo et al., 2000). Angesichts der Tatsache, dass TTV sowohl in den Faeces TTV-seropositiver Personen als auch im Ab- und Leitungswasser in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann, spielt auch diese Übertragungsform mutmaßlich eine relevante Rolle (Tavakoli Nick et al., 2019, Vecchia et al., 2013, Charest et al., 2015, Ross et al., 1999, Lin et al., 2000). Eine sexuelle Übertragung liegt angesichts des Nachweises von TTV in Zervikalabstrichen, Vaginalsekret und Sperma nahe, scheint jedoch nach aktuellem Stand eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (Fornai et al., 2001, Calcaterra et al., 2001, Tozetto-Mendoza et al., 2020, Inami et al., 2000).

Neben horizontalen Transmissionswegen wird auch eine vertikale Transmission (Mutter auf Kind) angenommen. Die hohe TTV-Prävalenz in uterinem Zervikalsekret bei schwangeren Frauen sowie der Umstand, dass vaginal entbundene Kinder eine größere Anellomdiversität zeigen, legen eine perinatale Übertragung nahe (Bagaglio et al., 2002, McCann et al., 2018, Chan et al., 2001). Ob eine Infektion bereits in utero, transplazentar möglich ist, ist weiterhin umstritten. Jüngere Studien deuten darauf hin, dass keine transplazentare Übertragung stattfindet und die Primärinfektion in der Regel erst während oder nach der Geburt erfolgt (Tyschik et al., 2017, Lolomadze et al., 2021).

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass neben dem Menschen auch andere Wirbeltiere infiziert werden und sowohl Haus- und Nutztiere als auch Wildtiere TTV-Träger sind (Okamoto, 2009, Romeo et al., 2000, Xiong et al., 2018, Martínez et al., 2006, Sibila et al., 2009, Leary et al., 1999, Zhu et al., 2011). Zum Teil zeigen die aus tierischen Proben gewonnenen TTV-Isolate eine hohe genetische Divergenz zu humanen Genotypen (Okamoto et al., 2000a, Okamoto et al., 2002). Dennoch scheint eine Übertragung spezie-spezifischer Genotypen auf andere Speziesarten, also auch eine Übertragung von Mensch auf Tier sowie vice versa („*cross species transmission*“), möglich zu sein (Singh and Ramamoorthy, 2018, Ssemadaali et al., 2016, Sarairah et al., 2020).

1.1.4 Zielzellen und Replikationsvorgang

Nach der initialen TTV-Isolierung aus Blutplasma, konnte TTV im humanen Organismus in zahlreichen Zelltypen, Gewebearten und Sekreten nachgewiesen werden (Matsubara et al., 2000, Goto et al., 2000, Tozetto-Mendoza et al., 2020, Maggi et al., 2003, Jurasz et al., 2024, Itoh et al., 2001, Desai et al., 2005, Rodríguez-Iñigo et al., 2000, Okamoto et al., 2000b, Okamoto et al., 2001). Trotz des nahezu ubiquitären Vorkommens von TTV im menschlichen Körper, sind die genauen Mechanismen des Infektionsprozesses, die Aufnahme in die Wirtszelle, sowie die

exakten Replikationsabläufe nach wie vor weitgehend unklar (Kaczorowska and van der Hoek, 2020).

Aufgrund der großen Infektionskompetenz wird angenommen, dass für den Viruseintritt Rezeptoren erforderlich sind, die von einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden (Spezia et al., 2023). Dennoch scheinen nur wenige der infizierten Zelltypen als Ort der Virusreplikation zu fungieren. Durch *in vitro*-Experimente gelang der Nachweis einer TTV-Replikation in aktivierten mononuklearen Zellen des peripheren Bluts (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), konkret in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten und Natural-killer-Zellen (NK-Zellen), sowie Granulozyten (Maggi et al., 2001a, Maggi et al., 2001b, Mariscal et al., 2002, Takahashi et al., 2002, Kosulin et al., 2018). T-Lymphozyten gelten dabei als Hauptquelle für TTV im peripheren Blut (Focosi et al., 2015). In Erythrozyten und Thrombozyten konnte bislang weder eine Infektion mit TTV noch eine Replikationsaktivität nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2002). Da Serumproben niedrigere TTV-Konzentrationen als die korrespondierenden Vollblutproben aufweisen, sowie in stark hämolytischen Proben ein erhöhter TTV-Spiegel im Vergleich zu nicht-hämolytischen Proben bei denselben Proband:innen nachgewiesen werden kann, wird angenommen, dass TTV hauptsächlich durch die Zerstörung TTV-haltiger Zellen in das Plasma gelangt (Takahashi et al., 2002, Kosulin et al., 2018, Focosi et al., 2020).

Zusätzlich wurde eine Replikationsaktivität in PBMC-Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Zellen im Knochenmark, postuliert (Okamoto et al., 2000b, Kikuchi et al., 2000). Diese These wird durch Studien aus der Hämatoonkologie und Transplantationsmedizin gestützt, da im Rahmen der myeloablativen Therapie ein temporärer Verlust nahezu aller TTV-Virionen im peripheren Blut beobachtet werden kann (Schmitz et al., 2020, Albert et al., 2017, Maggi et al., 2010). Trotz des initial postulierten Hepatotropismus ist weiterhin umstritten, ob auch Hepatozyten TTV-replikationskompetent sind (Desai et al., 2005, Kikuchi et al., 2000).

Bezüglich des Replikationsvorgangs wird davon ausgegangen, dass TTV, ähnlich wie andere einzelsträngige, zirkuläre DNA-Viren, einen „rolling circle Mechanismus“ (RCM) nutzt (Kaczorowska and van der Hoek, 2020). Hierbei wird durch ein virales Enzym die Replikation durch einen DNA-Einzelstrangbruch initiiert, während die restlichen Syntheseschritte meist durch Wirtsenzyme durchgeführt werden (Bonnamy et al., 2023). Nach erfolgter Replikation wird eine Virusfreisetzung via Zell-Lyse oder Vesikelabschnürung angenommen (de Villiers et al., 2011, Bird and Kirkegaard, 2015). Letzteres könnte darüber hinaus einen Mechanismus darstellen, um der Immunantwort des Wirts, insbesondere einer Antikörper-Clearance zu entgehen (Martelli et al., 2018). Unabhängig vom Freisetzungsmechanismus wird im Folgenden von einer Distribution der TTV-Partikel über das Blut ausgegangen (Spezia et al., 2023).

1.1.5 Erkrankungen

Bis dato konnte einer TTV-Infektion keine kausale Pathologie zugeordnet werden (Kaczorowska and van der Hoek, 2020) (Stand Oktober 2025). Insbesondere die initial aufgestellte Hypothese, dass TTV eine Hepatitis auslösen könnte, konnte in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (Kato et al., 2000). Deshalb erfolgte vorläufig die Einordnung als „Orphan-Virus“ (Rodríguez-Iñigo et al., 2000, Fabris et al., 2000, Poovorawan et al., 2001, Das et al., 2004). Als „Orphan-Virus“ werden Viren bezeichnet, für die bislang keine assoziierte Erkrankung beim Wirt identifiziert werden konnte (Mortimer, 2013, Li and Delwart, 2011).

Nichtsdestotrotz wurde in zahlreichen Studien eine Assoziation von TTV mit verschiedensten Erkrankungen aus diversen medizinischen Disziplinen beschrieben. Dies basiert meist auf der Beobachtung, dass in Kohorten mit einer bestehenden Grunderkrankung, höhere TTV-Prävalenzen und -Viruslasten im Vergleich zu Kohorten von Nicht-Erkrankten gemessen werden können. Auch gehen bei diversen Krankheitsbildern eine höhere Krankheitslast oder ein Krankheitsprogress mit höheren TTV-Spiegeln einher (Lapa et al., 2021, Giacconi et al., 2023, García-Álvarez et al., 2013, Li et al., 2023, Herz et al., 2022). Diesbezüglich ist jedoch fraglich, ob TTV tatsächlich eine kausale Rolle spielt, oder ob eine TTV-Infektion beziehungsweise ein Anstieg der TT-Viruslast lediglich eine Folge der Immunschwächung durch die jeweilige Grunderkrankung ist (Spezia et al., 2023). Konsens ist, dass ein Zusammenspiel zwischen dem Immunstatus des Wirts und einer TTV-Infektion besteht, welches sich in einer variierenden Viruslast in Abhängigkeit vom immunologischen Status manifestiert.

Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen sind nach wie vor weitgehend unklar. Da TTV mutmaßlich in Immunzellen repliziert, gleichzeitig aber durch diese einer immunologischen Kontrolle unterliegt, sind die Wechselwirkungen zwischen der TT-Viruslast und dem Immunsystem komplex (Taylor et al., 2022). Nach aktuellem Kenntnisstand scheint eine TTV-Infektion sowohl das angeborene Immunsystem als auch die humorale Immunantwort zu triggern. Die zelluläre Immunantwort richtet sich mutmaßlich gegen infizierte Zellen, während die humorale Immunantwort zur Neutralisierung des zirkulierenden Virus' beiträgt (van Rijn et al., 2023). Während über die zellvermittelten Immunreaktionen gegen TTV weiterhin wenig bekannt ist, ist die humorale Antwort, speziell die Antikörperreaktion, besser erforscht. Sowohl bei in der PCR TTV-positiven als auch negativen Individuen, können TTV-Antikörper im Serum detektiert werden (Springfeld et al., 2000, Tsuda et al., 1999, Ott et al., 2000). Nach erfolgter TTV-Infektion kommt es nach ca. 10-21 Wochen zu einem Anstieg des Anti-TTV-IgM-Titers, welcher im Verlauf wieder absinkt. Der Anti-TTV-IgG-Titer beginnt etwa 16 Wochen nach der Infektion anzusteigen und persistiert über Jahre hinweg (Rezahosseini et al., 2019). Trotz des Nachweises, dass TTV im Blut an IgG-Antikörper bindet und Immunkomplexe bildet (Itoh et al.,

2000), ist weiterhin umstritten, ob die gebildeten Antikörper in der Lage sind, das Virus zu neutralisieren. Angesichts der weltweit hohen TTV-Prävalenzen scheint keine vollständige Elimination zu erfolgen. Es wird angenommen, dass aus dem Zusammenspiel zwischen de novo Replikation und antikörpervermittelter, immunologischer Clearance eine chronisch-persistierende Virämie mit relativ konstanter Viruslast resultiert (Väisänen et al., 2022).

Trotz sich mehrender Hinweise auf eine immunologische Beeinflussung durch TTV, wurde aufgrund der fehlenden Pathogenität, nach der Entdeckung von TTV und im Folgenden der Familie der Anelloviridae, das Konzept der „Nutznießer-Viren“ (engl. *commensal viruses*) etabliert und dafür plädiert, TTV als natürlichen Bestandteil des menschlichen Viroms zu betrachten (Lolomadze and Rebrikov, 2020, Kaczorowska and van der Hoek, 2020, Griffiths, 1999). Darüber hinaus wurde auch ein etwaiger Nutzen für den Menschen, beispielsweise als möglicher relevanter Faktor für eine gesunde Immunsystemreifung oder eine zukünftige Anwendung als Gentherapie-Vektor diskutiert (Kaczorowska and van der Hoek, 2020, Taylor et al., 2022).

1.2 TTV als Biomarker der Immunfunktion

Mit fortschreitenden Erkenntnissen über den Zusammenhang zwischen TTV und dem humanen Immunsystem, wurde postuliert, dass die TT-Viruslast den aktuellen Immunstatus des Wirts widerspiegeln und somit potenziell als endogener Biomarker zur Beurteilung der Immunfunktion genutzt werden könnte. Hierbei wurde sowohl die mögliche Anwendung als Marker für den aktuellen Immunstatus, als auch die Aussagekraft als prognostischer Immunmarker, zur Vorhersage immunologischer Verläufe oder dem Auftreten immunologischer Events, untersucht.

Das Torque-Teno-Virus weist dabei verschiedene Merkmale auf, die es als potenziellen Immunmarker qualifizieren: Zum einen ist es weltweit mit hoher Prävalenz nachweisbar, zum anderen lässt es sich auf individueller Ebene in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten und Geweben detektieren. Hierfür stehen etablierte PCR-Verfahren zur Verfügung, die sowohl eine qualitative als auch quantitative Auswertung mit vergleichsweise geringem technischem Aufwand ermöglichen. Die Anwendung standardisierter PCR-Protokolle eröffnet zudem die Perspektive, die Vergleichbarkeit zwischen Studienzentren weiter zu verbessern. Darüber hinaus zeigen klinisch gesunde Personen relativ stabile TT-Viruslasten mit einer geringen intraindividuellen Variabilität (Focosi et al., 2020). Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Werte, im zeitlichen Verlauf oder im Kontrast zu pathologischen Fällen. Auch scheint der TTV-

Spiegel durch Medikamente, insbesondere Virostatika und antivirale Medikamente, kaum beeinflusst zu werden und dementsprechend eine unverfälschte Beurteilung des Immunstatus zu erlauben (Focosi et al., 2016, Spezia et al., 2023).

Konkret erfährt die TT-Viruslast als immunologischer Marker in den letzten Jahren insbesondere im Kontext der soliden Organtransplantation (SOT) vermehrt an Aufmerksamkeit: Nachdem 2003 erstmals ein Anstieg der TT-Viruslast unter immunsuppressiver Therapie nach erfolgter Nierentransplantation beschrieben wurde (Moen et al., 2003), konnte in folgenden Arbeiten eine typische TTV-Kinetik nach stattgehabter solider Organtransplantation identifiziert werden, welche unabhängig vom transplantierten Organ einem ähnlichen Muster folgt: Nach der Organtransplantation steigt in fast allen Studien innerhalb der transplantierten Kohorte mit Beginn der immunsuppressiven Therapie die TTV-Prävalenz auf 100% an. Gleichzeitig steigt auch die individuelle Viruslast deutlich und erreicht in den meisten Fällen innerhalb von 2-3 Monaten nach Transplantation einen Höchststand, gefolgt von einem leichten Absinken mit anschließender Plateauphase, in deren Verlauf es zu einem weiteren, langsamen Absinken der Viruslast kommt (Görzer et al., 2014, Doberer et al., 2020, Focosi et al., 2014, Ruiz et al., 2019).

Als eine der Ersten beschrieben De Vlaminck et al. eine Assoziation zwischen einer niedrigen Anelloviruslast und dem Risiko einer Transplantat-Abstoßung im Rahmen einer soliden Organtransplantation und schlugen vor, die Anelloviruslast zur Vorhersage des Grades der Immunkompetenz zu nutzen (De Vlaminck et al., 2013, Jaksch et al., 2022). Diese Ergebnisse konnten in weiteren Studien reproduziert werden; zusätzlich wurde eine Assoziation zwischen der TT-Viruslast und einer Infektion nach Transplantation beschrieben. Studienübergreifend zeigte sich unabhängig vom transplantierten Organ, dass eine hohe TT-Viruslast posttransplant mit einem schwachen Immunsystem und erhöhtem Infektionsrisiko, eine niedrige TT-Viruslast hingegen mit einem starken Immunsystem und einem erhöhten Risiko einer Transplantatabstoßung assoziiert war (Gore et al., 2023, Doberer et al., 2020, Fernández-Ruiz et al., 2019, Strassl et al., 2019, Solis et al., 2019, Schiemann et al., 2017, Ruiz et al., 2019, Simonetta et al., 2017, Görzer et al., 2015).

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde TTV sowohl für die Steuerung der immunsuppressiven Therapie als auch zur Vorhersage des Auftretens klinischer Events nach solider Organtransplantation vorgeschlagen (Jaksch et al., 2018, Görzer et al., 2014, Görzer et al., 2015). Jüngere Daten deuten dabei auf eine mögliche Überlegenheit zur Vorhersage einer Abstoßungsreaktion gegenüber einer opportunistischen Infektion hin (van Rijn et al., 2021, van Rijn et al., 2023). Um eine Nutzung als endogenen Immunmarker zu konkretisieren, wurden bereits in mehreren Publikationen verschiedene TTV-Cut-Off-Werte für die klinische Anwendung vorgeschlagen, jedoch differieren diese, möglicherweise aufgrund der

unterschiedlichen transplantierten Organe und Therapieregime, teils deutlich (Strassl et al., 2019, Doberer et al., 2020, Schiemann et al., 2017, Solis et al., 2019, Jaksch et al., 2022). Derzeit wird die Anwendung von TTV zum Monitoring und Optimierung der immunsuppressiven Therapie nach Organtransplantation in zwei multinationalen, randomisierten kontrollierten Interventionsstudien getestet (Jaksch et al., 2022, Gore et al., 2023).

Auch im Bereich der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-HSCT) wird TTV als potenzieller Immunmarker untersucht. Im Vergleich zur soliden Organtransplantation ist hier die Datenlage jedoch uneindeutiger. Aufgrund von teils stark differierenden Studienergebnissen, bleibt eine mögliche Anwendung als immunologischer Marker weiterhin umstritten. Grundsätzlich scheint die Interpretation der TTV-Viruslast bei allo-HSCT-Empfängern durch das komplexe Zusammenspiel mit der Grunderkrankung mit Depletion der mutmaßlich replikationskompetenten Zellen und dem individuellen Zeitpunkt der Erholung der Lymphozytenzahlen erschwert zu sein (Redondo et al., 2022). Ähnlich wie bei der soliden Organtransplantation sind praktisch alle allo-HSCT-Empfänger nach erfolgter Transplantation im Serum TTV-positiv (Albert et al., 2024, Wohlfarth et al., 2018, Mouton et al., 2020).

Bezüglich des Zusammenhangs der TT-Viruslast und dem Auftreten von Virusinfektionen oder akuter oder chronischer Graft-versus-Host-Reaktion (engl. *Graft-versus-Host-Disease*, GvHD), zeigt sich im Bereich der allo-HSCT ein gemischtes Bild mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Studien konnten darlegen, dass eine höhere TT-Viruslast nach allo-HSCT mit einem erhöhten Risiko für virale Infektionen, einer akuten GvHD, sowie einem schlechteren Zweijahres-Überleben assoziiert war (Pradier et al., 2020, Gilles et al., 2017). Andere Forschungsgruppen beobachteten einen gegenteiligen Zusammenhang, bei dem eine niedrige TT-Viruslast nach allo-HSCT mit einem erhöhten Risiko einer Cytomegalievirus-Infektion (CMV) assoziiert war (Spiertz et al., 2023, Albert et al., 2018a). Albert et al. wiesen eine signifikante Korrelation der TT-Viruslast sowohl im Blutplasma als auch im Speichel mit der Immunrekonstitution nach und schlugen die TTV-DNA-Last als Marker für die T-Zell-Rekonstitution in den ersten Tagen nach der allo-SCT vor, merkten jedoch an, dass die numerische Wiederbesiedlung von Lymphozyten bei der allo-SCT nicht unbedingt eine funktionelle Rekonstitution widerspiegelt (Albert et al., 2017, Albert et al., 2018b, Albert et al., 2024). Im Kontrast dazu konnten andere Arbeiten weder ein Nutzen von TTV als Marker für den Grad der Immunsuppression noch als prognostischer Marker im Kontext einer allo-HSCT nachweisen (Schmitz et al., 2020, Mouton et al., 2020, Wohlfarth et al., 2018).

Abseits der Transplantationsmedizin wurde TTV auch im Rahmen von infektiologischen Erkrankungen als möglicher Immunmarker untersucht. So wurde beispielsweise der Nutzen zur Vorhersage des Verlaufs einer SARS-CoV-2-Virus-Infektion oder zur Abschätzung der

Immunantwort nach Impfung gegen SARS-CoV-2 bei Dialysepatienten untersucht, wobei höhere TTV-Belastungen vor der Impfung mit einer geringeren Gesamt-Antikörper-Antwort assoziiert waren (Solis et al., 2022, Forqué et al., 2022, Feghoul et al., 2023, Querido et al., 2022). Im Bereich der Rheumatologie zeichnet sich ab, dass der TTV-Spiegel geeignet sein könnte, das klinische Ansprechen auf eine Therapie mit biologischen krankheitsmodifizierenden Antirheumatika (engl. *disease-modifying anti-rheumatic drug*, DMARD) bei Rheumatoider Arthritis zu prognostizieren (Studenic et al., 2022). In ersten Untersuchungen zeichnet sich zudem ein Nutzen von TTV als ergänzender Biomarker zur Vorhersage einer klinischen Verschlechterung bei Intensivpatient:innen ab (Mallet et al., 2021). Auch im Kontext immunologischer Tumorthérapien wurde TTV als Surrogatmarker für die Immunkompetenz untersucht. Erste Ergebnisse legen nahe, dass die TT-Viruslast eine Vorhersage über die Wirksamkeit und Toxizität einer CAR-T-Therapie bei Patienten mit großzelligem B-Zell-Lymphom erlaubt, sodass eine TTV-gesteuerte Therapiestrategie denkbar erscheint (Benzaquén et al., 2024).

Zusammenfassend deuten viele Studien darauf hin, dass eine Verwendung von TTV als Immunmarker, insbesondere im Kontext der soliden Organtransplantation, möglich ist. Dennoch sind die Daten mit Vorbehalt zu betrachten. Es bleibt unklar, welcher Teil des Immunsystems durch die TT-Viruslast abgebildet wird, so dass konkrete Rückschlüsse, insbesondere die Beurteilung einer funktionellen Immunfunktion nur eingeschränkt möglich sind. Aktuelle Publikationen kritisieren zudem, dass aufgrund der teils mangelnden Studienqualität, welche sich durch kleine Kohorten, unzureichend definierte klinische Endpunkte, fehlende Validierung, sowie teils mangelhafte statistische Auswertung auszeichnet, zum jetzigen Zeitpunkt keine validen Rückschlüsse möglich sind. Demzufolge sollte eine Anwendung von TTV als Immunmarker zum jetzigen Zeitpunkt noch kritisch betrachtet werden (van Rijn et al., 2023). Perspektivisch scheint TTV weniger konkrete Vorhersagen von individuellen Verläufen zu erlauben, sondern eher geeignet zu sein, Risikopatienten („*patients at risk*“) zu definieren (Jaksch et al., 2022).

1.3 TTV im Kontext von HIV

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein RNA-Virus aus der Familie der Retroviren, welches nach erfolgter Infektion im humanen Organismus bevorzugt CD4⁺-T-Zellen befällt. Die resultierende Abnahme der CD4⁺-T-Zellzahl führt im Verlauf zu einer verminderten Immunkompetenz der infizierten Person. In der Folge kann es zum Auftreten opportunistischer Infektionen bis hin zum „*acquired immunodeficiency syndrome*“ (AIDS) kommen. Durch eine

antiretrovirale Therapie (ART) wird, durch eine Kombination verschiedener Wirkstoffe mit jeweils unterschiedlichen pharmakologischen Zielstrukturen, die Virusreplikation unterbunden. Dies führt in der Regel zu einem Absinken der im Plasma nachweisbaren HIV-RNA-Last, sowie zu einem Wiederanstieg der CD4⁺-T-Zellzahl (Autran et al., 1997, Lederman et al., 1998). Im klinischen Alltag wird die absolute CD4⁺-T-Zellzahl zur Abschätzung des Immunstatus sowie zur Risikostratifizierung genutzt (CDC, 2014). Durch eine effektive antiretrovirale Therapie weisen Menschen mit HIV (engl. *people living with HIV*, PLWH) mittlerweile bei frühem Therapiestart und initial hoher CD4⁺-T-Zellzahl eine ähnliche Lebenserwartung wie die Normalbevölkerung auf (Trickey et al., 2023). Nichtsdestotrotz gestalten sich die Verläufe unter der Therapie, insbesondere die Immunerholung, weiterhin sehr individuell. In einigen Fällen kann unter begonnener Therapie kein Anstieg der CD4⁺-T-Zellzahl trotz sinkender HI-Viruslast verzeichnet werden („immunologische Non-responder“). Umgekehrt können teilweise steigende CD4⁺-T-Zellzahlen bei Stagnation der HI-Viruslast beobachtet werden („virologische Non-responder“). Ein weiteres Problem stellen unerwünschte immunologische Ereignisse im Therapieverlauf dar, insbesondere das Auftreten eines Immunrekonstitutionssyndroms (engl. *immune reconstitution inflammatory syndrome*, IRIS). Hierbei kommt es durch die Verbesserung der Immunfunktion nach ART-Beginn, zu einer überschießenden Immunreaktion auf latente oder subklinische Infektionen abseits der HIV-Erkrankung (beispielsweise mit Tuberkulose, CMV, Kryptokokkose) (Manzardo et al., 2015). Meist tritt es in den ersten Wochen bis Monaten nach Therapiebeginn auf und äußert sich durch eine paradoxe Verschlechterung klinischer Symptome (Walker et al., 2015). Zu den Risikofaktoren für das Auftreten eines IRIS zählen eine niedrige CD4⁺-T-Zellzahl (< 50 Zellen/μl) und hohe HI-Viruslast vor Therapiestart, ein schneller Anstieg der CD4⁺-T-Zellzahl unter ART, sowie das Vorliegen weiterer, insbesondere opportunistischer Infektionen (Müller et al., 2010, Walker et al., 2015). Um solche immunologischen Komplikationen frühzeitig vorhersagen zu können, ist die Identifizierung ergänzender Immunmarker von besonderem Interesse (Aiuti and Mezzaroma, 2006).

