

Aus dem Institut für Virologie  
der Universität zu Köln  
Universitätsprofessor Dr. med. F. Klein

**Die quantitative Bestimmung der Torque-Teno-Viruslast als  
indirekter Marker für die Immunfunktion bei Menschen mit  
HIV-Infektion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Pia Lena Esser  
aus Ratingen

promoviert am 17.02.2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2026

Dekan:                   Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter:        Universitätsprofessor Dr. med. F. Klein  
2. Gutachter:        Professor Dr. med. Dr. nat. med. J. Rybniker

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Florian Klein, Rolf Kaiser, Martin Pirkl, Gibran H. Rubio Quintanares, Leona Dold, Bettina Langhans, Eva Heger, Michael Böhm, Björn-Erik Ole Jensen, Stefan Esser, Nadine Lübke, Gerd Fätkenheuer, Thomas Lengauer, Christoph Boesecke, Veronica Di Cristanziano

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Datensatz wurde von mir erhoben; hierbei bekam ich Unterstützung von Gibran H. Rubio Quintanares und Irina Fish. Die Daten und das Material der eingelagerten Proben von der RESINA-Studie, welche vom Institut für Virologie von Rolf Kaiser zur Verfügung gestellt wurden, nutzte ich für diese Arbeit.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Gibran Horeb von mir selbst ausgeführt worden.

Der von mir erhobene Datensatz und die Ergebnisse meiner Experimente wurden vor allem von Martin Pirkl mit dem statistischen Programm R und durch mich statistisch ausgewertet.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 03.05.2025

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Rolf Kaiser, der meine Dissertation betreut und korrigiert hat. Für die hilfreichen Anregungen, die Zeit und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Ich bedanke mich bei Prof. Florian Klein, der als Doktorvater, der sich stets Zeit für mich genommen hat und mit seiner Unterstützung die gesamte Arbeit erst möglich gemacht hat.

Dr. Gibran H. Rubio Quintanares und Irina Fish danke ich für die Zeit im Labor, dafür, dass sie mir jede Frage beantworten konnten und mich geduldig in die Materialien und Geräte eingewiesen haben. Ein weiterer Dank gilt allen Praxen und Kliniken, die mir über die RESINA-Studie die Proben für die Entwicklung meines Datensatzes zur Verfügung gestellt haben. Mein Dank gilt ihrer Informationsbereitschaft sowie ihren interessanten Beiträgen und Antworten auf meine Fragen. Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Dr. Martin Pirkl, Dr. Leona Dold und Dr. Bettina Langhans bedanken, die mir mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Dr. Martin Pirkl hat die Statistik in dieser Arbeit möglich gemacht, und Dr. Leona Dold hat mein Projekt wieder ins Leben gerufen, als ich glaubte, es aufgeben zu müssen. Außerdem möchte ich meinem Vater, Prof. Stefan Esser, meiner Mutter, Barbara Esser, Dr. Martin Pirkl, Dr. Rolf Kaiser und Prof. Florian Klein für das intensive Korrekturlesen und die Verbesserungen meiner Dissertation danken. Ich möchte meinem Vater, Prof. Stefan Esser, für die vielen Instruktionen, Vorschläge und Ideen danken, die mir mehr Verständnis für den Aufbau einer wissenschaftlichen Arbeit und Fragestellung gegeben haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken – für ihre bedingungslose Liebe, ihren Glauben an mich und ihr Vertrauen in mich.

Ich widme diese Dissertation meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>8</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
2.1. Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)	9
2.1.1. Geschichte des HI-Virus	10
2.1.2. Der natürliche verlauf der HIV-Infektion	10
2.2. Torque Teno Virus (TTV)	13
2.2.1. Humanes Pegivirus (HPgV)	14
2.3. TTV als potenzieller Immunmarker	15
2.3.1. TTV und HIV	17
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	17
<b>3. MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>30</b>
4.1. TTV-Last korreliert mit der CD4 <sup>+</sup> -Zellzahl	31
4.1.1. TTV-Last korreliert mit der CD4 <sup>+</sup> -Zellzahl	31
4.2. TTV und klinische HIV-Stadien CDC A bis C	31
4.2.1. Der Verlust spezifischer CD4 <sup>+</sup> -Zellen als Ursache bestimmter opportunistischer Infektionen	32
4.3. Limitationen	33
4.4. Einteilung der TTV-Last	34
4.5. Ausblick auf weitere Studien	34
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>37</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>44</b>
6.1. Abbildungsverzeichnis	44

<b>6.2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>45</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<b>ART</b>	Antiretrovirale Therapie
<b>BKV</b>	BK-Polyomavirus
<b>CD4<sup>+</sup></b>	T-Helferzellen (Cluster of Differentiation 4)
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Zytotoxische T-Zellen (Cluster of Differentiation 8)
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>GvHD</b>	Graft-versus-Host-Disease
<b>HAART</b>	Highly Active Antiretroviral Therapy
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienzvirus
<b>HPgV</b>	Humanes Pegivirus
<b>HSCT</b>	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
<b>mRNA</b>	Messenger-Ribonukleinsäure
<b>MSM</b>	Men having Sex with Men
<b>PBMC</b>	Periphere mononukleäre Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PjP</b>	Pneumocystis jirovecii Pneumonie
<b>PLWH</b>	People Living With HIV
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SARS-CoV-2</b>	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
<b>SCT</b>	Stammzelltransplantation
<b>TTV</b>	Torque Teno Virus
<b>TTMDV</b>	Torque-Teno-Midivirus
<b>TTMV</b>	Torque-Teno-Minivirus
<b>UTR</b>	Untranslated Region

## 1. Zusammenfassung

Die humane Immundefizienzvirus (HIV)-Infektion ist inzwischen durch eine antiretrovirale Therapie (ART) kontrollierbar und wird bereits seit Jahrzehnten erforscht und behandelt. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung des Torque-Teno-Virus (TTV) als Immunmarker zusätzlich zu den bewährten Surrogatmarkern für Menschen, die mit einer HIV-Infektion leben (people living with HIV, PLWH). Die Replikation des HIV findet in den CD4<sup>+</sup>-Helferzellen des adaptiven Immunsystems statt, wodurch der Untergang dieser Zellen beschleunigt wird. Je höher die HIV-Last ist, desto schneller fällt die Zahl der CD4<sup>+</sup>-Helferzellen ab, was zur Immundefizienz und damit assoziierten Krankheiten führt. Deshalb werden HIV-Last und CD4<sup>+</sup>-Zellzahl in der HIV-Medizin als Surrogatmarker zum Krankheitsmonitoring und zur Therapieerfolgskontrolle genutzt. Die durch HIV verursachte Immundefizienz, die im weiteren Verlauf zu opportunistischen Infektionen bis hin zum Tod führt, ist vergleichbar mit der iatrogenen Immunsuppression in anderen medizinischen Bereichen, beispielsweise nach Organtransplantationen. Hier hat sich TTV als quantitativer Biomarker gezeigt, da es der Immunfunktion unter Immunsuppression korreliert. Dieses einzelsträngige DNA-Virus, welches zur Familie der Anelloviren gehört, ist bei fast allen Menschen transient nachweisbar. Bei nicht immunkompromittierten Menschen wird TTV gut durch das Immunsystem kontrolliert und transient im Blut nachgewiesen. Bei Transplantierten hingegen ist TTV regelhaft nachweisbar und kann durch die Anzahl der Kopien/ml im Blut indirekt Aufschluss über die Immunfunktion geben. In der Transplantationsmedizin (Lunge und Niere) und auch nach Stammzelltransplantationen konnte der Nutzen der TTV-Last im Blut als Marker für die Immunfunktion zur besseren Einstellung der Immunsuppression gezeigt werden. Obwohl die HIV-Surrogatmarker in der Regel mit dem klinischen Verlauf der HIV-Infektion korrelieren, treten im klinischen Alltag zwei Phänomene auf: Zum einen entwickeln PLWH mit guten Helferzellen und niedriger HIV-Last vereinzelt AIDS-definierende Erkrankungen. Zum anderen entwickeln einige PLWH trotz niedriger CD4<sup>+</sup>-Zellzahl keine opportunistischen Erkrankungen. Darüber hinaus erholen sich die CD4<sup>+</sup>-Zellen bei den einzelnen PLWH unterschiedlich schnell. Dieser Prozess dauert jedoch länger als die Dynamik der HI-Viruslast-Senkung bei erfolgreicher Therapie. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die quantitative TTV-Last den Zustand der Immunsuppression beschreiben kann und ob sich dadurch die Möglichkeiten des Therapiemonitorings erweitern lassen. Während der Arbeit entwickelte sich die Frage, ob AIDS-definierende Ereignisse durch eine zufällige Auslöschung spezifischer Immunantworten, also durch die Deletion spezifischer CD4<sup>+</sup>-Zellen, die für diese Immunantwort verantwortlich sind, verursacht werden, oder ob sie durch die quantitative TTV-Lastbestimmung spezifisch vorhersagbar sind. In dieser retrospektiven, multizentrischen Studie wurden 186 Serumproben aus einer bereits bestehenden Kohorte (RESINA-Studie) auf die TTV-Last mittels Real-Time-PCR untersucht.

Klinische und epidemiologische Parameter umfassten Alter, Geschlecht, HIV-Last, CD4<sup>+</sup>-Zellzahl sowie die klinischen Stadien nach der CDC-Klassifikation zum Zeitpunkt der Blutabnahme und vor Einleitung der ART. Zudem wurde geprüft, ob die Pegi-Virusvermehrung eine Beeinflussung der statistischen Auswertung der HIV- Last in diesem Kollektiv ausübt. Die ausgewerteten Daten wurden mittels logistischer und linearer Regression analysiert. Die Analysen ergaben, dass eine hohe TTV-Last stark mit niedrigen CD4<sup>+</sup>-Zellen und den CDC-Stadien 2–3 korreliert, jedoch nicht mit den klinischen Stadien CDC A–C.

## **2. Einleitung**

Die antiretrovirale Therapie (ART) zur Behandlung der HIV-Infektion hat die Lebenserwartung von Menschen mit HIV (PLWH) erheblich verbessert und nahezu an die der Allgemeinbevölkerung angeglichen (1, 2). Trotz der Fortschritte bei der Suppression der Virämie gibt es weiterhin offene Fragen zum Verlauf der HIV-Infektion und zur Funktion des Immunsystems. In einigen Ausnahmefällen zeigt sich eine erhebliche Variabilität im klinischen Verlauf: Während einige PLWH trotz fortgeschrittener Immunsuppression keine AIDS-definierenden Erkrankungen entwickeln, schreitet bei anderen die Infektion schnell voran.

In dieser Arbeit untersuchen wir das Torque-Teno-Virus (TTV) als möglichen Marker zur indirekten Darstellung der Immunfunktion bei HIV- und AIDS-Patienten. Ziel ist es, die TTV-Last als ergänzenden Surrogatmarker bewerten zu können, um den immunologischen Zustand besser einzuschätzen, insbesondere in Fällen, in denen traditionelle Marker wie CD4<sup>+</sup>-Zellen nicht ausreichen, um den klinischen Verlauf vollständig zu erklären.

### **2.1. Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)**

HIV ist ein umhülltes Virus und gehört zur Familie der Retroviren. HIV bindet an den CD4<sup>+</sup>-Rezeptor der T-Helferzellen, welcher als primäre Andockstelle zur Zellintegration und damit zur Virusreplikation dient. Zusätzlich zu dem CD4<sup>+</sup>-Zellrezeptor braucht HIV für den Eintritt in die Wirtszelle einen Chemokinrezeptor (CCR5 oder CXCR4) (3). Die HIV-Varianten können sich in der Verwendung des nötigen Korezeptors unterscheiden – dies wird Tropismus (CCR5-trope oder CXCR4-trope HIV) genannt. Durch die Integration, insbesondere aber durch die HIV-Replikation ausgelöste Immunreaktion, werden CD4<sup>+</sup>-Zellen verbraucht (4). Der Untergang dieser Zellen führt zu einer Immundefizienz. In dessen Folge kommt es zu opportunistischen, sog. AIDS-definierenden Erkrankungen, die unbehandelt zum Tod führen (5, 6). Deshalb wird die Bestimmung der CD4<sup>+</sup>-Zellen als Surrogatmarker für das Ausmaß der Immundefizienz bei der HIV-Infektion genutzt.



welches auch unbehandelt wieder abklingt. Danach bleiben PLWH häufig auch ohne ART mehrere Jahre ohne auffällige Symptome (15, 16). Im weiteren Verlauf leiden PLWH unter Krankheiten, welche bereits auf eine zelluläre Immundefizienz hindeuten (Herpes Zoster, orale Haarleukoplakie, orale Candidose etc.), jedoch noch nicht AIDS-definierend sind. In der Regel treten erst 8–10 Jahre nach Erstinfektion AIDS-definierende Erkrankungen auf, die ohne Behandlung tödlich sind (16). Die klinischen Stadien können hintereinander auftreten oder auch übersprungen werden (17).

