



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**TORQUE TENO VIRUS COMO MARCADOR
SUBROGADO DE INMUNOCOMPETENCIA EN EL
TRASPLANTE**

VNIVERSITAT (ò†)
DE VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Doctorado en Medicina

Doctorando:

Eliseo Albert Vicent

Director de la Tesis:

David Navarro Ortega

Diciembre 2019

**TESIS
DOCTORAL**



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**TORQUE TENO VIRUS COMO MARCADOR SUBROGADO
DE INMUNOCOMPETENCIA EN EL TRASPLANTE**



D. David Navarro Ortega, Catedrático del Dpto. de Microbiología y Ecología de la Universitat de València y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Torque teno virus como marcador subrogado de inmunocompetencia en el trasplante”, realizado por el Ldo. Eliseo Alejandro Albert Vicent, se ha llevado a cabo bajo su dirección y ha sido supervisado y aprobado para su presentación como Tesis Doctoral con el objetivo de obtener por parte de éste el grado de Doctor atendiendo a la normativa prevista en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a Diciembre de 2019,

David Navarro Ortega

Agradecimientos:

La consecución de la Tesis Doctoral es para mí un gran éxito personal y profesional. Como todos los grandes logros, ha supuesto grandes sacrificios, se han sucedido emociones muy diferentes, ilusión y desesperanza, odio y felicidad, miedo y orgullo.

Los grandes proyectos requieren de la mentalidad adecuada. Hay que ser perseverante, humilde, tolerante y asociativo, pero también valiente y orgulloso. No siempre puedes rehuir la competición, ser complaciente o desechar emociones controvertidas como la ambición. Ese camino me condujo, en ocasiones pasadas, al abandono y la mediocridad.

Hay personas capaces de ver más allá de la simple máscara con la que nos mostramos al mundo, quizá por complicidad o porque su propio talento les confiere ese don, y sacar de nosotros la fuerza necesaria para luchar contra nuestros propios miedos, enfrentarnos a nuestras debilidades y permitirnos competir en lugares donde no habríamos sido capaces de hacerlo por nosotros mismos. No basta con ofrecerle a alguien una lanza para luchar contra los gigantes, es necesario conferirle valor, autoestima, una pizca de inconsciencia y que sepa, por encima de todo, que, si las cosas se tuercen, no estará solo. Gracias David por hacer de mí una persona mejor.

Quiero agradecerles a mis padres todo el esfuerzo realizado y todo el amor con el que siempre nos han acompañado a mis hermanos y a mí. Ese amor ha sido el faro que ha guiado nuestras vidas. Sin él, no valdría la pena. También a mis hermanos por estar siempre ahí.

Agradecer a mis compañeros de trabajo Víctor, Estela, Rocio y Alberto que han sido a la vez sustento y guía en este camino. Agradecer a mis amigos David, Noel, Jesús y Ángel, todo el cariño que he recibido de ellos. Sea como fuere que soy, también es gracias a ellos.

Por último, darle las gracias a Mónica, esta tesis también es, en parte, suya. Su comprensión y sacrificio la han hecho posible. Deseo que la vida nos permita enfrentarnos juntos a mil y un proyectos más.

A María y Alejandra

Presentación:

Esta tesis doctoral se publica como compendio de artículos en virtud del reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral según lo dispuesto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas de doctorado.

Las publicaciones que componen esta tesis doctoral se citan a continuación por orden cronológico:

1. Albert E, Solano C, Pascual T, Torres I, Macera L, Focosi D, et al. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2017; 94:22-8.
2. Albert E, Solano C, Gimenez E, Focosi D, Perez A, Macera L, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*. 2018;53(2):180-7.
3. Albert E, Torres I, Talaya A, Giménez E, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, et al. Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of medical virology*. 2018;90(9):1438-43.
4. Fernandez-Ruiz M, Albert E, Gimenez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, Lopez-Medrano F, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018.
5. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez A, Macera L, et al. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Medical microbiology and immunology*. 2019;208(2):253-8.

Abreviaturas y acrónimos:

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNemia: Presencia de ADN en sangre
- ADNss: ADN de cadena sencilla
- Alo-TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- AUC: *Area Under Curve*; Área bajo la curva
- CMSP: Células mononucleadas en sangre periférica
- CMV: Citomegalovirus
- D: Donante
- EBV: Virus de Epstein-Barr
- EICH: Enfermedad de injerto contra huésped
- ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- ELISPOT: *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*
- ESRD: *End Stage Renal Disease*; Enfermedad renal en fase terminal
- HLA: *Human Leukocyte Antigen*; Antígeno leucocitario humano
- HR: Hazard Ratio
- IC: Intervalo de confianza.
- ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus
- IE-1: Immediate-early protein 1; Proteína precoz 1
- INF- α : Interferon alfa
- INF- γ : Interferon gamma
- iRAE: Evento adverso relacionado con la inmunosupresión
- mL: Mililitro
- NF κ B: Factor nuclear activador de cadenas kappa de linfocitos B
- ORF: Openning Reading Frame. Marco abierto de lectura
- PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa
- PHA: Fitohemaglutinina
- pp65: Phosphoprotein 65; Fosfoproteína 65
- RAL: Recuento absoluto de linfocitos
- RALc: Recuento absoluto de leucocitos

- SD: Desviación estándar
- Td: Tiempo de duplicación
- TPH: Trasplante de precursores hematopoyético.
- TTV: Torque teno virus, entiéndase todas las especies comprendidas dentro del género *Alphatorquevirus*
- TTMV: Torque tenominivirus,
- TTMDV: Torque tenomidivirus
- TOS: Trasplante de órgano sólido
- UI: Unidades internacionales.
- URT Untranslated región; Región no traducida
- VHC: Virus de la hepatitis C
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
- VPP: Valor predictivo positivo
- VPN: Valor predictivo negativo

Índice:

▪ Introducción	1
1- Historia.....	3
2- Descripción general y taxonomía	4
3- Características del virus.....	6
3.1 Cápside viral.....	6
3.2 Genoma.....	6
3.3 Replicación.....	8
3.4 Tropismo viral.....	8
4-Prevalencia y trasmisión	9
5-El viroma y los anellovirus.....	11
6-Torque teno virus como biomarcador de la funcionalidad inmunológica.....	12
6.1 Dinámica de TTV en pacientes infectados con el Virus de la inmunodeficiencia humana.....	12
6.2 Dinámica de TTV en el trasplante.....	13
7-Inmunología en el trasplante de precursores hematopoyéticos	15
8-Métodos para la monitorización de la función inmunológica.....	16
▪ Hipótesis	19
▪ Objetivos	23
▪ Material y Métodos	32
1.Pacientes.....	33
2-Muestras de plasma y de saliva.....	34
3-Cuantificación de ADN de TTV en las muestras.....	35
4-Recuento de linfocitos y leucocitos totales.....	39
5-Monitorización virológica y manejo de la infección por CMV y EBV.	40
6-Monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV. ...	41
7-Definiciones.....	41

8-Análisis estadístico.....	42
▪ Resultados	45
1-TTV como marcador subrogado de inmunosupresión en el alo-TPH.....	47
1.1- Efecto del régimen de acondicionamiento sobre la carga de ADN de TTV en plasma.....	47
1.2- Dinámica de la ADNemia de TTV en plasma después del injerto.....	51
1.3- Efecto del EICH agudo severo en la ADNemia de TTV.....	57
1.4- Cinética de la ADNemia de TTV, incidencia y características de los episodios de ADNemias por CMV y EBV.....	59
1.5- Interacción entre CMV y TTV.....	67
1.6-Cinética de la carga de ADN de TTV en plasma y reconstitución temprana de inmunidad T CMV específica.....	69
1.7- Detección de ADN de TTV en muestras pareadas de saliva y plasma.....	70
1.8- Cinética de la carga de ADN de TTV en muestra de plasma y saliva.....	71
1.9- ADN de TTV en saliva y repoblación linfocitaria.....	74
1.10- Dinámica tardía del ADN de TTV en plasma.....	76
1.11- Carga de ADN de TTV y recuento absoluto de linfocitos en el estado de equilibrio estacionario.....	77
1.12-Efecto del régimen inmunosupresor y el uso de corticosteroides en la carga de ADN de TTV en plasma después del trasplante.....	78
2. Monitorización de la ADNemia de TTV para la predicción de complicaciones relacionadas con la inmunosupresión en el trasplante de riñón.....	80
2.1- Características de la población del estudio.....	80
2.2- Dinámica de las cargas de ADN de TTV.....	81
2.3-Correlación entre la carga de ADN de TTV y los parámetros inmunológicos.....	82
2.4-Carga de ADN de TTV en cada tiempo analítico y resultados clínicos.....	84

2.5-Áreas bajo la curva de las ADNemias de TTV y resultados clínicos	86
2.6-Cinética de las ADNemias de TTV y resultados clínicos	87
2.7-Carga de ADN de TTV y rechazo del injerto.....	89
▪ Discusión	91
▪ Conclusiones	111
▪ Bibliografía	115
▪ Anexos	123
1-Anexo I.....	125
2-Anexo II.....	130
▪ Artículos	131

Introducción

1.- Historia

El torque teno virus se identificó por primera vez en el año 1997 en el suero de un paciente japonés con hepatitis post transfusional no asociada a los virus de la hepatitis A-G(1). Para esta identificación se utilizó la técnica del análisis de representación diferencial utilizando como driver el suero del paciente transcurridas dos semanas de una intervención quirúrgica y como tester el suero de este mismo paciente transcurridas ocho semanas desde la cirugía, momento en el cual el paciente tenía unos valores ALT de 180 UI/L. Los amplicones generados se clonaron en la bacteria E. coli TG1 y se secuenciaron obteniéndose un total de 36 clones, de los cuales 9 eran similares entre sí. A partir de la secuencia homóloga de estos 9 clones se sintetizaron unos primers con los que se desarrolló una PCR que se utilizó posteriormente en los dos sueros del paciente en cuestión, detectándose el ADN objetivo únicamente en la muestra correspondiente al periodo de hepatitis aguda de este paciente índice. A este clon se le denominó N22 (2) y corresponde a la primera detección documentada de TTV

Para dilucidar si se trataba de un clon de ADN o ARN, se sometió a PCR utilizando los *primers* que se habían deducido del N22, una de las amplificaciones antepuesta por una transcripción reversa, obteniendo en ambos casos la misma intensidad de señal lo que indicaba la naturaleza ADN de N22.

Como el clon se obtuvo a partir de una muestra de suero de un paciente, se quiso demostrar que éste no pertenecía al material genético del propio huésped para ello se diseñó una PCR con los primer del N22 que se utilizaron para amplificar 4 muestras de ADN genómico humano, la falta de resultados atestiguó que el origen de la partícula no era humano. La naturaleza viral de este clon se demostró mediante fraccionamiento en un gradiente de densidad de sacarosa. El ADN con la secuencia de N22 aparece en una fracción con un pico de 1,26 g/cm³. El hecho de que la densidad de la partícula viral no variara cuando ésta se trató previamente con Tween 80 indicaba que se trataba de un virus no envuelto. Además, la fracción de ADN de N22 fue resistente a la digestión por ADNsa I a diferencia del ADN extraído del plasma del mismo paciente, esto podía indicar que el ADN de N22 estaba protegido por la cubierta de un virus putativo.

A este virus en una primera instancia se le denominó TTV, en honor al nombre del paciente del que había sido identificado. (2)

El género *Anellovirus* se creó a finales del año 2001, entonces no pertenecía a ninguna familia. El género *Anellovirus* se eligió por el término en latín *Anello*, que significa anillo, por la naturaleza circular de su genoma. Los virus identificados hasta esa fecha se denominaron torque teno virus sustituyendo al nombre TT virus o *Transfusion transmitted virus*. Finalmente, el género *Anellovirus* se describe por primera vez en la octava edición del informe del *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV), publicado en el año 2004. (3)

2. Descripción y taxonomía

El torque teno virus, del latín *torques* y *tenuis*, collar y delgado respectivamente, es un virus de pequeño tamaño, entre 30 y 50 nm, de ADN de cadena sencilla (ssADN), desnudo y capsulado perteneciente a la familia *Anelloviridae*. Los virus de ssADN son los patógenos ADN capsulados más pequeños que infectan a organismos eucariotas.

Entre los años 2015 y 2017 se resolvió la agrupación de estos virus de ADNss conocidos como CRESS virus *-replication initiator protein (Rep) encoding single stranded ADN-*. Actualmente se establecen 13 familias, de las cuales 11 contienen el ADN circular y dos, *Parvoviridae* y *Bidnaviridae*, ADN lineal. De estos 11, siete infectan a células eucariotas. Ellos son *Anelloviridae*, *Bacilladnaviridae*, *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Genomoviridae*, *Nanoviridae* y *Smacoviridae*. Sólo los anellovirus poseen el ADNss de polaridad negativa. (4)

Todos ellos se caracterizan por poseer una gran capacidad de recombinación y unas ratios muy elevadas de sustituciones nucleotídicas, aproximadamente $1,2 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio y año, equiparable a los virus ARN. (5)

La familia *Anelloviridae* no tiene un orden designado y se agrupa, junto con otras 85 familias, en el orden *unassigned* del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, del año 2016. Se compone de 12 géneros, los cuales se enumeran en la siguiente tabla:

Tabla I-I- Géneros comprendidos dentro de la familia *Anelloviridae*

Familia	Género
Anelloviridae	<i>Alphatorquevirus</i>
	<i>Betatorquevirus</i>
	<i>Deltatorquevirus</i>
	<i>Epsilontorquevirus</i>
	<i>Etatorquevirus</i>
	<i>Gammatorquevirus</i>
	<i>Gyrovirus</i>
	<i>Iotatorquevirus</i>
	<i>Kappatorquevirus</i>
	<i>Lambdatorquevirus</i>
	<i>Thetatorquevirus</i>
<i>Zetatorquevirus</i>	

Dentro del género *Alphatorquevirus* se engloban al menos 29 especies, lo cual corrobora, como antes comentábamos, la alta tasa de heterogeneidad del virus. Se diferencian mediante el análisis de la secuencia nucleotídica de ORF-1 en su totalidad, siendo el valor umbral de discrepancia entre secuencias, que permite diferenciar entre las especies es del 35% (6). Los géneros *Beta-* y *Gammatorquetenovirus* están compuestos por virus con un genoma de menor tamaño respecto al genoma del prototipo (torque teno virus), estos virus conservan la estructura genómica de los anellovirus, –que se caracteriza por una región codificante principal denominada ORF-1, una región ORF-2 superpuesta y otros ORF, y una región no codificante que contiene una zona rica en GC– pero con una región no codificante de mucho menor tamaño. A estos virus, que también producen infecciones crónicas en humanos y cuya diversidad respecto a TTV no corresponde sólo a la secuencia nucleotídica sino también al tamaño de su genoma, se les denomina torque teno minivirus y torque teno midivirus; el

tamaño de su genoma es aproximadamente de 2.200 y 3.200 nucleótidos respectivamente. (7)

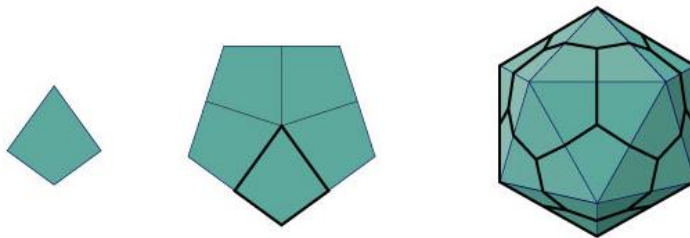
Previamente a esta clasificación que acabamos de comentar, se agrupó los aislados humanos de TTV en cinco genogrupos principales, con diversos genotipos cada uno. El principal interés de esta clasificación radicaba en la capacidad variable de las diferentes técnicas de PCR para amplificar cada uno de estos genogrupos, las posibilidades de coinfecciones así como la distribución sociodemográfica de cada uno de ellos, que aún está por determinar(8)

3. Características del virus, estructura y replicación

3.1 Cápside viral

TTV es un virus desnudo y capsulado. Su cápside se dispone con una simetría icosaédrica tipo T=1, con un diámetro aproximado de 30-32 nm. Está compuesta por 60 proteínas de la cápside que forman 12 capsómeros pentaméricos, tal y como se muestra en la figura:

T=1 icosaedral capsid protein



T=1

T=1 icosahedral capsid is composed of 12 pentameric capsomeres for a total of 60 capsid proteins.

3.2 Genoma

TTV posee un genoma circular de cadena única y polaridad negativa cuyo tamaño varía entre diferentes aislados entre 3,6 y 3,9 kb. El genoma viral se puede dividir en dos regiones principales: la región no codificante (URT), con un tamaño aproximado de 1,2 kb., y una región codificante de aproximadamente

2,6kb. El genoma viral también contiene una región rica en GC (89-90,6%). La región URT es la más conservada y se cree que desempeña un papel regulatorio en la replicación viral, mientras que en la región transcrita destacan dos marcos abiertos de lectura ORF-1 y ORF-2 comunes a TTV, TTMV y TTMDV. Ambos ORF tienen un alto nivel de divergencia, de entre un 47% y hasta un 70% en la secuencia de aminoácidos de los péptidos que codifican. (9) **(FIGURA I.I)**

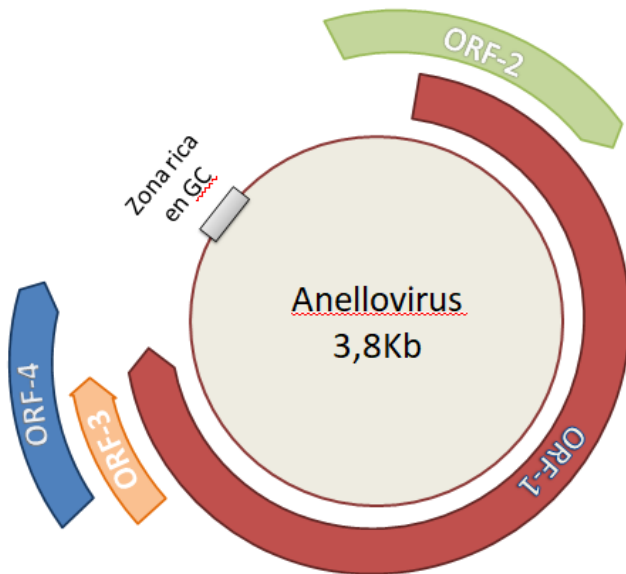


Figura I.I: Representación del genoma viral de torque teno virus, con cuatro marcos abiertos de lectura (ORF) parcialmente superpuestos y una zona no codificante (URT) común comuna región rica en guanósina-citosina (GC)

Los ORF se superponen parcialmente y su tamaño difiere entre diferentes aislados. Codifican al menos entre 5 y 7

proteínas cuyos tamaños varían entre los 12 y hasta los 80KDa y se expresan vía iniciación translacional alternativa.

Probablemente ORF-1 codifica la proteína putativa de la cápside viral, así como una proteína asociada a la replicación de los anellovirus. Por su parte, la región ORF-2 codifica una proteína que se cree puede interferir con la actividad de los linfocitos B mediante la supresión de la translocación del factor NF-κB al núcleo (10) y que contiene una secuencia altamente conservado, WX7HX3CXCX5H, ubicado en su región N terminal. En el caso de TTV, ORF-3 codifica una proteína con un dominio C terminal rico en serina capaz de generar diferentes sitios de fosforilación y que puede desempeñar un papel importante en la cronificación de la infección(6).

Aunque los mecanismos exactos de replicación y expresión del genoma no están del todo dilucidados, se han detectado al menos tres ARNm de 2,9, 1,2, y 1,0 KB respectivamente en diferentes órganos y tejidos. Estos ARNm se transcriben a

partir de una de las cadenas, la de polaridad negativa, que componen el ADN de doble cadena generado de manera transitoria en el proceso replicativo de TTV. Así pues, el genoma de TTV se replica mediante un intermediario de doble cadena que codifica cuatro proteínas, ORF1 (que podría corresponder a la proteína Rep de los virus CRESS), ORF 2, ORF 3 y ORF 4. Las proteínas se expresan por *splicing* alternativo del ARN mensajero. (11)

3.3 Replicación

TTV depende de la maquinaria celular para su propia replicación, por ello el virus infecta a células que se están dividiendo o induce a estas a entrar en fase de síntesis (Fase-S). Del análisis de la secuencia de ORF-1 se deduce que el virus no utiliza una polimerasa propia para su replicación. No se conoce el mecanismo exacto de replicación del virus, sin embargo, se cree que lo hace de manera análoga a otros virus ADNss como los circovirus mediante unas proteínas con un patrón definido conocidas como "Rep motif" mediante un mecanismo conocido como *rolling circle replication*. Estas proteínas interactúan con proteínas de la propia célula huésped para inducir la replicación del virus mediante la unión de éstas a una región altamente conservada en la UTR, próxima a la caja TATA. (12)

Las proteínas rep contienen dos dominios, uno hidrofóbico, rico en histidina con actividad endonucleasa en el extremo N-terminal, y otro dominio con actividad helicasa en la región C terminal, el primero de los cuales es esencial para la iniciación y terminación, mientras que el segundo participa en la elongación, todo ello durante el proceso replicativo (4)

3.4 Tropismo viral

TTV está presente en diferentes órganos y tejidos. Se ha detectado en tejido de pulmón, hígado, médula ósea o riñones entre otros. Sin embargo, se cree que los linfocitos son el principal nicho replicativo del virus y que, aunque éste se haya detectado en los diferentes órganos, su presencia pudiera deberse a la invasión de estos tejidos por parte del sistema inmune, pero que la replicación realmente solo se produce en CMSP. Esta hipótesis ya fue postulada en el año

2002 por Kikuchi *et al.* (13) que, de manera indirecta, puso de manifiesto la replicación del virus en médula ósea y la ausencia de ésta en los hepatocitos de un paciente de 37 años que ingresó por hepatitis con ictericia en Japón, en 1992.

Maggi *et al.* y Mariscal *et al.* (14) (15) demostraron la capacidad de replicación *in vitro* del virus en CMSP estimuladas con PHA. De ahí se derivó la hipótesis de que las células hematopoyéticas podían ser la principal fuente del TTV circulante en los pacientes infectados. Como ya hemos comentado, parvovirus, circovirus y otros virus de ADN de cadena sencilla requieren que la célula huésped esté multiplicándose activamente para una replicación productiva. Este hecho ocurre de manera análoga con TTV (12, 13) El papel fundamental que desempeñan los linfocitos en la replicación viral se demostró mediante la monitorización del ADN del virus en plasma de pacientes sometidos a trasplante hematopoyético (16), (17). Focosi *et al.* (18), con el fin de corroborar estos hallazgos preliminares, estudió de manera prospectiva la ADNemia de TTV en muestras de plasma de 70 pacientes sometidos a trasplante renal o pancreático durante la inducción de la inmunosupresión tras el trasplante, para lo cual se utilizó timoglobulina o basiliximab, ambos fármacos depleccionantes de linfocitos T. El marcado descenso en los niveles de TTV se relacionó, o con la destrucción de los linfocitos T, o con el bloqueo funcional de estos ocasionado por los fármacos, demostrando que los Linfocitos T funcionales son cruciales en el mantenimiento de la viremia de TTV.

4. Prevalencia y transmisión

La prevalencia del virus en la población general es muy alta, alcanzando niveles superiores al 95% en la mayoría de los casos, y es independiente del sexo y del estado socioeconómico (7). Atendiendo a fuentes epidemiológicas, se cree que dos terceras partes o más de la población global es portadora de TTV en plasma, siendo TTMV y TTMDV más ubicuos. Los genogrupos aparentemente más prevalentes son el 1 y el 3, mientras que el que se halla con menor frecuencia es el genogrupo 2 (19). De estos hallazgos podríamos concluir que no existe una distribución homogénea entre los diferentes genogrupos en la población general. Tanto si esta afirmación es correcta, cuanto la posible distribución de los posibles genogrupos, así como si éstos varían en función de la edad o el

estado de salud de los pacientes, es algo aún por determinar. Este fenómeno podría deberse simplemente a que las técnicas de amplificación empleadas por los diferentes grupos no son las mismas.

El virus se adquiere a edades tempranas. Además de la vía parenteral, el virus se puede transmitir de diferentes maneras. Se ha demostrado la excreción del virus en heces, adquiriendo por tanto la vía fecal-oral una gran relevancia como posible vía de transmisión. Otra vía principal de transmisión es la vía materno-fetal(20). También se ha postulado la vía respiratoria como medio de transmisión del virus. Maggi *et al.*, con el fin de estudiar en las nuevas infecciones el lugar de replicación inicial del virus antes del desarrollo de una infección sistémica, cuantificó ADN viral en muestras respiratorias de niños con enfermedades respiratorias agudas en el momento del ingreso en el hospital. Demostró que existe una alta cantidad de virus en muestras de aspirado nasofaríngeo y que el virus es capaz de replicarse activamente en las vías respiratorias altas, sugiriendo con esto que la respiratoria puede ser también una vía importante de difusión del virus. (21). La detección del virus en la saliva, las secreciones genitales, las lágrimas, la piel y los folículos pilosos implica la probable existencia de otros medios de difusión(22) (23).