Vor diesem Hintergrund wurde TTV als potenzieller Marker der Immunfunktion bei Personen mit HIV diskutiert: Wie bei anderen Risikokohorten mit supprimierter Immunfunktion, können bei Personen mit HIV sowohl signifikant höhere TTV-Prävalenzen als auch höhere TT-Viruslasten im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollproband:innen nachgewiesen werden (Touinssi et al., 2001, Thom and Petrik, 2007, Shibayama et al., 2001, García-Álvarez et al., 2013). HIV-Spätdiagnostizierte scheinen darüber hinaus höhere TT-Viruslasten aufzuweisen als Personen mit akuter HIV-1-Infektion (Abbate et al., 2023). Zudem konnte eine Alteration des Blutviroms bei bestehender HIV-1-Infektion, insbesondere eine größere Anelloiddiversität, nachgewiesen werden. Unter antiretroviraler Therapie scheint sich die Zusammensetzung des Blutviroms

wieder derjenigen von Individuen ohne HIV anzugleichen (Liu et al., 2021, Boukadida et al., 2024).

Bezüglich der TTV-Kinetik beschrieben Madsen et al. in einer longitudinalen Studie an therapienaiven Menschen mit HIV nach Beginn einer antiretroviralen Therapie, neben einem unmittelbaren Absinken der HIV-RNA-Last, einen verzögerten Abfall der TTV-DNA nach 3-5 Monaten (Madsen et al., 2002). Abbate et al. detektierten sogar einen transienten Anstieg der TTV-DNA-Last in den ersten Monaten nach Beginn einer antiretroviralen Therapie, welcher nach 3 Monaten einen Höchststand erreicht, gefolgt von einem Absinken der Viruslast. Der temporäre TTV-Anstieg korrelierte dabei signifikant mit quantitativen Veränderungen der CD4⁺- und CD8⁺-Immunphänotypen auf zellulärer Ebene, insbesondere einem vermehrten Nachweis von Seneszenz- und Erschöpfungsmarkern auf CD8⁺-T-Zellen (Abbate et al., 2023). Andere Arbeiten konnten keinen Zusammenhang zwischen der Anellovirus-Virämie, spezifischen Anellovirus-Genotypen oder einem höheren Maß an Koinfektionen und dem Prozentsatz der aktivierten CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen unter antiretroviraler Therapie feststellen (Li et al., 2015).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Transplantationsmedizin zeigte sich in Studien ebenfalls eine Assoziation zwischen dem Immunstatus von Personen mit HIV und der TT-Viruslast: Als eine der Ersten beschrieben Christensen et al. eine höhere TTV-Prävalenz bei Menschen mit HIV als bei nicht-infizierten Blutspender:innen, sowie eine Korrelation zwischen niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen und hohen TT-Viruslasten (Christensen et al., 2000). Dieser inverse Zusammenhang zwischen hoher TT-Viruslast und niedriger CD4⁺-T-Zellzahl bei bestehender HIV-Infektion konnte in folgenden Studien bestätigt werden und wird auf die herabgesetzte Immunkompetenz bei fortgeschrittener HIV-Infektion durch Dezimierung der CD4⁺-T-Lymphozyten mit einhergehender verminderter immunologischer Kontrolle zurückgeführt (Touinssi et al., 2001, Shibayama et al., 2001, Thom and Petrik, 2007, Abbate et al., 2023, Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024, Liu et al., 2021). Jüngere Arbeiten deuten darauf hin, dass auch der TTV-Titer im Speichel invers mit der CD4⁺-T-Lymphozyten-Zahl und positiv mit der HI-Viruslast korreliert (Honorato et al., 2021). Vereinzelt wurde auch eine signifikante Korrelation der TT- beziehungsweise der Anelloviruslast mit der HIV-1-Viruslast beschrieben (Liu et al., 2021, Abbate et al., 2023).

Aufbauend auf diesen Beobachtungen, wurde auch im Kontext einer HIV-Infektion die TT-Viruslast als Marker der Immunkompetenz und Prädiktor der Immunrekonstitution diskutiert. Während Christensen et al. die TT-Viruslast als signifikanten Prädiktor für das Gesamtüberleben von Menschen mit HIV identifizierten und beobachteten, dass eine hohe TT-Viruslast mit einem höheren Risiko zu Versterben assoziiert war (Christensen et al., 2000), wurde in folgenden

Arbeiten vermehrt der Fokus auf eine Vorhersage des immunologischen Verlaufs gelegt. Hierbei zeigten sich teils differierende Ergebnisse.

Basierend auf der Beobachtung, dass Personen, die unter ART einen fehlenden Anstieg der CD4⁺-T-Zellzahl bei gleichzeitigem Absinken der HI-Viruslast aufwiesen (sog. immunologische Non-responder), ebenfalls ein Absinken der TT-Viruslast zeigten, postulierten Madsen et al., dass die TT-Viruslast als Surrogatmarker für die funktionale Immunerholung bei Menschen mit HIV unter ART von Nutzen sein könnte (Madsen et al., 2002). Im Folgenden konnten Schmidt et al. demonstrieren, dass die TT-Viruslast vor Behandlungsbeginn signifikant mit dem CD4⁺-T-Zell-Zuwachs nach einem Jahr unter ART korrelierte, wobei höhere TTV-Plasmakonzentrationen mit einem geringeren CD4⁺-T-Zell-Zuwachs innerhalb des ersten Jahres einhergingen. Zudem erwies sich die initiale TTV-Plasmakonzentration neben der initialen CD4⁺-T-Zellzahl als signifikanter, wenn auch schwacher Prädiktor für den Verlauf der Immunerholung, gemessen am CD4⁺-T-Zell-Zuwachs nach einem Jahr unter ART (Schmidt et al., 2021). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten Esser et al. in einer Kohorte von Personen mit HIV-1 die TT-Viruslast als signifikanten Prädiktor für die absolute CD4⁺-T-Zellzahl identifizieren. Außerdem stellten sowohl die TT- als auch die HI-Viruslast signifikante Prädiktoren für eine CD4⁺-T-Zellzahl der CDC-Klasse 3 dar, wobei mit zunehmender TT-Viruslast die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer CDC-Klasse 3 stieg. Eine Prognose des klinischen Stadiums anhand der TT- oder HI-Viruslast war in der untersuchten Kohorte nicht möglich; weder die TT-Viruslast noch die HI-Viruslast korrelierten mit dem klinischen CDC-Stadium. Die beobachteten Effektstärken waren jedoch auch hier gering. Darauf aufbauend wurden konkrete TTV-Grenzwerte zur Beurteilung des Immunstatus vorgeschlagen: Eine TT-Viruslast von < 4 Millionen Kopien/ml ($\approx 6,64 \log_{10}$ Kopien/ml) wurde als „nicht immunsupprimiert“ (CDC-Stufe 1), eine Viruslast von ≥ 4 Millionen und ≤ 12 Millionen Kopien/ml ($\approx 7,09 \log$ Kopien/ml) als „immunsupprimiert“ (CDC-Stufe 2), eine TT-Viruslast von > 12 Millionen Kopien/ml wurde als „hochgradig immunsupprimiert“ (CDC-Stufe 3) eingestuft (Esser et al., 2024). In Kontrast dazu erwies sich in der Untersuchung von Abbate et al. die TT-Viruslast hinsichtlich der Vorhersage der Immunerholung nicht als signifikanter Prädiktor. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast zum Zeitpunkt der Erstmessung und der absoluten CD4⁺-T-Zellzahl nach einem Jahr unter Therapie erhoben werden. Zudem unterschied sich der Prozentsatz der Proband:innen, die nach 12 Monaten unter Therapie einen Zuwachs von mehr als 200 Zellen aufwiesen, nicht signifikant zwischen den Gruppen mit initial hoher und niedriger TTV-DNA-Last (Abbate et al., 2023).

Zusammenfassend zeigt sich im Kontext einer HIV-Infektion eine Assoziation der TT-Viruslast mit dem Immunstatus, welche sich in einer studienübergreifend messbaren Korrelation zwischen niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen und hohen TT-Viruslasten äußert. Es scheint, als könne TTV darüber

hinaus potenziell auch als prädiktiver Surrogatmarker für den Verlauf der Immunrekonstitution unter antiretroviraler Therapie fungieren. Aufgrund der teils ambivalenten Datenlage und schwachen beschriebenen Effektstärken, sind diese Ergebnisse jedoch mit Vorbehalt zu betrachten.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob die im Blutplasma gemessene TT-Viruslast als endogener Biomarker zur Vorhersage der Immunrekonstitution unter antiretroviraler Therapie bei therapienaiven Menschen mit HIV-1 geeignet ist. Zur Beantwortung dieser Frage erfolgt eine retrospektive Analyse von Plasmaproben von 120 Personen mit HIV-1 aus Bamenda, Kamerun, bei der mittels quantitativer realtime-PCR die TT-Viruslast vor Beginn einer antiretroviralen Therapie gemessen wird. Für die statistische Auswertung werden Regressionsmodelle aufgestellt, in welchen neben der TT-Viruslast die Faktoren Alter, Geschlecht, HI-Viruslast und CD4⁺-T-Zellzahl zum Zeitpunkt des Therapiebeginns als Prädiktoren einbezogen werden. Ziel ist es, deren jeweilige prognostische Relevanz für die Immunrekonstitution unter antiretroviraler Therapie zu untersuchen.

Die Ergebnisse sollen dabei im Kontext bereits veröffentlichter Studien betrachtet und deren Reproduzierbarkeit sowie Übertragbarkeit auf die untersuchte Population geprüft werden. Da sich die bisherigen Erkenntnisse überwiegend auf europäische Kohorten stützen, wurde in dieser Arbeit eine nicht-europäische Patient:innenkohorte aus Bamenda, Kamerun analysiert. Durch die Untersuchung dieser geografisch und klinisch unterschiedlichen Population soll geklärt werden, ob sich die beschriebenen Zusammenhänge auch unter abweichenden epidemiologischen und immunologischen Bedingungen bestätigen lassen. Zudem soll untersucht werden, ob sich bestimmte Subpopulationen, etwa basierend auf der CD4⁺-T-Zellzahl vor Therapiebeginn, identifizieren lassen, die besonders von einer TTV-basierten Prognoseabschätzung profitieren. Da Patient:innen mit niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen und immunologische Komplikationen wie das Immune-Reconstitution-Inflammatory-Syndrom (IRIS) aufweisen, ist eine verbesserte Prognoseabschätzung insbesondere für diese Gruppe von Bedeutung. Bei Nachweis einer prädiktiven Aussagekraft der TT-Viruslast für die Immunrekonstitution, ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, konkrete Grenzwerte zu identifizieren, innerhalb derer die TT-Viruslast sinnvoll als klinischer Biomarker angewendet werden könnte.

Das übergeordnete Ziel ist, einen Beitrag zur individualisierten HIV-Therapie zu leisten. Sollte sich die TT-Viruslast als geeigneter Marker für die Immunrekonstitution bei Personen mit HIV-1 erweisen, könnte sie künftig bereits zu Therapiebeginn, zusammen mit Parametern wie HI-Viruslast, CD4⁺-T-Zellzahl, HIV-Subtyp und Resistenzprofil, routinemäßig bestimmt werden. Auf dieser Basis ließe sich eine vorausschauende Einschätzung des immunologischen Verlaufs unter antiretroviraler Therapie treffen oder das Risiko für immunologische Komplikationen wie das Auftreten eines IRIS besser abschätzen. Langfristig könnte dies die Entwicklung individualisierter, risikoadaptierter Therapiekonzepte ermöglichen, etwa durch gezielte engmaschige Kontrollen oder frühzeitige medikamentöse Anpassungen. Perspektivisch könnten durch ein solches Vorgehen Komplikationen minimiert und das klinisch-immunologische Outcome der Patient:innen verbessert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Plasmaproben

In dieser Forschungsarbeit wurden retrospektiv Plasmaproben von Personen mit HIV-1 aus Bamenda, Kamerun aus dem Jahr 2010 untersucht. Entnommen wurden die Proben im Rahmen der Studie „Risk factors for virological therapy failure after 12 months of first-line ART in Cameroon in 300 HIV-infected patients“ am North West Regional Hospital in Bamenda, Kamerun (Zoufaly et al., 2015). Blutplasma und zelluläre Blutbestandteilen wurden nach Entnahme separiert und das Plasma bei -80°C tiefgefroren, sodass eine Stabilität der viralen Nukleinsäuren angenommen werden kann (Mohamadkhani and Poustchi, 2015, José et al., 2005).

Für dieses Forschungsprojekt standen initial 346 Plasmaproben sowie parallel erhobene Daten zu klinisch-immunologischen Parametern aus der oben genannten Studienkohorte zur Verfügung. Die Daten wurden zu drei Messzeitpunkten erhoben: Es erfolgte eine initiale Erhebung vor Beginn einer antiretroviralen Therapie (Baseline, *BL*), eine Folgemessung nach sechs Monaten (Monat 6, *M6*) sowie eine weitere Messung nach zwölf Monaten unter antiretroviraler Therapie (Monat 12, *M12*). Von den vorliegenden 346 Plasmaproben wurden 46 Proben aufgrund einer unzureichenden Probenmenge ausgeschlossen. Insgesamt wurden 300 Plasmaproben für die PCR-Analyse verwendet. Davon wurden 180 Proben vor Therapiebeginn (*BL*) gewonnen, die verbleibenden 120 Proben wurden nach 12 Monaten (*M12*) bei denselben Proband:innen als Verlaufskontrolle entnommen. Initial umfasste die ursprüngliche Studienkohorte somit 180 Fälle.

Von den 180 Fällen wurden 36 aufgrund unvollständiger Daten von der Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurden 23 Fälle exkludiert, in welchen kein Anstieg der CD4⁺-T-Zellzahl und/oder ein Anstieg der HI-Viruslast verzeichnet wurde, da in diesen Fällen keine erfolgreiche Immunrekonstitution vorlag, diese jedoch eine Voraussetzung für die Beantwortung der Forschungsfrage darstellt. Darüber hinaus konnte in einem Fall vor Therapiebeginn kein TTV in der Plasmaprobe nachgewiesen werden. Somit war eine Beurteilung der TT-Viruslast als prognostischer Immunmarker nicht möglich, weshalb auch dieser Fall exkludiert wurde. Final flossen 120 Fälle in die statistische Auswertung ein (siehe *Abb. 2*).

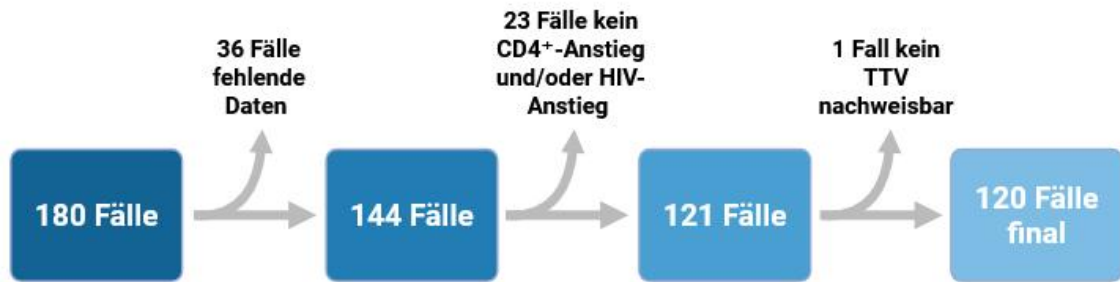


Abbildung 2: Flowchart Generierung der Fallzahl. Erstellt mit <https://BioRender.com>.

2.1.2 Ethikvotum

Im Rahmen der Beurteilung des Forschungsvorhabens durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden keine ethischen und rechtlichen Bedenken festgestellt. Das Projekt wird unter dem Aktenzeichen „2019-689-andere Forschung erstvotierend“ geführt.

2.1.3 Material DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den Plasmaproben erfolgte unter Verwendung des automatisierten Probenaufbereitungssystems EZ1® Advanced XL (Qiagen, Hilden, Deutschland) in Kombination mit dem EZ1® Virus Mini Kit v2.0. Eine Übersicht der hierfür eingesetzten Materialien ist nachfolgend in *Tabelle 1* dargestellt:

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte für die DNA-Extraktion

Artikel	Hersteller
EZ1® Virus Mini Kit v2.0	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Carrier RNA	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Disposable tip holders und filter tips	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Sample tubes, 2ml	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Elution tubes, conical tip, 1,5ml	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Geräte und Software	Hersteller
EZ1®Advanced XL	Qiagen (Hilden, Deutschland)
EZ1®Advanced XL Virus Card v2.0, Software	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.4 Material TTV-Realtime-PCR

Für die Durchführung der Realtime-PCR wurde das von Maggi et al. beschriebene TaqMan-TTV-PCR-Assay verwendet, welches die untranslatierte Region (UTR) als Zielregion nutzt. Dieses Assay ermöglicht den Nachweis aller TTV-Genotypen mit einer Nachweisgrenze von $1,0 \times 10^3$ viralen Genomen pro ml oder pro μg Gesamt-DNA, andere humane Anelloviren werden nicht amplifiziert (Maggi et al., 2003). *Tabelle 2* bietet eine Übersicht der verwendeten Primer und Sonde. *Tabelle 3* und *Tabelle 4* zeigen die für die TTV-Realtime-PCR verwendeten Materialien und Geräte:

Tabelle 2: Verwendete Primer und Sonde der TTV-Realtime-PCR

Primer und Sonde	Sequenz	Hersteller
AMTS, Forward Primer	5'-GTG CCG IAG GTG AGT TTA-3'	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
AMTAS, Reverse Primer	5'-AGC CCG GCC AGT CC-3'	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
AMTPTU, Sonde	5'-FAM-TCA AGG GGC AAT TCG GGC T- 3'TAMRA	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)

Tabelle 3: Verwendete Materialien der TTV-Realtime-PCR

Artikel	Hersteller
TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix, 5ml	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Forward Primer, AMTS	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Reverse Primer, AMTAS	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Sonde, AMTPTU	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Nuclease-Free Water, 25ml	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Software der TTV-Realtime-PCR

Geräte und Software	Hersteller
Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
7500 Software v2.3	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Zur Quantifizierung der amplifizierten DNA-Produkte anhand einer Kalibrationskurve wurden TTV-Standards verwendet. Die Standards wurden als Verdünnungsreihe in folgenden Konzentrationen angesetzt:

TTV-Standard (A) 2×10^7 Kopien/ μ l

TTV-Standard (B) 2×10^6 Kopien/ μ l

TTV-Standard (C) 2×10^5 Kopien/ μ l

TTV-Standard (D) 2×10^4 Kopien/ μ l

Zur Stabilisierung wurden die Standards in Salmon-Sperm-DNA mit 0,5 x Trishydroxymethylaminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TRIS-EDTA-Puffer; TE-Puffer) verdünnt. Für die TTV-qRT-PCR wurden die Standards (B), (C) und (D) genutzt.

2.1.5 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Eine Übersicht der verwendeten Plastik- und Verbrauchsmaterialien zeigt *Tabelle 5*:

Tabelle 5: Verwendete Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Pipetten 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TipOne®Pipette Tips 10/20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Star Lab GmbH (Herndon, Virginia, USA)
SafeSeal micro tube 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp® Optical 8-Tube Strip (0.2ml)	Applied biosystems by life technologies
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Applied biosystems by life technologies

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion der DNA

Die DNA-Extraktion aus den Plasmaproben erfolgte automatisiert mithilfe des Bio-Roboters EZ1®Advanced XL von Qiagen in Kombination mit dem EZ1®Virus Mini Kit v.2.0 gemäß den Herstellerangaben. Hierbei wurden 200µl der jeweiligen Plasmaprobe verwendet, aus welcher ein Eluat mit einem Volumen von 60µl gewonnen wurde. Die erstellten Eluate wurden permanent bei -80°C gelagert.

2.2.2 Quantifizierung der DNA-Menge

Die Quantifizierung der TTV-DNA erfolgte mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR). Zunächst wurden die Primer und Sonde aus *Tabelle 2* jeweils auf 10µM verdünnt. Der PCR-Mastermix wurde anschließend wie folgt angesetzt:

Tabelle 6: Mengenverhältnisse pro PCR-Einzelansatz

Menge pro Einzelansatz	Material
12,5µl	TaqMan® Universal PCR Master Mix
0,75µl	Forward primer
0,75µl	Reverse primer
0,25µl	Sonde
5,75µl	Nuclease-free Water

In jedes Well des MicroAmp® Optical 8-Tube Strip wurden jeweils 20µl Mastermix und 5µl des Proben-Eluats pipettiert und der Tube-Strip mit dem MicroAmp® Optical 8-Cap Strip verschlossen. In jedem PCR-Ansatz wurden die in Abschnitt 2.1.4 beschriebenen Standards (B), (C) und (D) jeweils in zweifacher Ausführung als Standardreihe pipettiert. Die TTV-qRT-PCR wurde im Anschluss im Thermocycler „Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR System“ (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA) mit folgendem Thermalprotokoll durchgeführt:

Tabelle 7: Thermalprotokoll der TTV-qRT-PCR

Cycle	Temperature	Time	Repeat	Ramp
HOLD	50°C	02:00		Auto
HOLD	95°C	10:00		Auto
CYCLE	95°C	00:15	45x	
	60°C	01:00		Auto

Da Schmidt et al. mittels verblindeter Ringtestung die Stabilität und Reproduzierbarkeit der mit dem verwendeten Protokoll erhobenen TT-Viruslasten belegen konnten (Schmidt et al., 2021), erfolgte in diesem Projekt lediglich stichprobenartig bei zwanzig Proben eine zweifache Messung der TT-Viruslast. Diese ergab geringe, statistisch nicht signifikante Wertedifferenzen, sodass auch in dieser Kohorte von einer Stabilität der gemessenen Viruslasten ausgegangen werden konnte.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 29.0.2 für Windows (2024) analysiert. Für die Moderationsanalyse wurde das „PROCESS tool v4.2 for SPSS“ von Andrew F. Hayes (Hayes and Rockwood, 2017) verwendet. Die abgebildeten statistischen Grafiken wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 10 (2023) erstellt.

Die mittels qRT-PCR bestimmten TT-Viruslasten wurden in Bezug zu klinisch-immunologischen Parametern der Proband:innen analysiert und ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurden die Parameter Geschlecht [männlich/weiblich], Alter [Jahre], die CD4⁺-T-Zellzahl *BL* [Zellen/ μ l], die CD4⁺-T-Zellzahl *M6* [Zellen/ μ l], die HIV-1-RNA-Viruslast *BL* [Kopien/ml], die HIV-1-RNA-Viruslast *M12* [Kopien/ml], die TTV-DNA-Viruslast *BL* [Kopien/ml] und die TTV-DNA-Viruslast *M12* [Kopien/ml] analysiert. Da die HI-Viruslasten und TT-Viruslasten jeweils große Wertebereiche umfassten, wurden sie mittels dekadischer Logarithmierung ($\log_{10}$) transformiert.