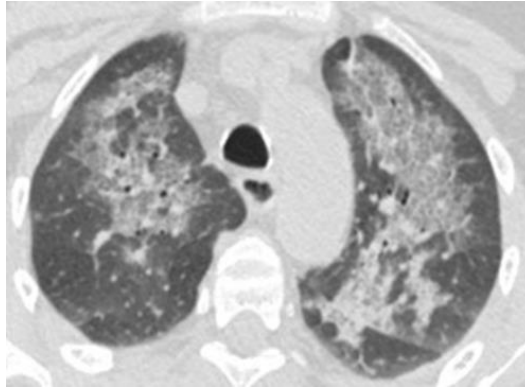


Abb. 2: CT-Bild einer PCP-Pneumonie

Das CT-Bild zeigt eine Lungenaufnahme mit typischem Befund einer *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie (PjP). Man erkennt eine milchglasartige Infiltration („ground-glass opacity“) beider Lungenflügel – ein klassisches Zeichen der PjP. Diese Infektion tritt meist bei starker Immunsuppression auf, insbesondere bei CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen <200/µl. Sie ist ein typisches Beispiel für eine AIDS-definierende Erkrankung im CDC-Stadium C. Quelle: American Journal of Roentgenology – "Pneumocystis jirovecii Pneumonia: High-Resolution CT Findings"

Durch die Einführung der ART ist die HIV-Infektion inzwischen eine kontrollierbare chronische Infektion geworden, sodass sich die Lebenserwartung von effektiv behandelten PLWH der Allgemeinbevölkerung angleicht (18). Die ART muss lebenslang zuverlässig eingenommen werden, denn ein Absetzen führt zu einer erneuten Virusreplikation mit Nachweis im peripheren Blut und kann dann erneut sowohl tödlich als auch ansteckend sein (19). In der Phase der Primärinfektion ist die HIV-Last im Blut am höchsten, sinkt mit dem Auftreten von Antikörpern ab und bleibt dann meistens über Jahre auf diesem Niveau stabil. Dies ist individuell unterschiedlich und wird als der *virale Setpoint* bezeichnet (20). Er ist entscheidend für die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression: Je höher der virale Setpoint, desto schneller kommt es zu einem Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellen und damit zu einem Fortschreiten der Infektion. Die Höhe der Viruslast und der Verlust der CD4<sup>+</sup>-Zellen sind maßgeblich für den Infektionsverlauf und dienen daher als Surrogatmarker zur Einschätzung der Immundefizienz und des Therapieerfolgs nach Beginn der ART.

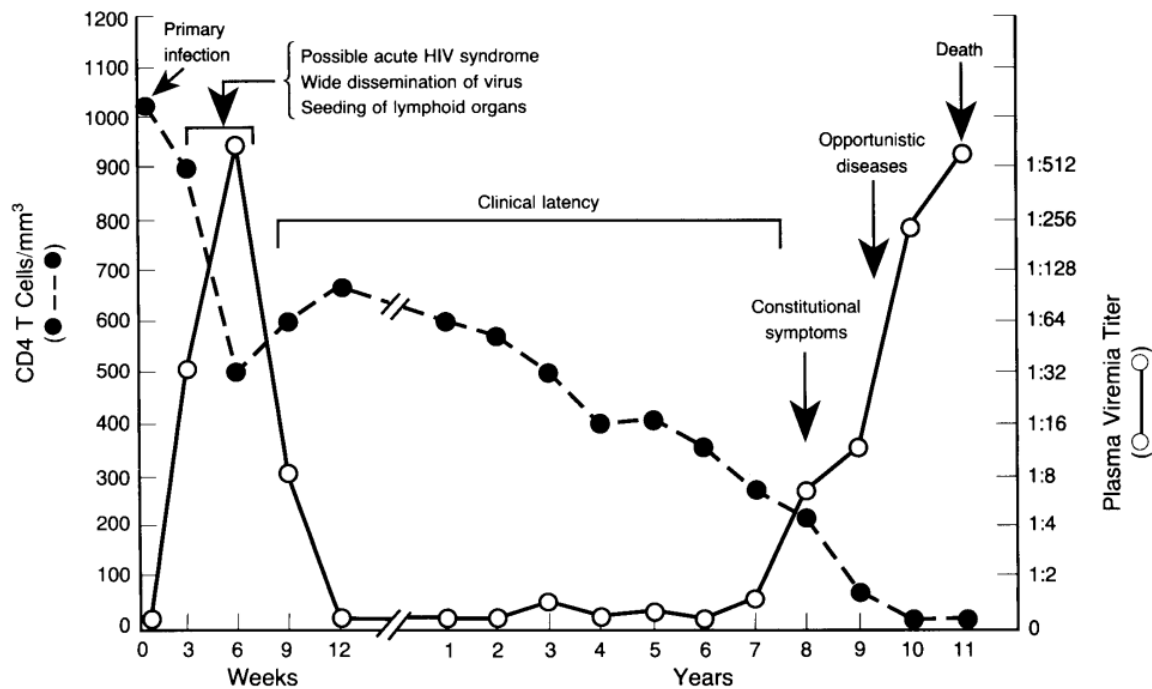


Abb. 3: Natürlicher Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion

Die Grafik stellt den klinischen und immunologischen Verlauf einer HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie (ART) dar. Zunächst steigt die Viruslast stark an (akute Phase), parallel fällt die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl ab, danach stabilisiert sich beides in der chronischen Phase (Setpoint), schließlich kommt es bei weiterem CD4<sup>+</sup>-Abfall zu AIDS. Die Darstellung erklärt die Grundlage für die klinische Klassifikation und Therapieentscheidung in der HIV-Medizin; "The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection." The New England journal of medicine vol. 328,5 (1993): 327-35. doi:10.1056/NEJM199302043280508

Neben den messbaren Parametern der HIV-Infektion (Viruslast, CD4<sup>+</sup>-Zellen, CD4/CD8-Ratio) kann im Rahmen der HIV-Infektion auch eine Aussage über die Funktion des Immunsystems durch die klinische Ausprägung der Infektion getroffen werden. Die Kombination aus Klinik und messbaren Surrogatmarkern wird in der CDC-Klassifikation zusammengefasst. Die CDC-Stadien wurden 1993 (21, 22) zur besseren Einteilung der HIV-Infektion entwickelt und 2014 überarbeitet (23). Dennoch ist bis heute die ursprüngliche CDC-Klassifizierung geläufig. Hierbei erfolgt die Einteilung nach laborchemischen Markern der CD4<sup>+</sup>-Zellen mit den Zahlen 1 (> 500/μl), 2 (200–499/μl) und 3 (< 200/μl) sowie den klinischen Stadien A, B und C, wobei das Stadium C immer eine AIDS-definierende Erkrankung umfasst (22).

Klinik / CD4-Zellen	asymptomatisch oder akute HIV-Krankheit	Symptomatisch aber nicht A oder C	AIDS-Erkrankung*
> 500/ $\mu$ l	A1	B1	C1
200 – 499/ $\mu$ l	A2	B2	C2
< 200/ $\mu$ l	A3	B3	C3

Tab.1: Einteilung der HIV-Erkrankung nach der CDC-Klassifikation von 1993 nach Hoffmann und Rockstroh (2012); \* zu den AIDS-Erkrankungen

Die Kohorten, die für diese Dissertation besonders interessant sind, sind PLWH mit AIDS aus der CDC- C Klasse mit der Kategorie C1 und C2 im Vergleich zu den C3 Klassifizierten sowie PLWH, die über einen langen Zeitraum im Stadium A3 bleiben in Vergleich zu denen die in B3 und C3 fortschreiten.

## 2.2. Torque Teno Virus (TTV)

TTV wurde erstmals 1997 beschrieben, bei Patienten mit laborchemischer Hepatitis nach Transfusionen von Blutprodukten (24, 25). Es ist ein kleines DNA-Virus, welches zur Familie der Anelloviridae gehört und Teil des menschlichen Viroms ist. Bislang wurde TTV mit einer angenommenen Anzahl von sieben Genotypen beschrieben (26), und es scheint keine Pathogenität zu besitzen, wohl aber einen immunmodulatorischen Einfluss insbesondere auf die zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort zu haben (27). TTV kann bei bis zu 90 % der gesunden Bevölkerung transient im Blut nachgewiesen werden (28). Es handelt sich um ein unbehülltes, negativ polarisiertes, einzelsträngiges, zirkuläres DNA-Virus mit 3,8 kb Nukleinsäure (29). Die Prävalenz von TTV nimmt mit dem Alter zu und erreicht in der frühen Kindheit ein Plateau. Es verursacht eine chronische, asymptomatische Infektion ohne bisherigen Nachweis von Krankheiten oder klinischer Manifestation (30, 31).

Obwohl TTV vor mehr als 25 Jahren entdeckt wurde, ist dessen Lebenszyklus bis heute nicht gut bekannt. Das bisherige Verständnis der Replikationsmechanismen beruht weitgehend auf dem Wissen über andere einzelsträngige DNA-Viren. Es ist bekannt, dass TTV verschiedene Zelltypen infiziert und überall im Körper vorkommt (32). Daher wird davon ausgegangen, dass die zellulären Rezeptoren, die für das Eindringen des Virus erforderlich sind, Moleküle sind, die in großen Mengen in Körpergeweben vorhanden sind und von einer Vielzahl von Zelltypen genutzt werden. Derzeit gibt es keine genaue Charakterisierung der Zelltypen, die die virale Replikation unterstützen. Längsschnittstudien an Hämatologie- und Transplantationspatienten zeigten, dass T-Lymphozyten die Hauptquelle für TTV im peripheren Blut sind (33). Hierüber löst TTV eine spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort aus, die jedoch größtenteils erschöpft und

funktionell beeinträchtigt ist. Die TTV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen eine hohe Expression des inhibitorischen NKG2A-Rezeptors sowie anderer Erschöpfungsmarker wie PD-1 und LAG-3. Diese Immunmodulation könnte die Persistenz von TTV im Wirt fördern und das Immunsystem in seiner Reaktionsfähigkeit beeinflussen (27).

Es wurde beobachtet, dass eine zelluläre Depletion infolge der Konditionierung für eine Stammzelltransplantation (SCT) zu einem vorübergehenden Verlust fast aller TTV im peripheren Blut führt (34).

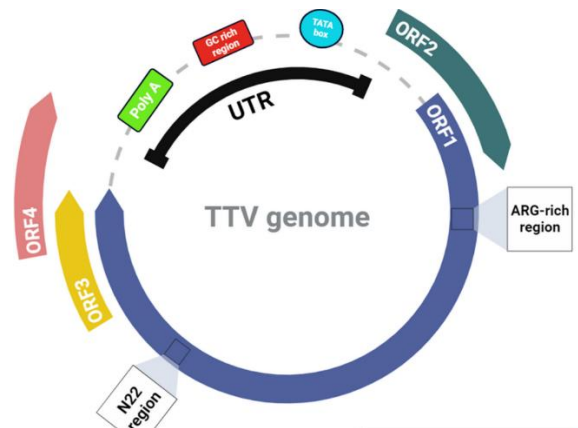


Abb. 4: Aufbau des TTV-Genoms. Das Torque-Teno-Virus (TTV) besitzt ein zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom mit mehreren offenen Leserahmen (ORFs), die regulatorische und strukturelle Proteine kodieren. Die UTR-Region (untranslated region) hat regulatorische Funktionen. Diese genetische Struktur ist relevant für die PCR-basierte Quantifizierung der TTV-Last und für das Verständnis seiner Replikation in Immunzellen. Modifiziert nach Nishizawa et al. (1997).

### 2.2.1. Humanes Pegivirus (HPgV)

HPgV gehört zur Gattung der *Pegiviren* innerhalb der Familie der *Flaviviren* und ist das am weitesten verbreitete Flavivirus der Welt. Es ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit einer Genomgröße von 9,8 kb, welches zwei strukturelle Proteine und sechs nicht-strukturelle Proteine enthält. HPgV-1 wird in sieben Genotypen mit unterschiedlicher geografischer Verbreitung eingeteilt (35). Die Übertragung erfolgt parenteral, sexuell und von der Mutter auf das Kind (35); dadurch sind PLWH häufig ebenfalls mit HPgV infiziert (bis zu 47 %). Derzeit sind der natürliche Verlauf, die pathogenen Mechanismen und die potenziellen Auswirkungen von HPgV-1 auf die menschliche Gesundheit noch nicht geklärt (35-37).

Es hat sich jedoch eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der HPgV-1-Viruslast sowie eine umgekehrte Korrelation zwischen HIV-1- und HPgV-1-Last gezeigt – ebenso eine geringere HIV-1-Viruslast und ein Zusammenhang mit einer klinisch langsameren HIV-Progression (38-40).

Aufgrund dieses interessanten Zusammenhangs zwischen HIV und HPgV nutzen wir noch verfügbare Proben in unserer Studie und testeten sie auf HPgV und TTV – in der Annahme, eine inverse Korrelation der beiden Viren zueinander zu beobachten.

### **2.3. TTV als potenzieller Immunmarker**

TTV hat in den letzten Jahren als potenzieller Surrogatmarker zur Abbildung der Immunfunktion an Aufmerksamkeit gewonnen. Bei Empfängern von Organtransplantaten (z. B. Nieren (31, 32) hat sich gezeigt, dass die TTV-Last im peripheren Blut mit dem Grad der angeborenen und adaptiven Immunität korreliert (31). Niedrige TTV-Lasten waren ein Indikator für eine starke Immunreaktion und wurden daher mit einer Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht (31-33), während hohe TTV-Lasten mit einem höheren Infektionsrisiko, nicht aber mit einer Transplantatabstoßung assoziiert waren.