Tras entrar en contacto con el virus, por vía parenteral o a través de las mucosas, éste se vuelve detectable en plasma en el plazo de unas pocas semanas. El resultado más frecuente es una infección de tipo crónico con valores detectables en plasma de TTV de por vida. De hecho, se cree que aquellos pacientes que han tenido contacto con el virus y en los que no se detectan valores en plasma, tienen ADNemia por debajo del umbral de detección de la técnica analítica y no han resuelto la infección.(20)

Los niveles de ADN de TTV en plasma varían ampliamente entre individuos. La ADNemia del virus abarca valores comprendidos entre 10^2 y 10^9 copias/ml. Generalmente los valores de TTV dentro de un propio individuo se mantienen en niveles relativamente estables, aunque pueden sufrir fluctuaciones bruscas que podrían estar ocasionadas por la sobreinfección de otra especie de TTV (24)

El virus se replica activamente en las personas infectadas, aproximadamente 10^{10} o 10^{11} virus se producen diariamente y a su vez prácticamente todos ellos son eliminados del plasma con esa misma frecuencia, lo cual indica que existen santuarios de replicación activa del virus en el organismo como pueden ser las CMSP. La vida media del virus en plasma es aproximadamente de 4 horas (25) (26)

5. El viroma y los anellovirus

El gran desarrollo de las técnicas de biología molecular ha revolucionado conceptos fundamentales de la virología, como son la complejidad de las interacciones de los virus con el hospedador y su gran relevancia como parte del microbioma. Ha quedado atrás el concepto reduccionista de la presencia o ausencia de un supuesto patógeno como agente causal de una enfermedad que obvia la relación cruzada de estos con el sistema inmune, su importancia en la maduración y la inmunotolerancia, así como su influencia en la funcionalidad inmunológica en diferentes enfermedades. En la actualidad se cree que el 45% de los virus que pueden afectar a mamíferos se encuentran en personas sanas. Existe una fluctuación constante en la composición de esta población de virus en diferentes partes del organismo que se consideran como parte del microbioma (27). El efecto de estos virus en la sangre de individuos sanos o enfermos no está dilucidado aunque, como se demuestra en el estudio de De Valmink *et al.* (28), ocupan la fracción mayoritaria del viroma sanguíneo y, de entre estos, los anellovirus suponen aproximadamente el 70%, pudiendo desempeñar una función fisiológica en el organismo. Se ha despertado un gran interés por el modo de interacción del virus con el sistema inmune, así como el resultado último de esta interacción en la funcionalidad de éste. Así pues, se ha comprobado en modelos *in vitro* la capacidad de TTV para evitar, mediante la proteína codificada por ORF-2, la translocación del factor nuclear NF κ B y con ello evitar la expresión de mediadores proinflamatorios tales como la IL-6, IL-8 y la ciclooxigenasa-2. También se ha puesto de manifiesto la capacidad del virus para estimular el sistema inmune por la presencia en su material genético de dímeros citosina guanosa (CpGs) que pueden ser reconocidos por las células del sistema inmunitario y estimular la producción de INF- α y otros mediadores

proinflamatorios (29). En el otro sentido, puede resultar de mucho interés estudiar la influencia del sistema inmune en la dinámica de estos virus en diferentes órganos o tejidos pudiendo, tanto la cuantificación del virus en plasma cuanto la cinética de este en muestras consecutivas de un paciente dado, ser de gran interés para la evaluación de la funcionalidad inmune del paciente.

6. Torque teno virus como biomarcador de la funcionalidad inmunológica

Un biomarcador es una característica objetivamente medida y evaluada como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (30). La elevada prevalencia del TTV, así como el hecho de que su presencia sea independiente de las características sociodemográficas de los pacientes, han hecho del estudio de TTV como biomarcador del nivel de inmunosupresión una prioridad en diferentes campos de la medicina.

6.1 Dinámica de TTV en pacientes infectados con el Virus de la inmunodeficiencia humana

En el año 2001 Shibayama *et al.* (31) estudió las cargas de TTV en el plasma de 144 pacientes con VIH, la relación de éstas con los niveles de CD4, así como la influencia de coinfecciones con CMV o hepatitis C en la ADNemia de TTV. También evaluó la relación entre el estatus inmune de estos pacientes VIH positivos y la carga de TTV. Se observó una mayor prevalencia y títulos más altos de TTV en pacientes con VIH que en pacientes sanos. También una ADNemia mayor de TTV en los pacientes con cargas de VIH más altas y en los pacientes con SIDA respecto a los pacientes VIH pero que no cumplían estos criterios. Respecto a su relación con los niveles de CD4, aquellos pacientes con cargas de TTV mayores tenían recuentos inferiores de linfocitos T CD4. Por lo tanto, al menos en este grupo de pacientes, la ADNemia de TTV parece estar asociada con los siguientes parámetros: la carga viral de VIH, los niveles de CD4 y la probabilidad de desarrollo de SIDA y, por tanto, con el grado de inmunosupresión.

En esta misma línea Madsen *et al.*(32), evaluó la utilidad de TTV como biomarcador de reconstitución inmune en el paciente con VIH una vez iniciado el tratamiento antirretroviral. En este trabajo se puso de manifiesto una reducción de la ADNemia de TTV que se tornaba significativa a los tres meses de iniciarse el tratamiento antirretroviral. Curiosamente, este descenso ocurría incluso en aquellos pacientes en los que el recuento de CD4 no aumentaba a pesar de la disminución de la carga de VIH, lo cual podría evidenciar la utilidad de TTV para la cuantificación de la respuesta inmune funcional con incluso una mayor sensibilidad que el recuento de los linfocitos T CD4.

Otros estudios han corroborado la misma hipótesis (33) (34). En la actualidad está comúnmente aceptado que TTV tiene picos de replicación en pacientes con VIH.

6.2 Dinámica de TTV en el trasplante

Existe cada vez un mayor cuerpo de evidencia que sugiere que la ADNemia de TTV permite inferir la competencia inmune del paciente trasplantado de órgano sólido(28, 35-39). Hipotéticamente, mediante la cuantificación del número de copias de ADN de TTV en plasma podríamos predecir el riesgo de rechazo del órgano trasplantado o por el contrario la probabilidad de aparición de infecciones oportunistas. Esta posible utilidad del TTV quedó patente en 2013 en un trabajo de De Vlamink *et al.*, que incluyó pacientes, tanto adultos como pediátricos, sometidos a trasplante de corazón o pulmón. En él se demostraba que tanto la abundancia relativa de TTV en el viroma de los pacientes, como la cantidad de ADN del virus en el plasma de éstos, estaba correlacionada positivamente con el grado de inmunosupresión y con el uso de antivirales, disminuyendo, además, estos últimos, la biodiversidad del viroma en favor de los anellovirus. Por otro lado, los pacientes con un episodio de rechazo moderado o severo del órgano trasplantado tenían cargas de TTV menores que aquellos sin rechazo (28). Estos mismos hallazgos se han encontrado en el trasplante de hígado (40) o de riñón (34) En este último caso, se ha correlacionado inversamente el rechazo mediado por anticuerpos con la carga de TTV. Los pacientes en los que se detectaban estos anticuerpos tenían ADNemias de TTV hasta 4 veces más bajas (39)

En el trasplante de órgano sólido el virus parece seguir una cinética ascendente en los primeros días tras el trasplante. Alcanza la concentración máxima aproximadamente 90 días tras la cirugía y se mantiene posteriormente en un estado estacionario que se prolonga en el tiempo y que, como hemos comentado, puede ser de utilidad como biomarcador de la competencia inmune (35, 37, 39). El incremento más abrupto se produce en los treinta primeros días postrasplante, probablemente por la fractura del balance dinámico entre el sistema inmune y TTV ocasionado por la introducción de los fármacos inmunosupresores (37). La concentración del virus en este estado de equilibrio estacionario se correlaciona de manera positiva con el nivel de los fármacos inmunosupresores (35, 37). Este comportamiento cinético del virus parece confirmarse en otros estudios (38).

En cuanto a la utilidad de la cuantificación de la ADNemia de TTV para estratificar el riesgo de infección en el trasplante de órgano sólido, en la actualidad es difícil extraer conclusiones. La mayoría de los estudios están compuestos por pocos pacientes y suelen estar centrados en la evaluación de la capacidad predictiva del virus del rechazo del injerto (38, 39, 41). Sin embargo, y a pesar de estas limitaciones, se ha visto que los pacientes que sufren infecciones postrasplante tienen ADNemias de TTV mayores en los tiempos de estudio previos a este evento adverso que aquellos en los que estas infecciones no se producen (37). En este trabajo Görzer *et al.* reportó un punto de corte de 9,3 log₁₀ copias /ml como valor predictivo de infección posterior en el trasplante de pulmón. Sin embargo, otros autores han fracasado en la obtención de esta correlación del ADN de torque teno virus en el plasma del paciente trasplantado con infección(42).

Por las particularidades del paciente sometido a trasplante hematológico se ha estudiado tanto la prevalencia como la dinámica del virus en este grupo de manera independiente del TOS. Así pues, se ha observado una mayor prevalencia de TTV en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea que en la población general, así como una dinámica particular con respecto al trasplante de órgano sólido (17). En este tipo de trasplante la ADNemia de TTV sufre un descenso, que en algunos casos es tan pronunciado que llega a convertirse en

indetectable durante el periodo de mielosupresión. Asimismo, respecto al trasplante de órganos sólido, se ha evidenciado un retraso en el inicio de la recuperación de las cargas TTV que se dilata hasta aproximadamente el día +40 (17). Existe discrepancia sobre la influencia de la enfermedad hematológica de base sobre la dinámica de recuperación del virus tras el trasplante, aunque sí se ha observado una correlación positiva entre el incremento de la carga de TTV tras el trasplante y el recuento de linfocitos T totales y específicos CD57+ (43) (44).

Aunque hay autores que ven la cuantificación de TTV como una herramienta útil para evaluar el riesgo de sufrir infecciones víricas persistentes como las causadas por CMV o VEB, o algunos efectos adversos relacionados con el nivel de inmunosupresión, como la enfermedad de injerto contra huésped (44, 45), lo cierto es que la mayoría de estos estudios disponen de cohortes de pequeño tamaño, aproximadamente 25 pacientes, y no siempre homogéneas. Se obtienen, por tanto, resultados poco concluyentes y, en ocasiones, contradictorios, lo cual pone de manifiesto la necesidad de un mayor esfuerzo en el estudio de la dinámica de TTV y su utilidad como biomarcador subrogado de funcionalidad inmune.

7. Inmunología en el trasplante de precursores hematopoyéticos

El trasplante de precursores hematopoyéticos es un tratamiento efectivo para varios trastornos hematológicos. El acondicionamiento farmacológico, previo al trasplante, destruye el sistema inmune del paciente aportando con ello un nuevo espacio para el injerto y previniendo el rechazo de este. La inmunodeficiencia que sigue al trasplante de órganos y en particular en el trasplante alogénico de médula ósea, predispone al paciente al desarrollo de infecciones oportunistas severas (46) y, en menor medida al desarrollo de trastornos linfoproliferativos que frecuentemente se presentan en forma de linfomas muy agresivos y de evolución fatal (47). Las infecciones oportunistas relacionadas con la inmunosupresión continúan siendo una de las principales causas de morbimortalidad en este tipo de pacientes. De entre ellas, las ocasionadas por la familia de los herpesvirus son las que más frecuentemente infectan al paciente trasplantado. Históricamente, la incidencia de enfermedad orgánica por

citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos variaba entre el 10 -40% con una mortalidad aproximada del 70%. Actualmente esta incidencia es mucho menor, con tasas de entre el 5 y 10% (48); en parte por la instauración del tratamiento antiviral profiláctico o anticipado y en parte por el mejor manejo del paciente trasplantado, para lo cual una correcta monitorización del nivel de inmunosupresión es fundamental.

El hecho de recuperar un recuento de leucocitos dentro de los rangos considerados normales no garantiza la funcionalidad del sistema inmune. Los monocitos son los primeros en recuperarse tras el trasplante de médula ósea, seguidos por granulocitos, plaquetas y células NK. Esta regeneración restaura en gran medida la inmunidad innata del huésped. Sin embargo, no ocurre lo mismo con la inmunidad adaptativa. La especificidad antigénica heredada del donante es muy pobre y durante al menos el primer año, a pesar de alcanzar un número de linfocitos adecuado, estos no se activan de la misma manera que lo hubieran hecho en éste. Durante el periodo próximo al trasplante, el ambiente proinflamatorio favorece la expansión de determinados clones de linfocitos respecto a otros. Esta deriva ocasiona la pérdida de gran parte de la especificidad antigénica heredada del donante, por la pérdida de linfocitos B con capacidad de hipermutación somática, y dificulta asimismo la entrada de los linfocitos T a los órganos linfoides secundarios y su interacción con las células presentadoras de antígeno. Todo esto genera respuestas clonales deficientes o, en el mejor de los casos, una respuesta inmunitaria primaria y de baja calidad. (49) (50).

8. Métodos para la monitorización de la función inmunológica:

De entre los métodos actualmente disponibles para la monitorización de la funcionalidad inmunológica en el paciente trasplantado, teniendo en cuenta la falta de correlación del recuento absoluto de linfocitos T y B, y de la funcionalidad de la inmunidad adaptativa principalmente en el periodo postrasplante, pero que puede prolongarse hasta el año, cabe destacar principalmente dos: el primero de ellos consiste en la monitorización de los niveles plasmáticos de los fármacos inmunosupresores. Otra herramienta prometedora para la cuantificación de la

competencia inmune son los métodos que evalúan la funcionalidad inmunitaria mediante la estimulación linfocitaria antígeno específico o no antígeno específico para su posterior cuantificación. Destacan el método InmunoKnow o el método ELISpot. La principal ventaja de estos métodos es que son de gran utilidad porque aportan una información más realista de la competencia inmune que la cuantificación de las células leucocitarias, sin embargo, son métodos que, aunque se han demostrado útiles, son muy laboriosos, no están estandarizados y requieren de ensayos prospectivos para su validación en el entorno clínico (51), (52)

Hipótesis

- 19 -

El torque teno virus es un virus de ADNss, con una alta prevalencia en la población general, independientemente de las características clínico-demográficas del grupo de población estudiado. Este hecho, junto con su capacidad para producir infecciones crónicas no deletéreas, pone de manifiesto la buena y exitosa interacción del virus con el sistema inmune del huésped.

Existen evidencias que sugieren que la viremia de TTV está inversamente relacionada con la competencia inmune del individuo(31-33, 35-37, 39). Se ha postulado la viremia de TTV como una herramienta útil, en el trasplante de órgano sólido, para la identificación de pacientes con riesgo de rechazo del órgano trasplantado así como para estratificar el riesgo de la infección postrasplante (37, 39, 40). Sin embargo, la mayoría de estos estudios son de pequeño tamaño y están exclusivamente centrados en la evaluación del riesgo de rechazo

Por otro lado, por las peculiaridades del trasplante de médula ósea, éste requiere de una mención particular. En primer lugar, en este tipo de patología, tras varios ciclos de quimioterapia, la cuantificación de linfocitos T CD4⁺ puede no ser representativa del estado inmunológico del paciente. El aumento del número de linfocitos no siempre se correlaciona con una recuperación de su funcionalidad; por ejemplo, por la ausencia transitoria de la capacidad de ofrecer una respuesta adaptativa debido a la pérdida de la memoria antigénica de los linfocitos. En segundo lugar, el efecto del acondicionamiento farmacológico previo al trasplante supone una depleción absoluta de los órganos linfoides primarios, lo cual puede condicionar la dinámica del virus ya no sólo por la influencia de la elevada inmunosupresión y su efecto sobre la viremia de TTV, sino por el hecho de que los CMSP son el principal nicho replicativo del virus y su depleción puede modificar la cinética del virus respecto al TOS. Por último, en un entorno tan complejo como el trasplante de médula ósea, qué mejor marcador de la capacidad de un organismo para defenderse de los parásitos intracelulares que la cuantificación de un virus en el propio plasma del paciente. Por tanto, el estudio tanto del valor clínico de la cuantificación de la ADNemia de TTV como la dinámica de éste tras el trasplante puede ser de gran utilidad y requiere de un

nuevo esfuerzo diferenciado del TOS (44). Por todo lo dicho, creemos necesario el estudio de la dinámica de TTV en el paciente trasplantado alogénico de médula ósea tanto en el periodo postrasplante temprano como una vez alcanzado el estado de equilibrio dinámico.

Sugerimos, por tanto, que la cuantificación y el estudio cinético de la ADNemia de TTV en el paciente trasplantado, tanto de médula ósea como de órgano sólido, puede ser una herramienta útil para la evaluación de la competencia inmune del paciente y, por tanto, del riesgo de sufrir eventos adversos relacionados con una inmunosupresión excesiva como las infecciones, los síndromes proliferativos o el rechazo del órgano trasplantado, o deficiente como el EICH agudo o crónico.

Objetivos

1. Analizar el comportamiento cinético de TTV mediante la cuantificación del ADN del virus en plasma de pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

Como se ha comentado con anterioridad, las ADNemias de TTV están inversamente relacionadas con la funcionalidad inmune en el paciente sometido a TOS. Sin embargo, por las peculiaridades del trasplante de médula ósea y el hecho de que se considere los CMSP como el nicho replicativo principal del virus, consideramos que la dinámica del virus puede ser diferente a la observada en otros tipos de trasplante y por tanto resulta de interés evaluar lo siguiente:

- a. Estudiar la influencia de la enfermedad hematológica de base en la dinámica del virus, en particular su relación con la carga de ADN de TTV en plasma previa al acondicionamiento farmacológico y en su comportamiento cinético tras el trasplante.
- b. Estudiar el comportamiento cinético de las cargas de ADN viral en el periodo postrasplante, tanto en el periodo de mielosupresión derivado del acondicionamiento farmacológico como tras éste, una vez se ha producido el injerto.
- c. Estudio de la influencia de las variables clínicas sobre la dinámica del virus. En particular el estudio de la influencia del tipo de donante, la fuente de progenitores, la intensidad del tratamiento de acondicionamiento o el tratamiento inmunosupresor empleado para la profilaxis del EICH
- d. Estudio del efecto de aEICH grave en la dinámica de la ADNemia TTV en plasma.

2. Evaluar la utilidad de la monitorización de los niveles de ADN de TTV en plasma inmediatamente después del injerto para predecir el riesgo de infecciones virales como las causadas por CMV y EBV, para cuyo control depende críticamente la reconstitución de la inmunidad T

El periodo comprendido entre los cuatro primeros meses post trasplante es el de mayor incidencia de infecciones por CMV y EBV. Presumiblemente en un primer estadio tras el injerto de las células madre infundidas la reconstitución de la población linfocitaria del paciente posibilitará la replicación de TTV. Por tanto, la viremia de TTV puede estar relacionada tanto con el aumento del recuento absoluto de leucocitos como con su funcionalidad inmune. Con el objeto de dilucidar lo anteriormente expuesto evaluaremos lo siguiente:

- a. Estudiar la asociación entre los parámetros cinéticos derivados de los niveles de ADN en plasma de TTV en función del tiempo, tales como la velocidad de reconstitución viral tras el acondicionamiento, el AUC del virus en los días próximos tras el injerto, la Cmax, o los niveles pretrasplante y la incidencia de infección activa por CMV o EBV, así como si ésta es tributaria de tratamiento con farmacológico.
- b. Estudiar la relación entre el comportamiento cinético de las cargas de ADN de TTV en el plasma de pacientes sometidos a Alo-TPH y las características propias de los episodios de infección activa de CMV o EBV, tales como la duración del episodio, su aclaramiento espontaneo, la aparición de recurrencias o la necesidad de tratamiento farmacológico para su resolución.
- c. Análisis de correlación entre las viremias de TTV con CMV o EBV.
- d. Análisis de correlación de la ADNemia de TTV con el recuento absolutos de linfocitos y leucocitos totales. Así como su relación con linfocitos T CMV específicos productores de interferón gamma.

3. Examinar el comportamiento cinético de las cargas de ADN de TTV en la saliva e investigar si la saliva puede ser una muestra alternativa adecuada al plasma para la monitorización de TTV y con ello poder inferir el grado de reconstitución inmune tras alo-TPH

La capacidad del virus para transmitirse vía respiratoria, como se ha demostrado anteriormente (53-55), hace de la saliva un posible espécimen de utilidad para la monitorización de TTV en el paciente trasplantado. Esto aportaría ventajas obvias frente a la vía parenteral, principalmente por la ausencia de una obtención cruenta de la muestra. Para confirmar la utilidad de la saliva para la monitorización de la dinámica de TTV en el paciente trasplantado estudiaremos los siguientes aspectos:

- a. Estudio de la sensibilidad de la saliva comparada con la muestra de plasma para la detección de ADN de TTV en diferentes tiempos de monitorización, tanto pre- como postrasplante.
- b. Estudio del comportamiento cinético de TTV en la saliva de pacientes trasplantados y análisis comparado de éste con el del virus en muestras de plasma en los cien primeros días tras el trasplante.
- c. Estudio de la relación de TTV en muestras de saliva con los niveles de leucocitos y linfocitos en el marco del trasplante alogénico de médula ósea.

4. Estudiar la dinámica de los niveles de ADN de TTV en plasma de pacientes sometidos a Alo-TPH en el periodo tardío (>día +100) así como su valor clínico potencial como marcador de inmunosupresión.

Resulta predecible que, en un periodo tardío tras el trasplante de médula ósea, el comportamiento dinámico del virus se asemeje más al observado en el TOS y exista, por tanto, una relación inversa entre la viremia de TTV y el grado de inmunidad efectiva. Con el objeto de justificar esta hipótesis evaluaremos los siguientes apartados:

- a. Dinámica de los niveles de ADN de TTV en el plasma de pacientes sometidos a Alo-TPH en el periodo de trasplante tardío, entendiéndose como tal el comprendido a partir del día +100 y el días 365 postrasplante.
- b. Estudio de correlación de TTV con el recuento absoluto de linfocitos en el periodo tardío post trasplante
- c. Estudio del efecto del régimen inmunosupresor y del uso de corticosteroides a altas dosis en la dinámica de la carga de ADN de TTV en plasma en el periodo tardío post trasplante.

5. Estudio del valor clínico de la monitorización de TTV en el ámbito del trasplante de órgano sólido para predecir la aparición de infecciones postrasplante, infecciones oportunistas, neoplasias *de novo* o en general cualquier tipo de reacción adversa atribuible a un nivel de inmunosupresión excesivo.

El estudio de las cargas virales de TTV puede convertirse en una herramienta útil para la monitorización del grado de inmunosupresión en el paciente trasplantado de órgano sólido. Existen diversos autores que han estudiado la relación existente entre una ADNemia baja de TTV y un riesgo elevado de rechazo de órgano trasplantado. Con el fin de evaluar la utilidad clínica de la monitorización de TTV para la prevención de infecciones oportunistas u otros eventos adversos relacionados con la inmunosupresión en el paciente trasplantado de órganos sólido, estudiaremos en una amplia cohorte de pacientes trasplantados de riñón los siguientes aspectos:

- a. Análisis de correlación entre los niveles ADN de TTV en plasma de pacientes trasplantados de riñón y los niveles de linfocitos T y de sus subpoblaciones CD4 y CD8.
- b. Análisis de la asociación entre la carga de TTV en cada uno de los tiempos de análisis y la aparición de efectos adversos relacionados con la inmunosupresión.
- c. Análisis de la asociación entre la magnitud de la carga acumulada de ADN de TTV y la aparición de efectos adversos relacionados con la inmunosupresión.
- d. Análisis cinético de los niveles plasmáticos de TTV en el paciente trasplantado y su asociación con la incidencia de efectos adversos relacionados con la inmunosupresión
- e. Análisis de la relación entre los niveles de ADNemia de TTV y el rechazo del injerto.

Material y Métodos

1. Pacientes

Los diferentes estudios llevados a cabo con cohortes de pacientes sometidos a trasplante hematopoyético son de tipo observacional retrospectivo y monocéntrico. Todos ellos incluyeron pacientes sometidos a alo-TPH en el Hospital Clínico Universitario de Valencia entre los años 2013 y 2016. El estudio que incluyó pacientes sometidos a trasplante de riñón también es monocéntrico y observacional, pero en este caso se trata de un estudio prospectivo llevado a cabo en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid entre los años 2014 y 2016.

El número concreto, las fechas en la que fueron trasplantados los pacientes incluidos en los diferentes trabajos y los días de seguimiento se resumen en la tabla IV-I.

Tabla IV-I. Características metodológicas: Localización, pacientes y seguimiento

Estudio	Localización	Nº de pacientes	Fecha de trasplante	Seguimiento (días)
Albert E. J Clin virol 2017	HCUV	72	Mayo 2013 y noviembre 2015	120
Albert E. BMT 2017	HCUV	71	April 2013 and marzo 2016	120
Albert E. J Med Virol 2018	HCUV	38	Abril 2013 and diciembre 2014.	100
Fernández-Ruiz M. Am J Trasplant 2018	H12OM	221	Noviembre 2014 and diciembre 2016	365
Albert E. Med microbiol Immunol 2019	HCUV	33	Diciembre 2013 and mayo 2016	240

HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia; H12OM: Hospital 12 de Octubre de Madrid.