Bei sämtlichen statistischen Tests wurde auf die Erfüllung der jeweiligen Voraussetzungen überprüft; bei Verletzungen dieser Voraussetzungen wurden geeignete alternative Verfahren herangezogen. Ergebnisse mit $p < .05$ wurden als signifikant erachtet, es wurde jederzeit zweiseitig getestet. Ausreißer und Extremwerte wurden nach der Methode von Tukey auf Basis des Medians, 1. und 3. Quartils sowie des Interquartilsabstands (*interquartile range*, IQR) identifiziert. Auf ein grundsätzliches Bereinigen von statistischen Ausreißern und Extremwerten wurde in der Auswertung verzichtet. Um eine mögliche Verzerrung der aufgestellten Modelle durch einflussreiche Fälle auszuschließen, wurde anhand der Cook-Distanz, der Hebelwerte, der Mahalanobis-Distanz, sowie der DFBeta Werte der statistische Einfluss der jeweiligen Fälle überprüft und falls erforderlich entsprechende Konsequenzen gezogen. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte sowohl grafisch, mittels Histogramms und Q-Q-Plot, als auch rechnerisch mittels Shapiro-Wilks-Test. Falls erforderlich, wurde auf non-parametrische Verfahren zurückgegriffen. Die Beurteilung der Entwicklung der CD4⁺-Zellzahl erfolgte mittels

Friedman-Test; anschließende paarweise Post-hoc-Vergleiche wurden mit Wilcoxon-Tests unter Anwendung einer Bonferroni-Korrektur des α -Fehlerniveaus durchgeführt. Die Medianvergleiche der TT-Viruslast und der HI-Viruslast erfolgten mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben. Die Korrelationen wurden als Spearman-Korrelationen angegeben.

Zur Beantwortung der Forschungsfrage wurde eine multiple lineare Regression als Verfahren gewählt. In das Regressionsmodell wurden die Parameter Geschlecht [männlich/weiblich], Alter [Jahre], die CD4⁺-T-Zellzahl *Baseline* [Zellen/ μ l], die HIV-1-RNA-Viruslast *Baseline* [$\log_{10}$ Kopien/ml] und die TTV-DNA-Viruslast *Baseline* [$\log_{10}$ Kopien/ml] als Prädiktoren aufgenommen. Als Zielvariable wurde die absolute CD4⁺-T-Zellzahl nach einem Jahr, *CD4⁺-T-Zellzahl M12* [Zellen/ μ l], unter antiretroviraler Therapie definiert. Die aufgestellte Regressionsgleichung ist in *Abb. 3* dargestellt:

$$CD4^+_{M12} = b_0 + b_1 \text{Geschlecht} + b_2 \text{Alter} + b_3 CD4^+_{BL} + b_4 \log_{10} HIV_{BL} + b_5 \log_{10} TTV_{BL} + \epsilon$$

Abbildung 3: Erstes Regressionsmodell, Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl M12

Die Auswahl der Regressionsvariablen erfolgte aufgrund von klinisch-inhaltlichen Überlegungen. Da in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der Immunrekonstitution untersucht wurde, stellt die TTV-DNA-Viruslast *Baseline* [$\log_{10}$ Kopien/ml] den relevantesten Prädiktor in den Regressionsmodellen dar. Neben der TT-Viruslast *BL* wurde die CD4⁺-T-Zellzahl *Baseline* [Zellen/ μ l] als Regressionsvariable aufgenommen. Da demonstriert werden konnte, dass die initiale CD4⁺-Zellzahl ein relevanter prognostischer Faktor zur Vorhersage der Immunerholung unter antiretroviraler Therapie ist (Mellors et al., 1997, Egger et al., 2002), übt die CD4⁺-T-Zellzahl *BL* auch in dieser Kohorte mutmaßlich einen relevanten Einfluss auf das erhobene Outcome, die CD4⁺-T-Zellzahl nach einem Jahr (*M12*) aus. Aus ähnlichen Gründen wurde die HIV-1-RNA-Viruslast *Baseline* [$\log_{10}$ Kopien/ml] als Prädiktor inkludiert. In vorangegangenen Studien wurde postuliert, dass die zu Therapiebeginn erhobene HI-Viruslast die CD4⁺-Anstiegsrate beeinflusst, insgesamt jedoch kein starker Prädiktor für die langfristige CD4⁺-Entwicklung darstellt (de Wolf et al., 1997). Da somit ein möglicher Einfluss auf das Outcome nicht auszuschließen ist, stellt die HI-Viruslast einen möglichen Confounder dar und wurde aus diesem Grund als Prädiktor eingeschlossen. In vorangegangenen Arbeiten konnte darüber hinaus ein Effekt des Alters sowohl auf die TT-Viruslast (Focosi et al., 2020), als auch auf die CD4⁺-Zellzahl bzw. CD4⁺-Zellzahl-Erholung bei Menschen mit HIV unter ART beobachtet werden (Bishop et al., 2016, Chen et al., 2022, Viard et al., 2001). Zusätzlich deuten Studien darauf hin, dass das Geschlecht bei Menschen mit HIV einen Einfluss sowohl auf die CD4⁺-Zellzahl Erholung als auch die HIV-Replikation ausübt (Maman et al., 2012, Brandt et al., 2023, Kouamou et al., 2023, Ruel et al., 2011). Um diesem Umstand Rechnung zu tragen und Alter

[Jahre] und Geschlecht [männlich/weiblich] als mögliche Confounder zu adressieren, wurden sie als Kontrollvariablen in die Modelle aufgenommen.

Die Parameter Hepatitis-B-Co-Infektion [ja/nein], Hepatitis-C-Co-Infektion [ja/nein] und Tuberkulose-Co-Infektion [ja/nein] wurden trotz klinisch-inhaltlicher Relevanz aufgrund zu geringer Fallzahlen und daraus resultierend zu geringer statistischer Power nicht als Prädiktoren in das Modell aufgenommen.

In allen Modellen wurde hypothesengeleitet vorgegangen, alle Prädiktoren wurden zeitgleich in das Modell aufgenommen, von einer automatisierten schrittweisen Variablenauswahl wurde abgesehen. Um ein lineares Modell annehmen und eine multiple lineare Regression rechnen zu können, wurde geprüft, ob die Voraussetzungen für lineare Modelle erfüllt sind. Für diese Arbeit wurden die Kriterien definiert von Fields et al. herangezogen (Field and Wilcox, 2017). Die Voraussetzungen für lineare Modelle wurden in diesem und allen weiteren aufgestellten linearen Modellen erfüllt.

Um die Bedeutung von TTV als prognostischem Marker weiter zu explorieren und explizit die Vorhersage der Immunrekonstitution zu untersuchen, wurde ein zweites Regressionsmodell aufgestellt. Die Prädiktoren wurden aus dem ersten Regressionsmodell übernommen, jedoch wurde statt der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr nun die Zunahme der CD4⁺-Zellzahl („CD4⁺-Zellzahl *Gain*“) unter Therapie als Zielvariable definiert. Das Regressionsmodell wurde folgendermaßen formuliert:

$$CD4^+Zunahme_{M12} = b_0 + b_1Geschlecht + b_2Alter + b_3CD4^+_{BL} + b_4\log_{10}HIV_{BL} + b_5\log_{10}TTV_{BL} + \epsilon$$

Abbildung 4: Zweites Regressionsmodell, Vorhersage der CD4⁺-Zellzahl-Zunahme M12

In einer weiteren, ergänzenden Rechnung wurde überprüft, ob die TT-Viruslast dazu dienen kann, abseits der absoluten CD4⁺-Zellzahl, das Auftreten einer bestimmten CD4⁺-Zunahme-Gruppe („Recovery-Gruppe“) nach einem Jahr unter antiretroviraler Therapie vorherzusagen. Hierfür wurden die von Schmidt et al. beschriebenen Recovery-Gruppen von < 50 Zellen/μl, 50-200 Zellen/μl und > 200 Zellen/μl herangezogen (Schmidt et al., 2021). Da die Zielvariable nun als ordinale Recovery-Gruppen definiert wurden, wurde eine ordinale logistische Regression gerechnet. Als Prädiktoren wurden erneut das Geschlecht [dummycodiert 0 = weiblich; 1 = männlich], das Alter [Jahre], die CD4⁺-Zellzahl BL [Zellen/μl], die logarithmierte HI-Viruslast BL [log₁₀Viruskopien/ml] und die logarithmierte TT-Viruslast BL [log₁₀Viruskopien/ml] festgelegt. Als Zielvariable wurde die Auftretenswahrscheinlichkeit der genannten CD4⁺-Zunahme-Gruppen

definiert. Die Gruppe „Zunahme > 200 Zellen/ μ l“ wurde dabei als Referenzkategorie festgelegt. Das Regressionsmodell ist in *Abb. 5* abgebildet:

$$P(CD4^+ \text{ gain} > 200 \text{ Zellen}/\mu\text{l}) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 \text{Geschlecht} + b_2 \text{Alter} + b_3 CD4^+_{BL} + b_4 \log_{10} HIV_{BL} + b_5 \log_{10} TTV_{BL})}}$$

Abbildung 5: Drittes Regressionsmodell, Vorhersage einer CD4⁺-Recovery-Gruppe

Vor Durchführung der Regression wurde auf das Erfüllen der Proportional-Odds-Annahme (Parallel-Linien-Annahme) geprüft.

Abschließend wurde untersucht, ob eine mögliche Interaktion zwischen der CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und der TT-Viruslast in der Vorhersage der Immunrekonstitution besteht. Konkret wurde getestet, ob der Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast *BL* und der CD4⁺-Zellzahl *M12* durch die CD4-Zellzahl *BL* beeinflusst wird. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob bestimmte CD4⁺-Subgruppen identifiziert werden können, für die die TT-Viruslast ein signifikanter prognostischer Marker ist, welche in den vorangegangenen Regressionen möglicherweise kaschiert wurden. Hierfür wurde eine Moderationsanalyse mit robusten Standardfehlern durchgeführt. In das Modell wurden erneut die Prädiktoren Geschlecht, Alter, die CD4⁺-Zellzahl *BL*, die logarithmierte HI-Viruslast *BL* und die logarithmierte TT-Viruslast *BL* aufgenommen. Um auf einen möglichen „moderierenden Effekt“ durch die Interaktion der CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und TT-Viruslast *BL* zu prüfen, wurde zusätzlich der Interaktionsterm der CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und TT-Viruslast *BL* ($CD4^+_{BL} \times TTV_{BL}$) als neue „Interaktionsvariable“ inkludiert. Die Regressionsgleichung wurde wie folgt formuliert:

$$CD4^+_{M12} = \beta_0 + \beta_1 \text{Geschlecht} + \beta_2 \text{Alter} + \beta_3 CD4^+_{BL} + \beta_4 \log^{10} HIV_{BL} + \beta_5 \log^{10} TTV_{BL} + \beta_6 \text{Interaktion}_{CD4^+_{BL} \times TTV_{BL}} + \epsilon$$

Abbildung 6: Viertes Regressionsmodell, Überprüfung einer möglichen Moderation des Zusammenhangs zwischen CD4⁺-Zellzahl M12 und TTV durch die CD4⁺-Zellzahl BL

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Studienkohorte

In der untersuchten Kohorte waren von 120 Personen 89 Personen weiblich (74,2%) und 31 männlich (25,8%). Der Median für das Alter betrug 38 Jahre (Range: 20 - 78 Jahre). In der initialen Erhebung vor Therapiebeginn lag die mediane CD4⁺-T-Zellzahl in der Kohorte bei 162 Zellen/ μ l (Range: 1 - 459 Zellen/ μ l), die mediane HI-Viruslast bei 5,5 log₁₀ Kopien/ml (Range: 3,2 log₁₀ - 6,7 log₁₀ Kopien/ml). Bei 12 Proband:innen (10 % der Gesamtkohorte) wurde zusätzlich der HIV-1-Subtyp bestimmt. Hierbei zeigte sich in 9 Fällen der Subtyp CRF02_AG. In den übrigen Fällen wurden jeweils einmal folgende Subtypen bzw. Rekombinanten identifiziert: CRF02_AG/D, CRF01_AE/A, F (N = 12; 108 fehlende Angaben). Die eingeleitete antiretrovirale Therapie (ART) basierte in 78 Fällen (65,5 %) auf Nevirapin, in 37 Fällen (31,1 %) auf Efavirenz und in 4 Fällen (3,4 %) auf Lopinavir (N = 119; 1 fehlende Angabe). Die vor Therapiebeginn erhobene mediane TTV-DNA-Viruslast lag in der Kohorte bei 5,7 log₁₀ Kopien/ml (Range: 2,7 - 8,1 log₁₀ Kopien/ml). Vor Therapiebeginn waren 14 Personen (11,7%) mit Hepatitis B und 3 Personen (2,8%) mit Hepatitis C (N = 109, 11 fehlende Angaben) co-infiziert. Eine akute Tuberkulose-Infektion lag bei 9 Personen (7,5%) vor (*siehe Tabelle 8*).

Tabelle 8: Übersicht der Patientencharakteristika vor Beginn der antiretroviralen Therapie, Zeitpunkt Baseline (BL)

		N	Gültige %
Geschlecht	weiblich	89	74
	männlich	31	26
Co-Infektionen	Hepatitis B	14	12
	Hepatitis C (N=109)	3	3
	Akute Tuberkulose	9	8
HIV-Subtyp	CRF02_AG	9	75
	CRF02_AG/D	1	8,3
	CRF01_AE/A	1	8,3
	F	1	8,3
	Fehlende Angabe	108	8,3
Angesetzte ART	Nevirapin	78	66
	Efavirenz	37	31
	Lopinavir	4	3
	Fehlende Angabe	1	
		Median	Min.- Max.
Alter [Jahre]		38	20 – 78
CD4⁺-T-Zellen [Zellen/μl]		162	1 – 459
HIV-RNA [log₁₀ Kopien/ml]		5,5	3,2 – 6,7
TTV-DNA [log₁₀ Kopien/ml]		5,7	2,7 – 8,1

3.2 Entwicklung der CD4⁺-T-Zellzahlen, der HI-Viruslast und der TT-Viruslast im Verlauf unter ART

Innerhalb des einjährigen Beobachtungszeitraums zeigte sich unter antiretroviraler Therapie im Verlauf der drei Messzeitpunkte (*BL*, *M6*, *M12*) ein signifikanter Anstieg der medianen CD4⁺-T-Zellzahl (Friedman-Test, $\chi^2(2) = 161,21$, $p < .001$). Die mediane CD4⁺-T-Zellzahl stieg dabei von 161 Zellen/μl (IQR 40 – 254) vor Therapiebeginn, auf 274 Zellen/μl (IQR 162 - 420) nach 6 Monaten und 320 Zellen/μl (IQR 224 - 474) nach 12 Monaten (siehe *Abb. 4*). Zu den Zeitpunkten *M6* und *M12* zeigte sich jeweils ein Ausreißer der Werte (*in dieser und den folgenden Abbildungen als Punkte dargestellt*). Post-hoc Analysen ergaben, dass sowohl der CD4⁺-Zellzahl-

Anstieg zwischen den Zeitpunkten *BL* zu *M6* ($z = -9,042$; $p < .001$), als auch der Anstieg von *M6* zu *M12* ($z = -3,625$; $p < .001$) statistisch signifikant war.

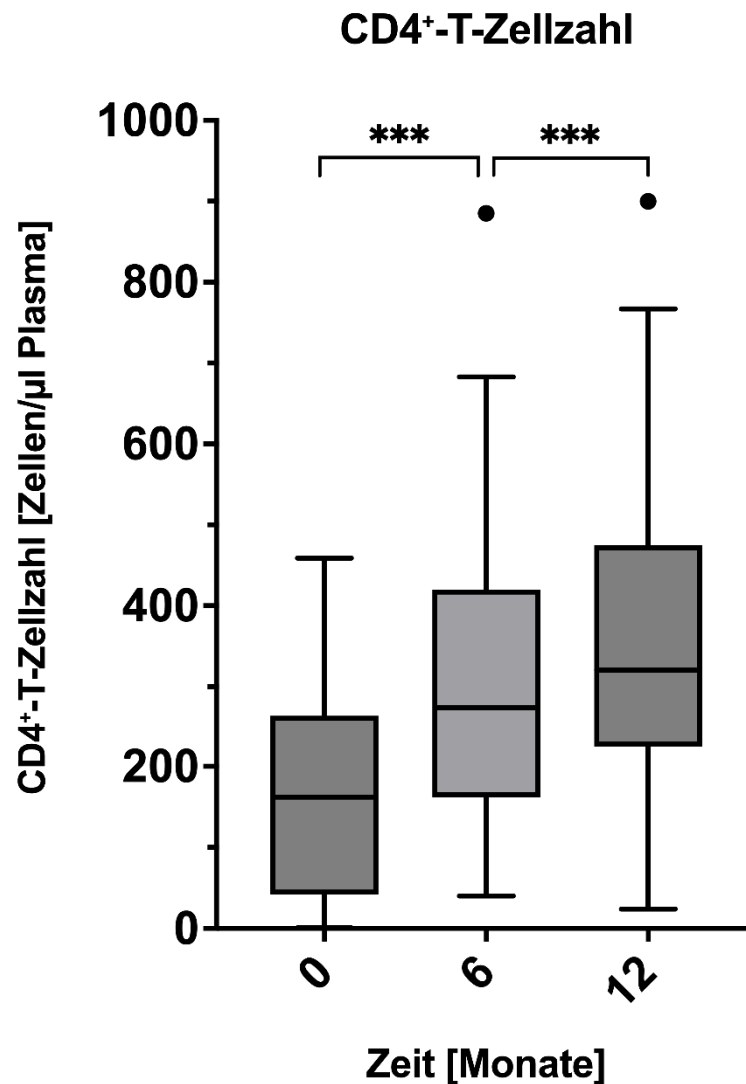


Abbildung 4: Anstieg der medianen CD4⁺-T-Zellzahl im Verlauf eines Jahres. Darstellung als Boxplot mit Median, 1. (Q1) und 3. Quartil (Q3), Minimalwert und Maximalwert. Werte außerhalb von $1,5 \times IQR$ unterhalb von Q1 bzw. oberhalb von Q3 wurden nach Tukey als Ausreißer ($1,5-3 \times IQR$) bzw. Extremwerte ($>3 \times IQR$) definiert und sind in dieser und den folgenden Grafiken als Punkt dargestellt

Im gleichen Zeitraum zeigte sich ein signifikantes Absinken der medianen HI-Viruslast, von *BL* 5,4 log₁₀Kopien/ml, auf einen Wert von 2,0 log₁₀Kopien/ml nach 12 Monaten ($z = -9,507$, $p < .001$). In einer Mehrzahl der Fälle konnte dabei ein deutlicher Rückgang auf einen Wert von 1,60 log₁₀Kopien/ml, entsprechend 40 Kopien/ml, verzeichnet werden (siehe Anhang, Abb. 12). Aufgrund der ART-Einnahme mit resultierender Verschiebung der HI-Viruslast-Verteilung in der

Kohorte, zeigten sich in der grafischen Darstellung viele Ausreißer und Extremwerte zum Zeitpunkt *M12* (siehe Abb. 5).

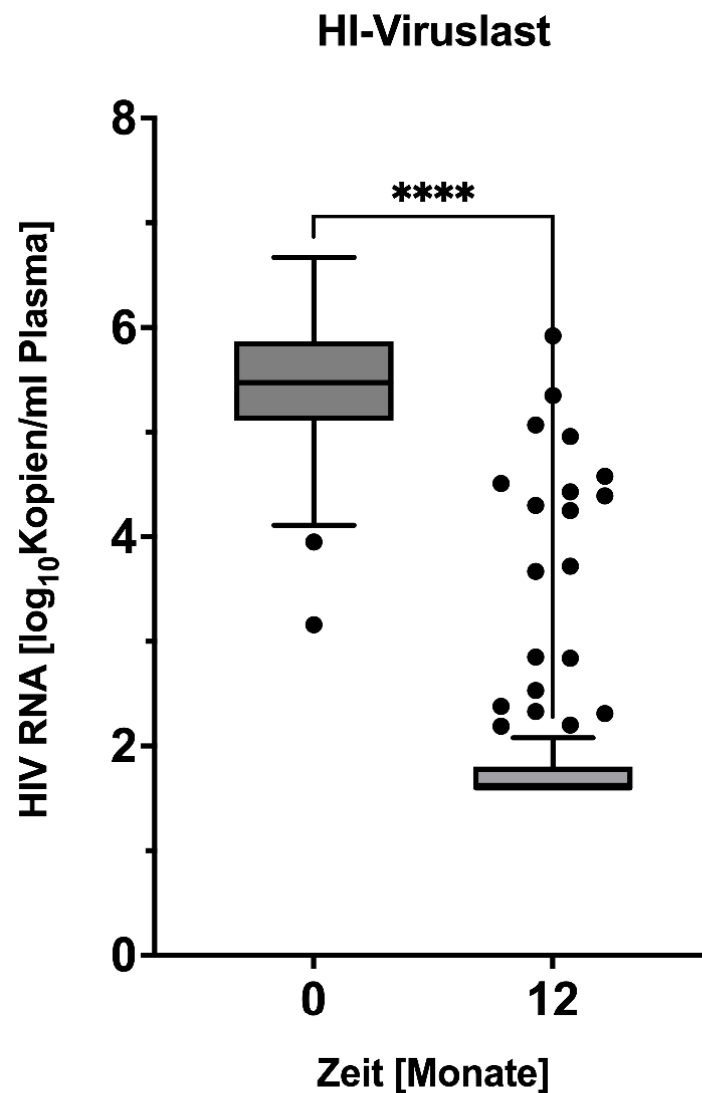


Abbildung 5: Entwicklung der logarithmierten HI-Viruslast über zwei Messzeitpunkte. Darstellung als Boxplot, siehe Abb. 4

Auch die mediane TT-Viruslast sank im Verlauf der zwei Messzeitpunkt *BL* und *M12* von initial 5,7 log₁₀Viruskopien/ml Blutplasma auf 4,1 log₁₀Viruskopien/ml Plasma signifikant ab ($z = -7,972$, $p < .001$) (siehe Abb. 6).

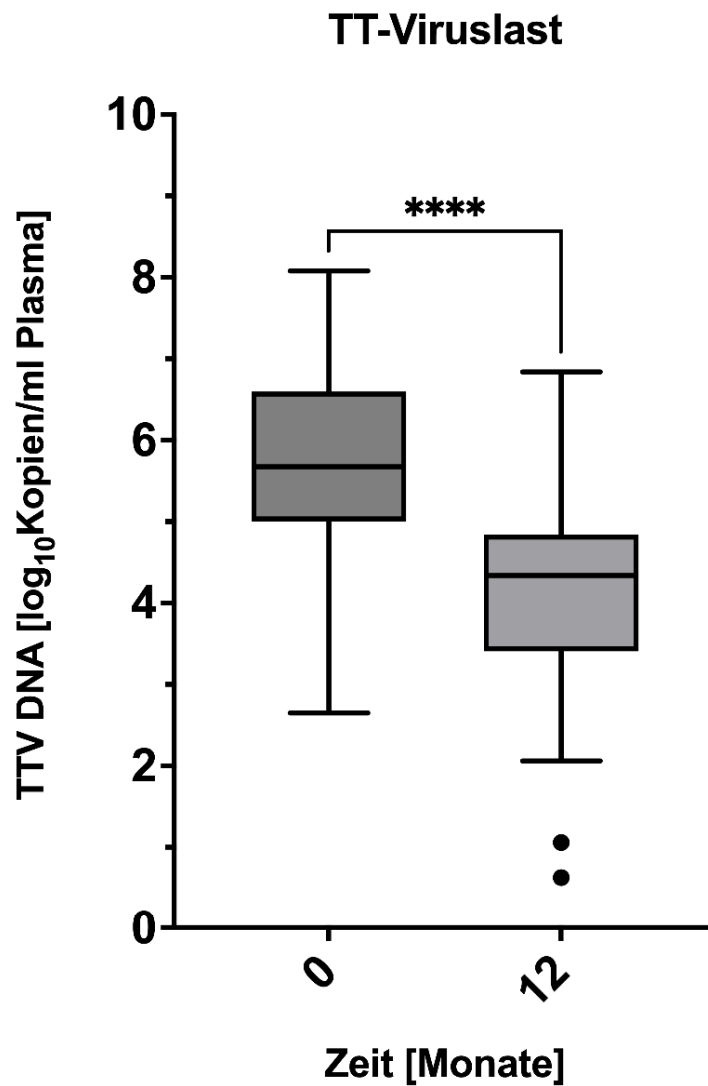


Abbildung 6: Entwicklung der logarithmierten TT-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten. Darstellung als Boxplot, siehe Abb. 4

3.3 Korrelationen zwischen TT-Viruslast, HIV-RNA-Konzentration und CD4⁺-Status

Es zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der HI-Viruslast *BL* und der CD4⁺-T-Zellzahl *BL* ($p < .001$, $r_s = -.343$). Hohe HI-Viruslasten gingen dabei mit niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen einher (siehe Abb. 7).