Bei Empfängern von Stammzelltransplantaten korrelierten hohe TTV-Lasten mit einer geringeren Rate an frühen Graft-versus-Host-Erkrankungen und auch mit einem höheren Risiko für Infektionskrankheiten, hauptsächlich durch Cytomegalieviren (CMV) (34, 41).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TTV auch ein Marker für die Immunantwort auf die Impfung gegen das *Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) bei Patienten mit Dialysepflichtigkeit ist (42). Eine hohe TTV-Last vor der Impfung war mit einer geringeren Gesamtantikörper-Antwort gegen Spike-Proteine bei mit Messenger-RNA BNT162b2-geimpften Nierentransplantatempfängern verbunden. Der Zusammenhang zwischen der TTV-Belastung und der Impfstoffreaktion könnte einen zusätzlichen Nutzen bei der Optimierung der Impfschemata für diese Patienten darstellen (43).

Die TTV-Last könnte auch mit dem Ausgang der SARS-CoV-2-Infektion in Verbindung stehen. Eine Metaanalyse verschiedener kleiner Kohorten legt nahe, dass die TTV-Last ein potenzieller Marker für den Ausgang schwerer Infektionen mit dem SARS-CoV-2-Virus sein könnte (44).

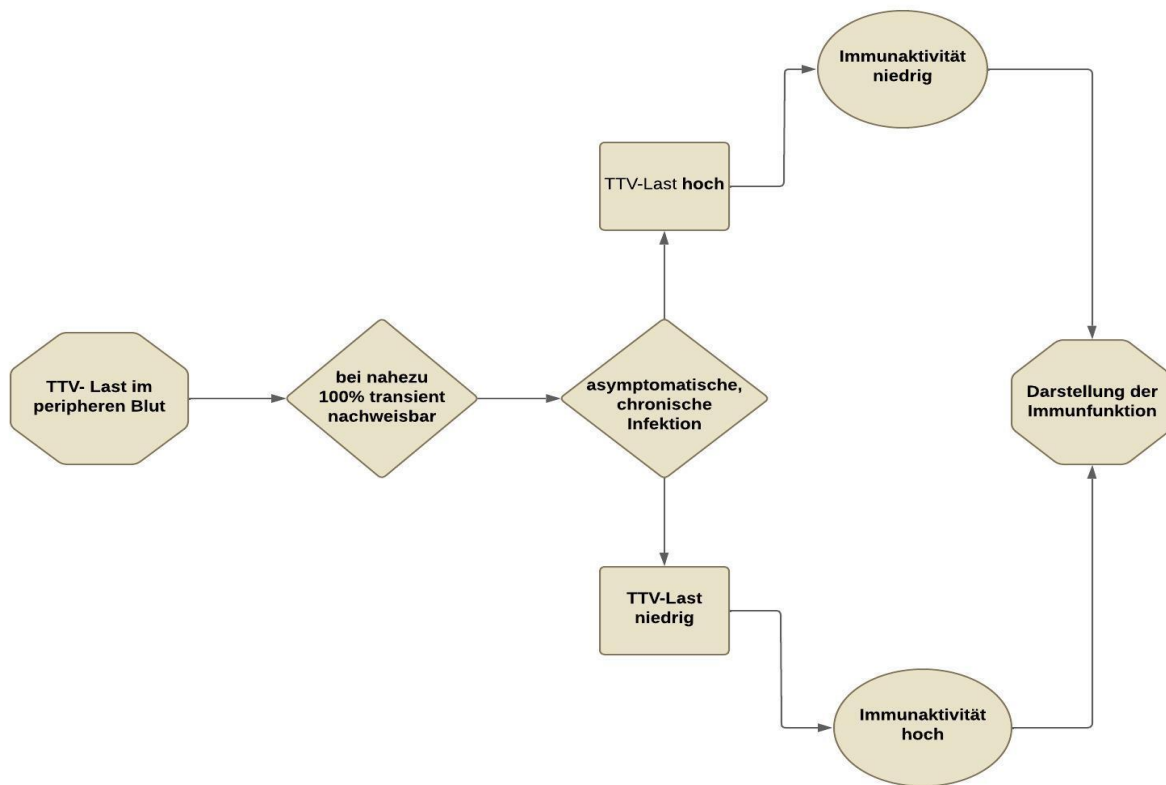


Abb. 5: Flowchart – Zusammenfassung TTV als Marker. Ein schematisches Flussdiagramm, das die Assoziation der TTV-Last mit verschiedenen klinischen Zuständen darstellt: Niedrige TTV-Last: normale Immunfunktion. Hohe TTV-Last: Immunsuppression. Visualisiert die Rolle von TTV als dynamischer Biomarker für Immunstatus in der Transplantationsmedizin und HIV.

Obwohl die hohe Prävalenz einer chronischen TTV-Infektion ohne klinische Symptome darauf hindeutet, dass TTV nicht pathogen ist, zeigt eine Studie von Szládek et al., dass eine Koinfektion mit dem humanen Papillomavirus und dem TTV-Genotyp 1 mit einer ungünstigen Prognose beim Larynxkarzinom assoziiert ist. Dabei bleibt jedoch völlig unklar, ob und in welchem Ausmaß TTV an der Krebsentstehung beteiligt sein könnte (45).

Die TTV-Last im peripheren Blut ist bei Transplantatempfängern oder Personen mit Sepsis dramatisch erhöht, wobei der Beitrag des Virus zur Morbidität unbekannt ist (46). Insgesamt scheint die Prognose der jeweiligen Erkrankung bei hoher TTV-Last schlecht zu sein.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei PLWH die TTV-Last invers mit der Höhe der CD4<sup>+</sup>-Zellen korreliert (47, 48), und es wurde nachgewiesen, dass die TTV-Last abnimmt, wenn die ART gegen HIV effektiv wirksam ist (49, 50). In den letzten Jahren wurden mehrere potenzielle neue Biomarker für die Immunfunktion untersucht, darunter T-Zell-Subsets, T-Zell-Proliferationsassays und lösliches CD30 (51-56). TTV ist in diesem Zusammenhang der am meisten untersuchte Biomarker, wobei die meisten Studien zeigen, dass eine hohe TTV-Belastung im Rahmen von Transplantationen mit einem erhöhten Infektionsrisiko und eine niedrige TTV-Belastung mit einem erhöhten Abstoßungsrisiko verbunden ist (56).

### **2.3.1. TTV und HIV**

Aufgrund des hohen Potenzials von TTV als Marker für die Immunfunktion bei immunsupprimierten Menschen stellt sich die Frage, ob TTV in der HIV-Medizin eine zusätzliche Information zu den bereits bekannten Surrogatmarkern geben kann. PLWH, bei denen der klinische Verlauf nicht mit der Entwicklung der HIV-Surrogatmarker korreliert, worauf PLWH in den CDC-Stadien C1 oder A3 hindeuten, könnten besonders von der TTV-Last als Marker für die Immunfunktion profitieren.

Ein zusätzlicher prädiktiver Marker zur Einschätzung der Immunfunktion könnte die Begleitung dieser PLWH erleichtern.

Zum Beispiel könnten die sonst eingesetzten Prophylaxen (57) gegen opportunistische Infektionen wie *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie (PjP) und Toxoplasmose-Enzephalitis bei PLWH im immunologischen Stadium 3 mit niedriger TTV-Last möglicherweise früher abgesetzt werden.

Durch den quantitativen Verlust von Immunzellen infolge der HIV-Infektion entwickelt sich eine zunehmende Immundefizienz, die zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten opportunistischer Erkrankungen führt (58). Doch nicht alle PLWH mit niedrigen CD4<sup>+</sup>-Zellen entwickeln opportunistische Erkrankungen.

### **2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

In der Arbeit sollen verschiedene Fragestellungen untersucht werden: Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der TTV-Last im Blut und der Häufigkeit opportunistischer Erkrankungen bei PLWH? Bietet ggf. die quantitative Bestimmung von TTV bei PLWH mit Diskrepanzen zwischen klinischen und immunologischen CDC-Stadien einen zusätzlichen Nutzen? Was verstehen wir unter einer hohen TTV- und was unter einer niedrigen TTV-Last? Korreliert die TTV-Last mit dem klinischen Zustand von PLWH?

Sehen wir eine inverse Korrelation zwischen HPgV und TTV? Können wir nach Beantwortung dieser Fragestellungen ggf. weitere Schlüsse in der HIV-Medizin in der Betreuung und Behandlung von PLWH ziehen, wie beispielsweise Prophylaxen, die standardmäßig in der HIV-Medikation verwendet werden, anhand der TTV-Last abzusetzen?

Während in der Transplantationsmedizin Infektionskrankheiten und Abstoßungsreaktionen klinisch mit der Immunfunktion korrelieren, dienen bei PLWH klinisch AIDS-definierende und HIV-assoziierte Erkrankungen zur Einschätzung der Immunfunktion. Die Klinik wird in den CDC-Stadien zusammengefasst. Die Assoziation der TTV-Last mit den HIV-Surrogatmarkern und den opportunistischen Infektionen bei PLWH wird in dieser Arbeit untersucht.

### 3. Material, Methoden und Ergebnisse

Die Materialien, Methoden und Ergebnisse sind ausführlich geschildert in meiner Publikation „Torque Teno Virus load is associated with CDC stage and CD4<sup>+</sup>- cell count in people living with HIV but unrelated to AIDS-defining events and Human Pegivirus load“, erschienen im Januar 2024 im „Journal of Infectious Diseases“.

Esser PL, Quintanares GHR, Langhans B, et al. Torque teno virus load is associated with CDC stage and CD4<sup>+</sup>- cell count in people living with HIV but unrelated to AIDS-defining events and Human Pegivirus load. *J Infect Dis* 2024; jiae014

#### Zusammenfassung der Publikation:

##### Einleitung:

Das Torque-Teno-Virus (TTV) ist ein unbehülltes, zirkuläres Einzelstrang-DNA-Virus und wird als Teil des menschlichen Viroms angesehen. Die Replikation von TTV korrelierte mit dem Immunstatus von Patienten, die nach einer Organtransplantation mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt wurden. Wir stellen die Hypothese auf, dass die TTV-Last ebenfalls ein zusätzlicher Marker für die Immundefunktion bei Menschen mit HIV (PLWH) sein könnte.

##### Methoden:

In dieser Analyse wurden Serumproben von PLWH aus der multizentrischen RESINA-Kohorte erneut auf TTV untersucht. Zu den untersuchten klinischen und epidemiologischen Parametern gehörten die Pegivirus-(HPgV-)Last, Alter, Geschlecht, HIV-Belastung, CD4<sup>+</sup>-Zellzahl (CDC 1, 2, 3) und klinische CDC-Stadien (CDC-Klassifikationssystem von 1993, A, B, C) vor Beginn der antiretroviralen Behandlung. Mit Hilfe einer Regressionsanalyse wurden mögliche Zusammenhänge zwischen den Parametern untersucht.

##### Ergebnisse:

Unsere Analyse bestätigte, dass TTV ein starker Prädiktor für die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl und CDC-Klasse 3 ist. Diese Beziehung wurde genutzt, um eine erste Klassifizierung der TTV-Last in Bezug auf das klinische Stadium vorzuschlagen. Wir fanden keinen Zusammenhang mit den klinischen CDC-Stadien A, B und C. Die HPgV-Last korrelierte umgekehrt mit der HIV-Last, nicht aber mit der TTV-Last. Es gab keinen Hinweis auf die gegenseitige Beeinflussung von HPgV-Last auf die TTV-Last.

Schlussfolgerungen:

Die TTV-Last war mit der Immunschwäche bei PLWH assoziiert und korrelierte mit der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl. Weder die TTV- noch die HIV-Last waren prädiktiv für die klinischen Kategorien der HIV-Infektion.

# Torque Teno Virus Load Is Associated With Centers for Disease Control and Prevention Stage and CD4<sup>+</sup> Cell Count in People Living With Human Immunodeficiency Virus but Seems Unrelated to AIDS-Defining Events and Human Pegivirus Load

Pia L. Esser,<sup>1,2,3</sup> Gibran H. Rubio Quintanares,<sup>2,4,5,6</sup> Bettina Langhans,<sup>1,3</sup> Eva Heger,<sup>2,4</sup> Michael Böhm,<sup>2,4</sup> Björn-Erik O. L. E. Jensen,<sup>7</sup> Stefan Esser,<sup>8</sup> Nadine Lübke,<sup>9,10</sup> Gerd Fätkenheuer,<sup>10</sup> Thomas Lengauer,<sup>2,4</sup> Florian Klein,<sup>2,4,11</sup> Mark Oette,<sup>12</sup> Juergen K. Rockstroh,<sup>1,3</sup> Christoph Boesecke,<sup>1,3</sup> Veronica Di Cristanziano,<sup>2,4</sup> Rolf Kaiser,<sup>2,4,13</sup> and Martin Pirkl<sup>2,4</sup> 

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; <sup>2</sup>Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>3</sup>German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Cologne-Bonn, Bonn, Germany; <sup>4</sup>German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Cologne-Bonn, Cologne, Germany; <sup>5</sup>Paul Ehrlich Institute, Langen, Germany; <sup>6</sup>Infectious Disease Department, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico; <sup>7</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; <sup>8</sup>Department of Dermatology, University Hospital Essen, Essen, Germany; <sup>9</sup>Institute of Virology, University Hospital Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; <sup>10</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital Cologne, Cologne, Germany; <sup>11</sup>Center for Molecular Medicine Cologne (CMCC), University of Cologne, Cologne, Germany; <sup>12</sup>Clinic for General Medicine, Gastroenterology, and Infectious Diseases, Augustinerinnen Hospital, Cologne, Germany; and <sup>13</sup>EuResist Network, Rome, Italy

**Background.** Torque teno virus (TTV) is part of the human virome. TTV load was related to the immune status in patients after organ transplantation. We hypothesize that TTV load could be an additional marker for immune function in people living with HIV (PLWH).