El conjunto de los datos clínico-demográficos de los pacientes incluidos en cada uno de los trabajos viene detallado en cada una de las publicaciones correspondientes.

2. Muestras de plasma y de saliva

Las muestras de plasma recuperadas para su análisis en los diferentes estudios que aquí describimos fueron criopreservadas a -80°C . Las muestras nunca se habían descongelado previamente.

Para el primer artículo (Albert E. J Clin Virol 2017), que estudió la dinámica de TTV en el paciente sometido a alo-TPH, las muestras de plasma se recuperaron en diferentes tiempos antes y después del trasplante. Específicamente, se cuantificó la carga de ADN de TTV en muestras obtenidas antes del inicio del acondicionamiento (mediana, día -7 ; rango, día -30 a día -6), alrededor del momento del trasplante (mediana, día $+1$; rango, día 0 a día $+7$), y a diferentes tiempos tras este: alrededor del día $+20$ (mediana, día $+21$; rango, día $+12$ a día $+27$), día $+30$ (mediana, día $+34$; rango, día $+25$ a día $+43$), día $+60$ (mediana, día $+60$; rango, día $+49$ a día $+74$) y día $+90$ (mediana, día $+90$; rango, día $+72$ a día $+111$).

Para el segundo trabajo (Albert E. BMT 2017), que estudió la capacidad predictiva de la dinámica de TTV en el periodo temprano tras el trasplante, se utilizaron muestras recogidas en los primeros cuatro meses tras el trasplante, debido a que es el periodo de tiempo en el que ocurren mayoritariamente las infecciones activas por CMV en este grupo de pacientes (46, 47) Concretamente se cuantificó la carga de ADN de TTV en muestras obtenidas el día $+20$ (mediana, día $+20$; rango, día $+14$ a día $+27$), día $+30$ (mediana, día $+31$; rango, día $+25$ a día $+35$), día $+40$ (mediana, día $+41$; rango, día $+35$ a día $+47$) y día $+50$ (mediana, día $+51$; rango, día $+45$ a día $+64$).

En el tercer trabajo (Albert E. J Med Virol 2018), que evaluó la correlación entre las concentraciones de plasma y saliva, se recogieron muestras de saliva y plasma emparejadas antes de Alo-TPH (mediana, día -7 ; rango, días -8 a -4), y en los siguientes tiempos postrasplante: día $+30$ (mediana día $+33$; rango, días

+21 a +38), +50 (mediana día +54.5; rango, días +42 a +64) y +90 (mediana día +90; rango, días +68 a +99).

Respecto a las muestras de saliva, se obtuvieron a primera hora de la mañana (9-10 AM) y fueron conservadas en crioviales estériles mediante el uso de la técnica de babeo pasivo de la saliva entera no estimulada que se acumula en la base de la boca. Esta técnica ha sido detallada con anterioridad (56). Las muestras de saliva visiblemente contaminadas con sangre fueron descartadas. Las salivas fueron criopreservadas a -20 ° C y posteriormente recuperadas para los análisis descritos en este documento. Las muestras no se habían descongelado con anterioridad.

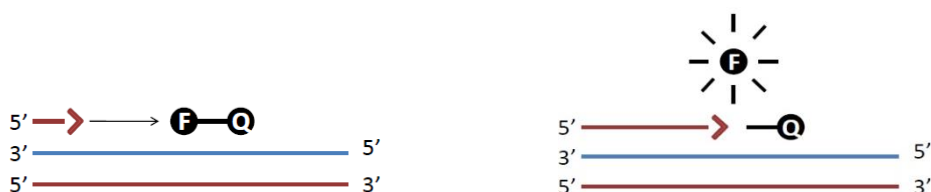
Para el estudio de la dinámica tardía de TTV en el paciente trasplantado (Albert E. Med Microbiol Immunol 2019) se cuantificaron muestras recogidas previamente al trasplante, mediana, día - 7; (rango día - 30 a día - 6) y a diferentes tiempos postrasplante cuya mediana y rango son los que siguen: día + 20 (rango día + 14 a día + 24), día + 30 (rango día + 25 a día + 35), día + 40 (rango día + 35 a día + 46) día + 50 (rango día + 47 a día + 55), día + 60 (rango día + 56 a día + 76), día + 90 (rango día + 78 a día + 97), día + 120 (rango día + 108 a día + 141), día + 150 (rango día + 142 a día + 163), día + 180 (rango día + 166 a día + 202), y día + 210 (día + 203 a día + 256).

Respecto al estudio en el que monitorizamos las cargas de ADN de TTV en pacientes trasplantados de riñón (Fernández-Ruiz M. Am J Transplant 2018) las muestras de plasma se recogieron 6 horas antes del trasplante, el día +7, los meses +1, +3, +6, y +12 postrasplante.

3. Cuantificación de ADN de TTV en las muestras

La cuantificación de la carga de ADN de TTV se realizó por medio de una PCR cuantitativa a tiempo real, previamente descrita(14) utilizando la tecnología TaqMan de Applay Biosystem (PE Biosystems, Foster City, CA, EE. UU). Esta tecnología se basa, de manera resumida, en el uso de sondas adheridas a un emisor de fluorescencia o fluoróforo inhibido por un represor o *Quencher*, donde el fluoróforo será liberado por la propia polimerasa que sintetiza el ácido nucleico

diana y en el que está fijado por complementariedad la sonda de la siguiente manera:



La región amplificada corresponde a un segmento altamente conservado en todas las especies de TTV de la región UTR del genoma viral (57-59).

Los *primers* y la sonda utilizada para la cuantificación del virus son los siguientes:

Tabla IV-II. Descripción de la sonda y los *primers* empleados para la cuantificación de TTV

Sonda y <i>primers</i>	Posición	Secuencia de oligonucleótidos
AMTS Foward	177-194	5' -GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3'
AMTAS Reverse	226-239	5' -AGCCCGGCCAGTCC-3'
AMTPTU TaqMan	205-223	5' FAM- TCAAGGGGCAATTCGGGCT-TAMRA 3'

EL ADN se extrajo a partir de 200 µl de plasma mediante el kit QIAamp DNA blood Mini QIAcube Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), que utiliza la plataforma de extracción “QIAcube platform” (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, en los dos primeros trabajos (Albert E. J Clin Virol 2017, Albert E. BMT 2017). También a partir de 200 µl de plasma, en esta ocasión mediante el kit de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® por medio de la plataforma automática de extracción easyMAG® (bioMérieux, Marcy - l'Étoile, France), siguiendo las instrucciones del fabricante, en los tres últimos trabajos (Albert E. J Med Virol 2018, Fernández-Ruiz M. Am J Transplant 2018, Albert E. Med Microbiol Immunol 2019). La extracción por el método de Qiagen se basa en la capacidad de una membrana de sílice para la adsorción del ADN en unas condiciones iónicas determinadas que se consiguen ajustando el pH mediante una solución tampón. En una primera etapa se facilita la liberación del material genético con el uso de una proteinasa K, una serin-proteasa que se obtiene del hongo *Tritirachium album* para, después, purificar el ADN en un

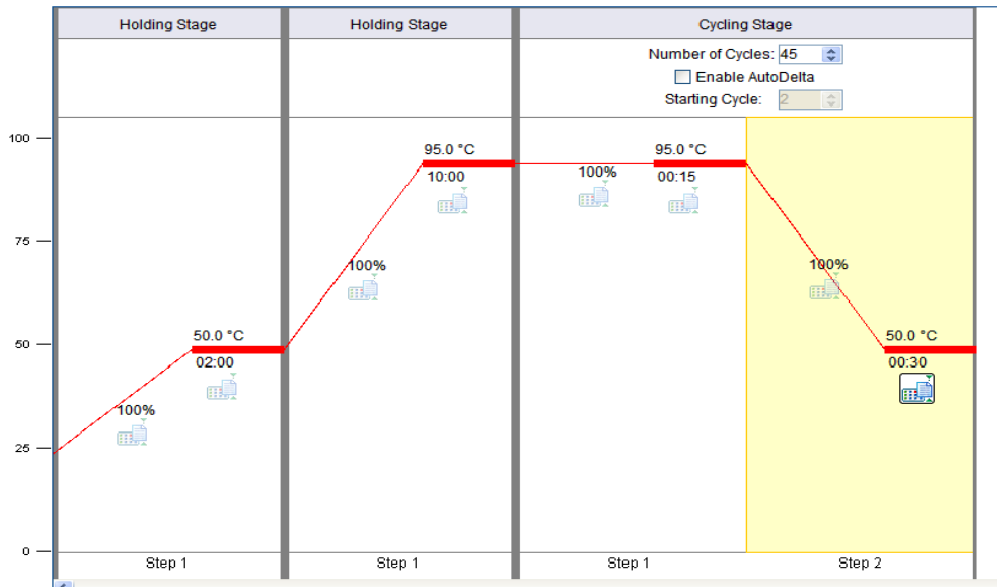
proceso de cuatro etapas secuenciales que someramente se pueden resumir de la siguiente manera: una primera etapa de unión a una membrana de sílice, una segunda y una tercera etapas de lavado y una última etapa de elución. Mediante este método de purificación de ADN se obtiene una media de 6µg de ADN total a partir de 200 µl de plasma en 60 µl de eluido. Por su parte el método de Nuclisens® se basa en la tecnología BOOM que permite la extracción del material genético de manera similar a la técnica explicada con anterioridad, pero en este caso mediante el uso de partículas de sílice magnéticas en lugar de una membrana, de manera que la lisis, fijación, lavados y su posterior elución se realizan en un único pocillo.

Para la amplificación y la detección de estos amplicones de ADN de TTV se empleó el sistema ABI Prism 7500 (PE Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) La metodología empleada para el diseño de esta PCR es el siguiente: Utilizamos 5 µl del eluido resultante del proceso de extracción que se añade a una mezcla previamente elaborada que contiene 20 µl con los siguientes que se exponen en la siguiente tabla:

Tabla IV-III. Detalle de la composición de la mezcla de reacción de la PCR empleada en el ensayo

Componente	Cantidad (µL)
Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystem)	10
Primer AMTS	0,9
Primer AMT-AS	0,9
Probe AMTP	0,04
H2O	8,2

El proceso de amplificación empleado consistió en una PCR en dos etapas repetidas cíclicamente 45 veces. Una primera etapa de desnaturalización (95°C, 15") y una segunda reconocimiento/extensión (50°C, 30"), precedidas ambas por una única etapa de desnaturalización inicial, que consistió en un primer paso de 2 minutos a 50°C y un segundo paso de 95°C durante 10 minutos. Tal y como se describe en la siguiente imagen:



La cuantificación, en número de copias por mililitro de muestra, se obtuvo extrapolando el valor de (*Cycle Threshold*) de cada una de las muestras en una recta de calibrado. La recta de calibrado se calculó mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de un conjunto de estándares de concentración conocida obtenidos por diluciones seriadas 1/10 partiendo de la concentración inicial de 10^6 copias/ml.

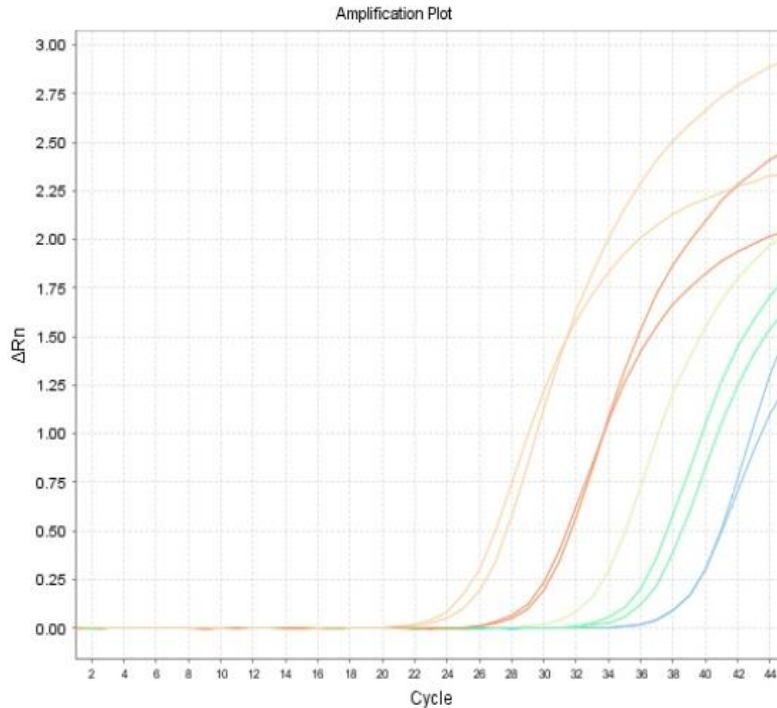


Figura V-I. Curvas de amplificación de correspondientes a una recta de calibrado entre las concentraciones de 10^6 hasta 10^2 copias.

Como estándar utilizamos un plásmido de concentración conocida obtenido mediante *nested* PCR y que contenía la región amplificada con los *primers* AMTS y AMTAS clonada en un PCR 2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) descrito previamente por el profesor Fabrizio Maggi (57) y facilitado por él.

En nuestra experiencia, el límite de cuantificación del ensayo fue de aproximadamente 25 copias / ml y el límite de detección, aproximadamente 10 copias / ml (75% de repetibilidad). A los especímenes con cargas de ADN de TTV indetectables se les asignó un valor de 0 con fines analíticos. Todas muestras de cada paciente fueron analizadas simultáneamente en singletes

4. Recuento de leucocitos y linfocitos totales

La cuantificación de número absoluto de leucocitos, así como de linfocitos totales, se llevó a cabo mediante citometría de flujo usando el FASCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San José, CA), según las prácticas habituales del centro.

5. Monitorización virológica y manejo de la infección por CMV y EBV

La monitorización de las cargas de ADN del CMV se realizó al menos una vez a la semana mediante el kit RealTime CMV PCR (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, como se ha descrito previamente (47, 60). El límite de detección y cuantificación de este ensayo es de 20 copias /ml (95% probabilidad) (60). Se inició un tratamiento antiviral, ya sea con valganciclovir 900mg /12 horas, ganciclovir 5mg/kg /12 horas o con foscarnet 69mg/kg /12 horas, siguiendo una estrategia preventiva de enfermedad por CMV, al detectar 1000 copias/ml (1.500UI/ml) o cuando el tiempo de duplicación de ADN de CMV fue igual o inferior a dos días. El tratamiento se suspendía cuando se producía la negativización de la carga plasmática. El tiempo de duplicación se calcula de manera rutinaria por parte del servicio de microbiología en este tipo de pacientes al inicio de cada episodio de CMV siempre y cuando se cumplan una serie de parámetros cinéticos previamente publicados (61-63). De manera resumida, el tiempo de duplicación se calculó acorde a la siguiente fórmula: $dt = (t_2 - t_1) \times [\ln 2 / \ln(q_2/q_1)]$, donde q_1 y q_2 representan las cargas de ADN de CMV en plasma (copias/ml), en el momento de la primera y la segunda carga positiva, respectivamente, y $(t_2 - t_1)$ el intervalo de tiempo, en días, entre ambas fechas. Sólo en aquellos episodios en los cuales el incremento entre estas dos primeras cargas fue igual o mayor a tres veces fueron considerados para el análisis.

La carga de ADN de EBV se cuantificó una vez por semana mediante el kit artus EBV PCR (distribuido por Abbott Molecular Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Atendiendo a los datos facilitados por el propio fabricante, el límite de detección del ensayo es 108 copias / ml (40 UI / ml) y su rango de cuantificación abarca hasta los 8.3 log₁₀ UI / mL (64). Cuando dos cargas consecutivas excedieron las 1.000 copias /ml se inició una terapia preventiva con rituximab según las prácticas habituales del centro. En algunos casos también se inició el tratamiento con rituximab sin que dos cargas consecutivas excedieran las 1.000 copias /ml a criterio médico, atendiendo éste a motivos clínicos como la co-presentación de aEICH.

6. Monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV

Los linfocitos T CD8 + productores de interferón γ y específicos de CMV en sangre total se cuantificaron por citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur utilizando el Software CellQuest (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA), por medio de una tinción de citoquinas intracelulares (BD FastImmune, Becton, Dickinson and Company, San José, CA, EE. UU.), como se ha detallado previamente (65) (66) De manera somera el proceso consiste en lo siguiente: Utilizamos 500 μ l de sangre total anticuagulada con heparina de sodio. Primero, se estimulan los linfocitos T del paciente mediante la exposición a dos antígenos de CMV altamente inmunógenos, el pp65 y el IE-1 (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania), en presencia de un corrector CD28/CD49 durante 6 horas a 37°C y de Brefeldina A (eBioscience), un inhibidor del transporte proteico. Posteriormente y tras lisar los hematíes mediante una solución de lisis FACS Lysing Solution 10x (BD-Beckton Dickinson, San Jose, CA) se congelan las muestras a -80°C hasta el momento del análisis. Antes de la tinción, tras descongelar las muestras, las células se permeabilizan (Permeabilizing Solution 2, BD-Beckton Dickinson, San Jose, CA) y se tiñen utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluoróforos frente a CD3, CD8, CD69 e INF- γ .

Para la selección de los linfocitos T CD8 productores de INF- γ utilizamos la técnica del “*gating*” mediante la realización de 10.000 mediciones. Se seleccionan en primer lugar las células CD3 y CD8 positivas y de éstas elegimos las CD69 e INF- γ positivas.

El número absoluto de linfocitos T CD8⁺ productores de INF- γ se obtiene de la multiplicación de el porcentaje de este subtipo de linfocitos por el número absoluto de linfocitos CD8. Las respuestas específicas tras la sustracción del *backgound* fueron aquellas superiores al 0,1%.

7. Definiciones

El diagnóstico de enfermedad de injerto contra huésped aguda se diagnosticó y gradó atendiendo a criterios previamente publicados (67). Se consideró que se había producido el *injerto* cuando el paciente alcanzó un recuento absoluto de neutrófilos de 0,5 x 10⁹/L y un recuento de plaquetas de 20 x 10⁹/L. (68)

La infección por CMV se define como el aislamiento del virus, la detección de proteínas virales (antígenos) o la detección de los ácidos nucleicos del virus en cualquier muestra biológica, ya sea un fluido o un tejido corporal. Se define ADNemia como la detección de ADN de CMV en muestra del paciente, como sangre, suero o plasma (69). El diagnóstico probado de enfermedad orgánica por CMV requirió la demostración de la presencia en el del virus en el tejido del órgano en cuestión, mediante el aislamiento del virus, histopatología, inmunohistoquímica, o técnicas de hibridación de ADN, junto con la presencia de síntomas atribuibles a la infección (69).

Se definió el trasplante como no idéntico cuando existía al menos una disparidad en alguno de los 10 sitios HLA de los locus A, B, C o DRB1, según lo determinado por el genotipado de alta resolución tanto en donantes emparentados como no emparentados (70).

Definimos infección oportunista como aquella causada por bacterias intracelulares (*Mycobacterium spp.*, *Listeria monocytogenes* o *Nocardia spp.*), herpesvirus (*Citomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, y *varicella-zoster virus*), poliomavirus (nefropatía asociada a virus BK probada mediante biopsia), levaduras (*Candida spp.* y *Cryptococcus spp.*), hongos (aspergilosis invasiva y mucormicosis), y parásitos (*Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, y *Leishmania spp.*) (71). Tanto la infección fúngica invasiva probable como probada se definió atendiendo los criterios establecidos por *European Organization on Research and Treatment in Cancer and the Mycoses Study Group criteria* (72)

Se definió efecto adverso relacionado con la inmunosupresión (iRAE) a una variable compuesta por la adición de la infección oportunista y/o malignidades de novo postrasplante.(73)

8. Análisis estadístico

Las diferencias entre medias y medianas se compararon mediante el uso de la prueba T- Student o U-Mann-Whitney, respectivamente. Los análisis de correlación entre variables cuantitativas continuas se efectuaron mediante la prueba de Pearson o mediante el análisis de correlación de Spearman,

dependiendo, en ambos casos, de la distribución de los datos (utilizando uno u otro en función de que esta distribución fuera paramétrica o no paramétrica). Para la identificación de los diferentes factores de riesgo para ciertos eventos clínicos se empleó un análisis de regresión de Cox, univariante y multivariante. Las curvas que representan el tiempo hasta el primer evento competitivo se trazaron mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre grupos de incidencia acumulada se compararon mediante el *log-rank-test*. El área bajo la curva (AUC) de valores plasmáticos de ADN de TTV se calculó mediante el método de los trapecios (74). Se informaron los valores de *P* bivariados; se consideró que un valor de *P* era estadísticamente significativo cuando era igual o inferior a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

El orden de exposición de los siguientes resultados atiende en la medida de lo posible el orden de publicación en el que se fueron obteniendo, dado que los resultados de unos trabajos movieron a la realización de los siguientes. En primer lugar, expondré los resultados de los cuatro estudios que incluyeron pacientes sometidos a alo-TPH y posteriormente los resultados del estudio que incluyó pacientes sometidos a trasplante de riñón.

1. Torque teno virus como marcador subrogado de inmunosupresión en el alo-TPH

1.1 Efecto del régimen de acondicionamiento sobre la carga de ADN de TTV en plasma

En primer lugar, estudiamos las cargas de ADN de TTV en plasma en muestras de pacientes obtenidas antes del acondicionamiento farmacológico. Dispusimos del plasma de 55 pacientes, de los cuales 44 (80%) tuvieron cargas de ADN de TTV detectables, 32 (58%) de ellas fueron, además, cuantificables. Las cargas de los 32 plasmas cuantificables estuvieron comprendidas entre el siguiente intervalo, (1,40 – 7,97 log₁₀ copias /ml). No hubo diferencias significativas entre la mediana de las cargas de los diferentes grupos en función de la enfermedad hematológica de base ($P= 0,554$) como se observa en la figura V-I:

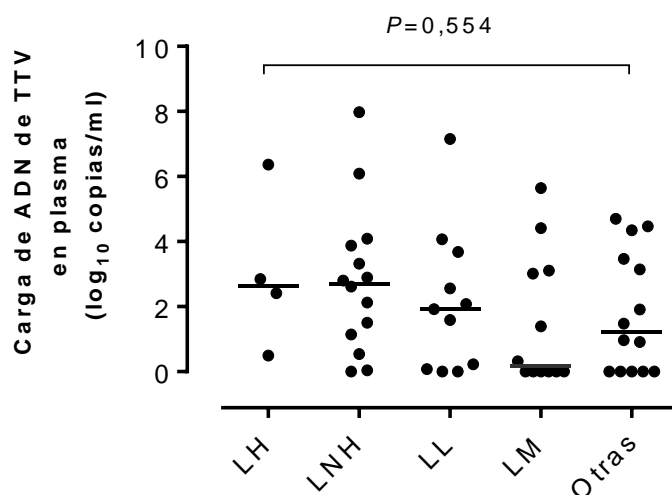


Figura V-I. Cargas de ADN de TTV previas al acondicionamiento en relación con la enfermedad hematológica de base. LH: Linfoma de Hodgkin, LNH: Linfoma no-Hodgkin, LL: Leucemia linfocítica, LM: Leucemia mieloide.