Korrelation CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und HI-Viruslast *BL*

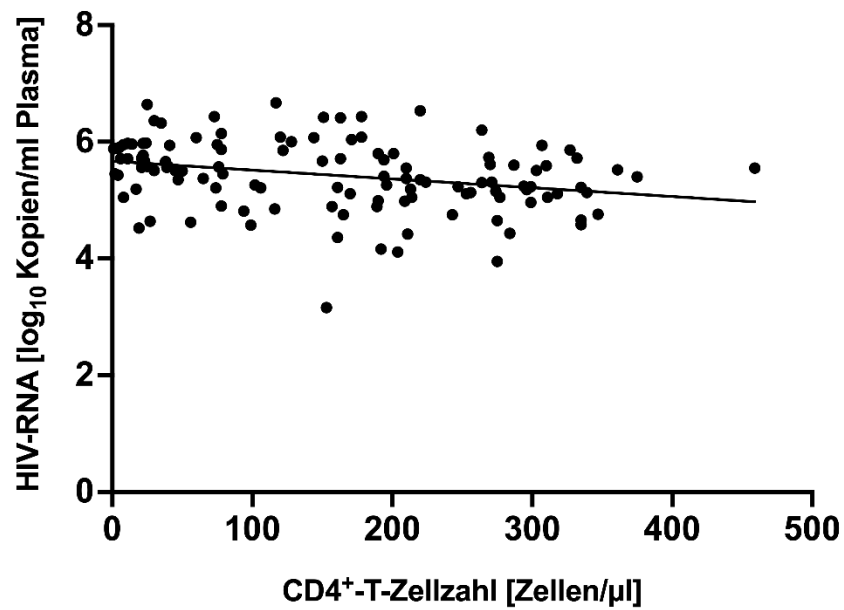


Abbildung 7: Korrelation der CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und HI-Viruslast *BL*

Des Weiteren konnte ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der CD4⁺-T-Zellzahl beobachtet werden: Die TT-Viruslast *BL* korrelierte signifikant invers sowohl mit der absoluten CD4⁺-Zellzahl *BL* ($p = .007$, $r_s = -.244$) (*Abb. 8*) als auch mit der absoluten CD4⁺-Zellzahl *M12* ($p = .022$; $r_s = -.209$) (*Abb. 9*). In beiden Fällen waren hohe TT-Viruslasten mit niedrigen CD4⁺-Zellzahlen assoziiert.

Korrelation CD4⁺-T-Zellzahl *BL* und TT-Viruslast *BL*

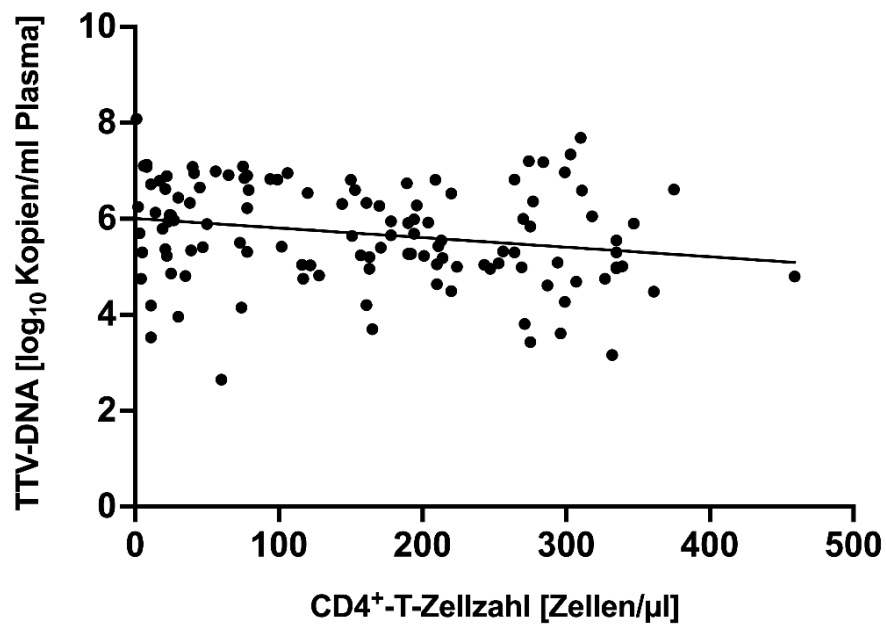


Abbildung 8: Korrelation der CD4⁺-Zellzahl BL und der TT-Viruslast BL

Korrelation CD4⁺-T-Zellzahl *M12* und TT-Viruslast *BL*

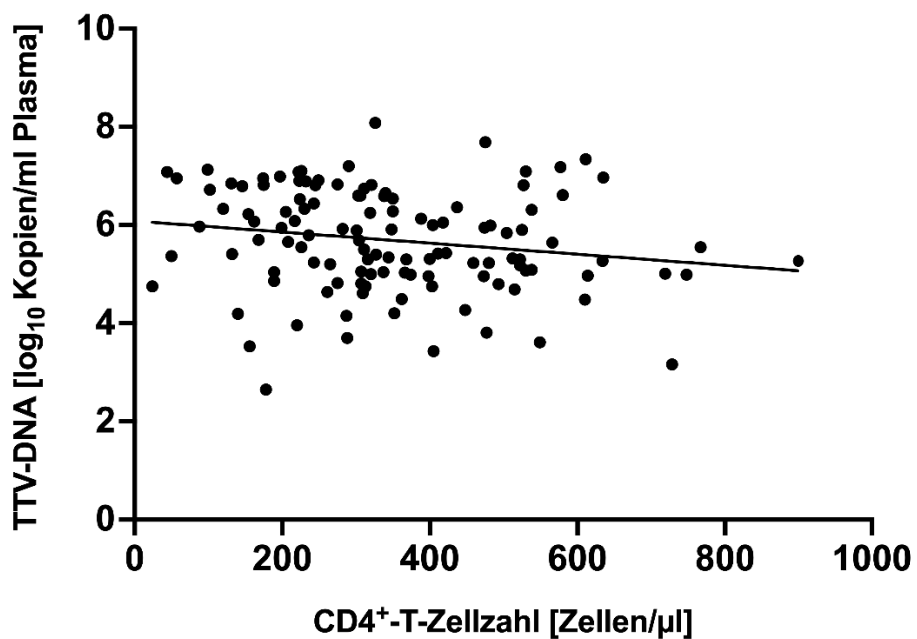


Abbildung 9: Korrelation der CD4⁺-Zellzahl M12 und der TT-Viruslast Baseline

Im Gegensatz dazu, konnte keine signifikante Korrelation der TT-Viruslast mit der CD4⁺-Zunahme nach einem Jahr unter ART nachgewiesen werden ($p = .094$; $r_s = -.140$) (siehe Abb. 10).

Korrelation CD4⁺-T-Zell-Zuwachs und TT-Viruslast *BL*

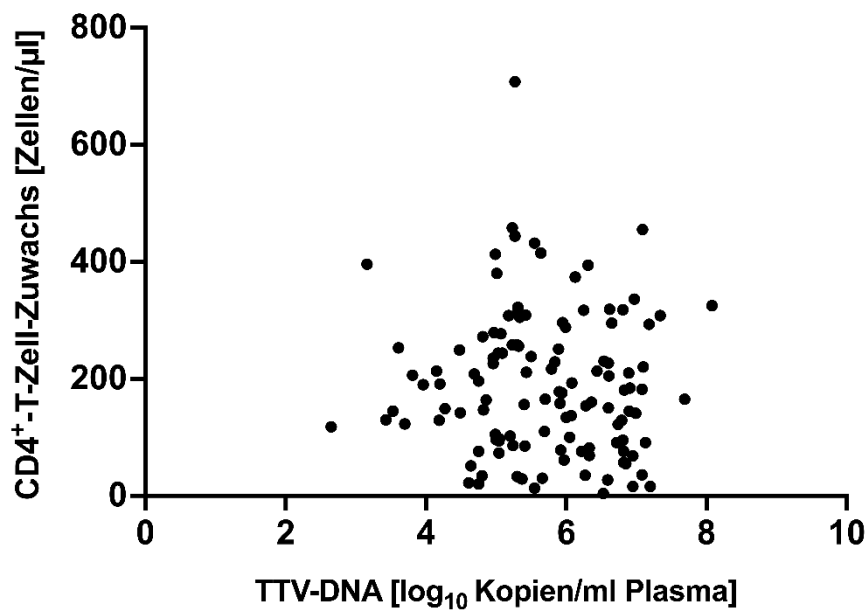


Abbildung 10: Korrelation der CD4⁺-Zell-Zunahme und der TT-Viruslast *BL*

Des Weiteren konnte in dieser Kohorte kein Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der HI-Viruslast beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt bestand eine signifikante Korrelation der beiden Parameter. (TTV *BL* und HIV *BL* $r_s = -.012$ $p = .899$; TTV *M12* und HIV *M12* $r_s = .207$ $p = .042$; TTV *BL* und HIV *M12* $r_s = -.041$ $p = .659$; HIV *BL* und TTV *M12* $r_s = .121$ $p = .238$).

3.4 Bewertung der prognostischen Aussagekraft der TT-Viruslast zur Vorhersage der Immunerholung nach einem Jahr unter ART

3.4.1 Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr

In einem ersten Schritt wurde die prognostische Aussagekraft der TT-Viruslast zur Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr mittels multipler linearer Regression überprüft. Grundsätzlich wurden alle Voraussetzungen für lineare Modelle in dieser Kohorte erfüllt: Es lag Linearität, sowie eine Normalverteilung der Residuen vor. Heteroskedastizität oder eine zu hohe Multikollinearität konnten ausgeschlossen werden (in allen Fällen galt $VIF < 10$, Toleranzindex > 0.1). Zudem konnte kein Fall identifiziert werden, der einen unzulässig großen Einfluss auf die aufgestellten Regressionsmodelle ausübte.

Das Modell zur Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr war insgesamt signifikant ($p < .001$, korrigiertes $R^2 = .471$; $F(5,114) = 22,22$), sodass die weitere Interpretation der Signifikanzen und Effektstärken der einzelnen Prädiktoren zulässig war. Bei der Betrachtung der ins Modell aufgenommenen Prädiktoren zeigte sich, dass nur die CD4⁺-T-Zellzahl *BL* in dieser Kohorte signifikant für die Vorhersage der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr war ($\beta = .69$, $p < .001$). Die Faktoren Alter ($p = .642$), Geschlecht ($p = .172$) und HI-Viruslast *BL* ($p = .823$) waren nicht signifikant. Auch die TT-Viruslast *BL* erreichte keine statistische Signifikanz ($p = .848$) und wies somit keine prognostische Relevanz für die absolute CD4⁺-T-Zellzahl nach einem Jahr auf. Die Regressionsergebnisse sind in *Tabelle 9* dargestellt:

Tabelle 9: Ergebnisübersicht der multiplen linearen Regression, Zielvariable absolute CD4⁺-Zellzahl M12; SE = standard error, Standardfehler

	Regressions koeffizient b	SE (B)	Standardisierte Koeffizienten β	t	p
Geschlecht	-36.767	26.757	-.095	-1.374	.172
Alter	.509	1.094	.032	.466	.642
CD4 ⁺ -T-Zellzahl <i>BL</i>	1.025	.106	.693	9.654	<.001
log ₁₀ HIV-Viruslast <i>BL</i>	4.468	19.930	.016	.224	.823
log ₁₀ TTV-Viruslast <i>BL</i>	-2.173	11.334	-.013	-.192	.848

Die vollständige Regressionsgleichung lautet:

$$CD4^+_{M12} = 163,4 + (-36,77)Geschlecht + 0,51 Alter + 1,03 CD4^+_{BL} + 4,47 \log_{10}HIV + (-2,17)\log_{10}TTV + \epsilon$$

3.4.2 Vorhersage der CD4⁺-Zellzahl-Zunahme nach einem Jahr

Um zu überprüfen, ob die TT-Viruslast ein geeigneter Marker ist, um die Immunrekonstitution nach einem Jahr unter ART, gemessen am CD4⁺-Zuwachs, vorherzusagen, wurde ein zweites Regressionsmodell aufgestellt. Statt der absoluten CD4⁺-Zellzahl nach einem Jahr wurde nun die die CD4⁺-Zellzunahme als Zielvariable definiert.

Das aufgestellte Regressionsmodell erwies sich als nicht signifikant ($p = .812$; korrigiertes $R^2 = -.024$; $F(5,114) = .451$). Entsprechend war das Modell insgesamt nicht geeignet, die Zunahme der CD4⁺-Zellen vorherzusagen, und die einzelnen Prädiktoren konnten nicht sinnvoll

interpretiert werden. Eine belastbare Aussage über mögliche Einflussfaktoren auf die Immunrekonstitution, gemessen an der CD4⁺-Zellzunahme, war in dieser Kohorte somit nicht möglich. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 10* dargestellt:

Tabelle 10: Ergebnisübersicht der multiplen linearen Regression, Zielvariable CD4⁺-Zellzahl Zunahme M12; SE = standard error

	Regressions koeffizient b	SE (B)	Standardisierte Koeffizienten β	t	p
Geschlecht	-36.767	26.757	-.133	-1.374	.172
Alter	0.509	1.094	.044	.466	.642
CD4 ⁺ -T-Zellzahl _{BL}	.025	.106	.023	.231	.818
log ₁₀ HIV-Viruslast _{BL}	4.468	19.930	.022	.224	.823
log ₁₀ TTV-Viruslast _{BL}	-2.173	11.334	-.019	-1.92	.848

Da das Gesamtmodell nicht signifikant war, ist die Regressionsgleichung nicht sinnvoll zu interpretieren und wird an dieser Stelle nicht berichtet.

3.4.3 Vorhersage der CD4⁺-T-Zell-Erholungsgruppen nach einem Jahr

Um die prognostische Aussagekraft von TTV für die Immunrekonstitution weiter zu beleuchten, wurde im Folgenden eine ordinale logistische Regression durchgeführt. In dieser wurde die Vorhersage der CD4⁺-Zunahme, unterteilt nach „CD4⁺-Recovery-Gruppen“ geprüft (siehe Schmidt et al., 2021). Die Voraussetzungen für eine logistische Regression wurden erfüllt; insbesondere die Proportional-Odds-Annahme (Parallel-Linien-Annahme) wurde nicht verletzt ($\chi^2(5) = 7.205$, $p = .206$).

Das aufgestellte Regressionsmodell erreichte keine statistische Signifikanz ($p = .783$; $\chi^2(5) = 2.456$, Cox & Snell Pseudo $R^2 = .020$, Nagelkerkes Pseudo $R^2 = .024$; McFadden Pseudo $R^2 = .011$). Auf Basis der berücksichtigten Prädiktoren ließ sich die Zugehörigkeit zu den CD4⁺-Recovery-Gruppen also nicht zuverlässig vorhersagen. Folglich konnten auch die einzelnen Prädiktoren aufgrund der fehlenden Modellsignifikanz nicht sinnvoll interpretiert werden. *Tabelle 11* bietet eine Übersicht der Ergebnisse:

Tabelle 11: Ergebnisse der ordinalen logistischen Regression, Vorhersage der Zugehörigkeit zu einer der definierten „Recovery-Gruppen“. *der Parameter „Geschlecht = männlich“ wurde auf Null gesetzt, da er als Referenzkategorie dient; SE = „Standard Error“

	β	SE	Wald $-\chi^2$	df	p	OR [95%-KI]
Geschlecht weiblich	.552	.418	1.747	1	.186	1.737 [0,766-3,941]
Geschlecht männlich	0*	.	.	.	.	.
Alter	.009	.017	.298	1	.585	1.009 [0,976-1,044]
CD4 ⁺ -T-Zellzahl _{BL}	.001	.002	.222	1	.637	1.001 [0,998-1,004]
log ₁₀ HIV-Viruslast _{BL}	.205	.311	.434	1	.510	1.228 [0,667-2,258]
log ₁₀ TTV-Viruslast _{BL}	-.024	.176	.019	1	.892	0.967 [0,691-1,38]

Da das Gesamtmodell nicht signifikant war, kann die Regressionsgleichung nicht sinnvoll interpretiert werden und wird an dieser Stelle nicht berichtet.

3.4.4 Überprüfung von Interaktionseffekten zwischen der CD4⁺-Zellzahl und TTV

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob ein Interaktionseffekt zwischen der CD4⁺-Zellzahl und der TT-Viruslast besteht. Dabei sollte untersucht werden, ob die zu Therapiebeginn gemessene CD4⁺-Zellzahl (*BL*) den Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der CD4⁺-Zellzahl nach zwölf Monaten (*M12*) beeinflusst. Ein solcher Effekt könnte darauf hinweisen, dass die TT-Viruslast nur in bestimmten CD4⁺-Subgruppen zu Beginn der Therapie ein relevanter prognostischer Marker ist. Die Variablen Geschlecht, Alter und HI-Viruslast wurden als Kovariaten in das Modell aufgenommen.

Das Gesamtmodell war signifikant ($p < .001$, $F(6, 113) = 17.83$, $R^2 = .495$), sodass eine Interpretation der eingeschlossenen Variablen zulässig war. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ersten Regressionsmodells erwies sich die CD4⁺-T-Zellzahl zu Therapiebeginn (*BL*) als signifikanter Prädiktor für die CD4⁺-Zellzahl nach 12 Monaten (*M12*) ($b = 1.36$, $p = .013$). Alle weiteren Prädiktoren zeigten keinen signifikanten Einfluss. Insbesondere konnte keine signifikante Interaktion zwischen der CD4⁺-Zellzahl und der TT-Viruslast zu Therapiebeginn nachgewiesen werden ($b = -.059$, $p = .52$). Somit variierte der Zusammenhang zwischen TT-Viruslast und CD4⁺-Zellzahl nach zwölf Monaten nicht in Abhängigkeit von der Ausgangs-CD4⁺-Zellzahl. Eine unterschiedliche prognostische Bedeutung der TT-Viruslast für verschiedene CD4⁺-

Subgruppen ließ sich demzufolge nicht belegen. Auch in der grafischen Darstellung zeigte sich, dass die CD4⁺-T-Zellzahl *BL* keinen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast *BL* und der CD4⁺-T-Zellzahl *M12* ausübt (siehe Anhang Abb. 23). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst:

Tabelle 12: Ergebnisübersicht der Moderationsanalyse zur Überprüfung eines möglichen Interaktionseffekts zwischen der CD4⁺-Zellzahl BL und der TT-Viruslast BL, SE= standard error

	Regressions koeffizient B	SE	t	p
Geschlecht	-36.129	27.142	-1.331	.186
Alter	.413	1.141	.362	.718
CD4 ⁺ -T-Zellzahl <i>BL</i>	1.023	.108	9.450	< .001
log ₁₀ HIV-Viruslast <i>BL</i>	5.258	24.114	.218	.828
log ₁₀ TTV-Viruslast <i>BL</i>	-2.357	10.773	-.219	.827
Interaktion log ₁₀ TTV <i>BL</i> x CD4 ⁺ <i>BL</i>	-.059	0.092	-.645	.520

Das vollständige Regressionsmodell lautet:

$$CD4^+_{M12} = 311,88 + (-36,13)Geschlecht + 0,41 Alter + 1,02 CD4^+_{BL} + 5,26 \log_{10}HIV + (-2,36)\log_{10}TTV + (-0,06) Interaktion_{CD4 \times TTV} + \epsilon$$

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die TT-Viruslast im Blutplasma als prognostischer Marker für die Immunrekonstitution bei therapienaiven Menschen mit HIV-1 geeignet ist. Ziel war es, zu prüfen, ob sich anhand der vor Therapiebeginn gemessenen TT-Viruslast Rückschlüsse auf den Verlauf der CD4⁺-T-Zell-Erhholung unter antiretroviraler Therapie ziehen lassen. Damit sollte die potenzielle Rolle von TTV als endogener Biomarker im Kontext einer HIV-Infektion näher beleuchtet werden.

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Entsprechend den Geschlechterverhältnissen in Studien aus Kamerun und Westafrika, war auch in der vorliegenden Kohorte mit 74,2% der überwiegende Anteil der Teilnehmenden weiblich (Haeuser et al., 2022, Liégeois et al., 2020, Hladik et al., 2023). Dies steht im Kontrast zu den überwiegend männlich dominierten Kohorten in Studien aus Europa und Nordamerika (Stengaard et al., 2021, Rein et al., 2023). Auch das mediane Alter von 38 Jahren entspricht den Altersverteilungen vergleichbarer Studien (Laurent et al., 2011, Coulaud et al., 2022).

Die Analyse der immunologischen Parameter verdeutlicht die stark beeinträchtigte Ausgangssituation der Proband:innen: Die vor Therapiebeginn erhobene mediane CD4⁺-T-Zellzahl von 162 Zellen/ μ l weist auf eine stark herabgesetzte zelluläre Immunkompetenz hin. Gleichzeitig deckt sich dieser Wert mit Angaben aus anderen Kohorten von Personen mit HIV aus Kamerun aus demselben Zeitraum (Ceccarelli et al., 2012, Mbougua et al., 2010, Laurent et al., 2011). Bei 74 Personen (62 %) lag die initiale CD4⁺-T-Zellzahl unter 200 Zellen/ μ l, was der Definition einer „*advanced HIV disease*“ (AHD) entspricht (WHO, 2017). Dieser Befund ist mit einer ungünstigeren Prognose sowie einer eingeschränkten Immunrekonstitution assoziiert und macht eine engmaschige klinische Überwachung sowie die Einleitung entsprechender Prophylaxemaßnahmen gegen opportunistische Infektionen erforderlich (Lehman et al., 2023, Izco et al., 2023). Die vor Therapiebeginn ermittelte mediane HIV-1-RNA-Viruslast von 5,5 log₁₀ Kopien/ml entspricht teilweise den in kamerunischen Kohorten berichteten Werten (Laurent et al., 2011), liegt insgesamt jedoch deutlich über den Viruslasten vergleichbarer Kohorten (Honorato et al., 2021, Hladik et al., 2023, Ceccarelli et al., 2012). In Kombination mit der niedrigen CD4⁺-T-Zellzahl unterstreicht dies den stark eingeschränkten Immunstatus. Bezüglich der Bestimmung des HIV-Subtyps konnte „CRF02_AG“ mit 63,6% als häufigste Entität identifiziert werden, was dem dominierenden HIV-Subtyp im westafrikanischen Raum, speziell in Kamerun, entspricht (Bbosa et al., 2019, Ceccarelli et al., 2012). Da die Bestimmung des HIV-Subtyps nur bei einem kleinen Teil der Kohorte durchgeführt wurde, ist dieser Wert mit

Vorbehalt zu betrachten. Die im Plasma erhobene mediane TTV-DNA-Viruslast von 5,7 log₁₀ Kopien/ml lag ebenfalls innerhalb des Wertebereichs, der in vergleichbaren Studien berichtet wurde (Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024). Hinsichtlich bestehender Co-Infektionen konnten Prävalenzangaben zu Co-Infektionen mit Hepatitis B und Hepatitis C aus vorangegangenen Studien bei Menschen mit HIV in Kamerun bestätigt werden (Bigna et al., 2018, Liégeois et al., 2020, Agbor et al., 2018, Andoulo et al., 2016). Auch wenn die Rate an Tuberkulose-Infizierten mit 7,7% unter den beobachteten Werten vergleichbarer Publikationen liegt (Anye et al., 2020, Tanue et al., 2019, Sama et al., 2023), scheinen die in dem vorliegenden Studienkollektiv beobachteten Häufigkeiten an Co-Infektionen insgesamt plausibel. Hier wird deutlich, dass neben der hohen HIV-RNA-Last mit einhergehend niedrigen CD4⁺-T-Zellzahlen auch durch Co-Infektionen eine relevante Krankheitslast besteht. Insgesamt zeigt die vorliegende Kohorte hinsichtlich der Basischarakteristika ähnliche Verteilungen wie vergleichbare Studienpopulationen und erlaubt damit grundsätzlich verallgemeinerbare Rückschlüsse.