**Methods.** In this analysis, serum samples of PLWH from the RESINA multicenter cohort were reanalyzed for TTV. Investigated clinical and epidemiological parameters included human pegivirus load, patient age and sex, HIV load, CD4<sup>+</sup> T-cell count (Centers for Disease Control and Prevention [CDC] stage 1, 2, or 3), and CDC clinical stage (1993 CDC classification system; stage A, B, or C) before initiation of antiretroviral therapy. Regression analysis was used to detect possible associations among parameters.

**Results.** Our analysis confirmed TTV as a strong predictor of CD4<sup>+</sup> T-cell count and CDC class 3. This relationship was used to propose a first classification of TTV load with regard to clinical stage. We found no association with clinical CDC stages A–C. The human pegivirus load was inversely correlated with HIV load but not TTV load.

**Conclusions.** TTV load was associated with immunodeficiency in PLWH. Neither TTV nor HIV load were predictive for the clinical categories of HIV infection.

**Keywords.** TTV; HIV; HPgV; immunodeficiency; biomarker.

Effective antiretroviral therapy (ART) for human immunodeficiency virus (HIV) infection improves the life expectancy of people living with HIV (PLWH), making it comparable to that of the general population [1]. Despite excellent therapeutic

options for suppression of viremia, there are still open questions regarding the course of HIV infection and immune function. Some PLWH progress faster in their infection than others, and in some patients immunodeficiency does not recover after ART initiation [2]. Even with high CD4<sup>+</sup> T-cell counts, AIDS disease can rarely occur in PLWH represented by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stage C1, according to the 1993 classification [3]. Thus, it is still unclear whether other additional parameters support estimating the immune function of these patients. However, it was shown that HIV infections have a general influence on the virome and immune status of PLWH [4].

Torque teno virus (TTV), a small single-stranded DNA virus belonging to the Anelloviridae family, is part of the human virome. To date TTV has been described with an assumed number of 7 genotypes [5, 6], and it has not been observed to be pathogenic [7, 8]. TTV can be detected in up to 90% of healthy

Received 09 October 2023; editorial decision 06 January 2024; accepted 11 January 2024; published online 17 January 2024

Presented in part: German-Austrian AIDS Conference, March 23–25, Bonn, 2023.

Correspondence: Martin Pirkl, PhD, Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany (martin.pirkl@uk-koeln.de).

**The Journal of Infectious Diseases**<sup>®</sup>

© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited.

For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiae014>

individuals. It has recently gained attention as a potential surrogate marker of the current state of immunodeficiency. In recipients of solid organ (eg, kidney [9, 10]) transplants, peripheral blood viral loads for TTV were shown to be a surrogate marker for the level of innate and adaptive immunity. Low TTV loads were an indicator of a strong immune reaction and were therefore associated with graft rejection [11–13], while high TTV loads were associated with a higher risk of infections [10, 12–15] but not graft rejection. In stem cell transplant recipients, high TTV titers were correlated with a decreased rate of early graft-vs-host disease and also with a higher risk of infectious diseases [16], mostly by cytomegalovirus.

Furthermore, TTV also was shown to be a marker for the immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccination in patients receiving dialysis [17]. Higher TTV loads before vaccination were associated with reduced anti-spike total antibody response in messenger RNA BNT162b2-vaccinated kidney transplant recipients. The association between TTV load and vaccine response may be an added value in optimizing vaccination regimens these patients [9]. TTV load could also be associated with the outcome of SARS-CoV-2 infection. Meta-analysis of different small cohorts suggested that TTV load could be a potential marker for the outcome of severe infections with SARS-CoV-2 virus [9, 18].

The high prevalence of TTV within the general population suggested that TTV did not represent a principal etiological agent of any specific disease, but it was discussed as a cofactor favoring the development of a pathological status. For example, coinfection of human papillomavirus with TTV genotype 1 has been associated with poor prognosis in laryngeal cancer, even though it is unknown whether and how TTV can be involved in cancer development [19]. Other relevant coinfections with HIV have been studied [20–22]. TTV DNA was detected in lymphocytes from patients with B-cell and Hodgkin lymphoma [16, 23]. Although detected in blood, serum, and breast milk, among other cell types [24], TTV is suggested to show tropism toward specific cells, such as hepatocytes [25, 26]. TTV load is dramatically elevated in transplant recipients or those with sepsis, although the contribution of the virus to morbidity is unknown [9, 16]. In PLWH, TTV DNA titers have been inversely correlated with CD4<sup>+</sup> T-cell counts [7, 21, 27], and it has been shown that the TTV DNA viral load declines if ART is effective against HIV [9, 16].

Human pegivirus (HPgV) is a virus that has been shown to reduce HIV replication in patients with HIV and HPgV coinfection [28, 29]. HPgV is a positive-sense single-stranded RNA virus, discovered in 1995 as a member of the family Flaviviridae and is the human virus most closely linked to HCV. The viral load is subdivided into low (3.04–3.74 log<sub>10</sub> copies/mL) and high (6.2–6.6 log<sub>10</sub> copies/mL) viremia and is dependent on the different virus subtypes. We do not yet

know whether this subdivision has special effects on HIV infection [30].

All in all, we still have open questions about the immune control and treatment of PLWH. In this retrospective study we tried to determine whether TTV load can be used to draw conclusions about the immune function in PLWH. Is it correlated with immunodeficiency or with CD4<sup>+</sup> T-cell counts or the presence of clinically relevant diseases that indicate immunodeficiency?

We analyzed whether TTV load has the potential to answer these questions for the immune status in PLWH. As HPgV interferes with (more specifically, reduces) HIV replication, we investigated whether this has also an impact on the TTV load.

## METHODS

### Study Population

The analysis of TTV plasma load was performed using long-term stored blood samples of PLWH included in the RESINA cohort. The RESINA study is an ongoing prospective multicenter HIV study with the primary goal of continuous surveillance of transmitted HIV drug resistance in ART-naïve patients with HIV before initiation of combination ART since 2000 [31]. In total, 38 study centers (outpatient clinics and physicians' offices providing specialized HIV care) from North Rhine-Westphalia, the most populous federal state in Germany, and adjacent cities in Rhineland-Palatinate, a neighboring federal state, were contributing to the study, which currently includes 4815 patients. Inclusion criteria for the RESINA study were documented HIV infection, eligibility for combination ART, and the agreement between treating physician and patient to start treatment. Exclusion criteria were prior exposure to antiretroviral drugs or unwillingness to participate. All participants had given informed consent according to good clinical practice rules. Documented data on CD4<sup>+</sup> T-cell count and HIV plasma concentration were available for study analyses. All plasma samples collected within the RESINA cohort were stored long term at –80°C to ensure sufficient stability of the viral nucleic acids [31].

### Plasma Sample Selection and Classification

The samples for this analysis were selected retrospectively, according to the following inclusion criteria. They were derived from PLWH with documented defined CDC stage, according to the 1993 CDC classification of HIV disease. PLWH with AIDS-defining events were preferentially included. Samples were included only if complete documented data were available concerning patient age, sex, HIV load, CD4<sup>+</sup> T-cell count (CDC stage 1, 2, or 3) and clinical symptoms categorized by CDC stage (A, B, or C) before initiation of ART. Samples were selected from a total of 4815 initially therapy-naïve persons with HIV from the RESINA cohort, of whom 278 fulfilled the inclusion

criteria. Plasma samples for study investigations were available in 186 of those patients and were included in our analysis. We correlated CDC A, B, and C stages with TTV load and especially with the presence of AIDS-defining illnesses. We also analyzed TTV loads and corresponding CD4<sup>+</sup> T-cell counts. To investigate the possible influence of the presence of HPgV, we also analyzed the HPgV load if an adequate sample was available (enough sample material for both virus-specific polymerase chain reaction [PCR] tests).

#### TTV Quantification

The viral DNA was extracted from 700 µL of the sample a Roche MagnaPure 96 totalNA-kit, resulting in an elution volume of 100 µL according to the manufacturer's recommendations. The TTV DNA was quantified by means of real-time PCR (quantitative PCR). The TTV primers and probes for real-time PCR were provided by the Department of Virology, Medical University of Vienna, as described by Maggi et al [32]. Real-time PCR was performed using the VERSANT kPCR Molecular System (Siemens Healthcare Diagnostics), under the following conditions: 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 58°C for 60 seconds. Quantification was validated in a collaborative trial. HPgV quantification was performed as described by Horemheb-Rubio et al [30].

#### Statistical Analysis

The measured TTV DNA plasma levels spanned a wide range in the analyzed cohort. We analyzed the data with the statistical software R [33]. First, we used descriptive statistics to exhibit the distribution of the variables. We used linear regression, with CD4<sup>+</sup> T-cell count as the response and TTV load as the predictor (R function lm). We also included the confounders HIV load, sex and age as predictors in the linear model as well. Hence the linear regression is defined by

$$CD4 = \beta_0 + \beta_1 TTV + \beta_2 HIV + \beta_3 SEX + \beta_4 AGE + \epsilon$$

with an error term  $\epsilon$ .

Viral loads and cell counts were log-transformed with base 10. We used a likelihood ratio test (R software package lmtest [34]) to compare the model without TTV as a predictor to the model including TTV. To find the dependence between TTV and different CDC classification groups (CDC stages 1–3 or A–C) we used logistic regression with the same predictors as before plugged into the sigmoid function

$$P(x) = \frac{1}{1 + \exp[-(\beta_0 + \beta_1 TTV + \beta_2 HIV + \beta_3 SEX + \beta_4 AGE)]}$$

with the sample class probability  $P(x)$ . We also performed Wilcoxon rank sum and Kolmogorov-Smirnov cumulative distribution function tests, which test for the identity of 2 distributions by rank and cumulative distribution, respectively. For logistic regression we optimized the maximum a posteriori likelihood of

**Table 1. Patient Characteristics**

Characteristic	Patients, No. (%) <sup>a</sup>
Age, mean, y	42.7
Sex	
Male	165 (88.7)
Female	21 (11.3)
Viral load, mean, copies/mL	
HIV	302.04
TTV	1 310 349 789
CDC clinical stage	
A	59 (31.7)
B	45 (24.2)
C	82 (44.1)
1 (CD4 <sup>+</sup> T-cell count >500/µL)	14 (7.5)
2 (CD4 <sup>+</sup> T-cell count 200–499/µL)	77 (41.4)
3 (CD4 <sup>+</sup> T-cell count <200/µL)	95 (51.1)
CD4 <sup>+</sup> T-cell count, mean, cells/µL	217.72

Abbreviations: CDC, Centers for Disease Control and Prevention; HIV, human immunodeficiency virus; TTV, torque teno virus.  
<sup>a</sup>Data represent no. (%) of patients unless otherwise specified.

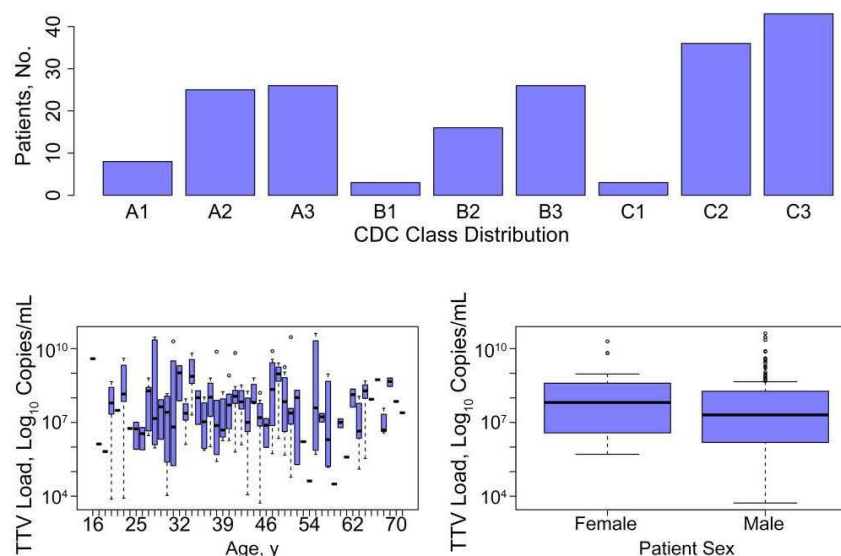
the 2 classes [35] with an implementation of the method from [36] (R function optim). The optimized model, a sigmoid function, estimates the class probabilities of TTV load. Cutoffs for immunosuppression classification based on TTV load were computed by fitting a linear regression with log<sub>10</sub> CD4<sup>+</sup> T-cell counts as the predictor for log<sub>10</sub> TTV load. For the linear function  $f(x) = y$ , we plugged in the cutoff values  $x = 200/\mu\text{L}$  and  $x = 500/\mu\text{L}$  for CD4<sup>+</sup> T-cell counts to obtain TTV load levels  $y$ .