Evaluamos a continuación, el efecto potencial del tratamiento de acondicionamiento en la dinámica de las cargas de ADN de TTV. Con ese fin utilizamos únicamente aquellos pacientes que tuvieran ADNemias de TTV cuantificables en la muestra previa al acondicionamiento. Dispusimos de 12 pacientes con muestras pareadas en el día 0 y previas a éste y 19 pacientes con muestras pareadas pretrasplante y el día +20 postrasplante. La mediana de las cargas pretrasplante y el día 0 y +20 postrasplante respectivamente se muestran en la figura V-II. (Panel A y B):

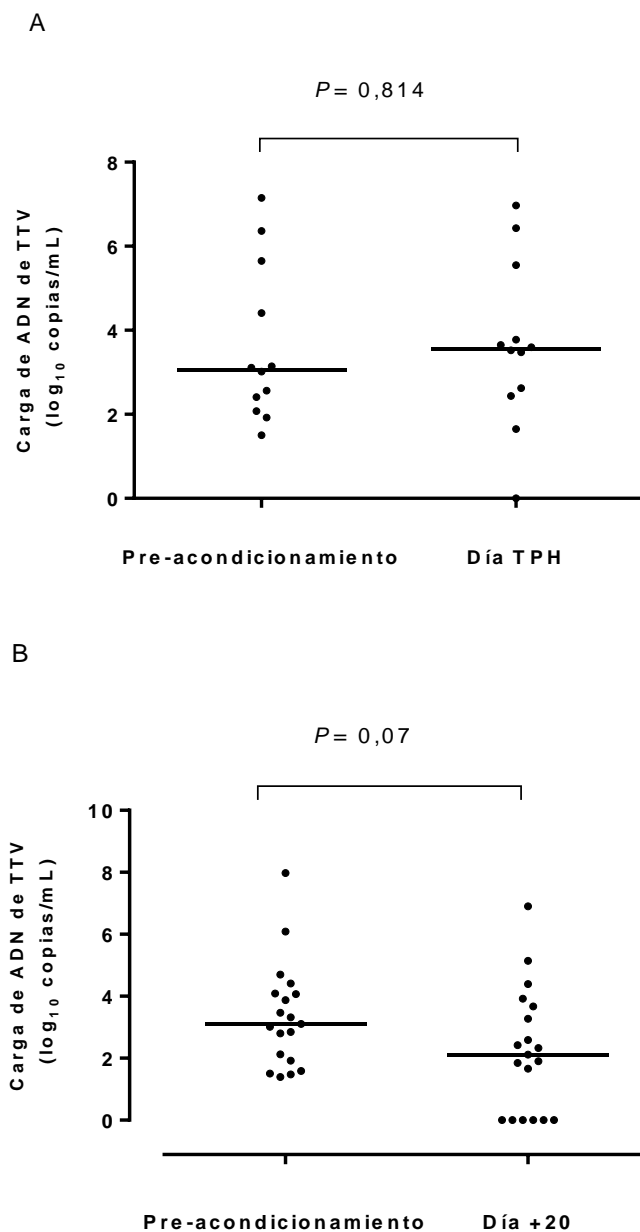


Figura V-II. Efecto del régimen de acondicionamiento en la carga de ADN de TTV en plasma en pacientes sometidos a Alo-TPH. A) Cargas totales de ADN de TTV obtenidas antes del acondicionamiento y el día del trasplante. B) Cargas totales de ADN de TTV obtenidas antes del acondicionamiento y el día +20 tras el trasplante

La mediana de las cargas obtenidas en el día pretrasplante y a tiempo 0 fue comparable mientras que la mediana de las cargas de ADN el día +20 postrasplante fue menor que la obtenida antes del acondicionamiento, aunque la diferencia no alcanzó valores de significación estadística.

La dinámica de la ADNemia de TTV en cada paciente comprendida entre el momento previo al acondicionamiento y el día +20 postrasplante se muestra en la figura V-III:

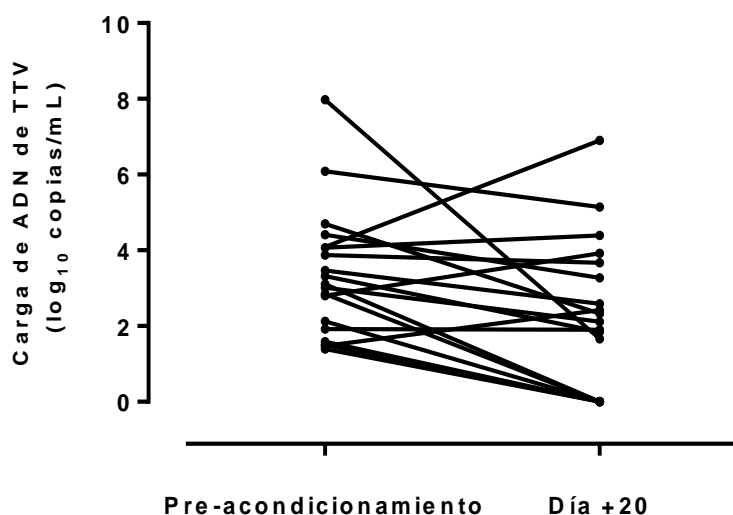


Figura V-III. Efecto del régimen de acondicionamiento en la carga de ADN de TTV en plasma en pacientes sometidos a Alo-TPH. Cinética de la carga de ADN de TTV en el plasma de cada paciente con muestra pareadas obtenidas preacondicionamiento y el día +20 postrasplante.

Como se puede observar, en 15 de los 19 pacientes la dinámica del virus es descendente (mediana 3,11 log₁₀ copias/ml; rango 0,49-7,97 log₁₀ copias/ml), mientras que en los otros cuatro se produjo un incremento de la carga de ADN en plasma, en todos ellos el injerto tuvo lugar antes del día +20 postrasplante. La magnitud de este descenso no se vio influenciada por la intensidad del acondicionamiento ($P=0,22$), como se refleja en la figura V-IV. Sin embargo, el escaso número de pacientes que recibieron un tratamiento de

acondicionamiento mieloablativo no permite obtener conclusiones firmes al respecto.

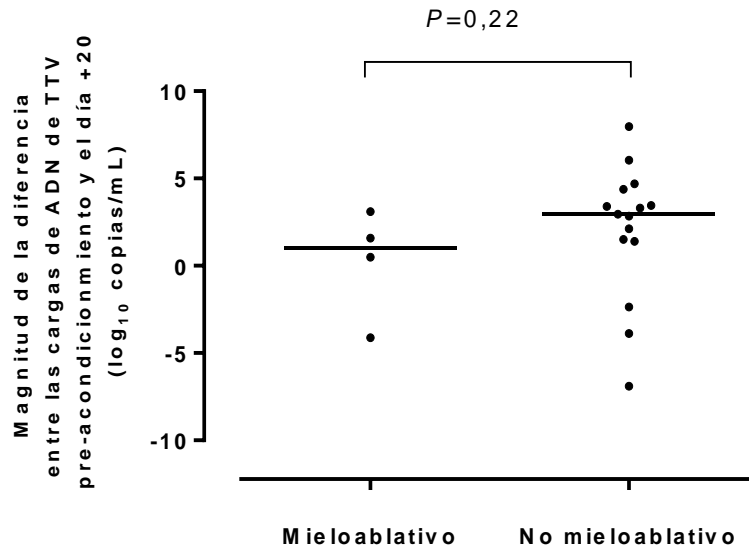


FIGURA V-IV: Diferencia entre la carga de ADN de TTV entre muestras pareadas pre-acondicionamiento y el tiempo +20 del estudio agrupadas en función de la intensidad del tratamiento de acondicionamiento.

Este descenso de las cargas de TTV se vio acompañado por un descenso paralelo del recuento absoluto de linfocitos (RAL) ($P= 0,035$), pero no del recuento absoluto de leucocitos (RALc) ($P=0,69$). Este hecho se ve reflejado en la figura V-V:

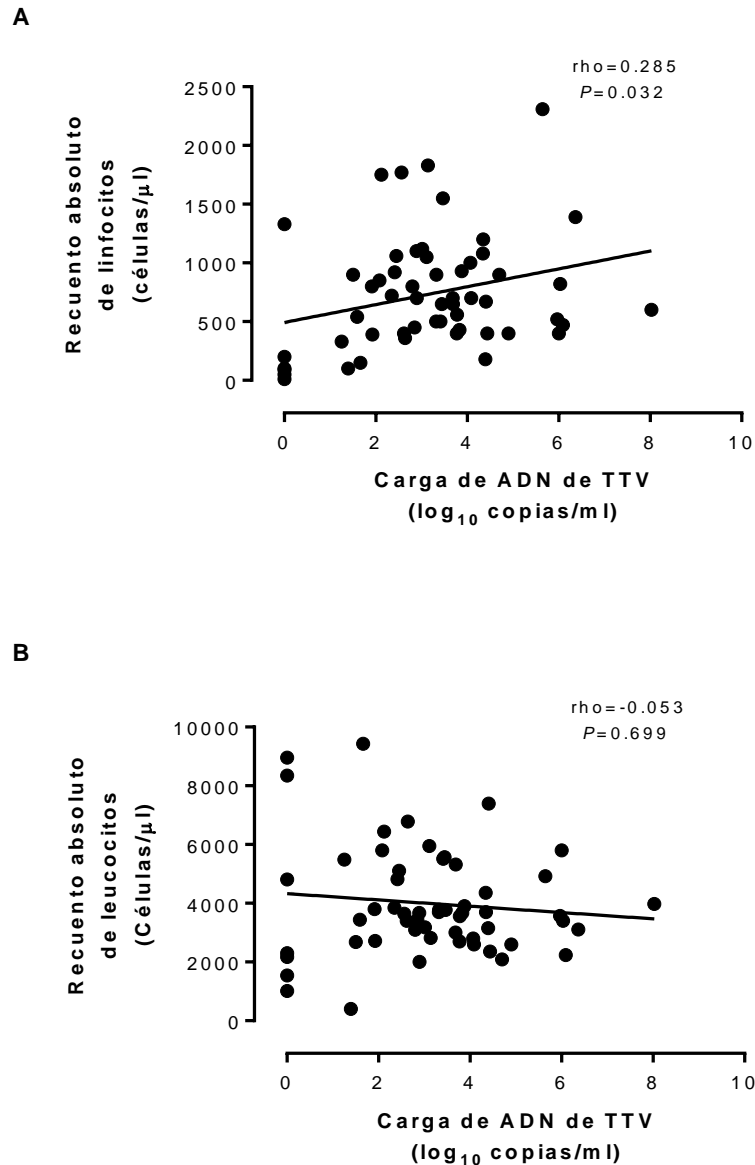


Figura V.V: Correlación entre las ADNemias de TTV en plasma y el recuento absoluto de linfocitos (ALC) (A) y el recuento absoluto de glóbulos blancos (WBC) (B) medidos antes del acondicionamiento y el día +20 después del Alo-TPH.

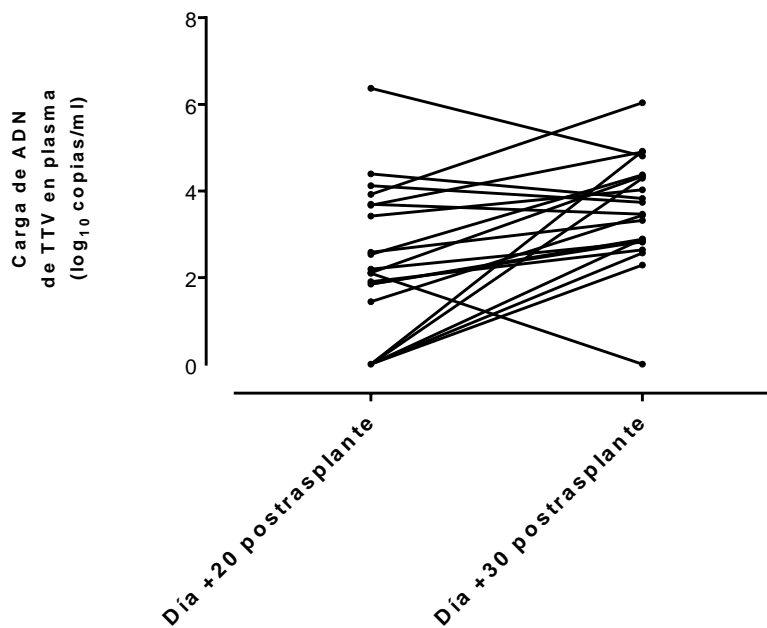
1.2 Dinámica de la ADNemia de TTV en plasma después del injerto

Para investigar la dinámica del virus tras el injerto (la mediana de días tras el trasplante a la que se produjo el injerto en nuestra cohorte fue de 18 días) cuantificamos el ADN de TTV en muestras de plasma de los pacientes aproximadamente en los días +30, +60 y +90 tras el trasplante y las comparamos con la obtenida el día +20 postrasplante. Los pacientes que sufrieron aEICH grave tributario de tratamiento con corticoides (n=18) fueron excluidos de este

análisis con el fin de evitar un posible factor de confusión del tratamiento inmunosupresor.

Dispusimos de un total de 31 pacientes con muestras pareadas entre los días +20 y +30 después del trasplante. Diez de estos pacientes tuvieron las cargas indetectables en ambos puntos. De los 21 restantes, 16 incrementaron la carga de ADN del virus (mediana 3,35 log₁₀ copias /ml; rango 2,29-6,03 log₁₀ copias /ml) (Figura V-VI) (Panel A), mientras que en 5 pacientes hubo un descenso de la carga. Estos últimos cinco pacientes tuvieron cargas el día +20 postrasplante entre 2,09 y 6,76 log₁₀ copias /ml y no mostraron características clínico-demográficas que justificaran esta diferencia. La carga de ADN de TTV el día +30 postrasplante fue significativamente mayor que la del día +20 tras éste (figura V-VI) (Panel B).

A



B

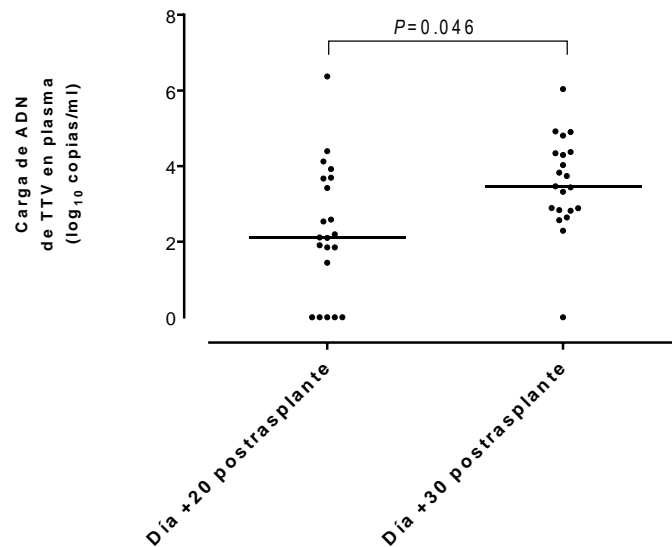


Figura V-VI. A) Dinámica de la carga de ADN de TTV en plasma tras el injerto en pacientes que no desarrollaron EICH agudo grave. B) Mediana de la carga ADN de TTV en plasma, comparación entre los días +20 y +30. Solo se muestran aquellos pacientes con cargas de ADN de TTV cuantificables.

Dispusimos de un total de 27 pacientes con muestras pareadas entre los días +20 y +60 después del trasplante. Un paciente presentó valores indetectables de TTV en ambas muestras. Como se muestra en la figura V-VII se observó un incremento de la carga de ADN de TTV en 22 pacientes (mediana 4,43 log₁₀ copias /ml; rango 1,69–7,90 log₁₀ copias /ml) (Panel A). Se observó un descenso de la carga ADNemia de TTV en los restantes cuatro pacientes. Los cuatro pacientes recibieron un trasplante HLA idéntico. La carga de ADN de TTV se incrementó significativamente entre ambos tiempos (Panel B).

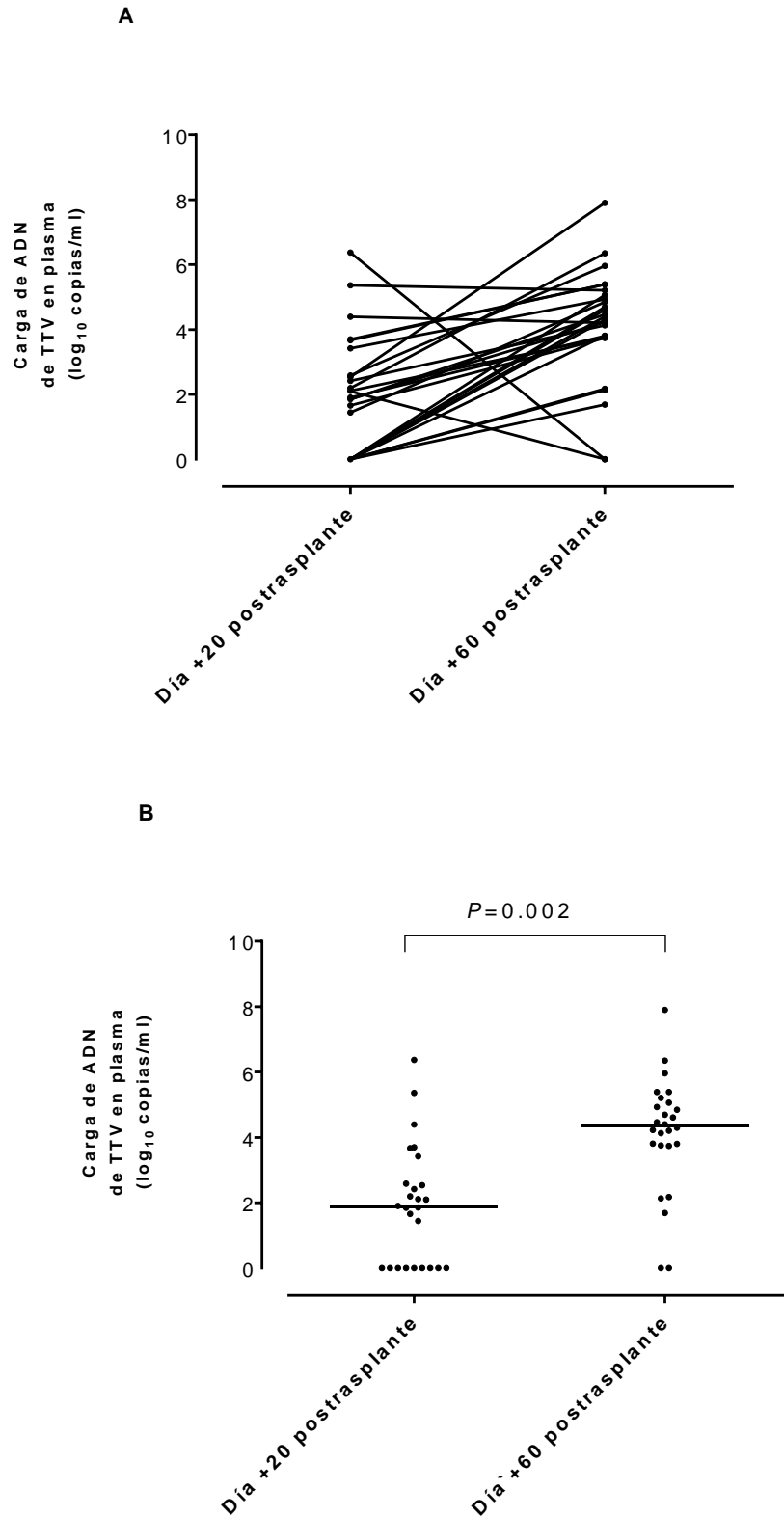
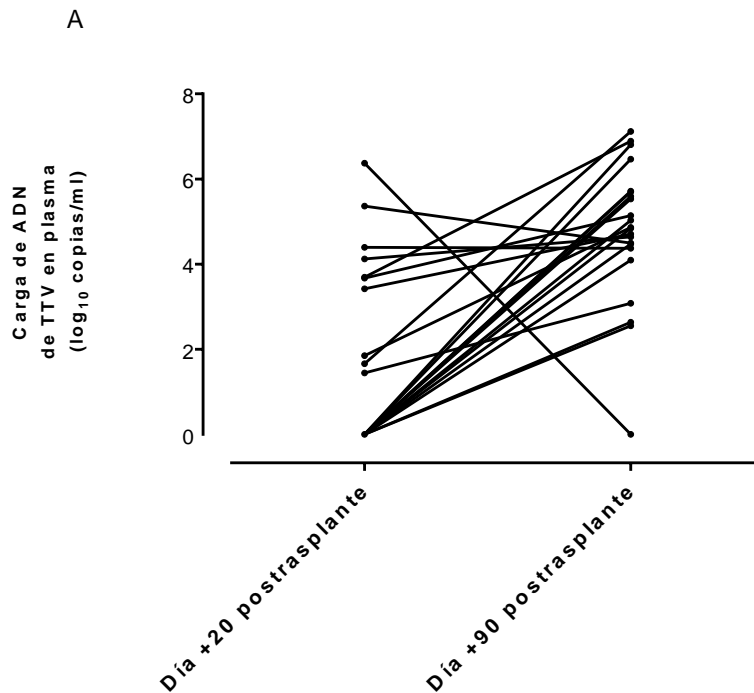


Figura V-VII. A) Dinámica de la carga de ADN de TTV en plasma tras el injerto en pacientes que no desarrollaron EICH agudo grave. B) Mediana de la carga ADN de TTV en plasma, comparación entre los días +20 y +60. Solo se muestran pacientes con cargas de ADN de TTV cuantificables.

Finalmente, dispusimos de muestras pareadas de 23 pacientes obtenidas entre los días +20 y +90 después del trasplante; en todos los casos las cargas fueron cuantificables. De estos 23 pacientes, 19 experimentaron un incremento de la carga (mediana 5,02 \log_{10} copias /ml; rango 2.55–7.12 \log_{10} copias /ml) (figura V-VIII) (Panel A). En cuatro pacientes la dinámica de ADN del virus resultó en un descenso de la carga entre estos dos tiempos. En esta ocasión, estos cuatro pacientes también recibieron un trasplante HLA idéntico. Las cargas de ADN de TTV cuantificadas el día +90 fueron significativamente mayores que aquellas medidas en días +20 (figura V-VIII) (Panel B).



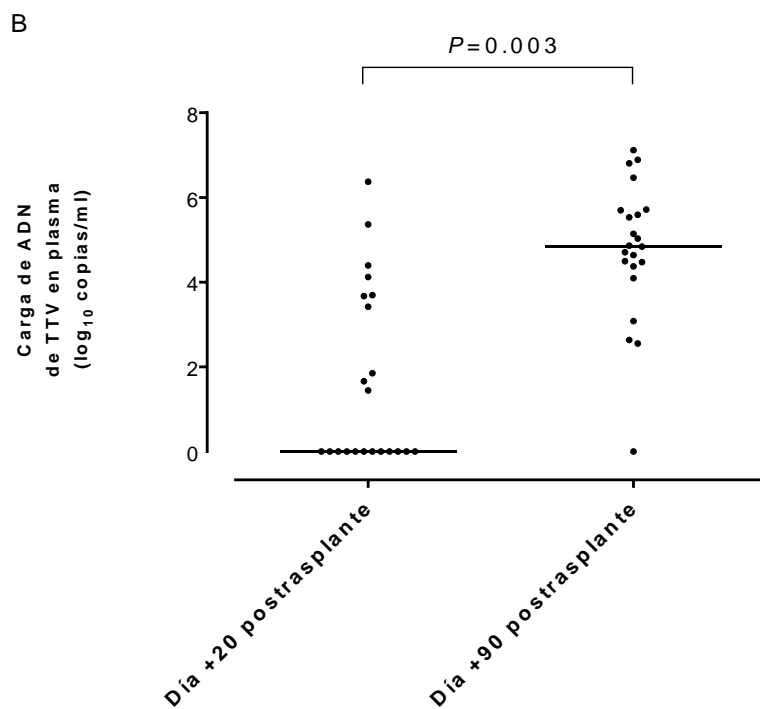


Figura V-VIII. A) Dinámica de la carga de ADN de TTV en plasma tras el injerto en pacientes que no desarrollaron EICH agudo grave. B) Mediana de la carga ADN de TTV en plasma, comparación entre los días +20 y +90. Solo se muestran pacientes con cargas de ADN de TTV cuantificables.

Dispusimos de todos los plasmas correspondientes a los días +20, +30, +60 y +90 tras el trasplante de 22 pacientes. El análisis de correlación de la carga de ADN de TTV en cada uno de los tiempos mostró estar directamente relacionada con el RAL, pero no con el RALc. Aunque no alcanza la significación estadística ($P=0,094$), se observó una clara tendencia. No así para el RALc ($P=0,913$) (Figura V-IX).