Bei Betrachtung der immunologischen Entwicklung innerhalb eines Jahres unter antiretroviraler Therapie, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der medianen CD4⁺-T-Lymphozytenzahl im Verlauf von drei Messzeitpunkten (*siehe Abb. 4*). Dies spricht für eine Wirksamkeit der angesetzten ART mit resultierender zellulärer Immunrekonstitution (Mathez et al., 1997, Gulick et al., 1997). Parallel zum Anstieg der medianen CD4⁺-T-Zellzahl, nahm die mediane HIV-RNA-Last im Verlauf des Beobachtungszeitraumes signifikant ab und sank in der Mehrheit der Fälle auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze von 50 Viruskopien/ml (*siehe Abb. 5*). Dies spricht ebenfalls für eine gute Wirksamkeit der antiretroviralen Therapie mit einer effektiven Unterbindung der Virusreplikation. Die in der Fachliteratur übereinstimmend beschriebene inverse Beziehung zwischen der CD4⁺-T-Zellzahl und der HI-Viruslast (Kannangai et al., 2001, O'Brien et al., 1996), konnte auch in dieser Kohorte beobachtet werden (*siehe Abb. 7*). Neben einer Abnahme der HI-Viruslast zeigte sich unter antiretroviraler Therapie auch ein signifikanter Abfall der medianen TT-Viruslast (*siehe Abb. 6*). Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, in denen ebenfalls unter ART ein Rückgang der TT-Viruslast beobachtet werden konnte (Madsen et al., 2002, Abbate et al., 2023). Dieser könnte auf eine verbesserte Viruskontrolle durch den Anstieg der CD4⁺-T-Zellen zurückzuführen sein (Tarancon-Diez et al., 2024, Schmidt et al., 2021).

In Einklang mit früheren Publikationen, konnte auch in dieser Kohorte eine signifikante inverse Korrelation zwischen der CD4⁺-T-Zellzahl und der TT-Viruslast nachgewiesen werden. Die TT-Viruslast *BL* korrelierte dabei signifikant negativ sowohl mit der CD4⁺-T-Lymphozytenzahl *BL* (*siehe Abb. 8*), als auch mit der CD4⁺-T-Lymphozytenzahl *M12* (*siehe Abb. 9*). In beiden Fällen waren hohe TT-Viruslasten mit niedrigen CD4⁺-Zellzahl-Werten assoziiert. Damit fügen sich die vorliegenden Ergebnisse in die bestehende Literatur ein, in welcher übereinstimmend ein

inverser Zusammenhang zwischen der CD4⁺-T-Lymphozytenzahl und der TT-Viruslast beschrieben wurde (Touinssi et al., 2001, Shibayama et al., 2001, Thom and Petrik, 2007, Abbate et al., 2023, Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024, Liu et al., 2021). Zusätzlich wird ein weiterer Punkt illustriert: Ausgehend von der Annahme, dass TTV in PBMCs repliziert und insbesondere T-Lymphozyten die Hauptquelle für TTV im peripheren Blut darstellen (Focosi et al., 2015, Mariscal et al., 2002), wäre theoretisch bei starker zellulärer Depletion der CD4⁺-Zellen ein Abfall der TT-Viruslast denkbar. In der vorliegenden Kohorte, wie auch in vorherigen Publikationen, zeigte sich jedoch ein gegenteiliger Effekt. Hier wiesen Proband:innen mit niedrigen CD4⁺-Zellzahlen, teils im einstelligen Bereich, eine höhere TT-Viruslast auf als Gruppen mit hohen CD4⁺-Zahlen. Da angenommen wird, dass antikörpervermittelt täglich bis zu 90% der TT-Virionen gecleared werden (Spezia et al., 2023), muss diese hohe TT-Viruslast durch de novo-Synthese entstehen. Im Umkehrschluss muss angesichts der vorliegenden Ergebnisse somit ein Replikationsreservoir abseits von T-Lymphozyten in Betracht gezogen werden, welches einen relevanten Beitrag zur TTV-Virämie leistet. Gleichzeitig könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass CD4⁺-T-Lymphozyten eine relevante Rolle in der TT-Viruskontrolle spielen und die wegfallende Immunkontrolle bei bestehender HIV-Infektion einen entscheidenden Faktor für den TTV-DNA-Anstieg darstellt. Zwischen der TT-Viruslast und der HI-Viruslast konnte in dieser Kohorte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden mehrerer Studien zu HIV-TTV-Co-Infektionen, in denen ebenfalls überwiegend kein Zusammenhang zwischen den jeweiligen Virusentitäten festgestellt wurde (Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024).

Zur Bewertung des potenziellen Nutzens der TT-Viruslast als prognostischen Marker der Immunrekonstitution wurden verschiedene Modelle zur Vorhersage der Immunerholung nach einem Jahr antiretroviraler Therapie erstellt. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich die zu Therapiebeginn gemessene CD4⁺-T-Zellzahl ein signifikanter Prädiktor für die spätere absolute CD4⁺-Zellzahl war. Alter, Geschlecht und die initiale HI-Viruslast standen dagegen in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem Ausmaß der Immunerholung. Auch die TT-Viruslast zu Therapiebeginn wies keinen relevanten Einfluss auf die spätere absolute CD4⁺-Zellzahl auf und besaß somit keine prognostische Relevanz. Dass die Ausgangs-CD4⁺-T-Zellzahl den stärksten prädiktiven Wert für den weiteren Verlauf zeigte, entspricht den bisherigen Erkenntnissen und bestätigt den bekannten Zusammenhang zwischen initialem Immunstatus und Therapieerfolg (Egger et al., 2002). Überraschend war jedoch, dass trotz der zuvor in der Kohorte beobachteten Korrelation zwischen TT-Viruslast und CD4⁺-Zellzahl nach 12 Monaten (M12) kein prognostischer Effekt auf die spätere Immunrekonstitution nachgewiesen werden konnte.

Da im Kontext einer HIV-Infektion vor allem die Verbesserung der CD4⁺-Zellzahl unter Therapie von Interesse ist, wurde anschließend der Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast zu Therapiebeginn und dem Anstieg der CD4⁺-T-Zellen im Verlauf untersucht. Hier zeigte sich, dass sich die CD4⁺-Zellzunahme anhand der einbezogenen Faktoren in dieser Kohorte insgesamt nicht zuverlässig vorhersagen ließ. Entsprechend ergab sich auch für die TT-Viruslast kein Hinweis auf eine prognostische Bedeutung im Hinblick auf den Zuwachs der CD4⁺-T-Zellen unter antiretroviraler Therapie. Ebenso konnte bei der Betrachtung unterschiedlicher Gruppen der CD4⁺-T-Zell-Erholung kein Zusammenhang zwischen der initialen TT-Viruslast und dem späteren Therapieergebnis festgestellt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die TT-Viruslast in dieser Kohorte keine relevante Vorhersagekraft für das Ausmaß der Immunrekonstitution besitzt.

Im Anschluss wurde untersucht, ob der Zusammenhang zwischen TT-Viruslast und Immunrekonstitution von der Höhe der CD4⁺-Zellzahl zu Therapiebeginn beeinflusst wird. Ziel war es zu prüfen, ob die TT-Viruslast möglicherweise nur bei bestimmten Subgruppen der initialen CD4⁺-Zellzahl – etwa bei sehr niedrigen oder hohen Werten – eine prognostische Bedeutung hat. Die Analyse ergab jedoch keinen Hinweis auf einen solchen Einfluss. Ein abgestufter Effekt der TT-Viruslast zur Prädiktion der Immunrekonstitution ließ sich somit in dieser Kohorte nicht feststellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Großteil der Teilnehmenden zu Studienbeginn sehr niedrige CD4⁺-Zellzahlen aufwies, sodass mögliche Zusammenhänge bei Personen mit höherem Ausgangsniveau nur eingeschränkt beurteilbar waren.

Modellübergreifend konnte in dieser Kohorte somit kein signifikanter prädiktiver Effekt der TT-Viruslast für die Immunrekonstitution nachgewiesen werden. Weder die Vorhersage in absoluten CD4⁺-Zellzahl-Werten, noch die Vorhersage der CD4⁺-Zellzahl-Zunahme war anhand der TT-Viruslast möglich. Eine Definition von TTV-Grenzwerten zur Prognoseabschätzung bzw. zur Definition von Risikopopulationen war dementsprechend hinfällig. Insgesamt stehen diese Ergebnisse teilweise im Kontrast zu bestehenden Publikationen. So erwies sich die TT-Viruslast in der Arbeit von Schmidt et al. neben der initialen CD4⁺-Zellzahl, als signifikanter Prädiktor zur Vorhersage der Immunrekonstitution nach einem Jahr unter Therapie (Schmidt et al., 2021). Ergänzend konnten auch Esser et al. einen Nutzen der TT-Viruslast zur Vorhersage der Immunerholung nachweisen (Esser et al., 2024). Da in den beiden Arbeiten die beschriebenen Effektstärken gering waren, erscheint es durchaus plausibel, dass in dieser Kohorte der beschriebene, schwache Effekt nicht reproduziert werden konnte. Des Weiteren stehen die Ergebnisse der vorliegenden Kohorte im Einklang mit der Arbeit von Abbate et al, in welcher ebenfalls kein Nutzen der TT-Viruslast als prädiktiver Marker für die Immunrekonstitution unter

antiretroviraler Therapie bei Personen mit akuter HIV-1-Infektion identifiziert werden konnte (Abbate et al., 2023). In der genannten Publikation war die Stichprobe mit 21 eingeschlossenen Proband:innen jedoch verhältnismäßig klein und umfasste ausschließlich Personen mit akuter Infektion, die meist nur eine geringe oder moderate Reduktion der CD4⁺-T-Zellzahl aufwiesen, weshalb auch diese Ergebnisse mit Vorbehalt interpretiert werden sollten.

Grundsätzlich bleibt fraglich, inwieweit virale Marker im Kontext einer HIV-Infektion als Immunmarker dienen können. Da CD4⁺-T-Zellen eine zentrale Rolle in der Immunkontrolle spielen und die Wechselwirkungen mit viralen Entitäten komplex sind, sind die Interpretation und klinische Nutzbarkeit der gemessenen Viruslasten bei bestehender HIV-Infektion erschwert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit scheint im Kontext einer HIV-1-Infektion ein Nutzen von TTV als Immunmarker zur Einschätzung des Immunstatus und der Immunrekonstitution fraglich und trägt somit zu einer weiterhin heterogenen Datenlage bei.

4.2 Limitationen

Diese Forschungsarbeit weist einige Limitationen auf, welche im Folgenden betrachtet werden sollen. Ein zentraler Punkt betrifft die vergleichsweise geringe Kohortengröße von 120 eingeschlossenen Fällen. Angesichts der großen statistischen Varianz der erhobenen Parameter sowie der geringen berichteten Effektstärken in vergleichbaren Studien (Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024), wäre eine größere Fallzahl wünschenswert gewesen, um die statistische Power zu erhöhen und die Generalisierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern. Da eine nachträgliche Rekrutierung zusätzlicher Fälle nicht möglich war, konnte diese Limitation nicht adressiert werden.

Darüber hinaus wurden einige potenziell relevante Parameter nicht in die Analyse miteinbezogen. So fehlen beispielsweise Daten zur CD8⁺-T-Zellzahl, zum CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis, detailliertere Angaben zur Entwicklung der HI-Viruslast, etwa zum Auftreten von „Blips“ (temporäre Anstiege der HI-Viruslast unter antiretroviraler Therapie) und zu dem Auftreten immunologischer Ereignisse, beispielsweise eines Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS). Insbesondere letzteres stellt ein schwerwiegendes Ereignis im Rahmen einer antiretroviralen Therapie dar und wäre ein relevanter Endpunkt in dieser Untersuchung gewesen. Auch wäre eine Erhebung der klinischen Stadien im Verlauf und im Folgenden eine Auswertung der prognostischen Aussagekraft von TTV für die klinische Entwicklung, von Interesse gewesen. Diesbezüglich deuten aktuelle Daten jedoch darauf hin, dass bei Personen mit HIV keine Assoziation des klinischen Stadiums mit der TT-Viruslast besteht (Esser et al., 2024). Da die

genannten Parameter in der initialen Studie entweder nicht erhoben oder nur unzureichend dokumentiert wurden, konnten sie in dieser Auswertung nicht aufgegriffen werden.

Obwohl in der Kohorte über zwei Messzeitpunkte (*BL* und *M12*) ein deutlicher und statistisch signifikanter Rückgang der medianen TT-Viruslast beobachtet wurde, wären ergänzende Messungen der TT-Viruslast über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg wünschenswert gewesen. Durch eine detailliertere Dokumentation der TTV-Kinetik bei Menschen mit HIV-1 hätte der potenzielle Nutzen der TT-Viruslast als Immunmarker präziser beurteilt werden können. Diesbezüglich wäre beispielsweise von Interesse, ob Veränderungen der TT-Viruslast bereits vor einer Änderung der CD4⁺-Zellzahl auftreten und somit eine frühzeitige Einschätzung der immunologischen Entwicklung möglich ist. Darüber hinaus wären zusätzliche Messungen hilfreich gewesen, um die beobachtete Abnahme der TT-Viruslast eindeutig der Intervention, dem Beginn der antiretroviralen Therapie und der damit einhergehenden Immunrekonstitution, zuzuordnen und zufällige Schwankungen der Viruslast auszuschließen. Da Madsen et al. eine Konstanz der HI- und TT-Viruslast vor Therapiebeginn demonstrieren konnten (Madsen et al., 2002), kann auch in dieser Kohorte von einer Beständigkeit der TT-Viruslast vor Therapiebeginn ausgegangen werden. Im Umkehrschluss kann das beobachtete Absinken der medianen TT-Viruslast als tatsächlicher, mit dem Therapiebeginn assoziierter Effekt interpretiert werden.

Auch in Bezug auf die Methodik weist diese Arbeit Limitationen auf: Für die qRT-PCR wurde, in Übereinstimmung mit vergleichbaren Studien (Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024), ein in-house-Protokoll unter Verwendung des Primersets von Maggi et al. verwendet (Maggi et al., 2003). Es steht zur Diskussion, ob der Einsatz eines standardisierten PCR-Assays, wie etwa des TTV-R-Gene-Assays® (Kulifaj et al., 2018), vorzuziehen gewesen wäre, um die Vereinheitlichung der Messmethoden voranzutreiben und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, insbesondere mit zukünftigen Studien, zu verbessern. Ein weiterer Kritikpunkt betrifft die fehlende Untersuchung der Proben auf virale Co-Infektionen, insbesondere aus der Gruppe der Herpesviridae (CMV, EBV, Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)). Da eine wechselseitige Beeinflussung zwischen einer EBV- und TTV-Infektion beschrieben wurde (Borkosky et al., 2012), könnten die genannten Co-Infektionen mögliche Confounder darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass vorangegangene Publikationen jedoch darlegen konnten, dass Co-Infektionen mit CMV, EBV und HHV-8 sowie die humane Pegiviruslast keinen signifikanten Einfluss auf die TT-Viruslast ausüben und keine prädiktiven Marker für die Immunrekonstitution sind (Schmidt et al., 2021, Esser et al., 2024), wurde in dieser Arbeit auf eine zusätzliche Analyse der genannten viralen Erreger bewusst verzichtet.

Bezüglich der Auswertung stellt sich die zentrale Frage, welcher Parameter das Immunsystem bzw. die Immunrekonstitution möglichst präzise abbildet und wie demnach die Zielvariable

konkret definiert werden soll. Obwohl die absolute CD4⁺-T-Lymphozytenzahl im Kontext einer HIV-Infektion ein etablierter Surrogatparameter für den Immunstatus ist, bleibt zu beachten, dass die Erholung der CD4⁺-T-Zellzahl nicht zwangsläufig mit einer funktionellen Immunerholung gleichzusetzen ist. Folglich erlaubt die absolute CD4⁺-T-Zellzahl nur begrenzt Rückschlüsse auf den tatsächlichen individuellen Immunstatus (Jaksch et al., 2022). Darauf aufbauend stellt sich die Frage, wie die Angabe der CD4⁺-T-Lymphozytenzahl angegeben werden soll, ob als absoluter Wert oder als Differenz zu einem Ausgangswert. Die Angabe von absoluten Werten entspricht sowohl der üblichen Praxis im klinischen Setting als auch dem Vorgehen in vergleichbaren Studien und ermöglicht eine direkte Beurteilung des aktuellen Immunstatus. Differenzwerte haben den Vorteil, dass sie die Dynamik des Verlaufs abbilden, müssen jedoch immer in Relation zu einem Ausgangswert berechnet werden und können nicht kontextlos interpretiert werden. Um beide Optionen zu berücksichtigen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Regressionsmodelle aufgestellt.

Wie bereits dargestellt, zeigte sich im Rahmen der statistischen Auswertung hinsichtlich der Ausprägung metrischer Merkmale teils eine große Streuung der Werte. Zudem wurden in Rahmen der rechnerischen und grafischen Analyse der intervallskalierten Parameter mathematische Ausreißer und Extremwerte identifiziert. Diese Fälle könnten potenziell eine statistische Verzerrung verursachen und die statistische Power herabsetzen. Da jedoch alle beobachteten Werte innerhalb eines realistischen Wertebereichs lagen und eine große Streuung der Daten in der Kohorte zu erwarten war, wurde bewusst auf eine generelle Bereinigung durch Ausschluss von Extremwerten und Ausreißern verzichtet. Ziel war es, die natürliche Varianz innerhalb der Kohorte unverfälscht darzustellen, eine Verringerung der Fallzahl mit entsprechendem Verlust der statistischen Power zu vermeiden und einen potenziellen Selektionsbias zu vermeiden. Um dennoch möglichen Verzerrungen der Regressionsmodelle entgegenzuwirken, kamen teils robuste statistische Verfahren zum Einsatz. Außerdem erfolgte eine Überprüfung auf statistisch einflussreiche Fälle, in welcher jedoch keine problematischen Fälle identifiziert werden konnten. Diese Vorgehensweise reduziert das Risiko einer Verzerrung des Gesamtmodells, während die Integrität der Daten und die Aussagekraft der Analyse erhalten bleiben.

Ein weiteres Problem betrifft die eingeschränkte Aussagekraft der Ergebnisse für Personen mit HIV mit einer initial hohen CD4⁺-T-Zellzahl. Die Mehrheit der Teilnehmenden wies vor Therapiebeginn initial eine CD4⁺-T-Zellzahl von weniger als 200 Zellen/ μ l auf, keine Person zeigte eine CD4⁺-T-Zellzahl von mehr als 500 Zellen/ μ l. Dies führt dazu, dass die Analyse überwiegend auf Personen mit stark reduzierter CD4⁺-T-Zellzahl fokussiert ist. Folglich ist die Generalisierbarkeit der Ergebnisse auf die Gesamtpopulation von Personen mit HIV begrenzt.

Insbesondere eine Bewertung des Nutzens der TT-Viruslast als prädiktiver Immunmarker bei Personen mit einer initial hohen CD4⁺-T-Zellzahl ist, basierend auf dieser Kohorte, nur eingeschränkt möglich. Für diese Patient:innengruppe können aufgrund der geringen Fallzahl keine belastbaren Rückschlüsse gezogen werden.

4.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Der Einsatz von TTV als immunologischer Marker erscheint in bestimmten klinischen Bereichen vielversprechend und könnte perspektivisch einen Beitrag zu einer individualisierten Therapie leisten. Im Kontext einer HIV-1-Infektion bleibt die Datenlage jedoch heterogen. In der untersuchten Kohorte zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der TT-Viruslast und der Immunrekonstitution unter antiretroviraler Therapie. Weder die absolute CD4⁺-T-Zellzahl nach einem Jahr noch die Zunahme der CD4⁺-T-Zellen ließen sich anhand der TT-Viruslast vorhersagen. Auch eine stratifizierte Analyse nach initialer CD4⁺-T-Zellzahl ergab keine relevanten Unterschiede in der prognostischen Aussagekraft. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die TT-Viruslast in diesem Patientenkollektiv möglicherweise keinen unabhängigen prädiktiven Wert für die Immunrekonstitution besitzt.

Aufgrund der begrenzten Fallzahl, der Verteilungscharakteristika und der beobachteten Varianz in der Kohorte sollten die Ergebnisse jedoch mit Vorsicht interpretiert werden. Künftige Studien mit größeren und klinisch differenzierteren Kohorten, die auch relevante klinische Endpunkte einbeziehen, könnten dazu beitragen, den potenziellen Stellenwert von TTV in diesem Kontext genauer zu beurteilen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

2014. Revised surveillance case definition for HIV infection--United States, 2014. *MMWR Recomm Rep*, 63, 1-10.
2017. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *Guidelines for Managing Advanced HIV Disease and Rapid Initiation of Antiretroviral Therapy*. Geneva: World Health Organization
- Copyright © World Health Organization 2017.
- ABBATE, I., ROZERA, G., CIMINI, E., CARLETTI, F., TARTAGLIA, E., RUBINO, M., PITTALIS, S., ESVAN, R., GAGLIARDINI, R., MONDI, A., MAZZOTTA, V., CAMICI, M., GIRARDI, E., VAIA, F., PURO, V., ANTINORI, A. & MAGGI, F. 2023. Kinetics of TTV Loads in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Early Treated Acute HIV Infections. *Viruses*, 15.
- AGBOR, V. N., TAGNY, C. T., KENMEGNE, J. B., AWAZI, B., NGANSOP, C., MBANYA, D. & NDEMBI, N. 2018. Prevalence of anti-hepatitis C antibodies and its co-infection with HIV in rural Cameroon. *BMC Res Notes*, 11, 459.
- AIUTI, F. & MEZZAROMA, I. 2006. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev*, 8, 88-97.
- ALBERT, E., GIMÉNEZ, E., HERNANI, R., PIÑANA, J. L., SOLANO, C. & NAVARRO, D. 2024. Torque Teno Virus DNA Load in Blood as an Immune Status Biomarker in Adult Hematological Patients: The State of the Art and Future Prospects. *Viruses*, 16.
- ALBERT, E., SOLANO, C., GIMÉNEZ, E., FOCOSI, D., PÉREZ, A., MACERA, L., PIÑANA, J. L., BOLUDA, J. C. H., MAGGI, F. & NAVARRO, D. 2018a. 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 Transplant*, 53, 180-187.
- ALBERT, E., SOLANO, C., PASCUAL, T., TORRES, I., MACERA, L., FOCOSI, D., MAGGI, F., GIMÉNEZ, E., AMAT, P. & NAVARRO, D. 2017. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol*, 94, 22-28.
- ALBERT, E., TORRES, I., TALAYA, A., GIMÉNEZ, E., PIÑANA, J. L., HERNÁNDEZ-BOLUDA, J. C., FOCOSI, D., MACERA, L., MAGGI, F., SOLANO, C. & NAVARRO, D. 2018b. Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*, 90, 1438-1443.
- ANDOULO, F. A., KOWO, M., NGATCHA, G., NDAM, A. N., AWOUOYIEGNIGNI, B., SIDA, M. B., TZEUTON, C. & NDJITOYAP NDAM, E. C. 2016. Prevalence of Helicobacter pylori prevalence and upper gastrointestinal endoscopy in HIV/AIDS patients with gastrointestinal symptoms in the University Teaching Hospitals in Cameroon. *Med Sante Trop*, 26, 278-282.
- ANYE, C. S., NKFUSAI, C. N., YANKAM, B. M., WIRSIY, F. S., TSOKA-GWEGWENI, J. M. & CUMBER, S. N. 2020. A Four-Year Hospital-Based Retrospective Study of the Predictors of Tuberculosis in People Living with HIV and Receiving Care at Bamenda Regional Hospital, Cameroon. *Int J MCH AIDS*, 9, 167-172.
- ARZE, C. A., SPRINGER, S., DUDAS, G., PATEL, S., BHATTACHARYYA, A., SWAMINATHAN, H., BRUGNARA, C., DELAGRAVE, S., ONG, T., KAHVEJIAN, A., ECHELARD, Y., WEINSTEIN, E. G., HAJJAR, R. J., ANDERSEN, K. G. & YOZWIAK, N. L. 2021. Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host Microbe*, 29, 1305-1315.e6.
- AUTRAN, B., CARCELAIN, G., LI, T. S., BLANC, C., MATHEZ, D., TUBIANA, R., KATLAMA, C., DEBRÉ, P. & LEIBOWITCH, J. 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 277, 112-6.