## RESULTS

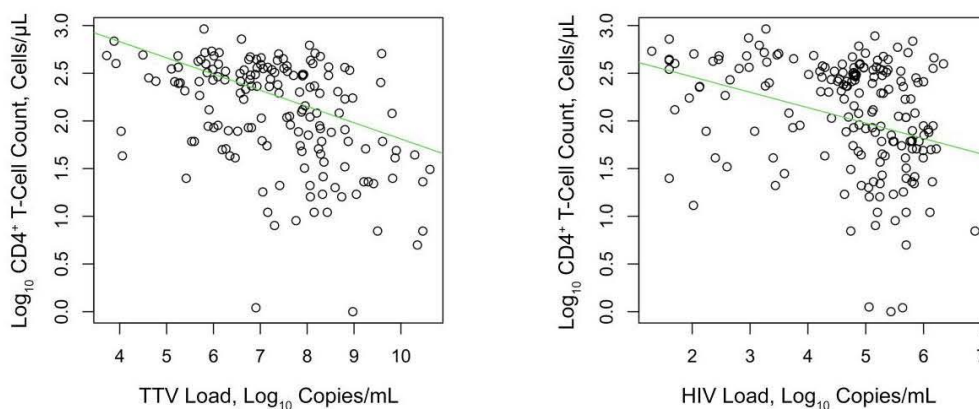
In total, 186 serum samples from 21 female and 165 male PLWH were examined. TTV was detected in 160 samples (ie, 86%). The mean HIV load (standard deviation) was 4.65 (1.24 log<sub>10</sub> copies/mL) and the mean TTV load was 7.33 (1.46) log<sub>10</sub> copies/mL. Most samples were from patients defined as CDC stage C (82 samples) or CDC stage 3 (95 samples), and the fewest from those defined as CDC stage 1 (14 samples). The mean patient age was 42.7 years (Table 1).

When the TTV load (in copies per milliliter) was presented in a logarithmic scale, it resembled a normal distribution in the group of untreated PLWH. Most samples were classified as CDC C3 (43 samples), and the fewest samples were classified as CDC B1 or C1 (3 samples each) (Figure 1, top). We could not observe any correlation between the age of the patient and the TTV load (Figure 1, bottom left). The TTV load was slightly higher in female than in male patients (Figure 1, bottom right).

Linear regression revealed that there was a significant ( $P < .001$ ) inverse linear relationship between TTV load and CD4<sup>+</sup> T-cell count, even after including HIV load ( $P < .001$ ), sex, and age (both  $P > .05$ ) in the model (Figure 2). A log-likelihood ratio test showed that the model excluding



**Figure 1.** Top, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) category distribution. Bottom, Torque teno virus (TTV) load distribution by age (left) and sex (right).

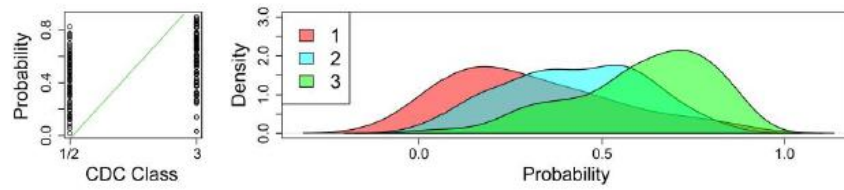


**Figure 2.** Plots showing the correlation between the log-transformed CD4<sup>+</sup> T-cell counts and torque teno virus (TTV; left) and human immunodeficiency virus (HIV; right) loads, with respective regression lines.

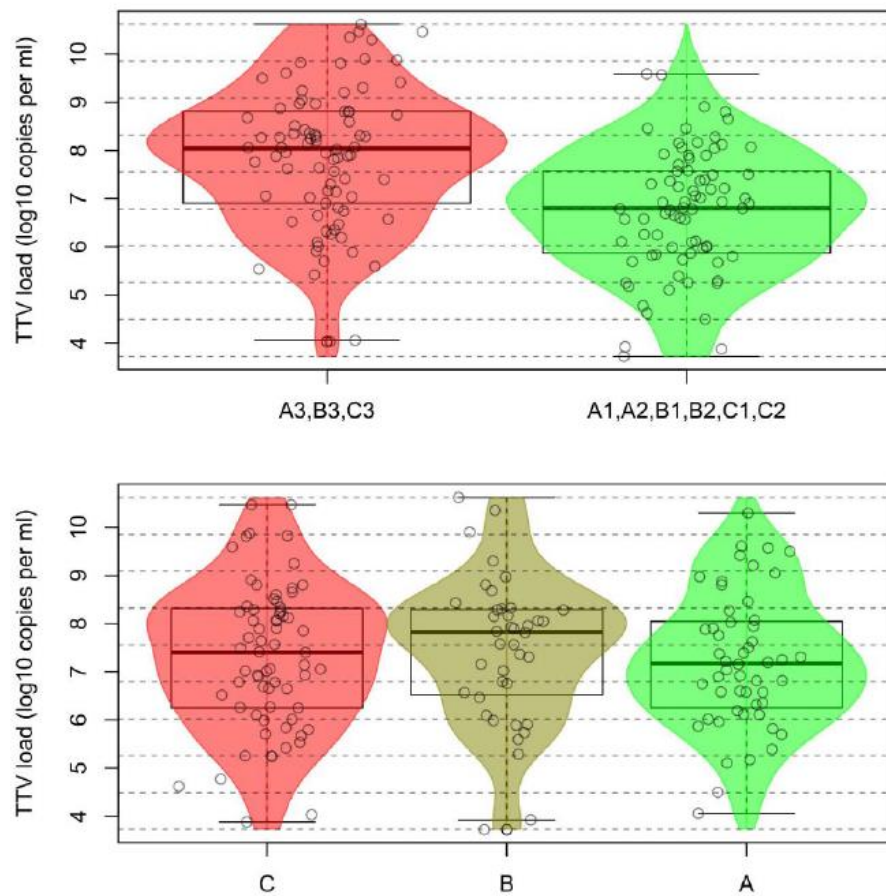
TTV load as a predictor is significantly less predictive ( $P < .001$ ). Logistic regression predicting CDC stage 3 confirmed TTV and HIV load as significant predictors ( $P < .001$  and  $P < .01$ , respectively). As a result, both TTV and HIV load exhibit a strong correlation with the probability of being CDC stage 3—that is, the higher the viral load, the higher the probability of being stage 3. Even though we joined CDC stages 1 and 2 into a single class for the logistic regression, both classes can be roughly distinguished by their probabilities (Figure 3). The probabilities for a sample of CDC class 1 (red) to be of

CDC class 3 are significantly lower than the probabilities for a sample of CDC class 2 (blue), which has a higher probability to be miss-classified as CDC class 3. However, while both regression models confirmed the relationship between CDC stage 3 (low CD4<sup>+</sup> T-cell count) and high TTV load (Figures 2 and 3), they have relatively poor  $R^2$  values [37] ( $< 0.3$ ). This could be due to missing confounders or to the data being too noisy (Figure 2).

In an additional analysis we directly compared the distributions of TTV among the different CDC classification groups. TTV loads are inversely related to CD4<sup>+</sup> T-cell counts, with



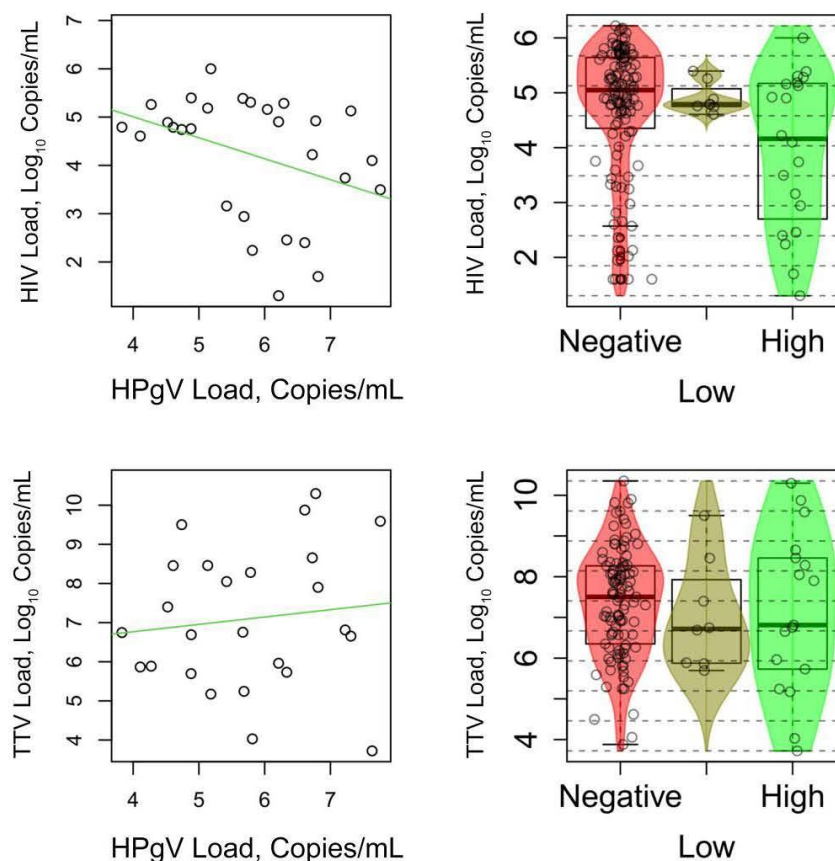
**Figure 3.** Probabilities assigned to Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classes via logistic regression, mapped to class (*left*) and the class-specific distribution of probabilities (*right*).



**Figure 4.** *Top*, Box plot comparing Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stages A3, B3, C3 (*left*) with stages A1, A2, B1, B2, C1, C2 (*right*) by torque teno virus (TTV) load. *Bottom*, Box plot comparing CDC clinical classification A–C by TTV load.

CDC stage 1 representing high CD4<sup>+</sup> T-cell counts (>500/ $\mu$ L) and CDC stage 3 representing low CD4<sup>+</sup> T-cell counts (<200/ $\mu$ L). CDC stages 1 and 2 are combined owing to the low sample size of CDC stage 1 (Figure 4, top). We used Wilcoxon rank sum and Kolmogorov-Smirnov tests to test

for differences in distributions. While the visual difference between stage 3 and stages 1 and 2 (Figure 4, top) is confirmed by the tests ( $P < .001$ ), there is no significant difference between CDC stages C, A, and B (Figure 4, bottom); TTV load is not correlated with the CDC clinical classification A–C.



**Figure 5.** *Top left*, Scatterplot comparing human pegivirus (HPgV) and human immunodeficiency virus (HIV) loads, with respective regression lines. *Top right*, Box plot comparing HIV load with HPgV load category (negative, low, or high). *Bottom left*, Scatterplot comparing HPgV and torque teno virus (TTV) loads, with respective regression lines. *Bottom right*, Box plot comparing TTV load with HPgV load category (negative, low, or high).

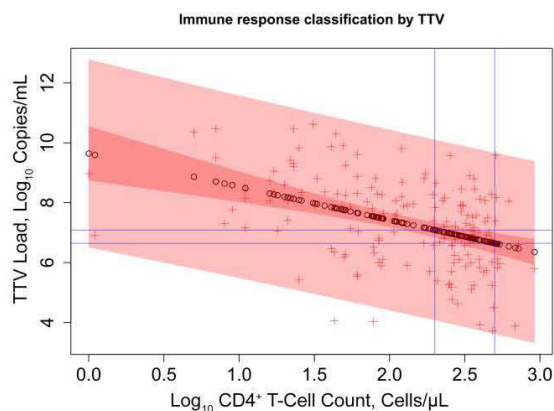
Even with our small sample size we could reproduce the negative linear correlation, including the confounders age and sex, of HPgV and HIV loads at a significant level ( $P < .06$ ; [Figure 5, top left](#)). A cumulative distribution function test showed significant ( $P < .03$ ) differences in HIV load between the 2 groups of high and low (including negative samples) HPgV load ([Figure 5, top right](#)), while a rank sum test did not ( $P = .15$ ). However, no such relationships can be observed for HPgV and TTV load ([Figure 5, bottom](#)), with  $P$  values of .92, .47, and .62, respectively. We visualized the negative linear correlation of HPgV and HIV load ([top left](#)). This relationship is still captured in the discretized (negative, low, high) HPgV load ([Figure 5, top right](#)). No significant correlation between TTV and HPgV load is observable, neither in the continuous ([Figure 5, bottom left](#)) nor in the discrete (negative, low, high) ([Figure 5, bottom right](#)) case.

In our final analysis we optimized TTV load cutoffs. We related TTV load levels to  $CD4^+$  T-cell counts via regression. Our

result suggests a much stronger correlation than detected by Schmidt et al [21] ( $R^2$  value, 0.028 vs 0.181, respectively;  $P$  value, .003 vs  $<.001$ ). Based on this result, we computed the rounded-down cutoffs for TTV load matching  $CD4^+$  T-cell counts of 200/ $\mu$ L and 500/ $\mu$ L, respectively. We propose to classify a TTV load of  $<4$  million copies/mL ( $\cong 6.64 \log_{10}$  copies/mL) as not immunosuppressed (CDC stage 1),  $\geq 4$  million and  $\leq 12$  million copies/mL ( $\cong 7.09 \log_{10}$  copies/mL to base 10) as immunosuppressed (CDC stage 2), and  $>12$  million copies/mL as highly immunosuppressed (CDC stage 3). However, high noise still leads to large uncertainty of the prediction ([Figure 6, light red](#)). The underlying model itself shows a much higher confidence level.

## DISCUSSION

Although we have much knowledge about HIV infection, its comorbid conditions, and its control and treatment, we are still



**Figure 6.** Regression of torque teno virus (TTV) load to CD4<sup>+</sup> T-cell count. Fitted TTV loads are depicted by black circles, raw TTV loads by crosses and 95% confidence intervals by bands. Model uncertainty is low (*darker*), while prediction uncertainty is high (*lighter*). Horizontal and vertical lines represent the cutoffs corresponding to Centers for Disease Control and Prevention categories 1–3.

limited in describing the disease status in some individuals. TTV has shown its potential as a marker in immunocompromised patients in several ways. We tried to infer TTV load levels as a proxy for the clinical stages of HIV to enable an individualized therapy adjustment at an early stage, if necessary, and to ascertain whether TTV load can provide additional information on the immune status of HIV-infected patients.