Dispusimos de muestras pareadas entre el día +90 y muestras pretrasplante en 21 pacientes. La mediana de la carga de estos 21 pacientes fue significativamente superior el día +90 postrasplante respecto a la mediana de la carga previa al acondicionamiento ($P=0,046$). Este incremento fue independiente del tipo de trasplante, ya fuera emparentado o no emparentado, HLA-idéntico o no idéntico, o del tipo de profilaxis empleada para la prevención de la EICH

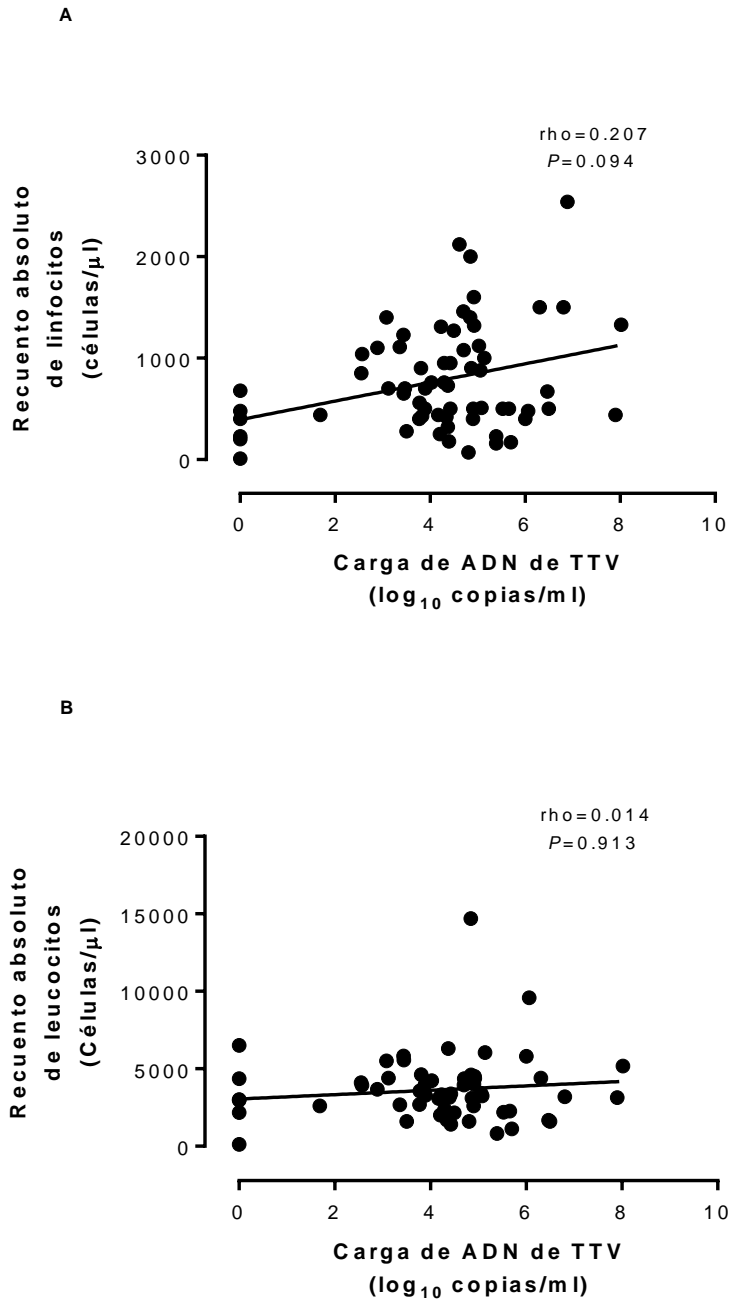


Figura V-IX. Correlación entre las cargas de ADN de TTV y el recuento absoluto de linfocitos (A) y el recuento de glóbulos blancos (B), medidos los días +20, +30, +60 y +90 tras el trasplante

1.3 Efecto del EICH agudo severo en la ADNemia de TTV

Hubo 18 pacientes con aEICH grados II-IV tributario de tratamiento con glucocorticoides a altas dosis, la mediana y el rango de tiempo hasta la aparición de este evento fue de 43,5 (+20, +99) días. Con el fin de evaluar el efecto que produce la aEICH tratada con corticoides a altas dosis sobre la dinámica de TTV,

comparamos las cargas de TTV entre los días +20 y +60 postrasplante de los pacientes de los que dispusimos de muestras pareadas y que sufrieran aEICH grados II-IV entre estos dos tiempos, con aquellos que no presentaran este evento. Las ADNemias de TTV entre los dos tiempos en el grupo con y sin aEICH se muestra en la figura V-X. La ADNemia se incrementó en el grupo con aEICH grado II-IV (mediana 5,93 log₁₀ copias/ml; rango 3.10-6.19 log₁₀ copias/ml) en todos los casos, salvo en uno que disminuyó; En el grupo sin aEICH, en 22 pacientes se produjo un incremento de la carga (mediana 4,43 log₁₀ copias/ml; rango 1.69–7.9 log₁₀ copias/ml), en 5 se produjo un descenso y un paciente tuvo cargas indetectables en ambos tiempos.

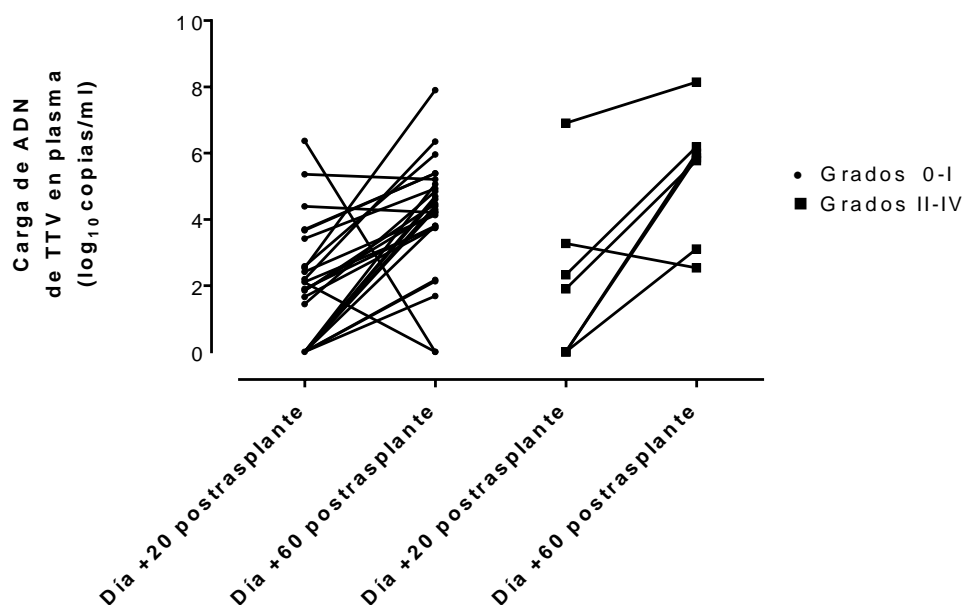


Figura V-X. Cinética de la ADNemia de TTV en pacientes con o sin EICH agudo grave entre los días +20 y +60 después del trasplante.

El incremento de la carga de ADN de TTV entre los días +20 y +60 postrasplante fue mayor en el grupo de pacientes con aEICH grados II-IV que recibieron tratamiento con glucocorticoides a altas dosis que, en el otro grupo, que no requirió tratamiento con corticoides, aunque no alcanzó significación estadística ($P=0,090$) (Figura V-XI). Sólo tres pacientes con aEICH grados II-IV tuvieron muestras pareadas entre el día +20 y +90 postrasplante, dado el escaso valor estadístico por el escaso número de pacientes no realizamos el análisis. Luego evaluamos si la carga de ADN de TTV el día +20 o +30 después del trasplante

permitía anticipar la aparición de aEICH, para ello estudiamos si existían diferencias entre las medianas de la carga de TTV en ambos tiempos entre los pacientes con y sin aEICH. No se hallaron diferencias entre ambos grupos ($P=0,865$ y $P=0,452$, respectivamente).

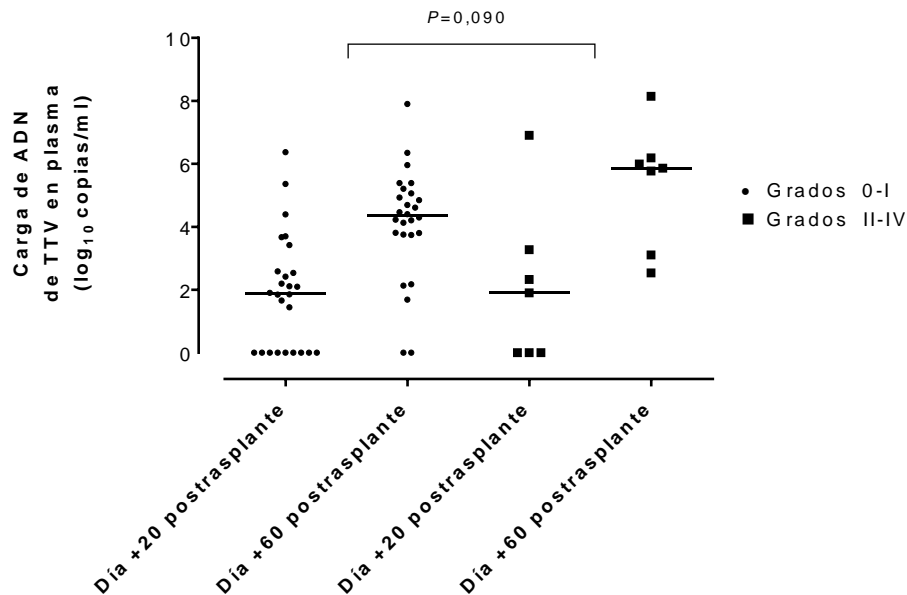


Figura V-XI. Mediana de la carga de ADN de TTV en pacientes con y sin EICHa grave entre los días +20 y +60 postrasplante.

1.4 Cinética de la ADNemia de TTV, e incidencia y características de los episodios de ADNemias por CMV y EBV

Una vez estudiada la dinámica del ADN de TTV en plasma en pacientes sometido a alo-TPH, evaluamos la utilidad de su monitorización, inmediatamente después del injerto, para predecir el riesgo de ADNemias virales por CMV y EBV; para ello analizamos, de manera retrospectiva, las muestras de plasma correspondientes a los días +20, +30, +40 y +50 tras el trasplante de un total de 71 pacientes. 52 de estos 71 pacientes desarrollaron uno o más episodios de ADNemias por CMV, una mediana de 24,5 días tras el trasplante y un rango comprendido entre -7 y 103 días, con una incidencia acumulada de 73,3% [95%IC (66,0-79,3)] en los primeros 120 días. De estos 52 pacientes, 27 (51,9%) desarrollaron episodios de ADNemias por CMV que requirieron tratamiento anticipado con fármacos antivirales. Doce pacientes (23%), experimentaron

recurrencias de ADNemias por CMV con una media y rango de 73 (32-117) días tras el trasplante. Ningún paciente sufrió enfermedad orgánica por CMV.

En el plasma de 34 de estos pacientes se detectó ADN de EBV, en una mediana y rango de 79 (0-175) días tras el trasplante. Su incidencia acumulada fue de 49,1% [IC95% (35,4-60,7)]. Cinco de estos pacientes requirieron tratamiento con rituximab. De estos cinco pacientes, tres tuvieron dos cargas consecutivas superiores a 1.000 copias/ml y los otros dos sufrieron aEICH grado III en el momento de la detección de EBV y se trataron con la primera carga superior a las 1.000 copias/ml. Once (32,4%) pacientes tuvieron recurrencias. La mediana de tiempo y rango a la que ocurrieron estas recurrencias fue 135 (100-160) días. Ningún paciente desarrolló trastornos linfoproliferativos tras el trasplante en el periodo de estudio. Todos los episodios tanto de CMV como de EBV fueron finalmente resueltos, con o sin tratamiento en el periodo de estudio.

Respecto al comportamiento cinético de TTV y su relación con los episodios de ADNemia por CMV o EBV, dispusimos de entre los 71 pacientes de 45 muestras pretrasplante, de las cuales 39 fueron cuantificables. La media y el rango de la carga de ADN de TTV en estos pacientes a este tiempo fue de 2,33 (0-7,97) \log_{10} copias/ml. Todos los pacientes con cargas indetectables (<10 copias/ml), a los que se les asignó el valor 0, tuvieron una o más cargas detectables en alguno de los tiempos posteriores del ensayo. Hubo una correlación positiva entre estas muestras, obtenidas antes del trasplante, con las muestras obtenidas en los tiempos +20 y +30 postrasplante ($P=0,001$ y $P=0,017$ respectivamente).

Observamos que la media del área bajo la curva de valores plasmáticos de ADN de TTV comprendidos entre el día +20 y +30 postrasplante (Figura V-XII) era menor en aquellos pacientes que posteriormente sufrieron un episodio de ADNemia por CMV (media 3,3 \log_{10} copias /ml; rango 0 - 7,62 \log_{10} copias /ml) que en pacientes sin ADNemia (media 4,4 \log_{10} copias /ml; rango 0 - 8,43 \log_{10} copias /ml), aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (Panel A). Sin embargo, la diferencia entre la media del AUC₂₀₋₃₀ de valores plasmáticos de ADN de TTV sí alcanzó significación estadística (Panel B) entre los pacientes con episodios de infección activa tributarios de tratamiento con antivirales

(media: 2,7 log₁₀ copias /ml; rango: 0-7,62 log₁₀ copias /ml), respecto al conjunto de pacientes con episodios de CMV que no requirieron tratamiento con antivirales y aquellos sin ningún episodio de infección activa por CMV (media 4,4 log₁₀ copias /ml; rango: 0-8,43log₁₀ copias /ml). Los pacientes con episodios de CMV previos al día +30 postrasplante fueron excluidos del análisis. Hubo siete pacientes en el grupo que recibió tratamiento con un AUC₂₀₋₃₀ ADN de TTV de cero. De estos siete pacientes, cinco tuvieron carga cuantificable el día +40, los otros dos pacientes se tornaron cuantificables aproximadamente el día +60 tras el trasplante. El incremento en el recuento absoluto de linfocitos entre los días 20 y 30 postrasplante fue menor en estos pacientes que en aquellos con valor del AUC₂₀₋₃₀>0 (datos no mostrados). Ninguno de estos pacientes se trató con ATG y fueron clínicamente heterogéneos (Tabla V-I).

Table V-I. Características clínicas y virológicas de pacientes con AUC₂₀₋₃₀ =0 ADN de TTV en plasma que desarrollaron ADNemia de CMV

Pre-alo-TPH	Carga de ADN de TTV (copias/ml)		UHD	Fuente	Tipo TPH	CMV serostatus	Régimen de acondicionamiento	aGvHD régimen de profilaxis	EICHa	
	Día									
	+40	+50								
25.0	48.2	791.5	AML	PB	R	Id	D+/R+	No mieloablative	CyA/MTX	0-I
19.0	2339.6	4679.2	AML	BM	R	H	D-/R+	No mieloablative	CP/CyA/MMF	II-IV
20.0	0.0	2845.5	AML	PB	R	Id	D+/R+	No mieloablative	CyA/MMF	0-I
132	149.4	2385.4	NHL	PB	R	H	D+/R+	No mieloablative	CP/CyA/MMF	0-I
0.0	0.0	393.1	AML	UCB	U	N-Id	D-/R+	myeloablative	CyA	II-IV
0.0	29737.9	10094512,4	NHL	PB	U	Id	D-/R+	No mieloablative	Tacro/Rapa	II-IV
0.0	0,0	9863.0	AML	PB	R	Id	D+/R+	No mieloablative	CyA/MMF	II-IV

NOTA: aEICH, enfermedad de injerto contra huésped; alo-TPH; trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos; AML, leucemia mieloide aguda; CMV, citomegalovirus; CP, ciclofosfamida CyA, ciclosporin A; D, donante; NHL, linfoma non-Hodgkin's; MTX, metotrexato; MMF, micofenolato de mofetilo; PB, sangre periférica; R, receptor; Rapa, sirolimus; Tacro, tacrolimus; TTV, torque teno virus; UCB, sangre de cordón umbilical; UHD. Enfermedad hematológica de base.

El AUC₂₀₋₃₀ ADN de TTV fue comparable independientemente del tipo de trasplante, o terapia de acondicionamiento empleada, la compatibilidad HLA, D/R CMV seroestatus o el uso de ciclofosfamida o ATG. El pequeño número de trasplantes cuya fuente de precursores hematopoyéticos fue diferente a la sangre periférica (n=2) impidió el análisis.

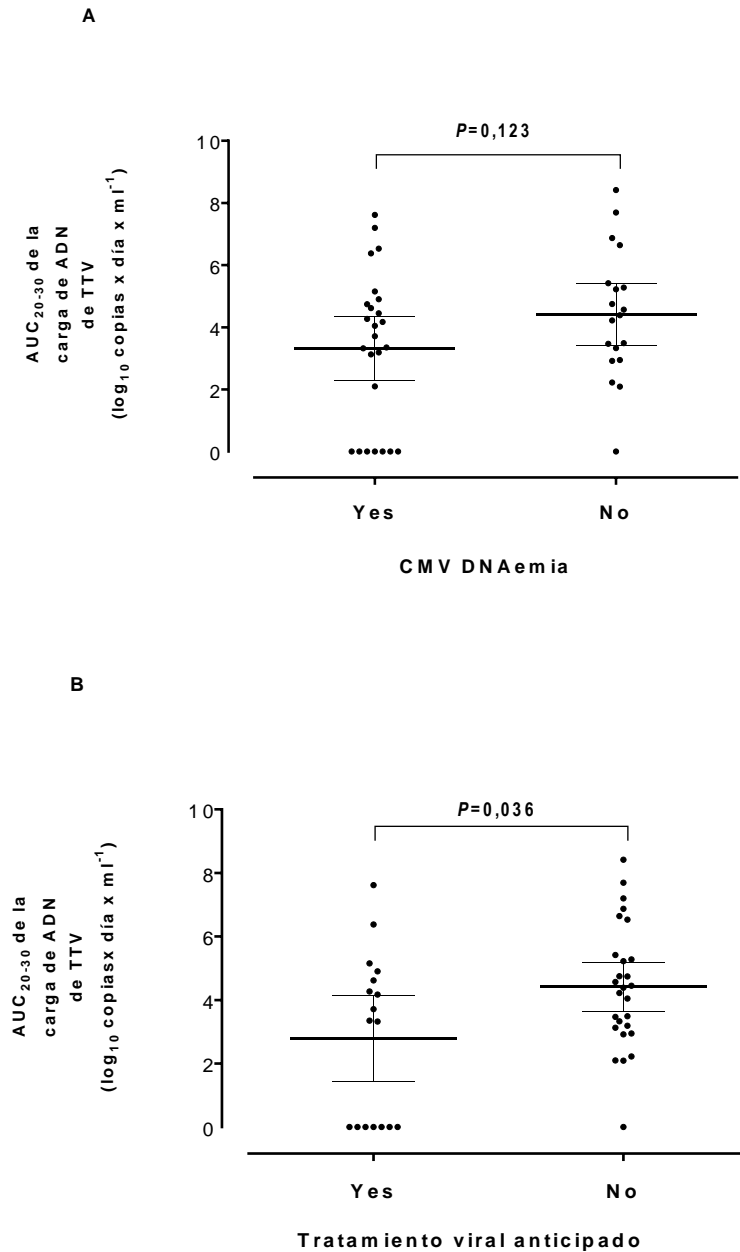


Figura V-XII. Log₁₀ AUC de las cargas de ADN de TTV cuantificadas entre los días 20 y 30 después del trasplante A) en pacientes con y sin ADNemia por CMV posterior al día +30 postrasplante (b). En pacientes con y sin ADNemia que requirió tratamiento antiviral preventivo posterior al día +30 postrasplante. Las barras indican la media y la desviación estándar.

Como se muestra en la figura V-XIII, no observamos una correlación estadísticamente significativa del AUC₂₀₋₃₀, ni con la duración del episodio de CMV (media 51 días; rango 18-153 días), ni con el pico máximo alcanzado por éste (media 3,43 log₁₀ copias/ml; rango 1,72-6,43 log₁₀ copias/ml). Sin embargo, sí se objetivó una tendencia hacia una correlación inversa entre ambos parámetros.

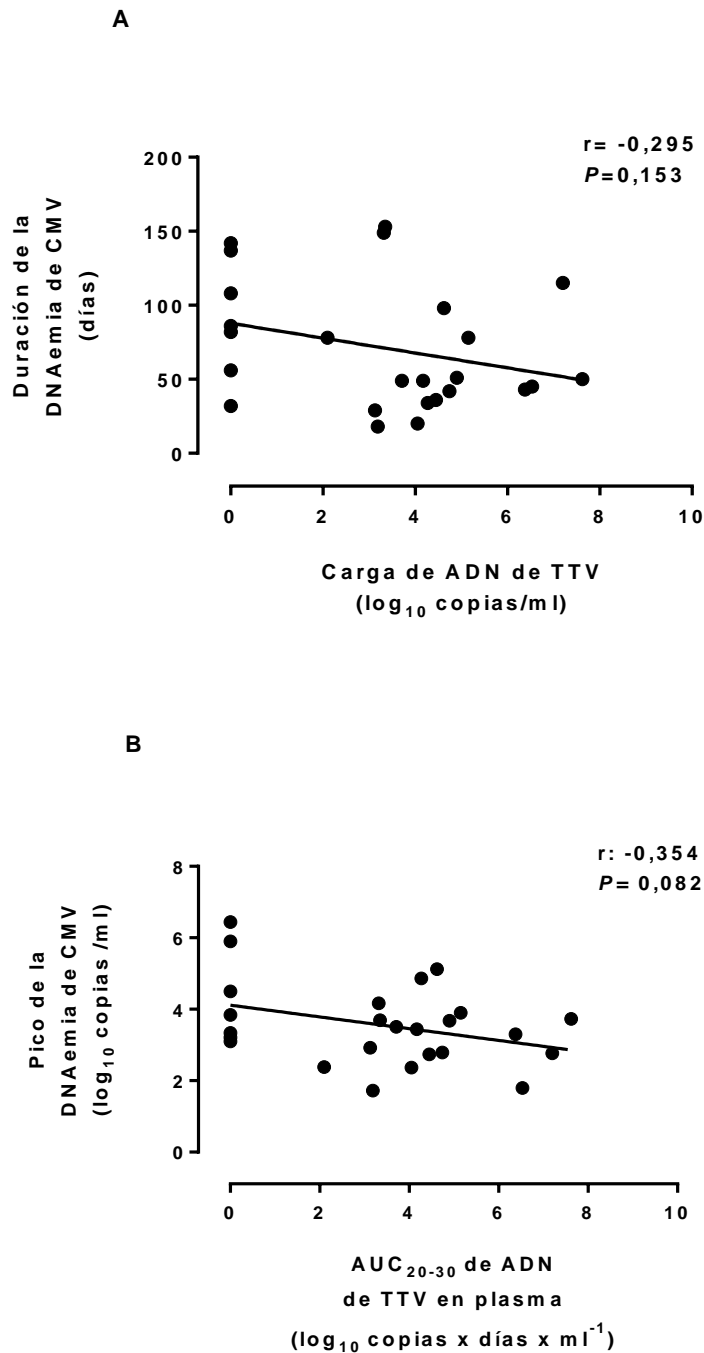


Figura V-XIII. Correlación entre el \log_{10} AUC de las cargas de ADN de TTV entre los días 20 y 30 tras el trasplante y A) La duración de la ADNemia de CMV B) El pico de la carga de ADN de CMV durante el primer episodio

Dado que el tratamiento inmunosupresor que requiere la aEICH grados II-IV puede modificar los niveles plasmáticos de TTV, estudiamos si esta incidencia era comparable entre los pacientes con y sin ADNemia por CMV, tanto si estos episodios eran tributarios de tratamiento antiviral o no lo eran. Observamos que ambos grupos eran comparables ($P=0,363$ y $P=0,714$ respectivamente).

A continuación, mediante una curva ROC (Figura V-XIV) ($P=0,07$), establecimos un valor de AUC_{20-30} de ADN de TTV con el fin de discriminar entre pacientes que posteriormente sufrirán o no ADNemias de CMV que requerirán tratamiento con antivirales. El valor que seleccionamos fue $2,8$ copias \times días \times mL^{-1} . Once pacientes tuvieron valores de AUC_{30-20} de TTV inferiores a $2,8$ copias \times días \times mL^{-1} ; de estos, siete tuvieron ADNemias de alto nivel que requirieron tratamiento con antivirales, mientras que 23 de 33 pacientes con $AUC_{20-30} > 2,8$ copias \times días \times mL^{-1} no desarrollaron este tipo de ADNemia. Atendiendo a estos resultados, el valor predictivo de un $AUC_{20-30} < 2,8$ copias \times días \times mL^{-1} para sufrir el evento en cuestión es de 64%, mientras que un $AUC_{20-30} > 2,8$ tiene un valor predictivo de protección del 70%.

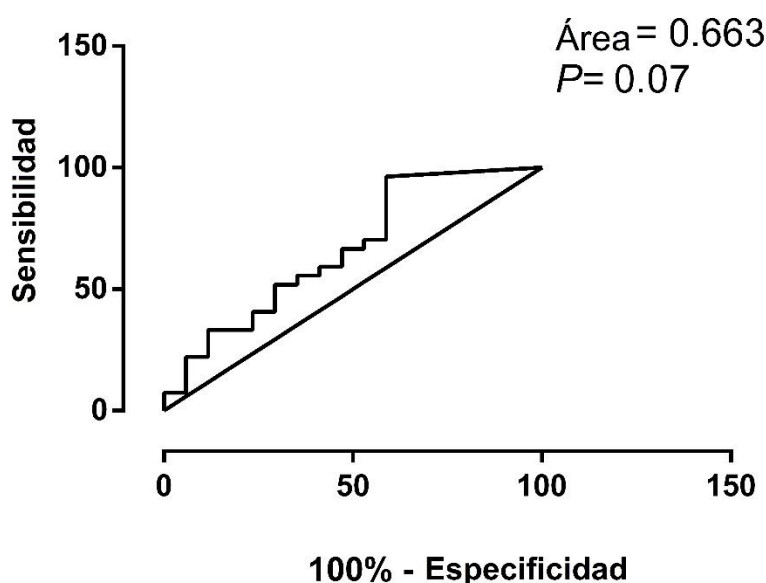


Figura V-XIV. Curva de características operativas del receptor (ROC) para evaluar la sensibilidad y especificidad generales del área bajo la curva (AUC) para el \log_{10} de las cargas de

ADN de TTV cuantificadas entre los días 20 y 30 tras el trasplante con el fin de discriminar entre pacientes con y sin episodios de ADNemia de CMV que requieran tratamiento antiviral anticipado.