- BAGAGLIO, S., SITIA, G., PRATI, D., CELLA, D., HASSON, H., NOVATI, R., LAZZARIN, A. & MORSICA, G. 2002. Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch Virol*, 147, 803-12.
- BBOSA, N., KALEEBU, P. & SSEMWANGA, D. 2019. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*, 14, 153-160.
- BENDINELLI, M., PISTELLO, M., MAGGI, F., FORNAI, C., FREER, G. & VATTERONI, M. L. 2001. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev*, 14, 98-113.
- BENZAQUÉN, A., GIMÉNEZ, E., IACOBONI, G., GUERREIRO, M., HERNANI, R., ALBERT, E., CARPIO, C., BALAGUER, A., PÉREZ, A., C, S. D. L. A., SÁNCHEZ-SALINAS, M. A., CHORÃO, P., PIÑANA, J. L., BEAS, F., MONTORO, J., HERNÁNDEZ-BOLUDA, J. C., FACAL, A., FERRER, B., VILLALBA, M., AMAT, P., GOMÉZ, M. D., CAMPOS, D., TEROL, M. J., SANZ, J., BARBA, P., NAVARRO, D. & SOLANO, C. 2024. Torque Teno Virus plasma DNA load: a novel prognostic biomarker in CAR-T therapy. *Bone Marrow Transplant*, 59, 93-100.
- BIGNA, J. J., NKECK, J. R., NGOUO, A., NYAGA, U. F. & NOUBIAP, J. J. 2018. Hepatitis B virus and HIV coinfection among adults residing in Cameroon: A systematic review and meta-analysis of prevalence studies. *Infect Dis Health*, 23, 170-178.
- BIRD, S. W. & KIRKEGAARD, K. 2015. Escape of non-enveloped virus from intact cells. *Virology*, 479-480, 444-9.
- BISHOP, J. D., DESHIELDS, S., CUNNINGHAM, T. & TROY, S. B. 2016. CD4 Count Recovery After Initiation of Antiretroviral Therapy in Patients Infected With Human Immunodeficiency Virus. *Am J Med Sci*, 352, 239-44.
- BONNAMY, M., BLANC, S. & MICHALAKIS, Y. 2023. Replication mechanisms of circular ssDNA plant viruses and their potential implication in viral gene expression regulation. *mbio*, 14, e0169223.
- BORKOSKY, S. S., WHITLEY, C., KOPP-SCHNEIDER, A., ZUR HAUSEN, H. & DE VILLIERS, E. M. 2012. Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS One*, 7, e32160.
- BOUKADIDA, C., PERALTA-PRADO, A., CHÁVEZ-TORRES, M., ROMERO-MORA, K., RINCON-RUBIO, A., ÁVILA-RÍOS, S., GARRIDO-RODRÍGUEZ, D., REYES-TERÁN, G. & PINTO-CARDOSO, S. 2024. Alterations of the gut microbiome in HIV infection highlight human anelloviruses as potential predictors of immune recovery. *Microbiome*, 12, 204.
- BRANDT, L., ANGELINO, P., MARTINEZ, R., CRISTINELLI, S. & CIUFFI, A. 2023. Sex and Age Impact CD4+ T Cell Susceptibility to HIV In Vitro through Cell Activation Dynamics. *Cells*, 12.
- CALCATERRA, S., ZANIRATTI, M. S., SERRAINO, D., PERONI, M., ABBATE, I., CAPPIELLO, G., PISELLI, P., PAVIA, C., REZZA, G., IPPOLITO, G. & CAPOBIANCHI, M. R. 2001. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J Hum Virol*, 4, 343-5.
- CEBRIÁ-MENDOZA, M., BRACHO, M. A., ARBONA, C., LARREA, L., DÍAZ, W., SANJUÁN, R. & CUEVAS, J. M. 2021. Exploring the Diversity of the Human Blood Virome. *Viruses*, 13.
- CECCARELLI, L., SALPINI, R., MOUDOUROU, S., CENTO, V., SANTORO, M. M., FOKAM, J., TAKOU, D., NANFACK, A., DORI, L., TORIMIRO, J., SARMAI, L., ANDREONI, M., PERNO, C. F., COLIZZI, V. & CAPPELLI, G. 2012. Characterization of drug resistance mutations in naïve and ART-treated patients infected with HIV-1 in Yaounde, Cameroon. *J Med Virol*, 84, 721-7.
- CHAN, P. K., TAM, W. H., YEO, W., CHEUNG, J. L., ZHONG, S. & CHENG, A. F. 2001. High carriage rate of TT virus in the cervixes of pregnant women. *Clin Infect Dis*, 32, 1376-7.
- CHAREST, A. J., PLUMMER, J. D., LONG, S. C., CARDUCCI, A., VERANI, M. & SIDHU, J. P. 2015. Global occurrence of Torque teno virus in water systems. *J Water Health*, 13, 777-89.
- CHEN, J., TITANJI, K., SHETH, A. N., GANDHI, R., MCMAHON, D., OFOTOKUN, I., WEITZMANN, M. N., DE PARIS, K. & DUMOND, J. B. 2022. The effect of age on CD4+ T-cell recovery in HIV-suppressed adult participants: a sub-study from AIDS Clinical Trial Group (ACTG)

- A5321 and the Bone Loss and Immune Reconstitution (BLIR) study. *Immun Ageing*, 19, 4.
- CHRISTENSEN, J. K., EUGEN-OLSEN, J., SŁRENSEN, M., ULLUM, H., GJEDDE, S. B., PEDERSEN, B. K., NIELSEN, J. O. & KROGSGAARD, K. 2000. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 181, 1796-9.
- COULAUD, P. J., SOW, A., SAGAON-TEYSSIER, L., NDIAYE, K., MARADAN, G., LAURENT, C., SPIRE, B., VIDAL, L., KUABAN, C. & BOYER, S. 2022. Individual and healthcare supply-related HIV transmission factors in HIV-positive patients enrolled in the antiretroviral treatment access program in the Centre and Littoral regions in Cameroon (ANRS-12288 EVOLCam survey). *PLoS One*, 17, e0266451.
- DAS, K., KAR, P., GUPTA, R. K. & DAS, B. C. 2004. Role of transfusion-transmitted virus in acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure of unknown etiology. *J Gastroenterol Hepatol*, 19, 406-12.
- DE VILLIERS, E. M., BORKOSKY, S. S., KIMMEL, R., GUNST, K. & FEI, J. W. 2011. The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules. *J Virol*, 85, 7284-95.
- DE VLAMINCK, I., KHUSH, K. K., STREHL, C., KOHLI, B., LUIKART, H., NEFF, N. F., OKAMOTO, J., SNYDER, T. M., CORNFIELD, D. N., NICOLLS, M. R., WEILL, D., BERNSTEIN, D., VALANTINE, H. A. & QUAKE, S. R. 2013. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*, 155, 1178-87.
- DE WOLF, F., SPIJKERMAN, I., SCHELLEKENS, P. T., LANGENDAM, M., KUIKEN, C., BAKKER, M., ROOS, M., COUTINHO, R., MIEDEMA, F. & GOUDSMIT, J. 1997. AIDS prognosis based on HIV-1 RNA, CD4+ T-cell count and function: markers with reciprocal predictive value over time after seroconversion. *Aids*, 11, 1799-806.
- DENG, X., TERUNUMA, H., HANDEMA, R., SAKAMOTO, M., KITAMURA, T., ITO, M. & AKAHANE, Y. 2000. 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*, 62, 531-7.
- DESAI, M., PAL, R., DESHMKH, R. & BANKER, D. 2005. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J Med Virol*, 77, 136-43.
- DOBERER, K., SCHIEMANN, M., STRASSL, R., HAUPENTHAL, F., DERMUTH, F., GÖRZER, I., ESKANDARY, F., REINDL-SCHWAIGHOFER, R., KIKIĆ, Ž., PUCHHAMMER-STÖCKL, E., BÖHMIG, G. A. & BOND, G. 2020. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients-A prospective observational trial. *Am J Transplant*, 20, 2081-2090.
- EGGER, M., MAY, M., CHÊNE, G., PHILLIPS, A. N., LEDERGERBER, B., DABIS, F., COSTAGLIOLA, D., D'ARMINIO MONFORTE, A., DE WOLF, F., REISS, P., LUNDGREN, J. D., JUSTICE, A. C., STASZEWSKI, S., LEPORT, C., HOGG, R. S., SABIN, C. A., GILL, M. J., SALZBERGER, B. & STERNE, J. A. 2002. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*, 360, 119-29.
- ESSER, P. L., QUINTANARES, G. H. R., LANGHANS, B., HEGER, E., BÖHM, M., JENSEN, B. O., ESSER, S., LÜBKE, N., FÄTKENHEUER, G., LENGAUER, T., KLEIN, F., OETTE, M., ROCKSTROH, J. K., BOESECKE, C., DI CRISTANZIANO, V., KAISER, R. & PIRKL, M. 2024. 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. *J Infect Dis*.
- FABRIS, P., BIASIN, M. R., INFANTOLINO, D., TOSITTI, G., VENZA, E., FLOREANI, A., ZANETTI, A. & DE LALLA, F. 2000. TTV infection in patients with acute hepatitis of defined aetiology and in acute non-A-E hepatitis. *J Hepatol*, 32, 661-5.
- FALABELLO DE LUCA, A. C., MARINHO, G. B., FRANCO, J. B., TENÓRIO, J. D. R., ANDRADE, N. S., BATISTA, A. M., MAMANA, A. C., TOZETTO-MENDOZA, T. R., PÉREZ SAYÁNS, M., BRAZ-

- SILVA, P. H. & ORTEGA, K. L. 2023. Quantification of Torque Teno Virus (TTV) in plasma and saliva of individuals with liver cirrhosis: a cross sectional study. *Front Med (Lausanne)*, 10, 1184353.
- FEHGOUL, L., CAILLAULT, A., PEYRONY, O., SALMONA, M., NERE, M. L., DELAUGERRE, C., AZOULAY, E., CHEVRET, S. & LEGOFF, J. 2023. Respiratory torque teno virus load at emergency department visit predicts intensive care unit admission of SARS-CoV-2 infected patients. *J Med Virol*, 95, e29319.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, M., ALBERT, E., GIMÉNEZ, E., RUIZ-MERLO, T., PARRA, P., LÓPEZ-MEDRANO, F., SAN JUAN, R., POLANCO, N., ANDRÉS, A., NAVARRO, D. & AGUADO, J. M. 2019. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*, 19, 1139-1149.
- FIELD, A. P. & WILCOX, R. R. 2017. Robust statistical methods: A primer for clinical psychology and experimental psychopathology researchers. *Behav Res Ther*, 98, 19-38.
- FOCOSI, D., ANTONELLI, G., PISTELLO, M. & MAGGI, F. 2016. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*, 22, 589-93.
- FOCOSI, D., MACERA, L., BOGGI, U., NELLI, L. C. & MAGGI, F. 2015. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol*, 96, 115-117.
- FOCOSI, D., MACERA, L., PISTELLO, M. & MAGGI, F. 2014. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis*, 210, 667-8.
- FOCOSI, D., SPEZIA, P. G., MACERA, L., SALVADORI, S., NAVARRO, D., LANZA, M., ANTONELLI, G., PISTELLO, M. & MAGGI, F. 2020. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect*, 26, 1406-1410.
- FORNAI, C., MAGGI, F., VATTERONI, M. L., PISTELLO, M. & BENDINELLI, M. 2001. High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol*, 39, 2022-4.
- FORQUÉ, L., ALBERT, E., GIMÉNEZ, E., TORRES, I., CARBONELL, N., FERRERES, J., BLASCO, M. L. & NAVARRO, D. 2022. Monitoring of Torque Teno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: May it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol*, 148, 105082.
- GALLIAN, P., BIAGINI, P., ZHONG, S., TOUINSSI, M., YEO, W., CANTALOUBE, J. F., ATTOUI, H., DE MICCO, P., JOHNSON, P. J. & DE LAMBALLERIE, X. 2000. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol*, 17, 43-9.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, M., BERENGUER, J., ALVAREZ, E., GUZMÁN-FULGENCIO, M., COSÍN, J., MIRALLES, P., CATALÁN, P., LÓPEZ, J. C., RODRÍGUEZ, J. M., MICHELOUD, D., MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. & RESINO, S. 2013. 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*, 32, 289-97.
- GIACCONI, R., LAFFON, B., COSTA, S., TEIXEIRA-GOMES, A., MAGGI, F., MACERA, L., SPEZIA, P. G., PIACENZA, F., BÜRKLE, A., MORENO-VILLANUEVA, M., BONASSI, S., VALDIGLESIAS, V., TEIXEIRA, J. P., DOLLÉ, M. E. T., RIETMAN, M. L., JANSEN, E., GRUNE, T., GONOS, E. S., FRANCESCHI, C., CAPRI, M., WEINBERGER, B., SIKORA, E., STUETZ, W., TOUSSAINT, O., DEBACQ-CHAINIAUX, F., HERVONEN, A., HURME, M., SLAGBOOM, P. E., SCHÖN, C., BERNHARDT, J., BREUSING, N., PÁSARO, E., MASEDA, A., LORENZO-LÓPEZ, L., MILLÁN-CALENTI, J. C., PROVINCIALI, M. & MALAVOLTA, M. 2023. Association of Torquetenovirus Viremia with Physical Frailty and Cognitive Impairment in Three Independent European Cohorts. *Gerontology*, 69, 684-693.
- GIACCONI, R., MAGGI, F., MACERA, L., PISTELLO, M., PROVINCIALI, M., GIANNECCHINI, S., MARTELLI, F., SPEZIA, P. G., MARIANI, E., GALEAZZI, R., COSTARELLI, L., IOVINO, L., GALIMBERTI, S., NISI, L., PIACENZA, F. & MALAVOLTA, M. 2018. Torquetenovirus (TTV) load is associated with mortality in Italian elderly subjects. *Exp Gerontol*, 112, 103-111.

- GILLES, R., HERLING, M., HOLTICK, U., HEGER, E., AWERKIEW, S., FISH, I., HÖLLER, K., SIERRA, S., KNOPS, E., KAISER, R., SCHEID, C. & DI CRISTANZIANO, V. 2017. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol*, 206, 355-362.
- GORE, E. J., GARD, L., NIESTERS, H. G. M. & VAN LEER BUTER, C. C. 2023. Understanding torquetenovirus (TTV) as an immune marker. *Front Med (Lausanne)*, 10, 1168400.
- GÖRZER, I., HALOSCHAN, M., JAKSCH, P., KLEPETKO, W. & PUCHHAMMER-STÖCKL, E. 2014. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 33, 320-3.
- GÖRZER, I., JAKSCH, P., KUNDI, M., SEITZ, T., KLEPETKO, W. & PUCHHAMMER-STÖCKL, E. 2015. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One*, 10, e0122975.
- GOTO, K., SUGIYAMA, K., ANDO, T., MIZUTANI, F., TERABE, K., TANAKA, K., NISHIYAMA, M. & WADA, Y. 2000. Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva. *Tohoku J Exp Med*, 191, 203-7.
- GRIFFITHS, P. 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol*, 9, 73-4.
- GULICK, R. M., MELLORS, J. W., HAVLIR, D., ERON, J. J., GONZALEZ, C., MCMAHON, D., RICHMAN, D. D., VALENTINE, F. T., JONAS, L., MEIBOHM, A., EMINI, E. A. & CHODAKEWITZ, J. A. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, 337, 734-9.
- HAEUSER, E., SERFES, A. L., CORK, M. A., YANG, M., ABBASTABAR, H., ABHILASH, E. S., ADABI, M., ADEBAYO, O. M., ADEKANMBI, V., ADEYINKA, D. A., AFZAL, S., AHINKORAH, B. O., AHMADI, K., AHMED, M. B., AKALU, Y., AKINYEMI, R. O., AKUNNA, C. J., ALAHDAB, F., ALANEZI, F. M., ALANZI, T. M., ALENE, K. A., ALHASSAN, R. K., ALIPOUR, V., ALMASI-HASHIANI, A., ALVIS-GUZMAN, N., AMEYAW, E. K., AMINI, S., AMUGSI, D. A., ANCUCEANU, R., ANVARI, D., APPIAH, S. C. Y., ARABLOO, J., AREMU, O., ASEMAHAGN, M. A., JAFARABADI, M. A., AWEDEW, A. F., QUINTANILLA, B. P. A., AYANORE, M. A., AYNALEM, Y. A., AZARI, S., AZENE, Z. N., DARSHAN, B. B., BABALOLA, T. K., BAIG, A. A., BANACH, M., BÄRNIGHAUSEN, T. W., BELL, A. W., BHAGAVATHULA, A. S., BHARDWAJ, N., BHARDWAJ, P., BHATTACHARYYA, K., BIJANI, A., BITEW, Z. W., BOHLOULI, S., BOLARINWA, O. A., BOLOOR, A., BOZICEVIC, I., BUTT, Z. A., CÁRDENAS, R., CARVALHO, F., CHARAN, J., CHATTU, V. K., CHOWDHURY, M. A. K., CHU, D. T., COWDEN, R. G., DAHLAWI, S. M. A., DAMIANI, G., DARTEH, E. K. M., DARWESH, A. M., DAS NEVES, J., WEAVER, N. D., DE LEO, D., DE NEVE, J. W., DERIBE, K., DEUBA, K., DHARMARATNE, S., DIANATINASAB, M., DIAZ, D., DIDARLOO, A., DJALALINIA, S., DOROSTKAR, F., DUBLJANIN, E., DUKO, B., EL TANTAWI, M., EL-JAAFARY, S. I., ESHRATI, B., ESKANDARIEH, S., EYAWO, O., EZEONWUMELU, I. J., EZZIKOURI, S., FARZADFAR, F., FATTAHI, N., FAUK, N. K., FERNANDES, E., FILIP, I., FISCHER, F., FOIGT, N. A., FOROUTAN, M., FUKUMOTO, T., GAD, M. M., et al. 2022. Mapping age- and sex-specific HIV prevalence in adults in sub-Saharan Africa, 2000-2018. *BMC Med*, 20, 488.
- HALOSCHAN, M., BETTESCH, R., GÖRZER, I., WESESLINDTNER, L., KUNDI, M. & PUCHHAMMER-STÖCKL, E. 2014. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)*, 36, 9716.
- HAYES, A. F. & ROCKWOOD, N. J. 2017. Regression-based statistical mediation and moderation analysis in clinical research: Observations, recommendations, and implementation. *Behav Res Ther*, 98, 39-57.
- HERZ, C. T., KULTERER, O. C., KULIFAJ, D., GELAS, F., FRANZKE, B., HAUPENTHAL, F., PRAGER, G., LANGER, F. B., MARCULESCU, R., HAUG, A. R., KIEFER, F. W. & BOND, G. 2022. Obesity is associated with a higher Torque Teno viral load compared to leanness. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 962090.

- HLADIK, W., STUPP, P., MCCracken, S. D., JUSTMAN, J., NDONGMO, C., SHANG, J., DOKUBO, E. K., GUMMERSON, E., KOU, I., BODIKA, S., LOBOGNON, R., BROU, H., RYAN, C., BROWN, K., NUWAGABA-BIRIBONWOHA, H., KINGWARA, L., YOUNG, P., BRONSON, M., CHEGE, D., MALEWO, O., MENGISTU, Y., KOEN, F., JAHN, A., AULD, A., JONNALAGADDA, S., RADIN, E., HAMUNIME, N., WILLIAMS, D. B., KAYIRANGWA, E., MUGISHA, V., MDODO, R., DELGADO, S., KIRUNGI, W., NELSON, L., WEST, C., BIRARO, S., DZEKEDZEKE, K., BARRADAS, D., MUGURUNGI, O., BALACHANDRA, S., KILMARX, P. H., MUSUKA, G., PATEL, H., PAREKH, B., SLEEMAN, K., DOMAOAL, R. A., RUTHERFORD, G., MOTSOANE, T., BISSEK, A. Z., FARAHANI, M. & VOETSCH, A. C. 2023. The epidemiology of HIV population viral load in twelve sub-Saharan African countries. *PLoS One*, 18, e0275560.
- HONORATO, L., WITKIN, S. S., MENDES-CORREA, M. C., CONDE TOSCANO, A. L. C., LINHARES, I. M., DE PAULA, A. V., PAIÃO, H. G. O., DE PAULA, V. S., LOPES, A. O., LIMA, S. H., RAYMUNDI, V. C., FERREIRA, N. E., DA SILVA JUNIOR, A. R., ABRAHIM, K. Y., BRAZ-SILVA, P. H. & TOZETTO-MENDOZA, T. R. 2021. 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)*, 8, 809312.
- INAMI, T., KONOMI, N., ARAKAWA, Y. & ABE, K. 2000. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol*, 38, 2407-8.
- ITOH, M., SHIMOMURA, H., FUJIOKA, S., MIYAKE, M., TSUJI, H., IKEDA, F. & TSUJI, T. 2001. High prevalence of TT virus in human bile juice samples: importance of secretion through bile into feces. *Dig Dis Sci*, 46, 457-62.
- ITOH, Y., TAKAHASHI, M., FUKUDA, M., SHIBAYAMA, T., ISHIKAWA, T., TSUDA, F., TANAKA, T., NISHIZAWA, T. & OKAMOTO, H. 2000. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 279, 718-24.
- IZCO, S., GARCIA-BASTEIRO, A. L., DENNING, D. W., BOULWARE, D. R., PENN-NICHOLSON, A. & LETANG, E. 2023. Management of advanced HIV disease in Africa. *Lancet HIV*, 10, e358-e360.
- JAKSCH, P., GÖRZER, I., PUCHHAMMER-STÖCKL, E. & BOND, G. 2022. Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: The Road Toward Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. *Transplantation*, 106, 1940-1951.
- JAKSCH, P., KUNDI, M., GÖRZER, I., MURAKÖZY, G., LAMBERS, C., BENAZZO, A., HOETZENECKER, K., KLEPETKO, W. & PUCHHAMMER-STÖCKL, E. 2018. Torque Teno Virus as a Novel Biomarker Targeting the Efficacy of Immunosuppression After Lung Transplantation. *J Infect Dis*, 218, 1922-1928.
- JOSÉ, M., GAJARDO, R. & JORQUERA, J. I. 2005. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals*, 33, 9-16.
- JURASZ, H., BUKOWSKA-OŚKO, I., RYDZANICZ, M., POPIEL, M., DZIECIAŃKOWSKI, T., BAKUŁA-GRZĄDKA, K., PACIOREK, M., MAKOWIECKI, M., HORBAN, A., LASKUS, T., RADKOWSKI, M. & PERLEJEWSKI, K. 2024. Torque teno virus (TTV) Infection in Patients with Encephalitis. *Int J Mol Sci*, 25.
- KACZOROWSKA, J. & VAN DER HOEK, L. 2020. Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. *FEMS Microbiol Rev*, 44, 305-313.
- KANNANGAI, R., RAMALINGAM, S., JESUDASON, M. V., VIJAYAKUMAR, T. S., ABRAHAM, O. C., ZACHARIAH, A. & SRIDHARAN, G. 2001. Correlation of CD4(+) T-Cell counts estimated by an immunocapture technique (Capcellia) with viral loads in human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 1286-8.
- KATO, H., MIZOKAMI, M., ORITO, E., OHNO, T., HAYASHI, K., NAKANO, T., KATO, T., TANAKA, Y., SUGAUCHI, F., MUKAIDE, M. & UEDA, R. 2000. Lack of association between TTV viral load and aminotransferase levels in patients with hepatitis C or non-B-C. *Scand J Infect Dis*, 32, 259-62.