In contrast to the early years, today all PLWH are offered ART, as the treatment is usually well tolerated and is successful for inhibiting HIV replication. TTV load could be presented here as a surrogate marker of immunodeficiency. We see 2 remaining questions for the diagnostic use of TTV determination. The first is based on the observation that it is unclear why some patients' CD4<sup>+</sup> T-cell counts recovers quickly while others need more time to recover. Our study forms the basis for an investigation of TTV as predictive marker for the immunological success of ART. In the current study we determined baseline values for TTV. We also want to provide the baseline before the start of therapy and determine in later studies whether the change in CD4<sup>+</sup> T-cell counts is predicted by the baseline TTV load and whether the change in TTV load is more rapid than the increase in CD4<sup>+</sup> T-cell count. The rationale for our investigation is that further questions cannot be addressed without a valid investigation of the baseline situation as provided in this article.

In our cohort we could reproduce previous observations that high HIV load is correlated with low CD4<sup>+</sup> T-cell count and, in addition, that HPgV interferes with HIV replication. These 2 results indicate that our cohort is comparable with other HIV cohorts in Germany and other Western countries.

We were able to reproduce an inverse correlation between the TTV load and the CD4<sup>+</sup> T-cell count, as observed before [7, 21, 38]. High TTV load is associated with low CD4<sup>+</sup> T-cell count (CDC stage 3 vs stages 1 and 2) and vice versa. This indicates that TTV is also a marker of immunocompetence in PLWH. In contrast to CDC stages 1, 2 and 3, which are based on the CD4<sup>+</sup> T-cell count, the CDC A–C classification refers to the occurrence of AIDS-defining diseases in persons with HIV. CDC stage C is more likely to occur with a low CD4<sup>+</sup> T-cell count but is also dependent on two additional events—namely, presence of the pathogen and loss of the pathogen-recognizing CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulation. Our analysis of CDC classes A–C in relation to TTV did not show any significant correlation.

In our study, 86% of the patients' plasma samples showed evidence of active TTV replication. The fact that CD4<sup>+</sup> T-cell count exhibits a significant inverse correlation with TTV load indicates that TTV can be used as a marker of the immune function in HIV-infected patients. The mean viral load of TTV in this cohort (standard deviation) was  $1.3 \times 10^9$  ( $5.2 \times 10^9$ ) copies/mL and is comparable to that of other high-risk cohorts [9, 10, 18]. No classification of the TTV load distribution comparable to the CDC classification of the cell count has yet been made, which could characterize a stage of immune deficiency. In the current work, we show that TTV loads have a high correlation with CDC stages 1–3 and could help categorize PLWH, if CD4<sup>+</sup> T-cell counts are not available or the results are not consistent with the clinical situation.

A possible limitation of this retrospective analysis is the imbalance of the sample distribution regarding the CDC classification groups. Although the sample size was sufficient to ensure statistical power, the distribution between the different CDC stages—1–3 and A–C—was unbalanced. CDC stage 1 is significantly underrepresented over all CDC classes A–C.

Other parameters possibly influencing the CD4<sup>+</sup> T-cell count or HIV and TTV load include the CD8<sup>+</sup> T-cell count, the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, and coinfections. Unfortunately, the documentation by the participating centers regarding these parameters was frequently incomplete. Thus, the parameters could not be analyzed systematically in our analysis.

So far, not many studies have analyzed the TTV burden among HIV patients with or without AIDS [7]. One previous study has indicated TTV as a potential marker for the different immune status between PLWH and PLWH with AIDS-defining illnesses. Thom and Petrik [7] analyzed bone marrow and spleen samples from PLWH, obtained after death. The PLWH with AIDS-defining illnesses had a significantly higher TTV load than other PLWH. There may be several reasons why we could not reproduce this result. On the one hand, the cohort of Thom and Petrik [7] was smaller than ours (36 patients in total), and on the other hand we used different materials (plasma vs bone marrow cells and spleen cells). Furthermore,

we do not have full information on the comorbid conditions of the patients in the other study.

An additional limitation is the lack of longitudinal data. In this study we focused on a single time point, but we do know that a high TTV level before treatment of HIV infection is prognostically unfavorable for CD4<sup>+</sup> T-cell recovery [21, 39]. Thus, it would be of value for a future study to analyze longitudinal data. A combination of CD4<sup>+</sup> T-cell count and TTV load analysis could provide additional information on the immune recovery of HIV-infected patients [21]. Therefore, it would be interesting to have follow-up samples from the study participants to compare their TTV loads and the clinical course of the disease.

In summary, CD4<sup>+</sup> T-cell count is an established immune marker, but these counts can vary over a wide range and their decline count occurs slowly compared with the rapid changes in HIV load in response to interventions such as ART. TTV has shown its value as an immune marker in other settings, as in recipients of kidney, lung, or bone marrow stem cell transplants. TTV load provides an additional value to HIV load and CD4<sup>+</sup> T-cell count and can give important insight into the immunocompetence of PLWH. The current study complements the previous longitudinal study of Schmidt et al [21], which showed that patients with a high TTV load have a worse CD4<sup>+</sup> T-cell recovery than those with a low TTV load. However, a relationship to CDC classes A–C could not be established in this analysis. The role of TTV as a biomarker for immunocompetence in PLWH should be investigated in further studies.

#### Notes

**Author contributions.** P. L. E., B. E. O. J., S. E., N. L., V. D. C., and R. K. conceptualized the study. E. H., M. B., G. F., M. O., J. K. R., and C. B. managed data curation and access. G. H. R. Q., B. L., M. B., and M. P. processed the data. P. L. E., B. L., and M. P. conducted the statistical analysis. P. L. E., G. H. R. Q., T. L., F. K., R. K., and M. P. interpreted the results. P. L. E., S. E., T. L., R. K., and M. P. wrote the initial draft of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Data availability.** Data are available on request to the corresponding author.

**Financial support.** This work was supported by DZIF (German Center for Infection Research) TTU (Thematical Translational Unit) HIV Immunecontrol and EuResist. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the publication means of the Institute of Virology, University Hospital Cologne.

**Potential conflicts of interest.** B. E. O. J. has received consulting fees from Gilead, ViiV Healthcare (ViiV) and Merck Sharpe and Dohme (MSD). B. E. O. J. has received payment or honoraria for lectures and presentations from Gilead, ViiV and GSK. B. E. O. J. has received support for meetings and travel from Gilead. B. E. O. J. is scientific secretary of the German

AIDS Society (unpaid). S. E. has received grants or contracts, support for meetings or travel, and payments or honoraria for lectures or presentations from Gilead, ViiV, MSD and Janssen. S. E. participated on a data safety monitoring board or advisory board for Gilead, ViiV, MSD, Janssen and GSK. S. E. is in a leadership or fiduciary role for the German AIDS Society and the National AIDS Commission NRW. S. E. received equipment, materials, drugs, medical writing, gifts or other services from Gilead and GSK. N. L. received consulting fees from ViiV. N. L. received honoraria for lectures from ViiV and MSD. N. L. received support for travel from the Deutsche AIDS Gesellschaft. J. K. R. received consulting fees from Behringer. J. K. R. received payment for lectures or presentations from Gilead, MSD and ViiV. J. K. R. was paid for the participation on a data safety monitoring board or advisory board for Abivax. J. K. R. is EACS (European AIDS Clinical Society) board member. C. B. received grants or contracts from DZIF (German Center for Infection Research) and DFG (German Research Foundation). C. B. received consulting fees, payment for lectures and presentations, and support for meetings or travel from Abbvie, MSD, Janssen, Gilead and ViiV. C. B. is governing board member of EACS. R. K. received grants from DZIF. R. K. received payment for presentations or lectures from Janssen, Roche, Hologic, Abbvie, Abbott, MSD, ViiV, Gilead and Pfizer. R. K. participated on a data safety monitoring board or advisory board for ViiV, Gilead, Pfizer, MSD and Janssen. All other authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

#### References

1. Trickey A, Sabin CA, Burkholder G, et al. 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* 2023; 10:e295–307.
2. Aiuti F, Mezzaroma I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev* 2006; 8:88–97.
3. Kamps BS, Brodt HR, Staszewski S, Bergmann L, Helm EB. AIDS-free survival and overall survival in HIV infection: the new CDC classification system (1993) for HIV disease and AIDS. *Clin Investig* 1994; 72:283–7.
4. Liu K, Li Y, Xu R, et al. HIV-1 Infection alters the viral composition of plasma in men who have sex with men. *mSphere* 2021; 6:e00081–21.
5. Varsani A, Kraberger S, Opriessnig T, et al. Anelloviridae taxonomy update 2023. *Arch Virol* 2023; 168:277.
6. Hsiao KL, Wang LY, Cheng JC, Cheng YJ, Lin CL, Liu HF. Detection and genetic characterization of the novel torque

- teno virus group 6 in Taiwanese general population. *R Soc Open Sci* **2021**; 8:210938.
7. Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased torque teno virus and torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol* **2007**; 79:1–7.
  8. van Rijn AL, Roos R, Dekker FW, Rotmans JI, Feltkamp M. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation—a systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* **2023**; 33:e2393.
  9. Taher NM, Hussein MR, Kadhim HS. The predicting role of torque teno virus infection after renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **2021**; 32:1054–64.
  10. Herrmann A, Sandmann L, Adams O, et al. Role of BK polyomavirus (BKV) and torque teno virus (TTV) in liver transplant recipients with renal impairment. *J Med Microbiol* **2018**; 67:1496–508.
  11. Doberer K, Haupenthal F, Nackenhorst M, et al. Torque teno virus load is associated with subclinical alloreactivity in kidney transplant recipients: a prospective observational trial. *Transplantation* **2021**; 105:2112–8.
  12. Frye BC, Bierbaum S, Falcone V, et al. Kinetics of torque teno virus-DNA plasma load predict rejection in lung transplant recipients. *Transplantation* **2019**; 103:815–22.
  13. Ruiz P, Martínez-Picola M, Santana M, et al. Torque teno virus is associated with the state of immune suppression early after liver transplantation. *Liver Transpl* **2019**; 25:302–10.
  14. Forqué L, Albert E, Piñana JL, et al. Monitoring of plasma torque teno virus, total Anelloviridae and human pegivirus 1 viral load for the prediction of infectious events and acute graft versus host disease in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting. *J Med Virol* **2023**; 95:e29107.
  15. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Early kinetics of torque teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis* **2020**; 22:e13240.
  16. Gilles R, Herling M, Holtick U, et al. Dynamics of torque teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* **2017**; 206:355–62.
  17. Querido S, Adragão T, Pinto I, et al. Torquetenovirus viral load is associated with anti-spike antibody response in SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccinated kidney transplant patients. *Clin Transplant* **2022**; 36:e14825.
  18. Solis M, Gallais F, Garnier-Kepka S, et al. Combining predictive markers for severe COVID-19: Torquetenovirus DNA load and SARS-CoV-2 RNAemia. *J Clin Virol* **2022**; 148:105120.
  19. Szládek G, Juhász A, Kardos G, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol* **2005**; 58:402–5.
  20. Lapa D, Del Porto P, Minosse C, et al. Clinical relevance of torque teno virus (TTV) in HIV/HCV coinfecting and HCV mono-infected patients treated with direct-acting antiviral therapy. *J Clin Med Res* **2021**; 10:2092.
  21. Schmidt L, Jensen BEO, Walker A, et al. Torque teno virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients. *Infection* **2021**; 49:501–9.
  22. Siahpoush M, Noorbazargan H, Kalantari S, Shayestehpour M, Yazdani S. Coinfection of torque teno virus (TTV) and human papillomavirus (HPV) in cervical samples of women living in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol* **2022**; 14:181–5.
  23. Figueiredo CP, Franz-Vasconcelos HCF, di Giunta G, et al. Detection of torque teno virus in Epstein-Barr virus positive and negative lymph nodes of patients with Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* **2007**; 48:731–5.
  24. Spezia PG, Focosi D, Baj A, et al. TTV and other anelloviruses: the astonishingly wide spread of a viral infection. *Asp Mol Med*. **2023**; 1:100006.
  25. Reshetnyak VI, Maev IV, Burmistrov AI, Chekmazov IA, Karlovich TI. Torque teno virus in liver diseases: on the way towards unity of view. *World J Gastroenterol* **2020**; 26:1691–707.
  26. Xiao H, Luo K, Yang S, Wang Y, Liang W. Tissue tropism of the TTV in experimentally infected rhesus monkeys. *Chin Med J (Engl)* **2002**; 115:1088–90.
  27. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* **2001**; 15:563–70.
  28. Björkman P, Flamholz L, Molnégren V, Marshall A, Güner N, Widell A. Enhanced and resumed GB virus C replication in HIV-1-infected individuals receiving HAART. *AIDS* **2007**; 21:1641–3.
  29. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* **2001**; 345:715–24.
  30. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, et al. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One* **2017**; 12:e0184494.
  31. Reuter S, Oette M, Kaiser R, et al. Risk factors associated with older age in treatment-naive HIV-positive patients. *Intervirology* **2012**; 55:147–53.
  32. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* **2003**; 77:2418–25.
  33. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **2022**.
  34. Zeileis A, Hothorn T. Diagnostic checking in regression relationships. *R News*; **2012**. <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>. Accessed October 2022.