Introdujimos este valor en un análisis univariante de regresión logística para evaluar su asociación con ADNemia por CMV de alto nivel y encontramos una asociación estadísticamente significativa. Esta misma asociación también se encontró con la serología de CMV (Donante negativo/Receptor positivo). Sin embargo, ambas asociaciones perdieron la significación estadística en el análisis multivariante. Tabla V-II

Tabla V-II. Factores de riesgo para la ADNemia por CMV que requieren terapia antiviral preventiva

Variable	Univariante		Multivariante	
	OR (IC95%)		OR (IC95%)	<i>P</i> valor
AUC₂₀₋₃₀ ≤ 2.8 de ADN de TTV en plasma	4,02 (0,96–16,91)	0,05	5,94 (0,91–38,97)	0,06
Tipo de trasplante				
HLA idéntico vs no idéntico	1,45 (0,51–4,13)	0,48	-	-
Relacionado vs no relacionado	0,73 (0,27–1,92)	0,52	-	-
Régimen de acondicionamiento				
Mieloablativo vs no mieloablativo	1,62 (0,48–5,50)	0,46	-	-
Con ATG vs sin ATG	1,79 (0,23–13,54)	0,57	-	-
aEICH Grado 0-I vs III-IV	2,18 (0,76–6,30)	0,14	-	-
Seroestatus CMV				
D+/R+ (referencia)				
D-/R+	3,59 (1,07–12,00)	0,04	5,94 (0,90–38,97)	0,06
D-/R-	0,43 (0,04–4,06)	0,46	-	-
D+/R-	0,71 (0,127–4,05)	0,25	-	-

OD: Odds Ratio; AUC: Área bajo la curva; ATG: Timoglobulina; CMV: Citomegalovirus; D/R: Donante/Receptor.

Por el contrario, no se encontró asociación entre el \log_{10} del AUC₂₀₋₃₀ del recuento absoluto de linfocitos y la aparición de ADNemia de CMV de alto nivel ($P=0,156$), aunque el grupo que desarrollaría posteriormente ADNemias de CMV tributarias de tratamiento sí tuvo valores absolutos de linfocitos más bajos (media 3,4 células x día x μl^{-1}) respecto al otro grupo (media 4,4 células x día x μl^{-1}) ($P=0,156$). Como se muestra en la tabla V-III, no encontramos relación entre la carga de ADN TTV pretrasplante o los días +20 o +30 postrasplante con la posterior aparición de episodios de infección activa de CMV que requirieran tratamiento. Tampoco se halló ninguna asociación entre el AUC₂₀₋₃₀ de ADN en plasma de TTV y la aparición ADNemia recurrente por CMV ($P=0,247$).

Tabla V-III. Cargas de ADN de TTV en plasma antes y después del trasplante en relación con la aparición de ADNemia de CMV en pacientes receptores de aloTPH.

		Carga de ADN de TTV (\log_{10} copias/ml)								
		Pre - alo-TPH			Día +20 post-alo TPH			Día +30 post-alo TPH		
		No	Mediana	P-	No	Mediana	P-	No	Mediana	P-
		(rango)			(rango)			(rango)		
		valor			valor			valor		
CMV	S	35	1,51(0,00	0,82	27	1,89(0,00	0,24	25	2,48(0,00	0,28
	ADNemia	í	-7,97)		19	-9,00)		19	-5,67)	
	N	10	2,00(0,00		27	2,52(0,00		27	3,27(0,00	
	o		-6,09		-6,91)		-7,76)			
CMV	S	17	2,12(0,00	0,25	19	1,85(0,00	0,21	17	2,35(0,00	0,08
	ADNemia	í	-7,97)		27	-9,00)		27	-5,67)	
	de alto	N	28		1,22(0,00	27		2,41(0,00	27	
nivel	o		-7,97		-6,91)		-7,76)			

Alo TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos; CMV Citomegalovirus

Investigamos a continuación si el AUC₂₀₋₃₀ o el AUC₂₀₋₅₀ de ADN de TTV en plasma se asociaba con la aparición posterior de episodios de ADNemia de EBV. Este nuevo intervalo temporal se eligió porque la mayoría de los episodios de EBV ocurren después del día +50 tras el trasplante. Excluimos del análisis a 8 y 4 a pacientes que sufrieron episodios de EBV previos al día +50 o +30, respectivamente. Como se ve en la tabla V-IV, la media del AUC₂₀₋₃₀ o AUC₂₀₋₅₀ de ADN de TTV en plasma fue comparable en los pacientes con o sin episodios posteriores de EBV, independientemente de que estos episodios requirieran de

tratamiento con rituximab. ($P=0,52$ y $P=0,98$ para AUC_{20-30} y AUC_{20-50} respectivamente). Tampoco se hallaron diferencias entre la media de las AUC atendiendo al hecho de que estos pacientes sufrieran o no episodios recurrentes de EBV.

Tabla V-IV AUC de la carga de ADN de TTV entre los días 20-30 y 20-50 en relación con la aparición de ADNemia de EBV en pacientes receptores de aloTPH

	AUC ₂₀₋₃₀ de ADN de TTV		AUC ₂₀₋₅₀ de ADN de TTV	
	en plasma		en plasma	
	Media (rango) copias × días ×mL ⁻¹	<i>P</i>	Media (rango) copias × días ×mL ⁻¹	<i>P</i>
EBV ADNemia	Sí	3,93 (0-7,62)	6,67 (4,18-8,62)	0,315
	No	4,47 (0-9,85)	7,10 (0-9,90)	

Alo TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos; AUC: Área bajo la curva; EBV Virus de Epstein-Barr

1.5 Interacción entre CMV y TTV

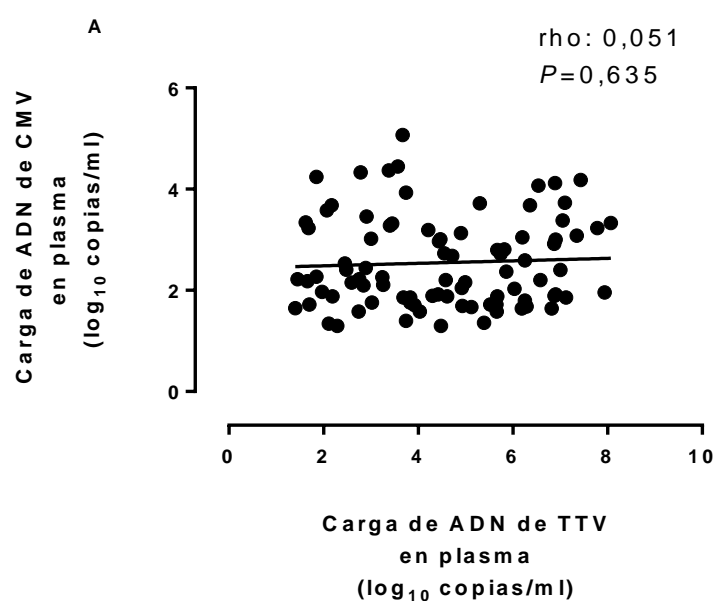
Nos preguntamos a continuación si la ADNemia de CMV influía en la dinámica de la ADNemia de TTV. Con ese fin comparamos la evolución entre los días 20-40 y 20-50 de aquellos pacientes con episodios de CMV que se iniciaron entre estos dos tiempos con aquellos pacientes sin episodios de CMV. Todos aquellos pacientes con ADNemias de CMV previas al día 20 o cuyo inicio fue posterior al día 50 fueron excluidos del análisis. No encontramos diferencias significativas en ambos análisis ($P=0,461$ y $P=0,748$), lo cual indica que, aparentemente, la ADNemia de CMV no tiene influencia en la cinética de TTV. En esta misma línea, y tal y como podemos comprobar en la siguiente tabla, no hubo diferencias significativas en la mediana del AUC de niveles plasmáticos de ADN de TTV entre los tiempos 20 y 30 en aquellos pacientes con ADNemias de CMV que se iniciaron antes del día 30.

Tabla V-V. Área Bajo la Curva (AUC)₂₀₋₃₀ de niveles plasmáticos de ADN de TTV atendiendo a la ADNemia de CMV

ANDemia de CMV de inicio previo al día +30 postrasplante	Nº de pacientes	AUC ₂₀₋₃₀ de AND de TTV en plasma mediana copias x días x ml ⁻¹ (rango)	P valor
Sí (27)		4,57 (0,00-9,85)	0,190
No (44)		3,79 (0,00-8,42)	

AUC: Área bajo la curva; CMV: Citomegalovirus

Además, no encontramos correlación entre las cargas de ADN de TTV y CVM independientemente de si excluíamos o no del análisis aquellas cargas de TTV indetectables, véase figura V-XV (Panel A y B)



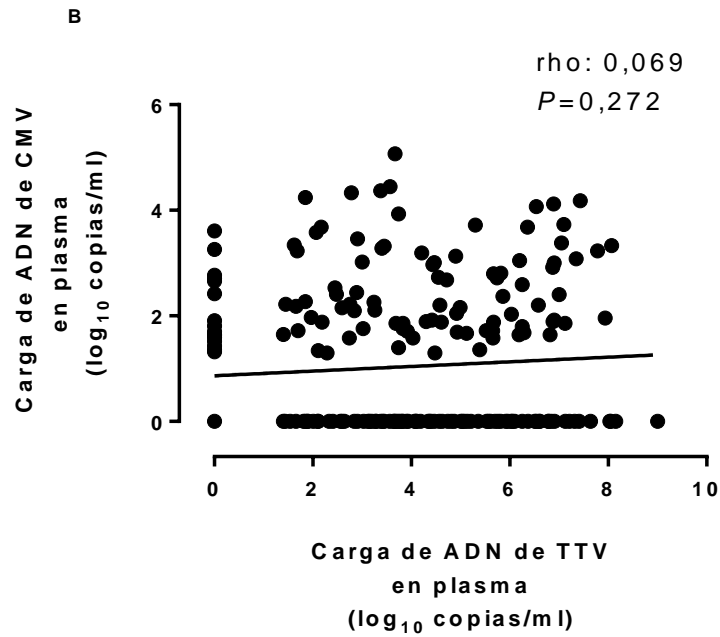


Figura V-XV. Correlación entre las cargas de ADN de TTV y CMV A) En muestras de plasma positivas para ambos virus por PCR, A) En todas las muestras incluidas las que dan negativo para TTV, CMV o ambos.

1.6 Cinética de la carga de ADN de TTV en plasma y reconstitución temprana de inmunidad T CMV específica

Lo siguiente que evaluamos fue la asociación entre la cinética del ADN de TTV en plasma y la reconstitución temprana de inmunidad T CMV-específica. Para ello analizamos la correlación entre el AUC₂₀₋₃₀ de ADN de TTV en plasma con los linfocitos T CMV específicos productores de interferón γ . Para este análisis dispusimos de datos de inmunidad específica de 21 pacientes. Ninguno de ellos tuvo episodios de CMV previos. Aunque no fue estadísticamente significativa, sí vimos una tendencia que indicaba una correlación directa entre ambas variables. (Figura V-XVI)

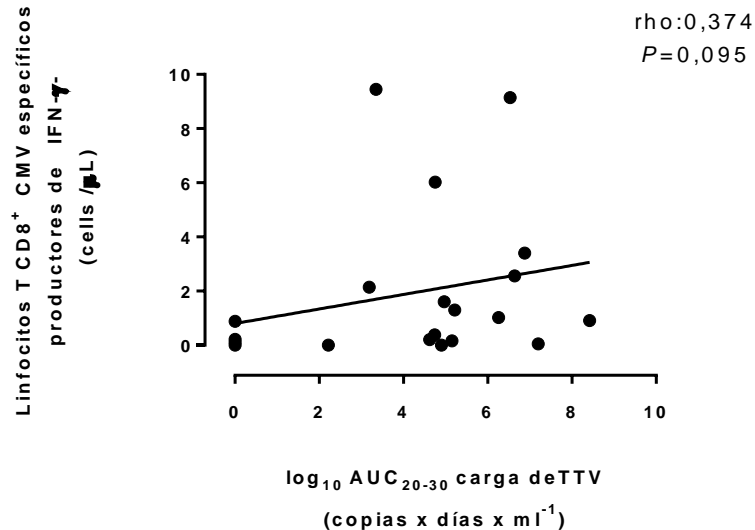


Figura V-XVI. Correlación entre el log₁₀ del AUC de TTV cuantificado entre los días 20 y 30 tras el trasplante y los niveles de células T CD8⁺ específicas frente a los antígenos pp65/IE1 de CMV productoras de interferon γ .

1.7 Detección de ADN de TTV en muestras pareadas de saliva y plasma

A continuación, evaluamos el comportamiento cinético de las cargas de ADN de TTV en la saliva e investigamos si ésta puede ser una muestra alternativa al plasma para la monitorización de TTV.

Obtuvimos un total de 104 muestras pareadas distribuidas de la siguiente manera: de nueve pacientes dispusimos de las cuatro muestras, once pacientes sólo pudieron recoger tres de las cuatro muestras, diecisiete pacientes dos muestras y de un paciente se dispuso únicamente de una muestra. Así pues, obtuvimos muestras pareadas de un total de 23, 24, 32 y 25 pacientes en los tiempos, pretrasplante y los días +30, +50 y +90 postrasplante respectivamente. Los resultados de la cuantificación de ADN de TTV tanto en plasma como en saliva en cada uno de los tiempos de análisis se muestra en la tabla V-VI. Se detectó ADN de TTV en saliva en el 94,2% de las muestras mientras que en plasma sólo en el 86,5%. Esta diferencia fue máxima (83,3% vs. 66,7%) en el tiempo de muestreo más próximo al injerto (día +30). En detalle, el ADN de TTV fue detectable en ambas muestras en 88 casos, solamente en saliva en 10

casos, únicamente en plasma en 2 casos y fue negativa en ambas muestras en 4 casos.

Tabla V-VI. Detección y cuantificación de ADN de TTV en muestras de plasma y de saliva emparejadas en receptores de Alo-TPH

Tiempo de muestreo (Nº de muestras pareadas)	Tipo de muestra	ADN de TTV detectable (SI/NO)	Log₁₀ carga de ADN de TTV copias/ml (media, rango)	Log₁₀ del ALC células/ml (media, rango)
Pretrasplante (23)	Saliva	23/0	5,1 (2,0-8,4)	2,9 (2,0-3,26)
	Plasma	20/3	2,6 (0,0-8,0)	
Día +30 (24)	Saliva	20/4	4,0 (0,0-8,6)	2,7 (0,0-3,39)
	Plasma	16/8	2,9 (0,0-7,8)	
Día +50 (32)	Saliva	30/2	4,7 (0,0-8,6)	2,9 (2,48-3,67)
	Plasma	30/2	4,6 (0,0-8,0)	
Día +90 (25)	Saliva	25/0	6,1 (1,4-9,4)	2,9 (2,04-3,79)
	Plasma	24/1	4,7 (0,0-8,0)	

Alo TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos

1.8 Cinética de la carga de ADN de TTV en muestra de plasma y saliva

Después estudiamos la dinámica comparada del ADN de TTV en saliva y plasma de los pacientes (Figura V-XVII). La media de las cargas de ADN de TTV fue incrementándose desde el día + 30 hasta el día +90 tanto en plasma como en saliva. En el caso particular de la saliva sólo la media de la carga del día +90 fue superior a la previa al trasplante, mientras que, en el caso del plasma, la carga del día +30 ya alcanzó valores superiores a los determinados previamente al trasplante. Sin embargo, tal y como se muestra en la figura V-XVIII, la media de las cargas en saliva fue significativamente mayor que en plasma.

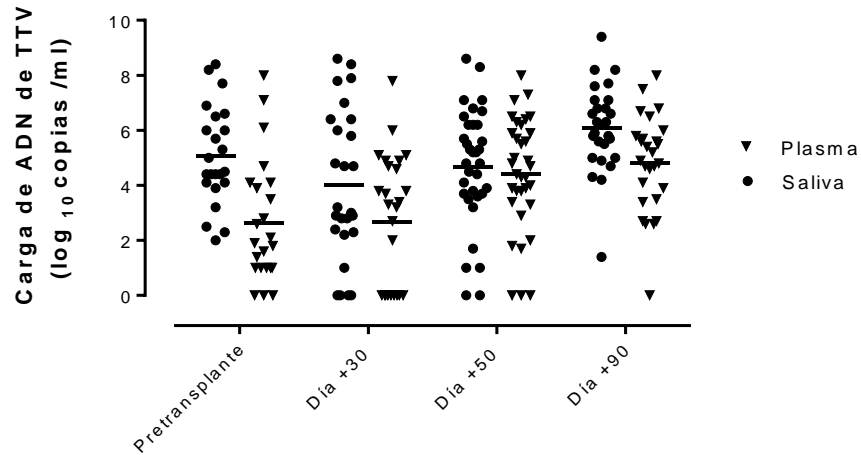


Figura V-XVII. Cinética comparada de las cargas de ADN en plasma y saliva en muestras pareadas en receptores de alo-TPH. Las barras indican los valores medios

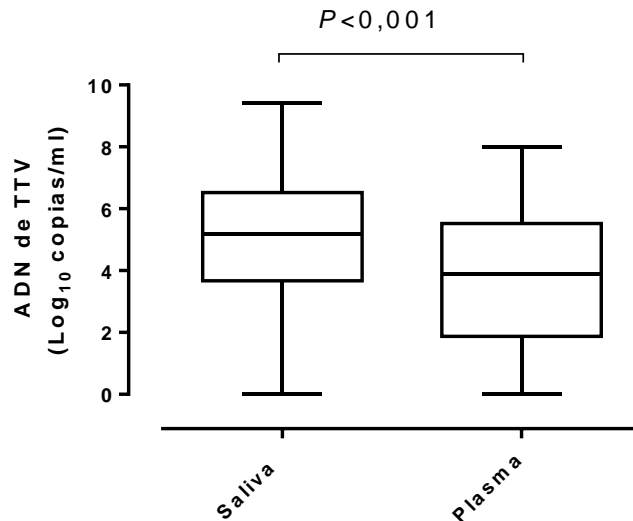


Figura V-XVIII. Comparación de las cargas de ADN de TTV en plasma y saliva

Observamos una correlación entre la carga de ADN de TTV en plasma y saliva que, aunque modesta ($r=0,507$), fue claramente significativa. Cuando realizamos este mismo análisis de manera diferenciada en cada uno de los tiempos de muestreo, vimos que la mejor correlación, tal y como se muestra en la figura V-XIX, fue la observada en el día +30.

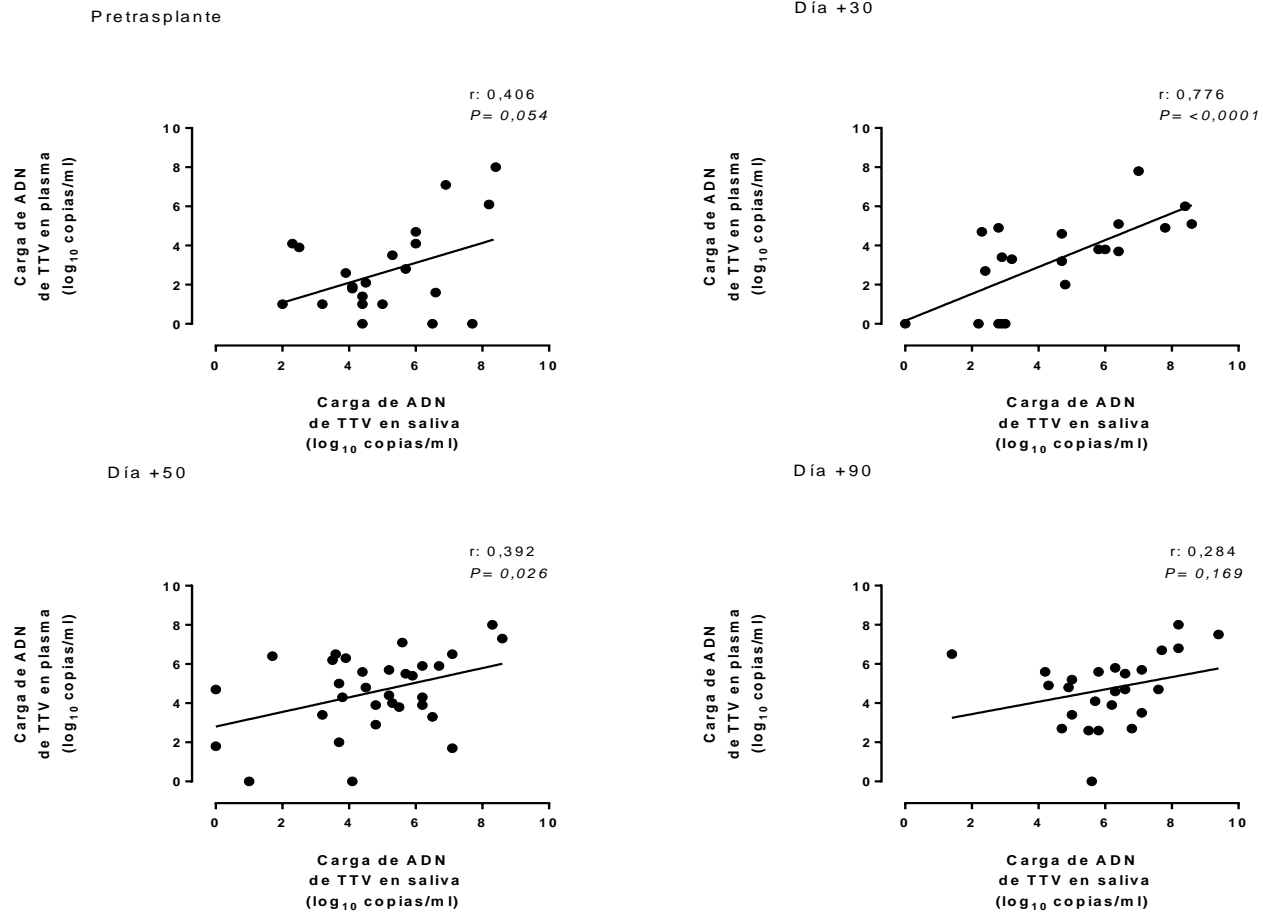


Figura V-XIX. Correlación entre las cargas de ADN de TTV cuantificadas en muestras de saliva y plasma pareadas en diferentes tiempos tras el alo-TPH.

1.9 ADN de TTV en saliva y repoblación linfocitaria

Por último, analizamos la correlación entre las cargas de ADN de TTV y el recuento absoluto de linfocitos. Observamos que el incremento de las cargas de TTV descrito desde el día +30 y hasta el día +90 vino acompañado de un incremento del RAL en el día +30 y +50 postrasplante. No ocurrió lo mismo el día +90, donde el RAL permaneció invariado respecto al día +50 (Figura V-XX).

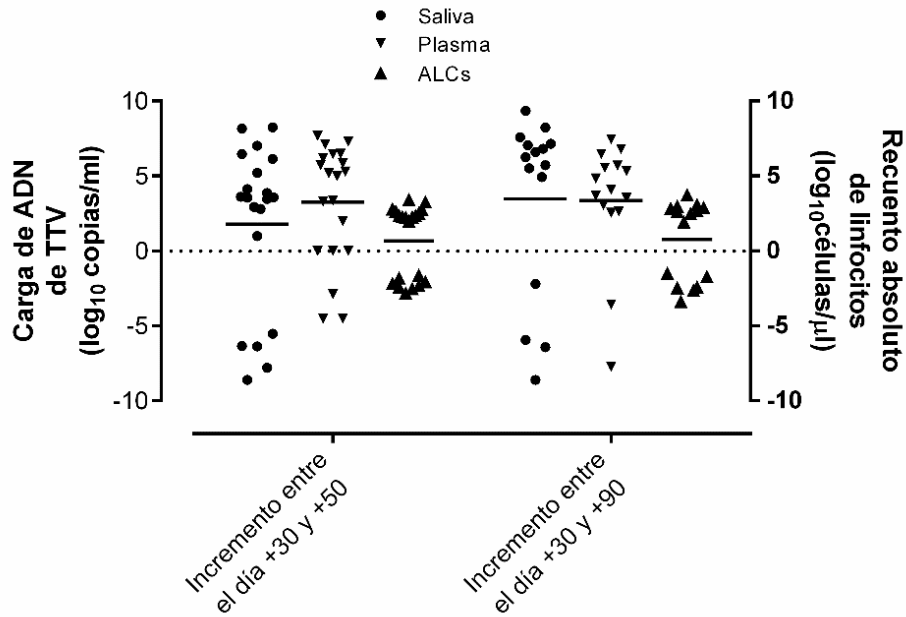


Figura V-XX. Media del incremento de la carga de ADN de TTV en saliva y plasma, así como del recuento absoluto de linfocitos entre los días +30 y +50 y entre los días +30 y +90 después del alo-TPH.

Por otra parte, evidenciamos, tal y como muestra la figura XXI, una correlación entre la carga de ADN de TTV y el RAL tanto en saliva como en plasma entre los días +30 y +50 tras el trasplante que, aunque discreta, fue estadísticamente significativa.