- KIKUCHI, K., MIYAKAWA, H., ABE, K., KAKO, M., KATAYAMA, K., FUKUSHI, S. & MISHIRO, S. 2000. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol*, 61, 165-70.
- KOSULIN, K., KERNBICHLER, S., PICHLER, H., LAWITSCHKA, A., GEYEREGGER, R., WITT, V. & LION, T. 2018. Post-transplant Replication of Torque Teno Virus in Granulocytes. *Front Microbiol*, 9, 2956.
- KOUAMOU, V., GUNDIDZA, P., NDHLOVU, C. E. & MAKADZANGE, A. T. 2023. Effects of Gender and Baseline CD4 Count on Post-Treatment CD4 Count Recovery and Outcomes in Patients with Advanced HIV Disease: A Retrospective Cohort Study. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 39, 340-349.
- KRABERGER, S., OPRIESSNIG, T., CELER, V., MAGGI, F., OKAMOTO, H., BLOMSTRÖM, A. L., CADAR, D., HARRACH, B., BIAGINI, P. & VARSANI, A. 2021. Taxonomic updates for the genus Gyrovirus (family Anelloviridae): recognition of several new members and establishment of species demarcation criteria. *Arch Virol*, 166, 2937-2942.
- KULIFAJ, D., DURGUEIL-LARIVIERE, B., MEYNIER, F., MUNTEANU, E., PICHON, N., DUBÉ, M., JOANNES, M., ESSIG, M., HANTZ, S., BARRANGER, C. & ALAIN, S. 2018. 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*, 105, 118-127.
- LAPA, D., DEL PORTO, P., MINOSSE, C., D'OFFIZI, G., ANTINORI, A., CAPOBIANCHI, M. R., VISCOMANDINI, U., MCPHEE, F., GARBUGLIA, A. R. & ZACCARELLI, M. 2021. Clinical Relevance of Torque Teno Virus (TTV) in HIV/HCV Coinfected and HCV Monoinfected Patients Treated with Direct-Acting Antiviral Therapy. *J Clin Med*, 10.
- LAURENT, C., KOUANFACK, C., LABORDE-BALEN, G., AGHOKENG, A. F., MBOUGUA, J. B., BOYER, S., CARRIERI, M. P., MBEN, J. M., DONT SOP, M., KAZÉ, S., MOLINARI, N., BOURGEOIS, A., MPOUDI-NGOLÉ, E., SPIRE, B., KOULLA-SHIRO, S. & DELAPORTE, E. 2011. Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*, 11, 825-33.
- LEARY, T. P., ERKER, J. C., CHALMERS, M. L., DESAI, S. M. & MUSHAHWAR, I. K. 1999. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol*, 80 (Pt 8), 2115-2120.
- LEDERMAN, M. M., CONNICK, E., LANDAY, A., KURITZKES, D. R., SPRITZLER, J., ST CLAIR, M., KOTZIN, B. L., FOX, L., CHIOZZI, M. H., LEONARD, J. M., ROUSSEAU, F., WADE, M., ROE, J. D., MARTINEZ, A. & KESSLER, H. 1998. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and zalcitabine: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis*, 178, 70-9.
- LEHMAN, A., ELLIS, J., NALINTYA, E., BAHR, N. C., LOYSE, A. & RAJASINGHAM, R. 2023. Advanced HIV disease: A review of diagnostic and prophylactic strategies. *HIV Med*, 24, 859-876.
- LI, G., JIN, Y., CHEN, B., LIN, A., WANG, E., XU, F., HU, G., XIAO, C., LIU, H., HOU, X., ZHANG, B. & SONG, J. 2023. Exploring the Relationship between the Gut Mucosal Virome and Colorectal Cancer: Characteristics and Correlations. *Cancers (Basel)*, 15.
- LI, L. & DELWART, E. 2011. From orphan virus to pathogen: the path to the clinical lab. *Curr Opin Virol*, 1, 282-8.
- LI, L., DENG, X., DA COSTA, A. C., BRUHN, R., DEEKS, S. G. & DELWART, E. 2015. Virome analysis of antiretroviral-treated HIV patients shows no correlation between T-cell activation and anelloviruses levels. *J Clin Virol*, 72, 106-13.
- LIÉGEOIS, F., BOYER, S., EYMARD-DUVERNAY, S., CARRIERI, P., KOUANFACK, C., DOMYEUM, J., MARADAN, G., DUCOS, J., MPOUDI-NGOLÉ, E., SPIRE, B., DELAPORTE, E., KUABAN, C., VIDAL, L. & LAURENT, C. 2020. Hepatitis B testing, treatment, and virologic suppression in HIV-infected patients in Cameroon (ANRS 12288 EVOLCAM). *BMC Infect Dis*, 20, 49.

- LIN, C. L., KYONO, W., TONGSON, J., CHUA, P. K., EASA, D., YANAGIHARA, R. & NERURKAR, V. R. 2000. Fecal excretion of a novel human circovirus, TT virus, in healthy children. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7, 960-3.
- LIU, S. H., BOGGAVARAPU, R., COHEN, N. R., ZHANG, Y., SHARMA, I., ZEHEB, L., MUKUND ACHAREKAR, N., RODGERS, H. D., ISLAM, S., PITTS, J., ARZE, C., SWAMINATHAN, H., YOZWIAK, N., ONG, T., HAJJAR, R. J., CHANG, Y., SWANSON, K. A. & DELAGRAVE, S. 2024. Structure of anellovirus-like particles reveal a mechanism for immune evasion. *Nat Commun*, 15, 7219.
- LIU, K., LI, Y., XU, R., ZHANG, Y., ZHENG, C., WAN, Z., LI, H., YANG, Z., JIN, X., HAO, P., ZHAO, J. & ZHANG, C. 2021. HIV-1 Infection Alters the Viral Composition of Plasma in Men Who Have Sex with Men. *mSphere*, 6.
- LOLOMADZE, E. A., DEGTYAREVA, A. V. & REBRIKOV, D. V. 2021. The newborns Torque teno virus dynamics depending on the term, feeding type and maternal viral load. *Acta Virol*, 65, 307-312.
- LOLOMADZE, E. A. & REBRIKOV, D. V. 2020. Constant companion: clinical and developmental aspects of torque teno virus infections. *Arch Virol*, 165, 2749-2757.
- LUO, K., LIANG, W., HE, H., YANG, S., WANG, Y., XIAO, H., LIU, D. & ZHANG, L. 2000. Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in rhesus monkey. *J Med Virol*, 61, 159-64.
- MACERA, L., SPEZIA, P. G., MEDICI, C., ROFI, E., DEL RE, M., FOCOSI, D., MAZZETTI, P., NAVARRO, D., ANTONELLI, G., DANESI, R., PISTELLO, M. & MAGGI, F. 2022. Comparative evaluation of molecular methods for the quantitative measure of torquetenovirus viremia, the new surrogate marker of immune competence. *J Med Virol*, 94, 491-498.
- MADSEN, C. D., EUGEN-OLSEN, J., KIRK, O., PARNER, J., KAAE CHRISTENSEN, J., BRASHOLT, M. S., OLE NIELSEN, J. & KROGSGAARD, K. 2002. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*, 3, 287-95.
- MAGGI, F. & BENDINELLI, M. 2009. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 331, 65-90.
- MAGGI, F., FOCOSI, D., ALBANI, M., LANINI, L., VATTERONI, M. L., PETRINI, M., CECCHERINI-NELLI, L., PISTELLO, M. & BENDINELLI, M. 2010. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol*, 84, 6891-3.
- MAGGI, F., FORNAI, C., ZACCARO, L., MORRICA, A., VATTERONI, M. L., ISOLA, P., MARCHI, S., RICCHIUTI, A., PISTELLO, M. & BENDINELLI, M. 2001a. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol*, 64, 190-4.
- MAGGI, F., PIFFERI, M., FORNAI, C., ANDREOLI, E., TEMPESTINI, E., VATTERONI, M., PRESCIUTTINI, S., MARCHI, S., PIETROBELLI, A., BONER, A., PISTELLO, M. & BENDINELLI, M. 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol*, 77, 2418-25.
- MAGGI, F., PISTELLO, M., VATTERONI, M., PRESCIUTTINI, S., MARCHI, S., ISOLA, P., FORNAI, C., FAGNANI, S., ANDREOLI, E., ANTONELLI, G. & BENDINELLI, M. 2001b. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol*, 75, 11999-2004.
- MALLET, F., DIOUF, L., MEUNIER, B., PERRET, M., REYNIER, F., LEISSNER, P., QUEMENEUR, L., GRIFFITHS, A. D., MOUCADEL, V., PACHOT, A., VENET, F., MONNERET, G., LEPAPE, A., RIMMELÉ, T., TAN, L. K., BRENGEL-PESCE, K. & TEXTORIS, J. 2021. Herpes DNAemia and TTV Viraemia in Intensive Care Unit Critically Ill Patients: A Single-Centre Prospective Longitudinal Study. *Front Immunol*, 12, 698808.
- MAMAN, D., PUJADES-RODRIGUEZ, M., SUBTIL, F., PINOGES, L., MCGUIRE, M., ECOCHARD, R. & ETARD, J. F. 2012. Gender differences in immune reconstitution: a multicentric cohort analysis in sub-Saharan Africa. *PLoS One*, 7, e31078.

- MANZARDO, C., GUARDO, A. C., LETANG, E., PLANA, M., GATELL, J. M. & MIRO, J. M. 2015. Opportunistic infections and immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected adults in the combined antiretroviral therapy era: a comprehensive review. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13, 751-67.
- MARISCAL, L. F., LÓPEZ-ALCOROCHO, J. M., RODRÍGUEZ-IÑIGO, E., ORTIZ-MOVILLA, N., DE LUCAS, S., BARTOLOMÉ, J. & CARREÑO, V. 2002. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology*, 301, 121-9.
- MARTELLI, F., MACERA, L., SPEZIA, P. G., MEDICI, C., PISTELLO, M., GUASTI, D., ROMAGNOLI, P., MAGGI, F. & GIANNECCHINI, S. 2018. Torquetenovirus detection in exosomes enriched vesicles circulating in human plasma samples. *Virology*, 15, 145.
- MARTÍNEZ, L., KEKARAINEN, T., SIBILA, M., RUIZ-FONS, F., VIDAL, D., GORTÁZAR, C. & SEGALÉS, J. 2006. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol*, 118, 223-9.
- MATHEZ, D., BAGNARELLI, P., GORIN, I., KATLAMA, C., PIALOUX, G., SAIMOT, G., TUBIANA, P., DE TRUCHIS, P., CHAUVIN, J. P., MILLS, R., RODE, R., CLEMENTI, M. & LEIBOWITZ, J. 1997. Reductions in viral load and increases in T lymphocyte numbers in treatment-naïve patients with advanced HIV-1 infection treated with zalcitabine, zidovudine and zalcitabine triple therapy. *Antivir Ther*, 2, 175-83.
- MATSUBARA, H., MICHITAKA, K., HORIIKE, N., YANO, M., AKBAR, S. M., TORISU, M. & ONJI, M. 2000. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology*, 43, 16-9.
- MBOUGUA, J. B., LAURENT, C., KOUANFACK, C., BOURGEOIS, A., CIAFFI, L., CALMY, A., GWET, H., KOULLA-SHIRO, S., DUCOS, J., MPOUDI-NGOLÉ, E., MOLINARI, N. & DELAPORTE, E. 2010. Hepatotoxicity and effectiveness of a Nevirapine-based antiretroviral therapy in HIV-infected patients with or without viral hepatitis B or C infection in Cameroon. *BMC Public Health*, 10, 105.
- MCCANN, A., RYAN, F. J., STOCKDALE, S. R., DALMASSO, M., BLAKE, T., RYAN, C. A., STANTON, C., MILLS, S., ROSS, P. R. & HILL, C. 2018. Viromes of one year old infants reveal the impact of birth mode on microbiome diversity. *PeerJ*, 6, e4694.
- MELLORS, J. W., MUÑOZ, A., GIORGI, J. V., MARGOLICK, J. B., TASSONI, C. J., GUPTA, P., KINGSLEY, L. A., TODD, J. A., SAAH, A. J., DETELS, R., PHAIR, J. P. & RINALDO, C. R., JR. 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*, 126, 946-54.
- MOEN, E. M., SAGEDAL, S., BJØRO, K., DEGRÉ, M., OPSTAD, P. K. & GRINDE, B. 2003. Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol*, 70, 177-82.
- MOHAMADKHANI, A. & POUSTCHI, H. 2015. Repository of Human Blood Derivative Biospecimens in Biobank: Technical Implications. *Middle East J Dig Dis*, 7, 61-8.
- MORTIMER, P. P. 2013. Orphan viruses, orphan diseases: still the raw material for virus discovery. *Rev Med Virol*, 23, 337-9.
- MOUTON, W., CONRAD, A., BAL, A., BOCCARD, M., MALCUS, C., DUCASTELLE-LEPRETRE, S., BALSAT, M., BARRACO, F., LARCHER, M. V., FOSSARD, G., LABUSSIÈRE-WALLET, H., ADER, F., BRENGEL-PESCE, K., TROUILLET-ASSANT, S. & HEMINF STUDY GROUP, L. 2020. Torque Teno Virus Viral Load as a Marker of Immune Function in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Viruses*, 12.
- MÜLLER, M., WANDEL, S., COLEBUNDERS, R., ATTIA, S., FURRER, H. & EGGER, M. 2010. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 10, 251-61.
- MUSHAHWAR, I. K., ERKER, J. C., MUERHOFF, A. S., LEARY, T. P., SIMONS, J. N., BIRKENMEYER, L. G., CHALMERS, M. L., PILOT-MATIAS, T. J. & DEXAI, S. M. 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3177-82.

- NINOMIYA, M., NISHIZAWA, T., TAKAHASHI, M., LORENZO, F. R., SHIMOSEGAWA, T. & OKAMOTO, H. 2007. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol*, 88, 1939-1944.
- NINOMIYA, M., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., SHIMOSEGAWA, T. & OKAMOTO, H. 2008. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol*, 46, 507-14.
- NISHIZAWA, T., OKAMOTO, H., KONISHI, K., YOSHIZAWA, H., MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 241, 92-7.
- O'BRIEN, W. A., HARTIGAN, P. M., MARTIN, D., ESINHART, J., HILL, A., BENOIT, S., RUBIN, M., SIMBERKOFF, M. S. & HAMILTON, J. D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med*, 334, 426-31.
- OKAMOTO, H. 2009. TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 331, 35-52.
- OKAMOTO, H., FUKUDA, M., TAWARA, A., NISHIZAWA, T., ITOH, Y., HAYASAKA, I., TSUDA, F., TANAKA, T., MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. 2000a. Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *J Virol*, 74, 1132-9.
- OKAMOTO, H., NISHIZAWA, T., TAKAHASHI, M., ASABE, S., TSUDA, F. & YOSHIKAWA, A. 2001. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology*, 288, 358-68.
- OKAMOTO, H., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., TAWARA, A., FUKAI, K., MURAMATSU, U., NAITO, Y. & YOSHIKAWA, A. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol*, 83, 1291-1297.
- OKAMOTO, H., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., TAWARA, A., SUGAI, Y., SAI, T., TANAKA, T. & TSUDA, F. 2000b. Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 657-62.
- OTT, C., DURET, L., CHEMIN, I., TRÉPO, C., MANDRAND, B. & KOMURIAN-PRADEL, F. 2000. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol*, 81, 2949-2958.
- POOVORAWAN, Y., TANGKIJVANICH, P., THEAMBOONLERS, A. & HIRSCH, P. 2001. Transfusion transmissible virus TTV and its putative role in the etiology of liver disease. *Hepatogastroenterology*, 48, 256-60.
- PRADIER, A., MASOURIDI-LEVRAT, S., BOSSHARD, C., DANTIN, C., VU, D. L., ZANELLA, M. C., BOELY, E., TAPPAREL, C., KAISER, L., CHALANDON, Y., SIMONETTA, F. & ROOSNEK, E. 2020. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 11, 998.
- QUERIDO, S., ADRAGÃO, T., PINTO, I., ORMONDE, C., PAPOILA, A. L., PESSANHA, M. A., GOMES, P., FERREIRA, S., FIGUEIRA, J. M., CARDOSO, C., VIANA, J. F. & WEIGERT, A. 2022. Torquetenovirus viral load is associated with anti-spike antibody response in SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccinated kidney transplant patients. *Clin Transplant*, 36, e14825.
- REDONDO, N., NAVARRO, D., AGUADO, J. M. & FERNÁNDEZ-RUIZ, M. 2022. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis*, 24, e13778.
- REIN, S. M., LAMPE, F. C., INGLE, S. M., STERNE, J. A. C., TRICKEY, A., GILL, M. J., PAPASTAMOPOULOS, V., WITTKOP, L., VAN DER VALK, M., KITCHEN, M., GUEST, J. L., SATRE, D. D., WANDELER, G., GALINDO, P., CASTILHO, J., CRANE, H. M. & SMITH, C. J. 2023. All-cause hospitalisation among people living with HIV according to gender, mode of HIV acquisition, ethnicity, and geographical origin in Europe and North

- America: findings from the ART-CC cohort collaboration. *Lancet Public Health*, 8, e776-e787.
- REZAHOSSEINI, O., DRABE, C. H., SØRENSEN, S. S., RASMUSSEN, A., PERCH, M., OSTROWSKI, S. R. & NIELSEN, S. D. 2019. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*, 33, 137-144.
- RODRÍGUEZ-IÑIGO, E., CASQUEIRO, M., BARTOLOMÉ, J., ORTIZ-MOVILLA, N., LÓPEZ-ALCOROCHO, J. M., HERRERO, M., MANZARBEITIA, F., OLIVA, H. & CARREÑO, V. 2000. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol*, 156, 1227-34.
- ROMEO, R., HEGERICH, P., EMERSON, S. U., COLOMBO, M., PURCELL, R. H. & BUKH, J. 2000. High prevalence of TT virus (TTV) in naive chimpanzees and in hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of new TTV genotypes in chimpanzees. *J Gen Virol*, 81, 1001-7.
- ROSS, R. S., VIAZOV, S., RUNDE, V., SCHAEFER, U. W. & ROGGENDORF, M. 1999. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol*, 13, 181-4.
- RUEL, T. D., ZANONI, B. C., SSEWANYANA, I., CAO, H., HAVLIR, D. V., KAMYA, M., ACHAN, J., CHARLEBOIS, E. D. & FEENEY, M. E. 2011. Sex differences in HIV RNA level and CD4 cell percentage during childhood. *Clin Infect Dis*, 53, 592-9.
- RUIZ, P., MARTÍNEZ-PICOLA, M., SANTANA, M., MUÑOZ, J., PÉREZ-DEL-PULGAR, S., KOUTSOUDAKIS, G., SASTRE, L., COLMENERO, J., CRESPO, G. & NAVASA, M. 2019. Torque Teno Virus Is Associated With the State of Immune Suppression Early After Liver Transplantation. *Liver Transpl*, 25, 302-310.
- SAMA, L. F., SADJEU, S., TCHOUANGUEU, T. F., DABOU, S., KUH, G. F., NGOUATEU, O. B. & NOUBOM, M. 2023. Diabetes Mellitus and HIV Infection among Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients in the North West Region of Cameroon: A Cross-Sectional Study. *Int J Clin Pract*, 2023, 5998727.
- SARAIKRAH, H., BDOUR, S. & GHARAIBEH, W. 2020. The Molecular Epidemiology and Phylogeny of Torque Teno Virus (TTV) in Jordan. *Viruses*, 12.
- SCHIEHMANN, M., PUCHHAMMER-STÖCKL, E., ESKANDARY, F., KOHLBECK, P., RASOUL-ROCKENSCHAUB, S., HEILOS, A., KOZAKOWSKI, N., GÖRZER, I., KIKIĆ, Ž., HERKNER, H., BÖHMIG, G. A. & BOND, G. 2017. Torque Teno Virus Load-Inverse Association With Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation*, 101, 360-367.
- SCHMIDT, L., JENSEN, B. O., WALKER, A., KEITEL-ANSELMINO, V., DI CRISTANZIANO, V., BOHM, M., KNOPS, E., HEGER, E., KAISER, R., DE LUCA, A., OETTE, M., HAUSSINGER, D., TIMM, J., FUCHS, A. & LUBKE, N. 2021. Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients. *Infection*, 49, 501-509.
- SCHMITZ, J., KOBBE, G., KONDAKCI, M., SCHULER, E., MAGORSCH, M. & ADAMS, O. 2020. 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*, 26, 643-650.
- SHIBAYAMA, T., MASUDA, G., AJISAWA, A., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., TSUDA, F. & OKAMOTO, H. 2001. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids*, 15, 563-70.
- SIBILA, M., MARTÍNEZ-GUINÓ, L., HUERTA, E., MORA, M., GRAU-ROMA, L., KEKARAINEN, T. & SEGALÉS, J. 2009. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. *Vet Microbiol*, 137, 354-8.
- SIMONETTA, F., PRADIER, A., MASOURIDI-LEVRAT, S., VAN DELDEN, C., GIOSTRA, E., MORARD, I., MUELLER, N., MUELLHAUPT, B., VALLI, P. V., SEMMO, N., SEEBACH, J., CHALANDON, Y., KAISER, L. & ROOSNEK, E. 2017. Torque Teno Virus Load and Acute Rejection After Orthotopic Liver Transplantation. *Transplantation*, 101, e219-e221.

- SINGH, G. & RAMAMOORTHY, S. 2018. Potential for the cross-species transmission of swine torque teno viruses. *Vet Microbiol*, 215, 66-70.
- SOLIS, M., GALLAIS, F., GARNIER-KEPKA, S., LEFEBVRE, N., BENOTMANE, I., LUDES, P. O., CASTELAIN, V., MEZIANI, F., CAILLARD, S., COLLANGE, O. & FAFI-KREMER, S. 2022. Combining predictive markers for severe COVID-19: Torquetenovirus DNA load and SARS-CoV-2 RNAemia. *J Clin Virol*, 148, 105120.
- SOLIS, M., VELAY, A., GANTNER, P., BAUSSON, J., FILIPPUTTU, A., FREITAG, R., MOULIN, B., CAILLARD, S. & FAFI-KREMER, S. 2019. Torquetenovirus viremia for early prediction of graft rejection after kidney transplantation. *J Infect*, 79, 56-60.
- SPEZIA, P. G., FOCOSI, D., BAJ, A., NOVAZZI, F., FERRANTE, F. D., CARLETTI, F., MINOSSE, C., MATUSALI, G. & MAGGI, F. 2023. TTV and other anelloviruses: The astonishingly wide spread of a viral infection. *Asp Mol Med*, 1, None.
- SPIERTZ, A., TSAKMAKLIS, A., FAROWSKI, F., KNOPS, E., HEGER, E., WIRTZ, M., KAISER, R., HOLTICK, U., VEHRESCHILD, M. & DI CRISTANZIANO, V. 2023. Torque teno virus-DNA load as individual cytomegalovirus risk assessment parameter upon allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*, 111, 963-969.
- SPRINGFELD, C., BUGERT, J. J., SCHNITZLER, P., TOBIASCH, E., KEHM, R. & DARAI, G. 2000. TT virus as a human pathogen: significance and problems. *Virus Genes*, 20, 35-45.
- SSEMADAALI, M. A., EFFERTZ, K., SINGH, P., KOLYVUSHKO, O. & RAMAMOORTHY, S. 2016. Identification of heterologous Torque Teno Viruses in humans and swine. *Sci Rep*, 6, 26655.
- STENGAARD, A. R., COMBS, L., SUPERVIE, V., CROXFORD, S., DESAI, S., SULLIVAN, A. K., JAKOBSEN, S. F., SANTOS, Q., SIMÕES, D., CASABONA, J., LAZARUS, J. V., DE WIT, J. B. F., AMORT, F. M., PHARRIS, A., NERLANDER, L. & RABEN, D. 2021. HIV seroprevalence in five key populations in Europe: a systematic literature review, 2009 to 2019. *Euro Surveill*, 26.
- STRASSL, R., DOBERER, K., RASOUL-ROCKENSCHAUB, S., HERKNER, H., GÖRZER, I., KLÄGER, J. P., SCHMIDT, R., HASLACHER, H., SCHIEMANN, M., ESKANDARY, F. A., KIKIĆ, Ž., REINDL-SCHWAIGHOFER, R., PUCHHAMMER-STÖCKL, E., BÖHMIG, G. A. & BOND, G. 2019. Torque Teno Virus for Risk Stratification of Acute Biopsy-Proven Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients. *J Infect Dis*, 219, 1934-1939.
- STUDENIC, P., BOND, G., KERSCHBAUMER, A., BÉCÈDE, M., PAVELKA, K., KARATEEV, D., STIEGER, J., PUCHNER, R., MUELLER, R. B., PUCHHAMMER-STÖCKL, E., DURECHOVA, M., LOISKANDL, M., PERKMANN, T., OLEJAROVA, M., LUCHIKHINA, E., STEINER, C. W., BONELLI, M., SMOLEN, J. S. & ALETAHA, D. 2022. Torque Teno Virus quantification for monitoring of immunomodulation with biologic compounds in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 61, 2815-2825.
- TAKAHASHI, K., IWASA, Y., HIJIKATA, M. & MISHIRO, S. 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*, 145, 979-93.
- TAKAHASHI, M., ASABE, S., GOTANDA, Y., KISHIMOTO, J., TSUDA, F. & OKAMOTO, H. 2002. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 242-8.
- TANUE, E. A., NSAGHA, D. S., NJAMEN, T. N. & ASSOBA, N. J. C. 2019. Tuberculosis treatment outcome and its associated factors among people living with HIV and AIDS in Fako Division of Cameroon. *PLoS One*, 14, e0218800.
- TARANCON-DIEZ, L., CARRASCO, I., MONTES, L., FALCES-ROMERO, I., VAZQUEZ-ALEJO, E., JIMÉNEZ DE ORY, S., DAPENA, M., IRIBARREN, J. A., DÍEZ, C., RAMOS-RUPERTO, L., COLINO, E., CALVO, C., MUÑOZ-FERNANDEZ, M., NAVARRO, M. L. & SAINZ, T. 2024. Torque teno virus: a potential marker of immune reconstitution in youths with vertically acquired HIV. *Sci Rep*, 14, 24691.