35. Platt J. Probabilistic outputs for support vector machines and comparisons to regularized likelihood methods. In: Smola A, Bartlett P, Schölkopf B, Schuurmans D, eds. *Advances in large margin classifiers*. Vol 10. Cambridge: MIT Press, 1999.
36. Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. *Computer J* 1965; 7:308–13.
37. Mittlböck M, Schemper M. Explained variation for logistic regression. *Stat Med* 1996; 15:1987–97.
38. Forqué L, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of torqueno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: may it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol* 2022; 148:105082.
39. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2002; 3:287–95.

## 4. Diskussion

Obwohl wir bereits viel über die HIV-Infektion, ihre Begleiterkrankungen, ihre Kontrolle und Behandlung wissen, können wir den Krankheitsverlauf bei einigen PLWH nur begrenzt einschätzen. Warum bleiben manche Patienten dauerhaft im CDC- Stadium A3? Ein Stadium, in dem die Helferzahl deutlich reduziert ist und dennoch werden keine opportunistischen Infektionen entwickelt, woran liegt das? Können wir mit den bereits etablierten Immunmarkern tatsächlich einen Teil der Immunfunktion bei PLWH nicht hinreichend abdecken? Und warum entwickeln Patienten mit vielen Helferzellen (CDC Stadium C1) dennoch AIDS definierende Erkrankungen?

TTV hat sein Potenzial als Marker bei immungeschwächten Patienten auf verschiedene Weise gezeigt (31, 60). Deshalb untersuchten wir, ob TTV mit der Klinik, bzw. mit den CDC Stadien A-C von PLWH korreliert und darüber ggf. einen zusätzlichen diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Nutzen zu den bereits vorhandenen Surrogatmarkern hat.

Heute wird allen PLWH möglichst zeitnah nach Diagnosestellung eine ART angeboten, da die Behandlung in der Regel gut verträglich ist und die HIV-Replikation erfolgreich gehemmt wird (19). Auch hier gibt es bis heute offene Fragen, warum erholt sich die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl nach Einleitung der ART bei einigen PLWH rasch, während andere mehr Zeit in der Immunrekonstruktion brauchen (59)? Die TTV-Last könnte hier als zusätzlicher Surrogatmarker zur Darstellung der vorliegenden Immunschwäche genutzt werden und ggf. neue Erkenntnisse über die Immunrekonstruktion nach Einleitung der ART geben.

Diese Studie bildet die Grundlage für eine Untersuchung von TTV als prädiktivem Marker für das immunologische Ansprechen nach Einleitung der ART. Es wurden die Ausgangswerte für TTV vor ART bestimmt. In dieser Untersuchung konnte eine Korrelation zwischen hohen HIV-Lasten und einer niedrigen CD4<sup>+</sup>-Zellzahl erneut gezeigt werden, wie es inzwischen allgemein bekannt ist (60). Wir sahen keine Unterschiede der TTV-Last bei Alter und Geschlecht, obwohl die HIV-Last nachweislich mit dem Alter korreliert (61 – 63). Es konnte erneut gezeigt, dass eine hohe HIV-Last mit dem CDC-Stadium 3 korreliert (64), was die Validität unserer Untersuchungen bestätigt.

Im Gegensatz zu den CDC-Stadien 1, 2 und 3, die auf der Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen basieren, bezieht sich die CDC-Klassifizierung A bis C auf das Auftreten von HIV-assoziierten und AIDS-definierenden Krankheiten bei PLWH. Eine Assoziation mit den klinischen Stadien CDC A, B und C konnte in unserer Untersuchung nicht signifikant gefunden werden.

#### **4.1. TTV-Last korreliert mit der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl**

Wir wiesen bei 86 % der Plasmaproben der Patienten eine aktive TTV-Replikation nach. Auch in unserer Studie zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der TTV-Last und der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl, wie sie bereits früher beobachtet wurde (65). Dies zeigt die Validität unserer Daten. Eine hohe TTV-Last geht mit einer niedrigen CD4<sup>+</sup>-Zellzahl einher (CDC-Stadium 3 gegenüber den Stadien 1 und 2) und umgekehrt. Die Tatsache, dass die Höhe der CD4<sup>+</sup>-Zellen eine signifikante inverse Korrelation mit der TTV-Last aufweist, deutet darauf hin, dass TTV als Marker für die Immunfunktion bei PLWH verwendet werden kann (65, 66).

##### **4.1.1. TTV-Last korreliert mit der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl**

Wir wiesen bei 86 % der Plasmaproben der Patienten eine aktive TTV-Replikation nach. Auch in unserer Studie zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der TTV-Last und der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl, wie sie bereits früher beobachtet wurde (65). Dies zeigt die Validität unserer Daten. Eine hohe TTV-Last geht mit einer niedrigen CD4<sup>+</sup>-Zellzahl einher (CDC-Stadium 3 gegenüber den Stadien 1 und 2) und umgekehrt. Die Tatsache, dass die Höhe der CD4<sup>+</sup>-Zellen eine signifikante inverse Korrelation mit der TTV-Last aufweist, deutet darauf hin, dass TTV als Marker für die Immunfunktion bei PLWH verwendet werden kann (65, 66).

#### **4.2. TTV und klinische HIV-Stadien CDC A bis C**

Eine Korrelation der CDC-Stadien A bis C mit der TTV-Last wurde ebenfalls geprüft. Die Hypothese dabei war, dass die TTV-Last mit AIDS-definierenden Erkrankungen korreliert. Dann wären AIDS-definierende Erkrankungen unabhängig von der Höhe der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl durch die TTV-Last vorhersagbar. Es besteht jedoch keine direkte Korrelation zwischen AIDS und TTV. Wir folgern aus dieser Beobachtung, dass die Zerstörung der CD4<sup>+</sup>-Zellen im Laufe der fortschreitenden Erkrankung ein zufallsbedingter Prozess ist und die Immunreaktionen dadurch ebenfalls zufällig verloren gehen. Hinzu kommt ein weiterer Zufallsprozess: der Kontakt mit dem AIDS-definierenden Erreger. Die Infektion mit diesen Erregern und der gleichzeitige Verlust der korrespondierenden Kontrolle führen dann zu AIDS-definierenden Ereignissen. Dies erklärt, warum bei hohen Helferzellzahlen bestimmte Immunreaktionen ausgelöscht wurden und eine AIDS-definierende Erkrankung früh auftritt – ebenso wie der umgekehrte Fall, bei dem trotz niedriger Helferzellen keine AIDS-definierende Erkrankung auftritt, weil die entsprechend konditionierten Helferzellen noch vorhanden sind, um die Infektion zu kontrollieren. Unser Ergebnis ist damit ein Indiz für einen zufälligen Prozess des Auftretens von AIDS-definierenden Erkrankungen, bei dem das Auftreten jedoch umso wahrscheinlicher wird, je geringer die Helferzellzahl ist.



und Petrik, die fehlenden Angaben zu Komorbiditäten und genauen AIDS-definierenden Erkrankungen führen zu einer weiteren Unschärfe.

Damit ist unsere Arbeit die erste größere Untersuchung zur TTV-Last im Blut in PLWH mit und ohne AIDS.

### **4.3. Limitationen**

Zu den weiteren Parametern, die möglicherweise die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl sowie die HIV- und TTV-Last beeinflussen, gehören die CD8<sup>+</sup>-Zellzahl, die CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio und Koinfektionen. Leider war die Dokumentation der teilnehmenden Zentren zu diesen Parametern häufig unvollständig. Daher konnten diese in unserer Analyse nicht systematisch ausgewertet werden. Diesen Einfluss in kommenden Studien genauer zu betrachten, wäre sinnvoll, denn es konnte der Einfluss von TTV auf die CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen Zellen mehrfach gezeigt werden. Es scheint so, als sei TTV in der akuten HIV-Infektion (AHI) durch das Immunsystem kontrolliert und erst nach einer gewissen Erschöpfungszeit der CD8<sup>+</sup>-Zellen in seiner Replikationsrate zunehmend, da bei den chronisch infizierten PLWH sich eine höhere TTV-Last als bei den akuten Infizierten zeigte (47).

Eine TTV-Infektion scheint zu einer hochgradig erschöpften TTV-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort zu führen, die durch eine verringerte IFN- $\gamma$ -Produktion und die Expression des hemmenden NKG2A-Rezeptors gekennzeichnet ist (27). Diesen Aspekt anhand unserer Kohorte näher zu betrachten und den Einfluss von TTV auf die CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Ratio zu untersuchen, wäre mit Sicherheit aufschlussreich gewesen.

Außerdem fehlen longitudinale Daten. Es wäre Inhalt zukünftiger Analysen, zu weiteren Zeitpunkten den Verlauf der TTV-Last-Entwicklung sowie die CD4<sup>+</sup>-Zell-Erholung engmaschig zu beobachten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe TTV-Last vor Beginn der ART ein negativer Prädiktor für die Immunrestitution unter ART ist (49, 50).

Eine weitere Limitation ist die unausgewogene Verteilung der Stichprobe hinsichtlich der CDC-Stadien. Obwohl die Stichprobengröße ausreichend war, um die statistische Aussagekraft zu gewährleisten, war die Verteilung zwischen den verschiedenen CDC-Stadien – 1–3 und A–C – unausgewogen. CDC-Stadium 1 ist gegenüber allen CDC-Klassen A–C deutlich unterrepräsentiert. Gerade da das Stadium C1 ein immunologisch äußerst Interessantes ist und TTV hier durchaus Potenzial hätte mehr Aussagekraft zu bieten, als es die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl offensichtlich in dieser Gruppe kann, wäre es schön gewesen eine größere Anzahl dieser

Gruppe zu haben. Die Menge spiegelt jedoch den klinischen Alltag, in welchem das Stadium C1 ein seltenes ist, wieder.

Letztlich ist auch die Testmethode der Viruslastmessung aus dem Serum über PCR eine etablierte und leicht verfügbare Methode, aber einige Studien zeigen auch eine valide Genamplifikationsanalyse über den Speichel, dies würde das Monitoring noch einfacher und zugänglicher gestalten (67).

Vielleicht könnte TTV mit einer ausgewogenen Verteilung der Stichproben in einer prospektiven, longitudinalen Studie den klinischen Zustand laborchemisch besser und schneller abbilden als die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl.

#### **4.4. Einteilung der TTV-Last**

Bisher unklar ist die Einteilung der Höhe der TTV-Last in Bezug auf den Immunstatus. In allen bisherigen Studien wird von hohen und niedrigen Lasten gesprochen, ohne dass es eine klare, einheitliche Einteilung gibt. Die mittlere TTV-Last in dieser Kohorte betrug TTV-DNA  $1,3 \times 10^9$  Kopien/ml (Standardabweichung  $\pm 5,2 \times 10^9$  Kopien/ml) und ist vergleichbar mit der in anderen Hochrisikokohorten (49, 67, 68).

In dieser Studie schlagen wir erstmals eine mögliche Einteilung vor, die den Status der Immunsuppression anhand der Höhe der TTV-Last darstellt:

- TTV-DNA < 4 Mio. Kopien/ml: nicht immunsupprimiert
- TTV-DNA  $\geq 4$ –12 Mio. Kopien/ml: immunsupprimiert
- TTV-DNA > 12 Mio. Kopien/ml: schwere Immunsuppression

Zur besseren Einordnung und Einschätzung einer möglichen Immunsuppression ist auch im klinischen Alltag im Rahmen anderer Immunmarker, vor allem durch Referenzwerte wie die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl, die Viruslast, aber auch Zielspiegel bestimmter Medikamente, eine Beurteilung und Einschätzung möglich. Es liegt daher nahe, dass auch für die TTV-Last eine Einteilung zur Bestimmung des Schweregrads der Kompromittierung der Immunfunktion sinnvoll ist. Deshalb machen wir – auf Grundlage unserer erhobenen Daten im Vergleich zu ähnlichen mittleren TTV-Lasten – den oben genannten Vorschlag. Dieser Vorschlag sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

#### **4.5. Ausblick auf weitere Studien**

Wir haben den Ausgangswert der TTV-Last vor Beginn der Therapie ermittelt. So können spätere Studien feststellen, ob die Veränderung der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl durch die TTV-

Ausgangslast vorhergesagt wird und ob die Veränderung der TTV-Last schneller erfolgt als der Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl. Mithilfe größerer Probandengruppen, die prospektiv und longitudinal getestet werden, könnten in Zukunft Verläufe einzelner PLWH, die bisher durch Surrogatmarker nicht ausreichend überwacht werden konnten, mittels TTV-Last aussagekräftiger und individueller eingeschätzt werden.

Prophylaxen wie die CMV- oder PjP-Prophylaxe, die in der HIV-Medizin bislang bei einer CD4<sup>+</sup>-Zellzahl von < 200 Zellen/µl eingesetzt werden, könnten gegebenenfalls anhand der TTV-Last früher abgesetzt oder gar nicht erst begonnen werden (69, 70).

Die hier erarbeitete Datenbasis liefert die Grundlage für die Untersuchung von PLWH nach Einleitung einer ART. Weitere mögliche Fragestellungen sind:

- Wie verläuft die Dynamik der TTV-Last im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen unter ART?
- Haben Patienten mit hoher TTV-Last eine schlechtere Erholung der CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen?
- Haben Patienten mit CD4<sup>+</sup>-Zellen < 350 Zellen/µl bei einer HIV-Last unterhalb der Nachweisgrenze (HIV-RNA < 50 Kopien/ml) nach ART-Einleitung eine vergleichbare TTV-Last wie Patienten mit einer guten bzw. schnellen Erholung der CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen?
- Zeigen Patienten mit einer Low-Level-Virämie bzw. nicht unterdrückter HIV-Last höhere TTV-Lasten?