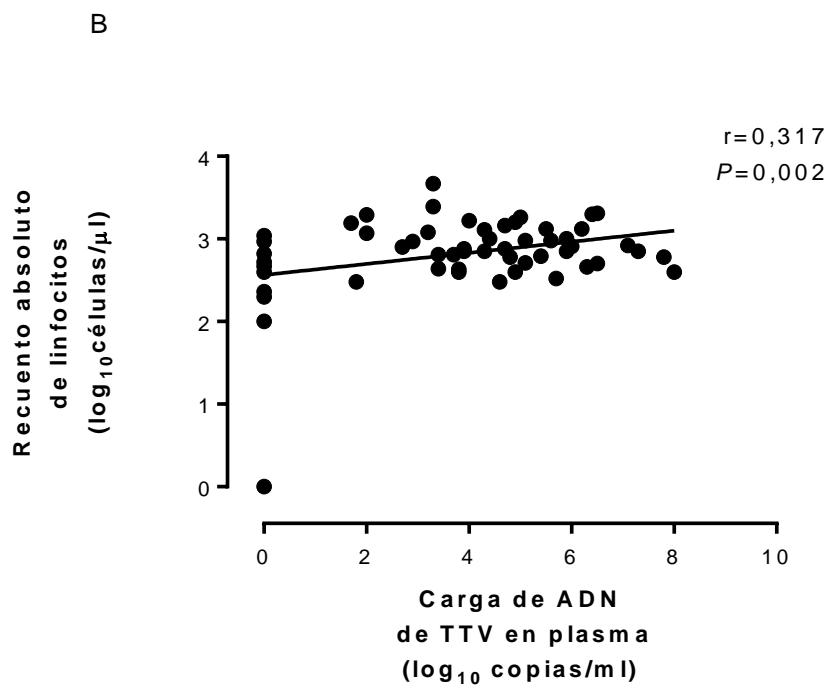
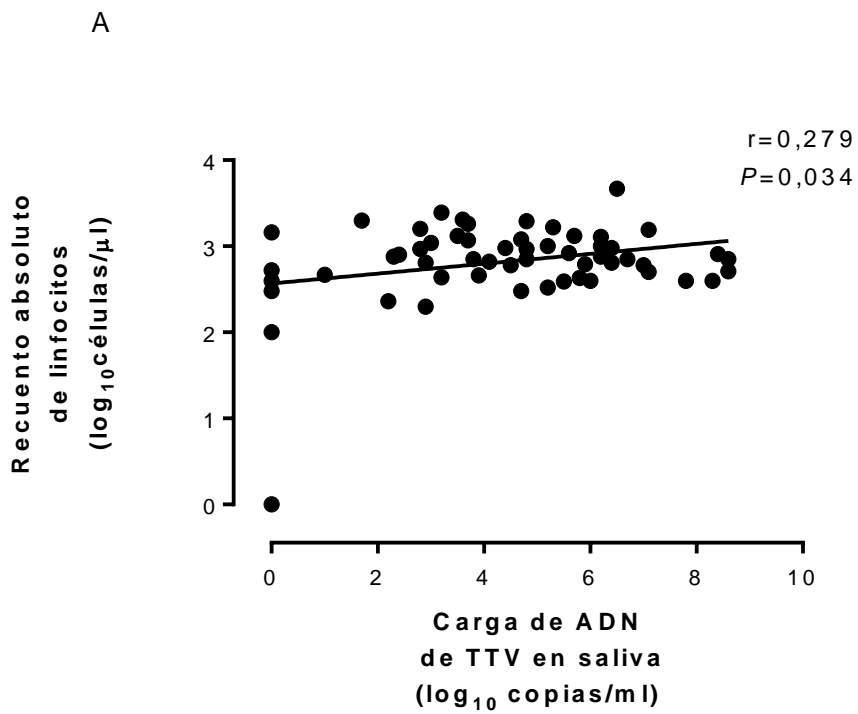


Figura V-XXI. Correlación entre las cargas de ADN de TTV cuantificadas en muestras de saliva

(A) y plasma (B) y el recuento absoluto de linfocitos después del injerto (entre los días +30 y +50 después del alo-TPH).

1.10 Dinámica tardía del ADN de TTV en plasma

Posteriormente evaluamos la dinámica de los niveles de ADN de TTV en plasma de pacientes sometidos a Alo-TPH en el periodo tardío (>día +100) así como su valor clínico potencial como marcador de inmunosupresión. Para este proyecto dispusimos de muestras de 33 pacientes. La mediana de las cargas de TTV fue incrementándose progresivamente desde el momento del injerto (aproximadamente el día +20), hasta alcanzar su máximo valor el día +90 postrasplante. La magnitud de la diferencia entre el día +90 postrasplante y el resto de las cargas está representado en la figura V-XXII. A partir de este momento, las cargas disminuyen progresivamente, aunque de manera no significativa, hasta alcanzar el día +210 después del trasplante. La mediana de esta última carga sí es significativamente inferior a la obtenida el día +90 postrasplante. Sin embargo, la carga correspondiente al día +210 tras el trasplante fue ligeramente superior a la obtenida previamente al acondicionamiento. ($P=0,398$).

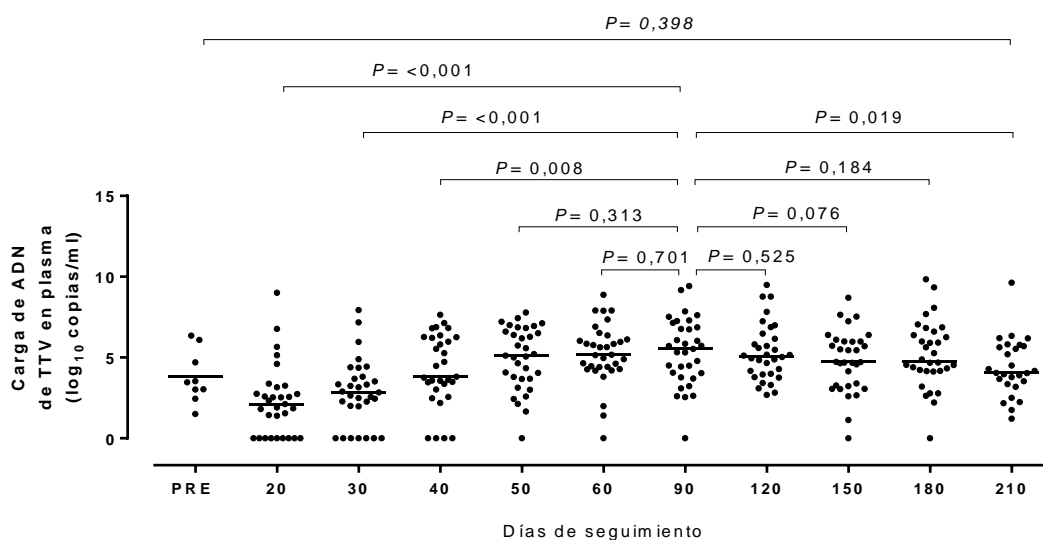
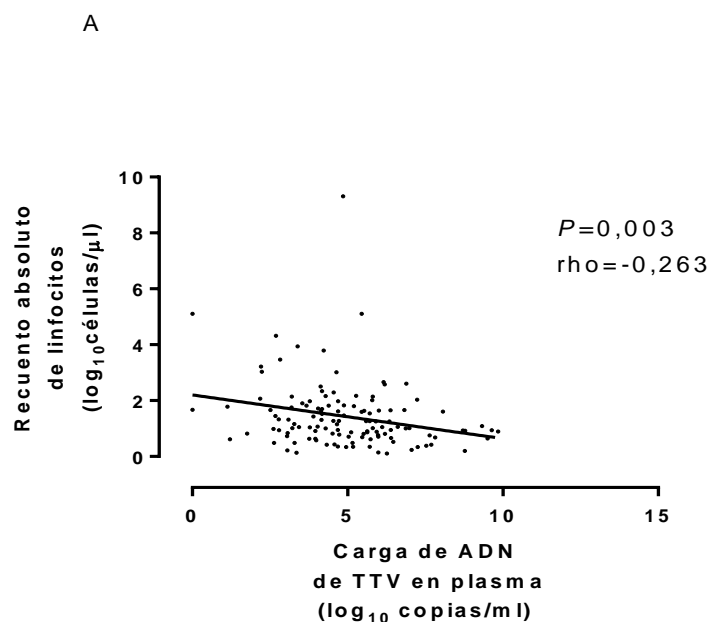


Figura V-XXII. Dinámica de la ADNemia de TTV en receptores de alo-TPH a diferentes tiempos respecto al trasplante. Las barras indican la mediana

1.11 Carga de ADN de TTV y recuento absoluto de linfocitos en el estado de equilibrio estacionario

Para estudiar la relación de la ADNemia de TTV con la inmunidad en el periodo tardío realizamos un análisis comparado de correlación entre las cargas de ADN de TTV en plasma y el recuento absoluto de linfocitos entre el periodo temprano (días +20 hasta +50) y en el periodo tardío (días +120 hasta +210) postrasplante. Como puede verse en la figura V-XXIII, se observó que en el periodo temprano la ADNemia de TTV correlacionaban directamente con el recuento absoluto de linfocitos (Panel A), mientras que en el periodo tardío esta correlación es inversa (Panel B). ($P=0,003$; $P=0,031$).



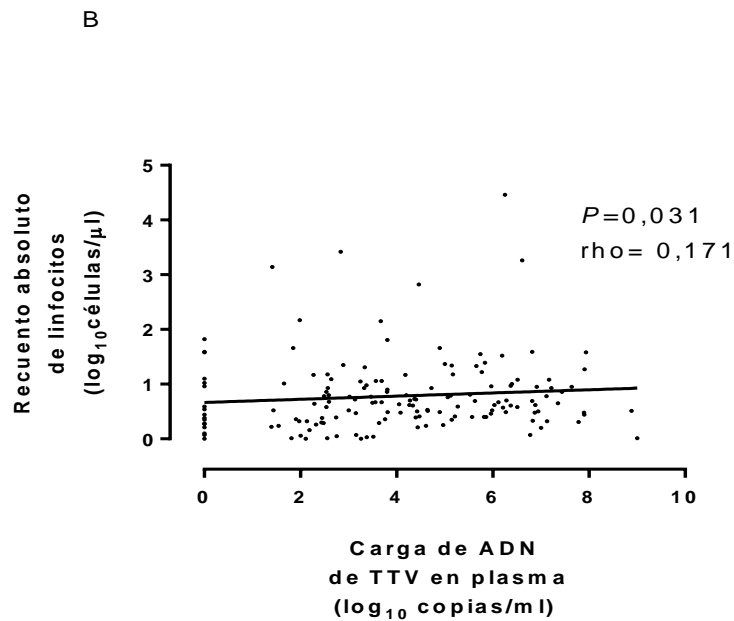


Figura V-XXIII. Correlación entre las cargas de ADN de TTV en plasma y el recuento absoluto de linfocitos medidos en todos los tiempos entre los días +120 y +210 (A) y entre +20 y +60 (B)

1.12 Efecto del régimen inmunosupresor y el uso de corticosteroides en la carga de ADN de TTV en plasma después del trasplante

Investigamos a continuación qué efecto producía el régimen inmunosupresor en la dinámica tardía de TTV en plasma; para ello utilizamos como variable de análisis el AUC de los niveles plasmáticos de ADN de TTV comprendidos entre los días +90 y +210 tras el trasplante. No encontramos diferencias significativas entre la mediana del AUC de los pacientes cuyo tratamiento inmunosupresor estuvo basado en ciclosporina A (mediana=7,53 log₁₀ copias x día x ml⁻¹; rango=4,68–9,57) y aquellos en los que se utilizó sirolimus y tacrolimus (mediana=8,58 log₁₀ copias x día x ml⁻¹; rango=3,93–9,56) $P=0,1$. En esta misma línea analizamos, en segundo lugar, el efecto que el tratamiento con glucocorticoides podía tener nuevamente sobre la dinámica tardía de TTV. Volvimos a hacer uso del AUC de TTV, ya que resulta un parámetro útil para evaluar el grado de exposición a un evento cuando sólo se dispone de medidas realizadas en tiempos discretos. De los 33 pacientes de los que se disponía inicialmente, excluimos a 6: cuatro de ellos por recaída de la enfermedad y 2 por

una muerte prematura. De los 27 restantes, 12 no recibieron tratamiento con glucocorticoides en el periodo de estudio y se utilizaron como grupo control, mientras que los otros 15 sí los recibieron. Cinco de ellos como tratamiento a un episodio de aEICH, siete por cEICH y tres por ambos. La descripción del tratamiento con los corticoides, la dosis acumulada, así como la fecha de diagnóstico de la enfermedad de injerto contra huésped se describe en la tabla V-VII.

Tabla V-VII. Características clínicas de los pacientes sometidos a tratamiento con glucocorticoids y que no sufrieron recaída ni fallecieron durante el period de estudio

Paciente	Corticoides (Prednisona)			EICHa (Día de diagnóstico tras el trasplante)	EICHc (Día de diagnóstico tras el trasplante)
	Día de inicio tras el Alo-TPH	Día de cese tras el Alo-TPH	Dosis acumulada hasta el día +210 (mg)		
1	116	>365	5240	116	-
2	120	>365	3735	-	107
3	97	202	4980	94	265
5	49	104	2950	49	172
6	97	173	3115	-	97
8	24	103	1085	24	-
10	204	266	360	-	170
11	46	213	4470	46	-
12	42	>365	3361	42	-
14	192	>365	1080	-	150
15	154	240	1505	-	154
16	28	93	2090	23	-
17	45	195	3265	26	45
18	120	>365	3775	-	120
19	133	248	1050	-	96

Alo-TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos; EICH: Enfermedad de injerto contra huésped.

Tal y como se muestra en la figura V-XXIV, la media del AUC₉₀₋₂₁₀ ADN de TTV en plasma fue significativamente mayor en los pacientes que recibieron

tratamiento con corticoides en ese periodo de tiempo respecto al grupo de los que no ($P=0,025$); sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre la dosis acumulada de corticoides con el AUC entre estas fechas. ($P=0,182$).

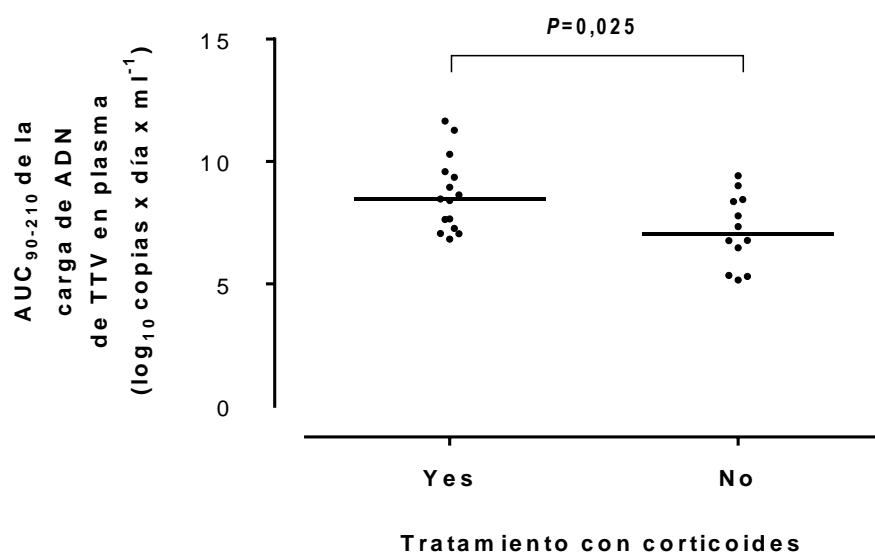


Figura V-XXIV. Área bajo la curva de las cargas de ADN de TTV cuantificadas entre los días +90 y +210 en pacientes sometidos o no a terapia con corticosteroides para la enfermedad de injerto contra huésped.

2. Monitorización de la ADNemia de TTV para la predicción de complicaciones relacionadas con la inmunosupresión en el trasplante de riñón.

Por otra parte, también estudiamos la utilidad clínica de la monitorización de TTV en pacientes trasplantados de riñón para predecir la aparición de infecciones postrasplante, infecciones oportunistas o, en general, cualquier tipo de reacción adversa atribuible a un nivel de inmunosupresión excesivo.

2.1 Características de la población del estudio

Incluimos un total de 221 pacientes trasplantados de riñón en el Hospital 12 de Octubre de Madrid entre los años 2014 y 2016. Las fechas de monitorización fueron las siguientes: el día del trasplante, a los 7 días, al mes, a los tres meses, seis meses y al año postrasplante. Dispusimos de un total de 997 muestras de plasma, una media de 5 por paciente (IQR:4-5). La media de seguimiento fue de 494 días (IQR:434-542). Cinco pacientes (2,3%) perdieron el órgano

trasplantado una mediana de 41 días tras el trasplante (IQR: 18-260,5), mientras que dos pacientes (0,9%) murieron dentro del periodo de seguimiento. Ciento veintiocho pacientes (57,9%), desarrollaron un total de 287 episodios de infección postrasplante. La mediana del intervalo de tiempo hasta la aparición del primer episodio fue de 37,5 días (IQR:14-99). Cincuenta y un pacientes (23,1%) tuvieron 65 episodios de eventos adversos relacionados con la inmunosupresión (iRAE) (Tabla V-VIII). La mediana del intervalo hasta el primer episodio fue de 78 días (IQR:39-235).

Tabla V-VIII. Descripción de los 65 episodios clínicos de iRAE que ocurrieron en la población estudiada

Síndrome clínico	N (%)
Infección oportunista	54 (83,1)
Infección activa por CMV	25 (38,4)
Colitis por CMV	4 (6,1)
Infección mucocutánea por VHS	9 (13,8)
Herpes Zóster	6 (9,2)
Viremia significativa por virus BK ^a	3 (4,6)
Nocardiosis	1 (1,6)
Aspergilosis invasiva	2 (3,1)
Mucormicosis	1 (1,6)
Criptococosis	1 (1,6)
Infección fúngica invasiva por Trichosporon spp	1 (1,6)
Leishmaniasis visceral	1 (1,6)
Malignidad de novo postrasplante	11 (16,9)
Tumor de órgano sólido ^b	7 (10,8)
Cáncer de piel no categorizado como melanoma ^c	4 (6,1)

CMV, citomegalovirus; iRAE, efecto adverso relacionado con la inmunosupresión; VHS, virus herpes simple.

a) Carga viral plasmática $>4 \log_{10}$ copias/mL dos puntos temporales diferentes con dos o más semanas de diferencia.

b) Incluyó adenocarcinoma de colon (3 casos), carcinoma renal (2 casos), carcinoma rectal, adenocarcinoma gástrico, y adenocarcinoma de próstata (1 caso de cada).

c) Carcinoma basal y de células escamosas (dos casos de cada uno)

2.2 Dinámica de las cargas de ADN de TTV

En todas las muestras excepto en 24 (2,4%) se detectó ADN de TTV. Hubo un incremento progresivo de la carga de TTV desde el valor basal, el día +0 ($2,9 \pm$

1.6 log₁₀ copias/ml), hasta el día +180 postrasplante (5,7 ± 1.9 log₁₀ copias/ml). Posteriormente, la carga disminuyó ligeramente hasta el día 360 postrasplante (5,0 ± 2,1 log₁₀ copias/ml). La mayoría de los pacientes (51,6% [114/221]) tuvo la carga más alta de ADN de TTV el mes 6 tras el trasplante (Figura V-XXV). En cuanto a la influencia de los factores propios del trasplante en la ADNemia de TTV, el uso de timoglobulina se asoció con una carga mayor de ADN de TTV en plasma durante los seis primeros meses tras el trasplante, alcanzando esta diferencia significación estadística el tercer mes (5,5 ±1,8 vs 4,8 ±1,9; *P*=0,018). No encontramos relación entre la carga de TTV y la administración de profilaxis para la infección de CMV, ni entre ésta y el régimen de inmunosupresión primario utilizado.

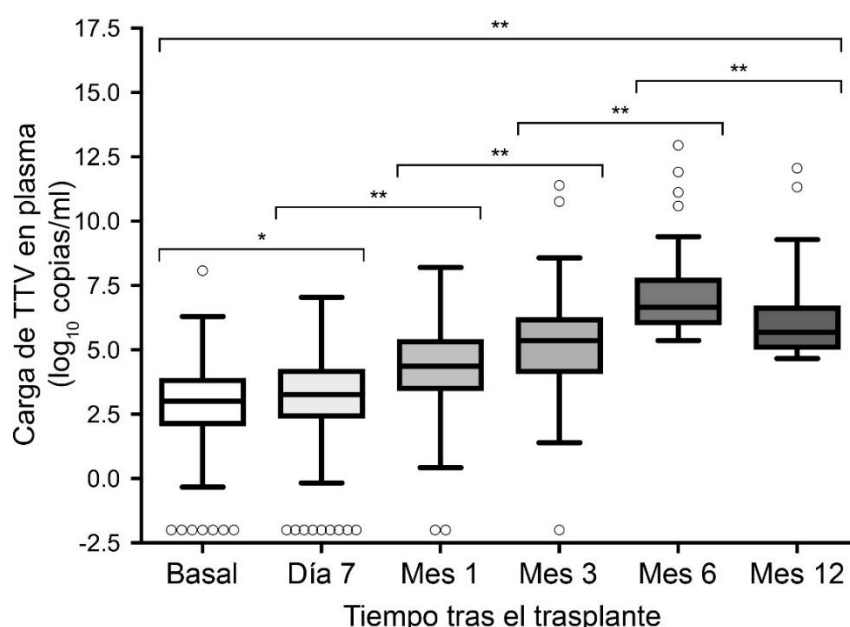


Figura V-XXV. Cinética de la carga de ADN de TTV desde el momento basal hasta el mes 12 tras el trasplante. * *P*=0,006; ***P*=0,0001.

2.3 Correlación entre la carga de ADN de TTV y los parámetros inmunológicos

Con el fin de evaluar la correlación entre la ADNemia de TTV con los diferentes parámetros inmunológicos, realizamos esta comparación con el recuento absoluto de linfocitos en sangre periférica. Hallamos una correlación inversa el mes 1 tras el trasplante entre la ADNemia de TTV y los niveles de CD3⁺ (*r*=-0,238; *P*=0,017), CD4⁺ (*r*=-0,241; *P*=0,015) y linfocitos T CD8⁺ (*r*=-0,240;

$P=0,016$). La correlación se hizo más evidente el tercer mes tras el trasplante, concretamente para CD3⁺ ($r=-0,347$; $P<0,001$) y CD4⁺ ($r=-0,330$; $P<0,001$).

2.4 Carga de ADN de TTV en cada tiempo analítico y resultados clínicos

Después evaluamos la relación entre la carga de TTV en plasma, en cada uno de los tiempos analíticos previamente descritos, con las variables clínicas del estudio. Tal y como se describe en la tabla V-IX, no encontramos diferencias en la mediana de las cargas basales entre los pacientes con y sin infección o iRAE, ni tampoco el día +7 tras el trasplante. Sin embargo, esta diferencia emerge a partir de entonces, cuando la mayoría de los pacientes han alcanzado un estado de inmunosupresión estable. En el primer mes tras el trasplante, la ADNemia de TTV es superior en los pacientes que posteriormente sufrirán una infección postraspante o una iRAE respecto a los pacientes que no sufrirán este efecto adverso ($P=0,023$ y $P=0,009$ respectivamente)

Tabla V-IX. Comparación de las cargas de ADN de TTV en plasma en relación con la aparición de eventos clínicos posteriores al trasplante (\log_{10} copias/ml)

Tiempo (días)	Infección			iRAE		
	Sí	No	<i>P</i> -valor	Sí	No	<i>P</i> -valor
	DNAemia TTV (\log_{10} copias/ml \pm SD)			DNAemia TTV (\log_{10} copias/ml \pm SD)		
+0	2,9 \pm 1,6	2,8 \pm 1,6	0,854	3,1 \pm 1,5	2,8 \pm 1,6	0,369
+7	3,2 \pm 1,7	3,1 \pm 1,7	0,697	3,5 \pm 1,6	3,0 \pm 1,7	0,148
+30	4,6 \pm 1,3	3,8 \pm 1,9	0,023	4,9 \pm 1,2	3,9 \pm 1,8	0,009

SD: Desviación estándar.