- TAVAKOLI NICK, S., MOHEBBI, S. R., HOSSEINI, S. M., MIRJALALI, H. & ALEBOUYEH, M. 2019. Occurrence and molecular characterization of Torque teno virus (TTV) in a wastewater treatment plant in Tehran. *J Water Health*, 17, 971-977.
- TAYLOR, L. J., KEELER, E. L., BUSHMAN, F. D. & COLLMAN, R. G. 2022. The enigmatic roles of Anelloviridae and Redondoviridae in humans. *Curr Opin Virol*, 55, 101248.
- THOM, K. & PETRIK, J. 2007. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol*, 79, 1-7.
- TOUINSSI, M., GALLIAN, P., BIAGINI, P., ATTOUI, H., VIALETES, B., BERLAND, Y., TAMALET, C., DHIVER, C., RAVAUUX, I., DE MICCO, P. & DE LAMBALLERIE, X. 2001. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol*, 21, 135-41.
- TOZETTO-MENDOZA, T. R., BONGIOVANNI, A. M., MINIS, E., LINHARES, I. M., BOESTER, A., FREIRE, W. S., LIMA, S. H., DE OLIVEIRA, N. P. G., MENDES-CORREA, M. C., FORNEY, L. J. & WITKIN, S. S. 2020. Torquetenovirus Titer in Vaginal Secretions from Pregnant and Postpartum Women: Association with Absence of *Lactobacillus crispatus* and Levels of Lactic Acid and Matrix Metalloproteinase-8. *Reprod Sci*, 27, 2075-2081.
- TRICKEY, A., SABIN, C. A., BURKHOLDER, G., CRANE, H., D'ARMINIO MONFORTE, A., EGGER, M., GILL, M. J., GRABAR, S., GUEST, J. L., JARRIN, I., LAMPE, F. C., OBEL, N., REYES, J. M., STEPHAN, C., STERLING, T. R., TEIRA, R., TOULOUMI, G., WASMUTH, J. C., WIT, F., WITTKOP, L., ZANGERLE, R., SILVERBERG, M. J., JUSTICE, A. & STERNE, J. A. C. 2023. Life expectancy after 2015 of adults with HIV on long-term antiretroviral therapy in Europe and North America: a collaborative analysis of cohort studies. *Lancet HIV*, 10, e295-e307.
- TSUDA, F., OKAMOTO, H., UKITA, M., TANAKA, T., AKAHANE, Y., KONISHI, K., YOSHIZAWA, H., MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. 1999. Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods*, 77, 199-206.
- TYSCHIK, E. A., RASSKAZOVA, A. S., DEGTYAREVA, A. V., REBRIKOV, D. V. & SUKHIKH, G. T. 2018. Torque teno virus dynamics during the first year of life. *Virol J*, 15, 96.
- TYSCHIK, E. A., SHCHERBAKOVA, S. M., IBRAGIMOV, R. R. & REBRIKOV, D. V. 2017. Transplacental transmission of torque teno virus. *Virol J*, 14, 92.
- VÄISÄNEN, E., KUISMA, I., MÄKINEN, M., ILONEN, J., VEIJOLA, R., TOPPARI, J., HEDMAN, K. & SÖDERLUND-VENERMO, M. 2022. Torque Teno Virus Primary Infection Kinetics in Early Childhood. *Viruses*, 14.
- VAN RIJN, A. L., ROOS, R., DEKKER, F. W., ROTMANS, J. I. & FELTKAMP, M. 2023. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation - A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*, 33, e2393.
- VAN RIJN, A. L., WUNDERINK, H. F., SIDOROV, I. A., DE BROUWER, C. S., KROES, A. C., PUTTER, H., DE VRIES, A. P., ROTMANS, J. I. & FELTKAMP, M. C. 2021. Torque teno virus loads after kidney transplantation predict allograft rejection but not viral infection. *J Clin Virol*, 140, 104871.
- VARSANI, A., KRABERGER, S., OPRIESSNIG, T., MAGGI, F., CELER, V., OKAMOTO, H. & BIAGINI, P. 2023. Anelloviridae taxonomy update 2023. *Arch Virol*, 168, 277.
- VECCHIA, A. D., KLUGE, M., DOS SANTOS DA SILVA, J. V., COMERLATO, J., RODRIGUES, M. T., FLECK, J. D., DA LUZ, R. B., TEIXEIRA, T. F., ROEHE, P. M., CAPALONGA, R., OLIVEIRA, A. B. & SPILKI, F. R. 2013. Presence of Torque teno virus (TTV) in tap water in public schools from Southern Brazil. *Food Environ Virol*, 5, 41-5.
- VIARD, J. P., MOCROFT, A., CHIESI, A., KIRK, O., RØGE, B., PANOS, G., VETTER, N., BRUUN, J. N., JOHNSON, M. & LUNDGREN, J. D. 2001. 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*, 183, 1290-4.

- WALKER, N. F., SCRIVEN, J., MEINTJES, G. & WILKINSON, R. J. 2015. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients. *HIV AIDS (Auckl)*, 7, 49-64.
- WOHLFARTH, P., LEINER, M., SCHOERGENHOFER, C., HOPFINGER, G., GOERZER, I., PUCHHAMMER-STOECKL, E. & RABITSCH, W. 2018. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biol Blood Marrow Transplant*, 24, 194-199.
- XIONG, Y. Q., MO, Y., CHEN, M. J., CAI, W., HE, W. Q. & CHEN, Q. 2018. Detection and phylogenetic analysis of torque teno virus (TTV) carried by murine rodents and house shrews in China. *Virology*, 516, 189-195.
- YOKOZAKI, S., FUKUDA, Y., NAKANO, I. & KATANO, Y. 1999. TT virus: a mother-to-child transmitted rather than bloodborne virus. *Blood*, 93, 3569-70.
- ZHU, C. X., SHAN, T. L., CUI, L., LUO, X. N., LIU, Z. J., TANG, S. D., LIU, Z. W., YUAN, C. L., LAN, D. L., ZHAO, W. & HUA, X. G. 2011. Molecular detection and sequence analysis of feline Torque teno virus (TTV) in China. *Virus Res*, 156, 13-6.
- ZOUFALY, A., JOCHUM, J., HAMMERL, R., NASSIMI, N., RAYMOND, Y., BURCHARD, G. D., SCHMIEDEL, S., DREXLER, J. F., CAMPBELL, N. K., TAKA, N., AWASOM, C., METZNER, K. J., VAN LUNZEN, J. & FELDT, T. 2015. Virological failure after 1 year of first-line ART is not associated with HIV minority drug resistance in rural Cameroon. *J Antimicrob Chemother*, 70, 922-5.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des zirkulären TTV-Genoms. GC: Guanin-Cytosin; UTR: Untranslated Region; ORF: Open Reading Frame. Diese Grafik wurde mit BioRender erstellt (BioRender.com)	8
Abbildung 2: Flowchart Generierung der Fallzahl. Erstellt mit https://BioRender.com	24
Abbildung 3: Erstes Regressionsmodell, Vorhersage der absoluten CD4 ⁺ -Zellzahl M12.....	29
Abbildung 4: Anstieg der medianen CD4 ⁺ -T-Zellzahl im Verlauf eines Jahres. Darstellung als Boxplot mit Median, 1. (Q1) und 3. Quartil (Q3), Minimalwert und Maximalwert. Werte außerhalb von $1,5 \times \text{IQR}$ unterhalb von Q1 bzw. oberhalb von Q3 wurden nach Tukey als Ausreißer ($1,5-3 \times \text{IQR}$) bzw. Extremwerte ($>3 \times \text{IQR}$) definiert und sind in dieser und den folgenden Grafiken als Punkt dargestellt.....	34
Abbildung 5: Entwicklung der logarithmierten HI-Viruslast über zwei Messzeitpunkte. Darstellung als Boxplot, siehe Abb. 4.....	35
Abbildung 6: Entwicklung der logarithmierten TT-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten. Darstellung als Boxplot, siehe Abb. 4	36
Abbildung 7: Korrelation der CD4 ⁺ -T-Zellzahl BL und HI-Viruslast BL	37
Abbildung 8: Korrelation der CD4 ⁺ -Zellzahl BL und der TT-Viruslast BL	38
Abbildung 9: Korrelation der CD4 ⁺ -Zellzahl M12 und der TT-Viruslast Baseline	38
Abbildung 10: Korrelation der CD4 ⁺ -Zell-Zunahme und der TT-Viruslast BL	39
Abbildung 11: Streudiagramm der jeweils gemessenen CD4 ⁺ -T-Zellzahlen im Laufe von drei Messzeitpunkten.....	68
Abbildung 12: Entwicklung der individuellen HI-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten (BL und M12), verbundene Werte	69
Abbildung 13: Entwicklung der individuellen logarithmierten TT-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten (BL und M12), verbundene Werte	70
Abbildung 14: Grafische Visualisierung des fehlenden Interaktionseffekts. Die Beziehung zwischen der TT-Viruslast und der CD4 ⁺ -Zellzahl M12 ist auf jeder Ausprägungsstufe der CD4 ⁺ -Zellzahl BL (Moderator) annähernd gleich.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte für die DNA-Extraktion.....	24
Tabelle 2: Verwendete Primer und Sonde der TTV-Realtime-PCR	25
Tabelle 3: Verwendete Materialien der TTV-Realtime-PCR.....	25
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Software der TTV-Realtime-PCR.....	26
Tabelle 5: Verwendete Plastik- und Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 6: Mengenverhältnisse pro PCR-Einzelansatz	27
Tabelle 7: Thermalprotokoll der TTV-qRT-PCR	27
Tabelle 8: Übersicht der Patientencharakteristika vor Beginn der antiretroviralen Therapie, Zeitpunkt Baseline (BL)	33
Tabelle 9: Ergebnisübersicht der multiplen linearen Regression, Zielvariable absolute CD4 ⁺ - Zellzahl M12; SE = standard error, Standardfehler	40
Tabelle 10: Ergebnisübersicht der multiplen linearen Regression, Zielvariable CD4 ⁺ -Zellzahl Zunahme M12; SE = standard error	41
Tabelle 11: Ergebnisse der ordinalen logistischen Regression, Vorhersage der Zugehörigkeit zu einer der definierten „Recovery-Gruppen“. *der Parameter „Geschlecht = männlich“ wurde auf Null gesetzt, da er als Referenzkategorie dient; SE = „Standard Error“	42
Tabelle 12: Ergebnisübersicht der Moderationsanalyse zur Überprüfung eines möglichen Interaktionseffekts zwischen der CD4 ⁺ -Zellzahl BL und der TT-Viruslast BL, SE= standard error	43

Anhang

Darstellung der individuellen $CD4^+$ -T-Zellzahl im Laufe der drei Messzeitpunkte (*BL*, *M6*, *M12*). Der Median ist jeweils als Balken dargestellt (siehe Abb. 11).

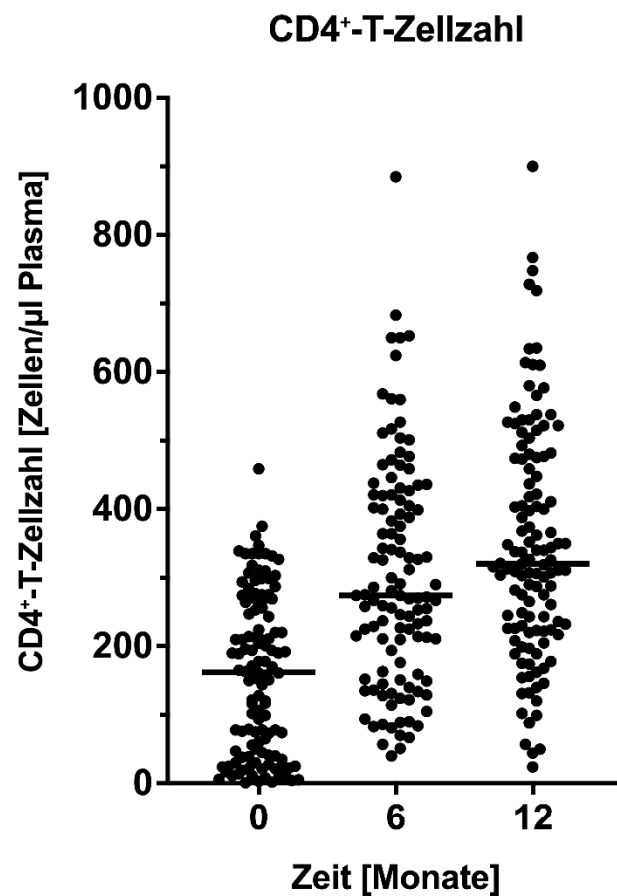


Abbildung 11: Streudiagramm der jeweils gemessenen $CD4^+$ -T-Zellzahlen im Laufe von drei Messzeitpunkten

Darstellung der individuell gemessenen HI-Viruslast im Laufe von zwei Messzeitpunkten (*BL* und *M12*). Es zeigt sich einer Mehrheit der Fälle ein deutliches Absinken der logarithmierten HIV-RNA-Viruslast innerhalb eines Jahres (siehe Abb. 12).

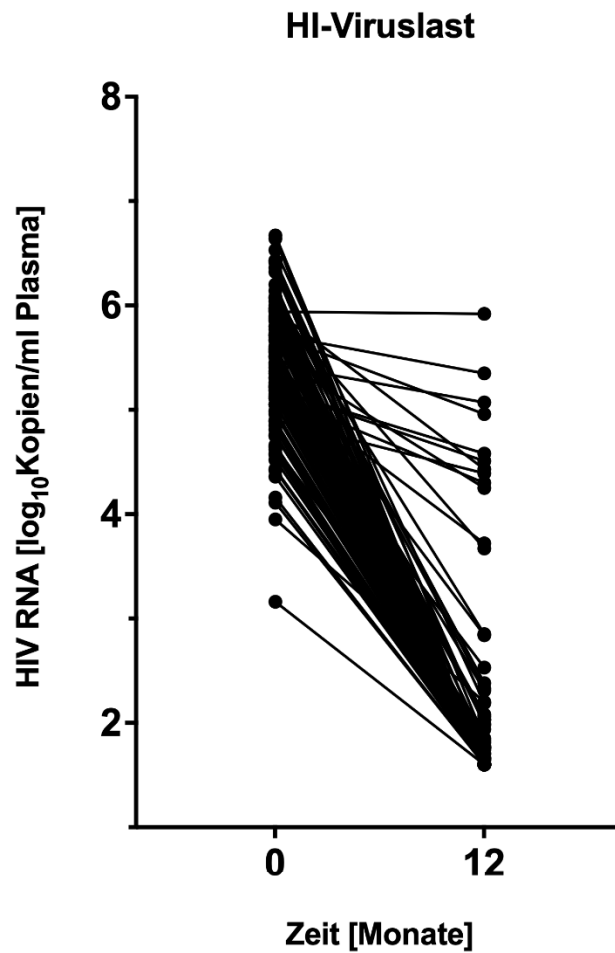


Abbildung 12: Entwicklung der individuellen HI-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten (BL und M12), verbundene Werte

Darstellung des Verlaufs der individuellen TT-Viruslast im Laufe von zwei Messzeitpunkten (BL und M12). In Übereinstimmung zur HI-Viruslast konnte auch hinsichtlich der im Plasma gemessenen individuellen TT-Viruslast im Verlauf des einjährigen Beobachtungszeitraums in den meisten Fällen ein deutlicher Rückgang verzeichnet werden (siehe Abb. 13).

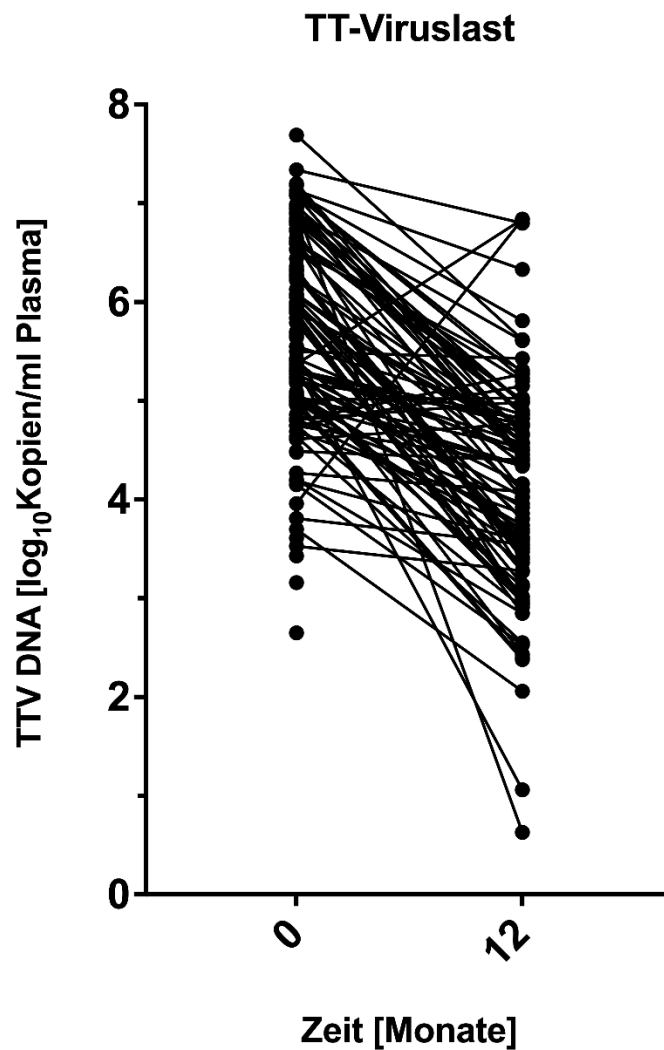


Abbildung 13: Entwicklung der individuellen logarithmierten TT-Viruslast im Verlauf von zwei Messzeitpunkten (BL und M12), verbundene Werte

Grafische Visualisierung des fehlenden Interaktionseffekts in der berechneten Moderationsanalyse mittels Interaktionsplot. Es sind die Regressionsgeraden für niedrige (–1 SD), mittlere und hohe (+1 SD) Ausprägungen der CD4⁺-Zellzahl BL dargestellt. Auch wenn sich auf den drei Ausprägungsstufen des Moderators, in diesem Fall der CD4⁺-Zellzahl BL, teils leicht divergierende Kurvenverläufe zeigten, kann in Gesamtschau der Ergebnisse nicht von einem signifikanten Effekt ausgegangen werden. Die Beziehung zwischen den beiden Parametern „logarithmierte TTV-Viruslast BL“ und „CD4⁺-Zellzahl M12“ ist auf jeder Stufe des Moderators „CD4⁺-Zellzahl BL“ annähernd gleich (siehe Abb. 14).

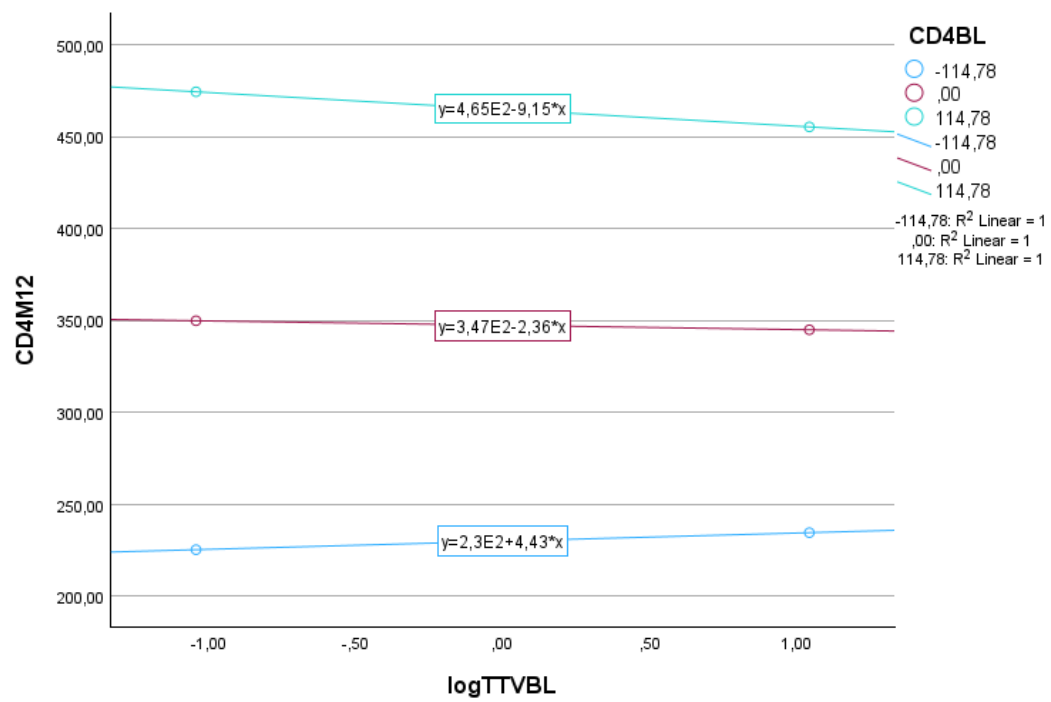


Abbildung 14: Grafische Visualisierung des fehlenden Interaktionseffekts. Die Beziehung zwischen der TT-Viruslast und der CD4^+ -Zellzahl M12 ist auf jeder Ausprägungsstufe der CD4^+ -Zellzahl BL (Moderator) annähernd gleich

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt dem gesamten Team der Virologie. Allen voran Nadine für die inhaltliche Einführung, das wertvolle Feedback, die Motivation und Geduld. Ich danke Prof. Dr. med. Torsten Feldt für die fundierten Einschätzungen und die klinische Einordnung. Ebenso danke ich Prof. Timm für die fachkundige Betreuung. Danke auch dem weiteren Team der Virologie, dass ich so nett aufgenommen, mir so vieles gezeigt und so viele Fragen beantwortet wurden – insbesondere Wiebke und Christopher. Ein besonderer Dank gilt außerdem dem Institut für Virologie der Uniklinik Köln für die Bereitstellung der Standards.

Danke, Leon, für die hilfreichen Anmerkungen, die Ideen und die gute Zeit. Danke, Louis, für das aufmerksame Zuhören, das interessierte Nachfragen und die Erklärungen. Julia Camilleri danke ich für das Engagement und die kompetente Beratung – durch den Austausch wurde mein Spaß an Statistik geweckt.

Von Herzen danke ich meiner Familie für die Liebe, das Vertrauen und die Unterstützung. Lukas, danke für die Bestärkung, die klugen Anmerkungen und die Begleitung auf meinem Weg.