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Höhe der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl ein etablierter Immunmarker ist, der jedoch in einem weiten Bereich schwanken kann und dessen Erholung im Vergleich zu den raschen Veränderungen der HIV-Last als Reaktion auf Maßnahmen wie ART langsam erfolgt.

Auch kann die CD4<sup>+</sup>-Zellzahl nicht immer den funktionellen immunologischen Status ausreichend widerspiegeln und gibt keinen Aufschluss über spezifische Immunantworten gegen einzelne Erreger.

TTV hat sich auch in anderen Untersuchungen als Immunmarker bewährt, zum Beispiel bei Empfängern von Nieren-, Leber-, Lungen- oder Stammzelltransplantationen.

Die TTV-Last ist ein zusätzlicher Wert zur HIV-Last und zur CD4<sup>+</sup>-Zellzahl und kann in Zukunft wichtige Erkenntnisse über die Immunfunktion von PLWH liefern.

Die aktuelle Studie ergänzt die frühere Längsschnittstudie von Schmidt et al. (42), die zeigte, dass Patienten mit einer hohen TTV-Last eine schlechtere Erholung der CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen aufweisen als Patienten mit einer niedrigen TTV-Last. Eine Beziehung zu den klinischen CDC-Klassen A bis C konnte in dieser Analyse nicht gezeigt werden. Die Rolle von TTV als Biomarker für die Immunfunktion bei PLWH sollte in weiteren Studien untersucht werden und könnte durchaus relevant sein.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoï B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 2010; 46: 5–14.
2. Johnson LF, May MT, Danel C, et al. 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* 2023; 10: e313–23.
3. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872–7.
4. Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med* 2002; 22: 611–35.
5. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus infection. *Ann Intern Med* 1989; 111: 223–31.
6. Blattner W, Gallo RC, Temin HM. HIV causes AIDS. *Science* 1988; 241: 515–6.
7. Piazza P, Fan Z, Rinaldo CR Jr. CD8+ T-cell immunity to HIV infection. *Clin Lab Med* 2002; 22: 773–97.
8. So-Armah K, Benjamin LA, Bloomfield GS, et al. HIV and cardiovascular disease. *Lancet HIV* 2020; 7: e279–93.
9. Alvi RM, Zanni MV, Lo J, et al. HIV infection and incidence of cardiovascular diseases. *J Am Heart Assoc* 2019; 8: e012241.
10. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868–71.
11. Jaffe HW, Choi K, Thomas PA, et al. National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. *Ann Intern Med* 1983; 99: 145–51.

12. Lee ASD, Cody SL. The stigma of sexually transmitted infections. *Nurs Clin North Am* 2020; 55: 295–305.
13. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. *N Engl J Med* 1987; 317: 185–91.
14. Bechtel-Boenning C. Antiviral treatment of HIV infection. *Nurs Clin North Am* 1996; 31: 1–13.
15. King SR. HIV: virology and mechanisms of disease. *Ann Emerg Med* 1994; 24: 443–9.
16. Kaplan MH. Pathogenesis of HIV. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8: 279–88.
17. Phillips AN, Lee CA, Elford J, et al. Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. *Lancet* 1991; 337: 389–92.
18. Flexner C, Owen A, Siccardi M, Swindells S. Long-acting drugs and formulations for the treatment and prevention of HIV infection. *Int J Antimicrob Agents* 2021; 57: 106220.
19. Wen Y, Bar KJ, Li JZ. Lessons learned from HIV antiretroviral treatment interruption trials. *Curr Opin HIV AIDS* 2018; 13: 416–21.
20. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004; 104: 942–7.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41: 1–19.
22. Kamps BS, Brodt HR, Staszewski S, Bergmann L, Helm EB. AIDS-free survival and overall survival in HIV infection: the new CDC classification system (1993) for HIV disease and AIDS. *Clin Investig* 1994; 72: 283–7.
23. Selik RM, Mokotoff ED, Branson BM, Owen M, Whitmore S, Hall HI. Revised surveillance case definition for HIV infection—United States, 2014. *MMWR Recomm Rep* 2014; 63: 1–10.

24. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92–7.
25. Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 2002; 12: 151–8.
26. Biagini P. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 331: 21–33.
27. Krebs K, Bacher P, Schlickeiser S, et al. Torque teno viruses exhaust and imprint the human immune system towards a NKG2A+ CD8+ T-cell phenotype. *Front Immunol* 2024; 15: 1447980.
28. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, et al. TT virus loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* 2001; 64: 190–4.
29. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 589–93.
30. Manzin A, Mallus F, Macera L, Maggi F, Blois S. Global impact of Torque teno virus infection in wild and domesticated animals. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9: 562–70.
31. Gore EJ, Gard L, Niesters HGM, Van Leer Buter CC. Understanding torquetenovirus as an immune marker. *Front Med (Lausanne)* 2023; 10: 1168400.
32. Kuczaj A, Przybyłowski P, Hrapkiewicz T. Torque Teno Virus as a potential marker of immunocompetence in solid organ recipients. *Viruses* 2023; 16: 17.
33. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The value of Torque Teno Virus as a marker for the degree of immunosuppression in adult patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; 26: 643–50.
34. Albert E, Solano C, Pascual T, et al. Dynamics of Torque Teno Virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol* 2017; 94: 22–8.

35. Yu Y, Wan Z, Wang JH, Yang X, Zhang C. Human pegivirus: prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. *Virulence* 2022; 13: 324–41.
36. Alex D, Steve RJ, Ramalingam VV, et al. Prevalence and potential impact of human pegivirus-1 on HIV-1 disease progression among Indian PLHIV. *J Infect Dev Ctries* 2024; 18: 1108–17.
37. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol* 2012; 20: 124–30.
38. Horemheb-Rubio G, Ramos-Cervantes P, Arroyo-Figueroa H, et al. High HPgV replication is associated with improved surrogate markers of HIV progression. *PLoS One* 2017; 12: e0184494.
39. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 563–72.
40. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med* 2006; 7: 173–80.
41. Gilles R, Herling M, Holtick U, et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* 2017; 206: 355–62.
42. Graninger M, Stumpf J, Bond G, et al. Prediction of humoral and cellular immune response to COVID-19 mRNA vaccination by TTV load in kidney transplant recipients and hemodialysis patients. *J Clin Virol* 2023; 162: 105428.
43. Querido S, Adragão T, Pinto I, et al. Torquetenovirus viral load is associated with anti-spike antibody response in SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccinated kidney transplant patients. *Clin Transplant* 2022; e14825.
44. Forqué L, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of Torque Teno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: may it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol* 2022; 148: 105082.

45. Szládek G, Juhász A, Kardos G, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol* 2005; 58: 402–5.
46. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One* 2014; 9: e98819.
47. Abbate I, Rozera G, Cimini E, et al. Kinetics of TTV loads in peripheral blood mononuclear cells of early treated acute HIV infections. *Viruses* 2023; 15: 1931.
48. Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *J Med Virol* 2007; 79: 1–7.
49. Schmidt L, Jensen BO, Walker A, et al. Torque Teno Virus plasma level as novel biomarker of retained immunocompetence in HIV-infected patients. *Infection* 2021; 49: 501–9.
50. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2002; 3: 287–95.
51. Yamaguchi H, Hsu JM, Sun L, Wang SC, Hung MC. Advances and prospects of biomarkers for immune checkpoint inhibitors. *Cell Rep Med* 2024; 5: 101621.
52. Yin X, Song Y, Deng W, et al. Potential predictive biomarkers in antitumor immunotherapy: navigating the future of antitumor treatment and immune checkpoint inhibitor efficacy. *Front Oncol* 2024; 14: 1483454.
53. Zhou X, Wagner V, Scheller L, et al. Changes in T-cell subsets, preexisting cytopenias and hyperferritinaemia correlate with cytopenias after BCMA-targeted CAR T-cell therapy in relapsed/refractory multiple myeloma. *Br J Haematol* 2024; 205: 999–1010.
54. Stempels FC, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJM, van der Burg SH, de Gruijl TD. A sensitive and less cytotoxic assay for identification of proliferating T cells based on bioorthogonally-functionalized uridine analogue. *J Immunol Methods* 2022; 502: 113228.

55. Mirzakhani M, Shahbazi M, Akbari M, et al. Soluble CD30, the immune response, and acute rejection in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* 2020; 11: 295.
56. van Rijn AL, Roos R, Dekker FW, Rotmans JI, Feltkamp MCW. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* 2022; e2393.
57. Bogner JR. Innovationen in Therapie und Prophylaxe der HIV-Infektion. *MMW Fortschr Med* 2022; 164: 5.
58. Taylor JM, Fahey JL, Detels R, Giorgi JV. CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989; 2: 114–24.
59. Agyeman AA, et al. The prognosis for delayed immune recovery in HIV-infected children undergoing long-term antiretroviral therapy. *PLoS One* 2024; 19: e1234567.
60. Ghosh K, Ghosh K, Shetty S, Mohanty D. Correlation of CD4+ T-cell counts estimated by an immunocapture method and flow cytometry with HIV type 1 load. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 903–7.
61. Reuter S, Oette M, Kaiser R, et al. Risk factors associated with older age in treatment-naive HIV-positive patients. *Intervirology* 2012; 55: 147–53.
62. Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *J Pathol* 2015; 235: 229–41.
63. Mackiewicz MM, Overk C, Achim CL, Masliah E. Pathogenesis of age-related HIV neurodegeneration. *J Neurovirol* 2019; 25: 622–33.
64. Vajpayee M, Kaushik S, Sreenivas V, Wig N, Seth P. Correlation of immune activation with HIV-1 RNA levels assayed by an in-house real-time RT-PCR in subtype C infected Indian patients. *J Clin Virol* 2007; 38: 146–52.
65. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 2001; 15: 563–70.

66. Esser PL, Quintanares GHR, Langhans B, et al. Torque Teno Virus load is associated with CDC stage and CD4+ cell count in people living with HIV but unrelated to AIDS-defining events and Human Pegivirus load. *J Infect Dis* 2024.
67. Honorato L, Witkin SS, Mendes-Correa MC, et al. The Torque Teno Virus titer in saliva reflects the level of circulating CD4+ T lymphocytes and HIV in individuals undergoing antiretroviral maintenance therapy. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 809312.
68. Kosulin K, Kernbichler S, Pichler H, et al. Post-transplant replication of Torque Teno Virus in granulocytes. *Front Microbiol* 2018; 9: 2956.
69. Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. *MMWR Recomm Rep* 2009; 58: 1–CE4.
70. McDonald EG, Afshar A, Assiri B, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in people living with HIV: a review. *Clin Microbiol Rev* 2024; 37: e0010122

## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Aufbau des HI- Virus; [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HI-Virion\\_de.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HI-Virion_de.svg) 10

Abb. 2: CT-Bild einer PCP-Pneumonie; American Journal of Roentgenology – "Pneumocystis jiroveci Pneumonia: High-Resolution CT Findings" 11

Abb. 3: Natürlicher Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion; Pantaleo, G., Graziosi, C., & Fauci, A. S. (1993).

The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*, 328(5), 327–335. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302043280508> 12

Abb. 4: Aufbau des TTV-Genoms; Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(1):92–97. doi:10.1006/bbrc.1997.7765 14

Abb. 5: Flowchart – Zusammenfassung TTV als Marker 16

Abb.6: Schematische Darstellung- Verlust einer spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zelle 32

Abbildungen in der Publikation:

Figure 1: Top, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) category distribution, Bottom, Torque Teno virus (TTV) load distribution by age (left) and sex (right).

Figure 2: Plots showing the correlation between the log- transformed CD4<sup>+</sup> T- cell counts and torque teno virus (TTV left) and human immunodeficiency virus (HIV; right) loads with respective regression lines.

Figure 3: Probabilities assigned to centers for Disease Control and Prevention (CDC) classes via logistic regression, mapped to class (left) and the class- specific distribution of probabilities (right).

Figure 5: *Top left*, Scatterplot comparing human pegivirus (HPgV) and HIV loads with respective regression lines *Bottom left* Scatterplot comparing HPgV and TTV loads, with

respective regression lines *Bottom right*, Box plot comparing TTV load with HPgV load category (negative, low or high).

Figure 6: Regression of TTV load to CD4<sup>+</sup> T-cell count Fitted TTV loads are depicted by black circles, raw TTV loads to crosses and 95% confidence intervals by bands. Models' uncertainty is low (darker), while prediction uncertainty is high (lighter) Horizontal and vertical lines represent the cutoffs corresponding to centers for Disease Control and Prevention categories 1-3.

## 6.2. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Einteilung der HIV-Erkrankung nach der CDC-Klassifikation von 1993 nach Hoffmann und Rockstroh (2012); \* zu den AIDS-Erkrankungen 13

Tabelle in Publikation:

Table 1. Patient Characteristics

## 7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

1. Esser PL, Quintanares GHR, Langhans B, et al. Torque teno virus load is associated with CDC stage and CD4<sup>+</sup> cell count in people living with HIV but unrelated to AIDS-defining events and Human Pegivirus load. *J Infect Dis* 2024; jiae014

2. Vortrag auf dem Deutsch österreichischen AIDS-Kongress 2023 mit dem Titel „Quantitative TTV-Viruslastbestimmung im Serum als Marker für die Immunfunktion bei HIV und AIDS?“

3. Vortrag auf dem Avenir Meeting in Köln April 2024 mit dem Titel „Torque Teno Virus (TTV) load correlates with immunodeficiency in HIV-1 infected patients prior to antiretroviral treatment“

4. Preis für NachwuchsforscherInnen der DAIG 2023