Del mismo modo, cuando evaluamos el pico de la carga de TTV en plasma en los periodos previos al evento adverso, observamos que eran superiores tanto en el mes tres ($5,6 \pm 1,3$ vs $4,7 \pm 1,8$ \log_{10} copias/ml; $P = 0,007$) como en el mes seis ($6,8 \pm 2,0$ vs $5,8 \pm 1,7$ \log_{10} copias/ml; $P=0,012$) entre los pacientes sin iRAE respecto a aquellos con esta variable clínica compendiada. Figura V-XXVI

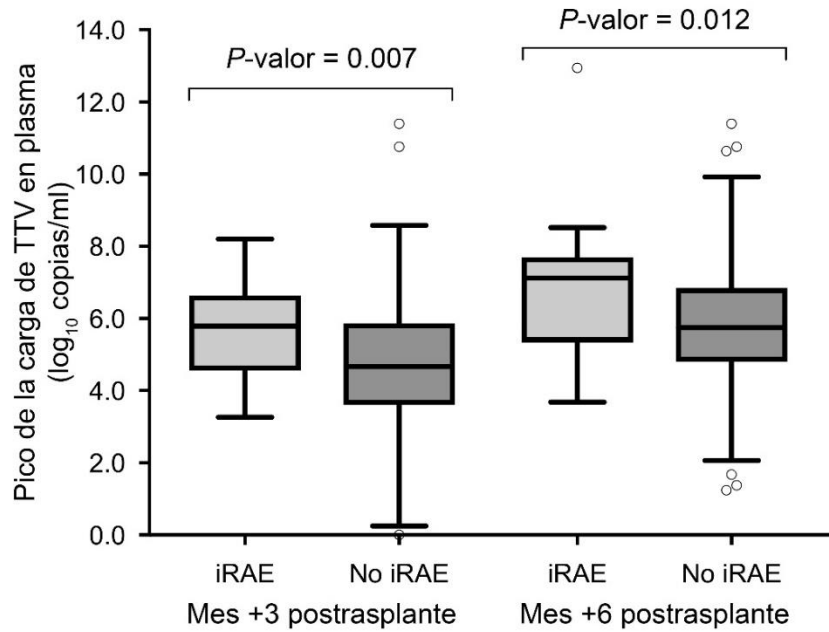
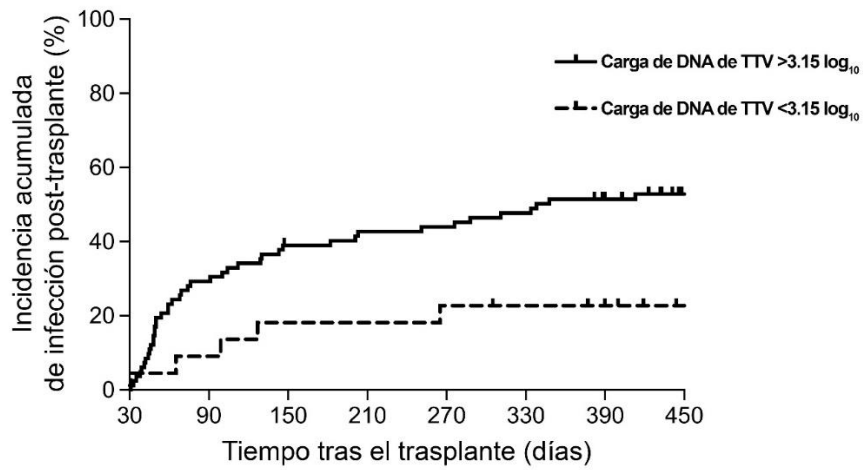


Figura V-XXVI. Comparación de la carga máxima de ADN de TTV en plasma el tercer y sexto mes en relación con la posterior aparición de iRAE. iRAE: eventos adversos relacionado con la inmunosupresión

Con el fin de analizar la utilidad de la cuantificación de TTV para la toma de decisiones clínicas tempranas tras el trasplante, buscamos un valor de TTV el primer mes tras el trasplante capaz de discriminar entre aquellos pacientes que sufrirían infecciones o iRAE posteriormente; para ello realizamos una curva ROC. El auROC para predecir infecciones o iRAE fue de 0,624 (95% CI: 0,517-0,732; $P=0,029$) y 0,704 (95% CI: 0,588-0,820; $P=0,002$) con un *cut-off* óptimo de 3,15 y 4,56 copias/ml respectivamente. Así pues, un valor de ADN de TTV en plasma superior a estos valores se asoció con una mayor incidencia acumulada de infección o iRAE ($P=0,009$ y $P=0,0006$ respectivamente), tal y como se muestra en la figura V-XXVII.



B

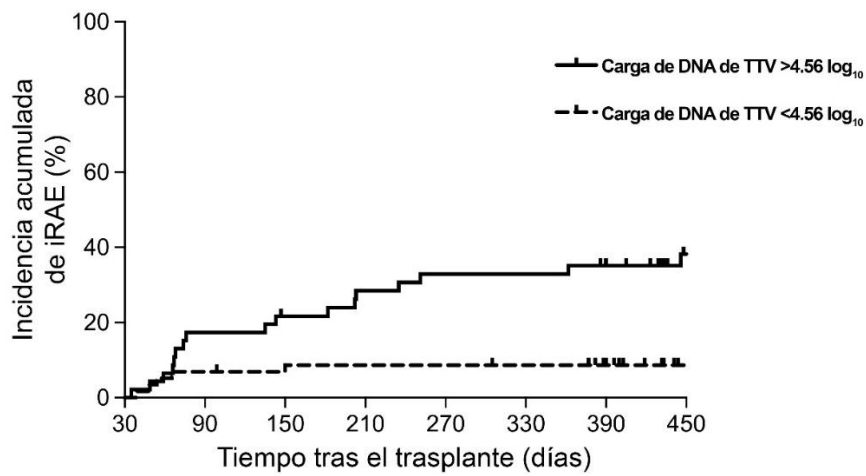


Figura V-XXVII. Curvas de incidencia acumulada de Kaplan Meier de las variables a estudio en función de la carga ADN de TTV en el primer mes tras el trasplante. A) Infección postrasplante ($P=0,009$); B) iRAE: $P=0,0006$. iRAE: Efecto adverso relacionado con la inmunosupresión.

La capacidad predictiva de ambos valores, calculada mediante un análisis *Bootstrap* con 100 muestras, se detalla en la tabla X.

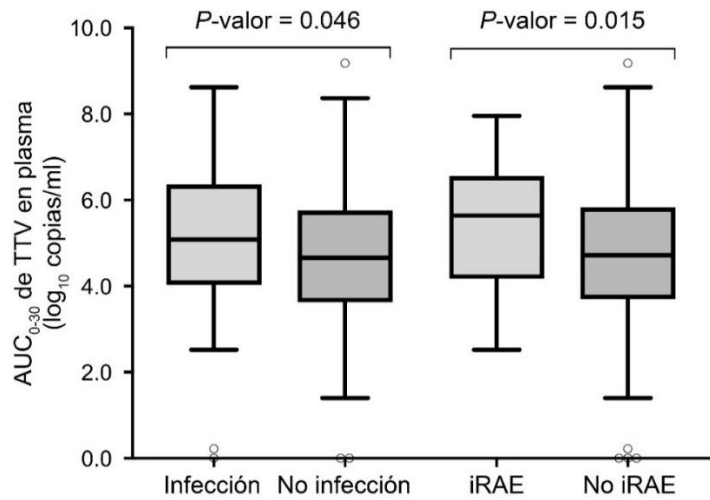
TablaV- X. Capacidad predictiva de las cargas de ADN de TTV el primer mes tras el trasplante para predecir la aparición de las variables a estudio en un *Bootstrap* de 1000 muestras.

Punto de corte (log₁₀ copias/ml)	Evento predicho	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
Plasma>3,15	Infección	89,8% (79,6-98,0)	30,9% (18,2-43,6)	53,8% (42,7-64,6)	77,3% (59,1-95,5)
Plasma>4,56	iRAE	76,0% (60,0-92,0)	65,8% (55,7-75,9)	41,3% (28,3-54,3)	89,7% (81,0-96,6)

2.5 Áreas bajo la curva de las ADNemias de TTV y resultados clínicos

En esta misma línea, evaluamos la capacidad de la ADNemia acumulada de TTV en plasma para predecir infecciones o iRAE. Para ello, comparamos el AUC de las cargas de TTV en el primer mes y los primeros 6 meses entre ambos grupos de pacientes. Como observamos en la figura V-XXVIII, el AUC₀₋₃₀ en los pacientes que posteriormente desarrollarían una infección ($5,1 \pm 1,7$ vs $4,6 \pm 1,7$ log₁₀ copias/ml; $P=0,046$) o una iRAE ($5,4 \pm 1,4$ vs $4,7 \pm 1,7$ log₁₀ copias/ml; $P=0,015$) era significativamente mayor que en aquellos en los que no (Panel A). Esto mismo ocurrió al analizar el AUC₀₋₁₈₀, el cual fue también significativamente superior en los pacientes que sufrieron una infección o iRAE que en aquellos en los que no. ($8,8 \pm 1,3$ vs $7,9 \pm 1,6$ log₁₀ copias/ml; $P=0,032$) y ($9,1 \pm 1,2$ vs $7,9 \pm 1,5$ log₁₀ copias/ml; $P = 0,023$) respectivamente (Panel B).

A



B

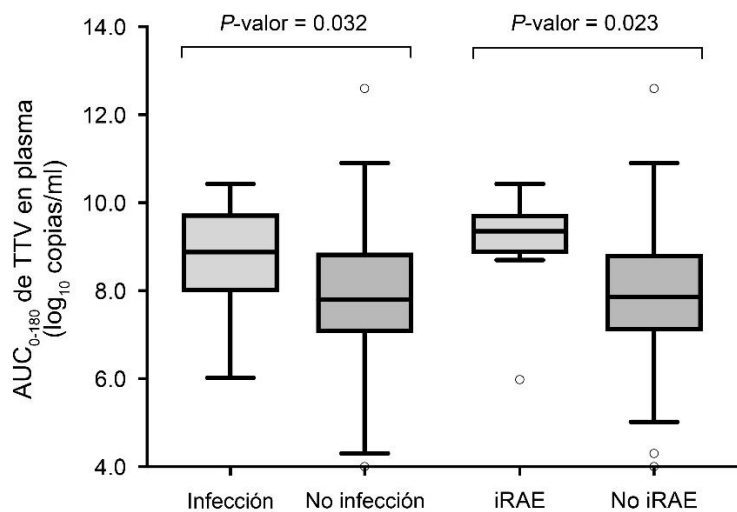


Figura V-XXVIII. Comparación de los log₁₀ del AUC de la carga de ADN de TTV cuantificadas entre la línea base y el primer mes postrasplante (A) y el sexto mes postrasplante (B) atendiendo a la aparición posterior de infección o de iRAE. AUC: Área bajo la curva; iRAE: Evento adverso relacionado con inmunosupresión.

2.6 Cinética de las ADNemias de TTV y resultados clínicos

Después, estudiamos la correlación de la dinámica de TTV con las variables clínicas a estudio. Concretamente, evaluamos la trayectoria del virus, ya fuera ascendente o no, el tiempo de duplicación y los cambios entre las cargas de dos

tiempos consecutivos de análisis. Los pacientes con una trayectoria ascendente de las cargas comprendidas entre el día +7 y +30 postrasplante tuvieron una mayor proporción de infecciones que aquellos pacientes sin esta trayectoria (57.3% [47/82] vs 18.8% [3/16]; $P = 0,005$). Se observó una tendencia no significativa para este mismo fenómeno cuando evaluamos iRAE (26,8% [22/82] vs 6,2% [1/16]; $P = 0,108$). De hecho, una cinética ascendente entre ambos puntos actuó como predictor independiente de infección postrasplante (H.R=4,29; IC95%: 1,32 – 14,04; $P=0,016$) con diferencias significativas también en términos de incidencia acumulada (log – rank $P=0,013$), tal y como se muestra en la siguiente figura:

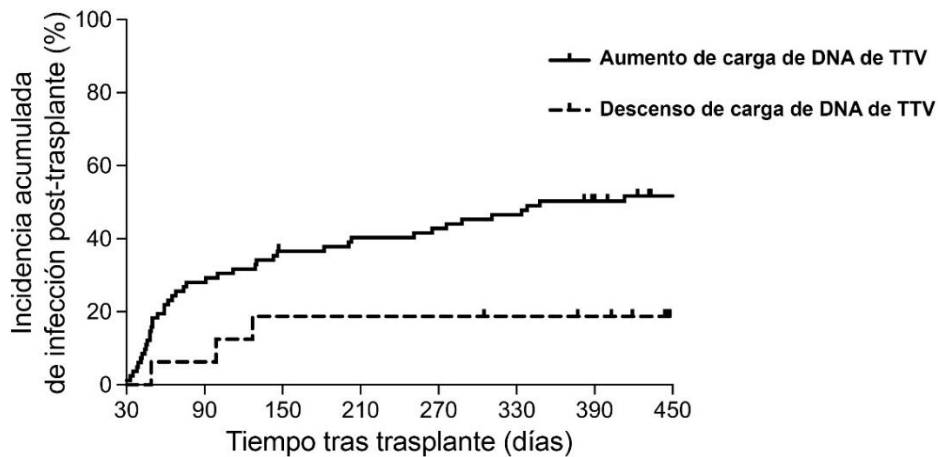


Figura V-XXVIII. Curvas de incidencia acumulada de Kaplan-Meier de infección postrasplante en relación a la cinética del ADN de TTV observada entre el día +7 y +30 después del trasplante ($P = 0,013$)

No se encontraron más asociaciones entre tiempos restantes de análisis, incluyendo al tiempo comprendido entre el momento basal y el día +7 tras el trasplante. El mayor tiempo de duplicación se obtuvo entre el día +7 y +30 postrasplante, (Td: 4,9 días; [IQR: 3,3 – 7,6]). Observamos un tiempo de duplicación menor en el primer mes de trasplante entre los pacientes que recibieron ATG, como parte de su terapia de inducción, tanto en el intervalo entre el día basal y el día +7 (Td:4,0 días; [IQR: 2,1 – 6,5]) vs. (Td: 7,1días; [IQR: 4,3 – 17,1] $P<0,001$), cuanto en el comprendido entre el día +7 hasta el primer mes tras el trasplante (Td: 4,0 días; [IQR: 2,8 – 6,1]) vs. (Td: 6,3 días; [IQR: 3,6 – 9,1] $P=0,020$). A tenor de esta diferencia estudiamos si las variables principales de

- 88 -

estudio estaban condicionadas por la utilización de ATG en el esquema de inducción. No hubo diferencias entre los pacientes tratados con ATG en cuanto al desarrollo o no de infecciones o iRAE. Sin embargo, el tiempo de duplicación entre el día +7 postrasplante y el primer mes fue menor en aquellos pacientes que no recibieron ATG y desarrollaron infección postrasplante comparado con aquellos que permanecieron libres de esta complicación. (Td: 5,5 días; [IQR: 3,5 – 8,4]) vs (Td: 7,3 días; [IQR: 7,3 – 22,4] $P=0,070$).

2.7 Carga de ADN de TTV y rechazo del injerto

En último lugar, analizamos la asociación entre la carga de ADN de TTV en plasma y el rechazo del injerto. Encontramos que la carga de TTV el día basal era significativamente menor en pacientes que posteriormente sufrirían un algún evento de rechazo del injerto en los primeros 90 días respecto a aquellos libres de este evento. ($1,7 \pm 2,3$ vs $2,9 \pm 1,6$ \log_{10} copias/ml; $P=0,035$). De hecho, la proporción de pacientes con carga indetectable en el tiempo basal fue significativamente mayor en aquellos pacientes que sufrirían el acontecimiento adverso respecto a los que no. (28% [2/7] vs 3,3% [6/180] $P=0,030$)

La carga basal de TTV fue el único factor predictivo que permaneció significativo en el análisis multivariante de factores de riesgo para predecir la aparición de rechazo en los primeros 90 días tras el trasplante. (Tabla V-XI)

Tabla V-XI. Factores de riesgo para la aparición de rechazo en los primeros 90 días tras el trasplante.

	Rechazo agudo		P-valor	Análisis univariante	Análisis multivariante
	Sí (n=11)	No (n=210)		HR [IC95%], P-valor)	
Edad (media \pm SD)	51,6 \pm 13,2	54,0 \pm 15,8	0,609		
Género [n(%)]	8 (72,7)	152 (72,4)	1,000		
DM pretrasplante [n(%)]	2 (18,2)	68 (32,4)	0,509		
Serología VHC [n(%)]	2 (18,2)	15 (7,1)	0,203		

TOS previa [n (%)]	4 (36,5)	25 (12,0)	0,042	3,94 (IC95% [1,15 – 13,47] <i>P</i> =0,029)	--
Hipersensibilización previa [n(%)]	1 (9,1)	15 (7,1)	0,571	--	--
Incompatibilidades HLA \geq 4 [n(%)]	8 (72,7)	151 (71,9)	1,000	--	--
Terapia de reemplazo renal [n(%)]	9 (81,8)	185 (88,1)	0,629	--	--
Tiempo de diálisis, días (IQR)	988 (258 – 1.499)	536 (284 – 1.059)	0,649	--	--
Edad del donante (media \pm SD)	50 \pm 16	52 \pm 16	0,650	--	--
Tiempo de isquemia fría, horas (mediana \pm SD)	15 \pm 9	15 \pm 7	0,906	--	--
DCD [n (%)]	1 (9,1)	46 (21,9)	0,464	--	--
Donante vivo [n (%)]	2 (18,2)	27 (12,9)	0,641	--	--
Uso de ATG [n (%)]	8 (72,7)	98 (46,7)	0,092	2,91 (IC95% [0,77 – 10,99] <i>P</i> =0,114)	--
Retraso en la funcionalidad del injerto [n (%)]	6 (54,5)	96 (45,9)	0,577	--	--
Carga basal de ADN de TTV en plasma, log ₁₀ copias/ml (media \pm SD)	1,7 \pm 2,4	2,9 \pm 1,6	0,035	0,69 (IC95% [0,49 – 0,97] <i>P</i> =0,033)	0,69 (IC95% [0,49 – 0,97] <i>P</i> =0,034)

ATG: Timoglobulina; HR: DCD: Donante tras la muerte circulatoria; Hazard Ratio; DM: Diabetes Mellitus; IQR: Rango intercuartílico; SD: Desviación estándar; TOS: Trasplante de órgano sólido; VHC: Virus de la hepatitis C

Discusión

Cada vez existe un mayor cuerpo de evidencia sobre la correlación entre TTV e inmunidad. Esta interrelación *a priori* parece de tipo inverso en el trasplante de órgano sólido, es decir, a mayor funcionalidad inmune menor carga de TTV. Este virus se ha postulado como un marcador útil para inferir el nivel de inmunosupresión efectiva, guiando mediante su monitorización el uso de inmunosupresores de manera específica en cada paciente. Si esto es extrapolable al Alo-TPH, no ha quedado completamente dilucidado (16, 17, 75).

En primer lugar, en el trabajo (Albert E. J. Clin Virol 2017) evaluamos la dinámica temprana de TTV tras el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos, concretamente hasta el día +120 después del trasplante. Hemos realizado este análisis de manera comparada junto con la reconstitución del RALc y del RAL, dado que estos últimos son el principal nicho replicativo del virus. A este respecto, concluimos lo siguiente:

(i) La carga de TTV pre-acondicionamiento fue comparable independientemente de cuál fuera la enfermedad hematológica de base. Estos resultados divergen de los publicados por el grupo de Masouridi *et al.* (75), en que la carga de TTV sí se ve influenciada por la patología de base en el momento del trasplante. Así, pacientes con leucemia linfocítica aguda o linfoma no Hodgkin presentaron cargas sustancialmente más altas que los pacientes con otras enfermedades hematológicas. El escaso número de pacientes con leucemia linfocítica aguda y linfoma no-Hodgkin, en ambas series, impide extraer conclusiones definitivas a este respecto. Se requerirán, por tanto, estudios adicionales que permitan dilucidar esta aparente discrepancia.

(ii) Hemos evidenciado una disminución drástica de la carga de TTV tras el acondicionamiento, acompañada a su vez de una caída del recuento absoluto de linfocitos. Este hallazgo corrobora la hipótesis de que los linfocitos son el lugar principal de replicación del virus y que, por tanto, la depleción medular consecuente al acondicionamiento impide la consecución del ciclo viral. Este mismo fenómeno ha sido previamente documentado en un pequeño subgrupo de pacientes, nueve en total, en dos estudios previos (16, 17). En nuestra cohorte, la magnitud del descenso de la carga de ADN de TTV fue similar tanto si el acondicionamiento fue o no fue mieloablativo.

(iii) La carga de ADN de TTV se incrementó progresivamente desde el momento del injerto hasta alcanzar su pico máximo el día +90. Existe, además, una clara tendencia, aunque no estadísticamente significativa, hacia una correlación positiva entre el RAL y los niveles de ADN de TTV. Este dato respalda observaciones previas hechas tanto en trasplante autólogo (43), como en alogénico (16, 44) de precursores hematopoyéticos. Este hecho indica que la reconstitución del injerto aporta células competentes para la replicación del virus y, por tanto, en trasplante alogénico el incremento de la carga de ADN de TTV, al menos en la fase inicial tras el trasplante, refleja la repoblación linfocitaria. Sin embargo, la correlación de este incremento progresivo de ADN de TTV junto con el recuento absoluto de linfocitos con una adecuada reconstitución de la competencia inmunitaria no puede ser directamente inferida hasta la fecha.

A pesar de lo expuesto, la mayoría de las líneas de evidencia hasta el momento sugieren, tal y como ocurre en trasplante de órgano sólido, que el grado de inmunosupresión tras el trasplante modula el nivel replicativo del virus e incluso la magnitud de la ADNemia de éste. En este sentido, en nuestro trabajo hemos observado que la carga de TTV del día +90 tras el trasplante es significativamente superior a la obtenida antes del acondicionamiento, lo cual puede reflejar, en mayor o menor medida, el efecto de los fármacos inmunosupresores en la inmunidad del paciente. No encontramos diferencias en el patrón cinético de TTV tras el injerto, ni atendiendo al tipo de trasplante ni al tipo de profilaxis empleada para prevenir la EICH. Asimismo, pacientes con enfermedad de injerto contra huésped grados II-IV, que recibieron glucocorticoides a altas dosis, experimentaron incrementos en la carga de TTV entre los días +20 y +60 superiores que los pacientes con EICH grado 0-I, independientemente del recuento de linfocitos. Esta diferencia, aunque tendente, no alcanzó significación estadística. Este mismo hallazgo ya había sido documentado previamente: nuestro trabajo corrobora estos resultados. (75). Ni la carga de TTV el día +20 tras el trasplante ni aquella cuantificada el día +30 tras éste, permitieron predecir el desarrollo posterior de EICH grave.

Además de su diseño retrospectivo, este primer estudio tiene diversas limitaciones. En primer lugar, no dispusimos de todas las muestras secuenciales que habíamos planeado analizar para varios de los pacientes. En segundo lugar,

no realizamos un fenotipado de los diferentes subtipos de linfocitos, por lo que no pudimos inferir la funcionalidad potencial de los subgrupos de linfocitos repoblados. A este respecto se ha demostrado que el incremento de la carga de ADN de TTV en plasma en el trasplante autólogo se correlaciona particularmente con los linfocitos T CD8 CD57+ (76). Este marcador es representativo de una diferenciación terminal de los linfocitos. Por tanto, esta correlación, y concretamente el incremento de la ADNemia de TTV, se ha interpretado como un marcador de inmunosupresión asociado al incremento de estos linfocitos (77). Sin embargo, este subtipo es bastante heterogéneo, con funciones incluso antagónicas (citotóxica o reguladora); por lo tanto, el efecto resultante de su actividad depende en gran medida del subgrupo predominante (78). En este sentido, se ha demostrado que una expansión específica de este subtipo de linfocitos T está asociado con la recuperación del paciente frente a una viremia por CMV y, por tanto, a la ausencia de progresión hacia enfermedad por CMV (79). Además, CD57+ es un marcador de polifuncionalidad en células T cuya expansión es impulsada por la replicación de CMV (80, 81).

Una vez analizada la dinámica de TTV tras el trasplante, en el segundo proyecto (Albert E BMT 2017), sugerimos que la cuantificación de la magnitud total de su carga inmediatamente después del injerto, concretamente entre los días +20 y +30 tras el trasplante (\log_{10} AUC₂₀₋₃₀ ADN de TTV), podía ser un parámetro auxiliar útil que permitiera predecir la aparición posterior de infección activa por CMV tributaria de tratamiento con fármacos antivirales. Este parámetro podría complementar otros, como el análisis de la respuesta funcional de linfocitos T frente a CMV, o el comportamiento cinético del virus en sangre (46). Ambos parámetros permiten inferir el riesgo de episodios con cargas elevadas de CMV en el paciente trasplantado y han demostrado su utilidad en la toma de decisiones para la instauración de un tratamiento antiviral, previniendo así la enfermedad por CMV. Su uso mejora la supervivencia global de estos pacientes (70) (82).

Encontramos que la magnitud del \log_{10} AUC₂₀₋₃₀ de ADN de TTV entre pacientes con o sin ADNemia de CMV subsecuente no fue significativa, aunque sí existió una tendencia que indicaba una correlación inversa entre los dos

parámetros. Sin embargo, sí que observamos una asociación entre los pacientes que desarrollarían ADNemias de CMV de alto nivel dependientes de tratamiento antiviral para su resolución y una media significativamente menor de AUC_{20-30} de TTV en aquellos que fueron capaces de aclarar la infección sin la necesidad de tratamiento o aquellos sin ADNemias documentadas. Los criterios empleados para el inicio del tratamiento antiviral fueron uno de los siguientes: tiempo de duplicación de CMV ≤ 2 días ($n=2$) o una carga de ADN de CMV > 1.000 copias/ml ($n=15$). Resulta de interés destacar que ambos parámetros se aplican comúnmente como desencadenantes del inicio del tratamiento antiviral en este contexto.

Identificamos, además, un umbral de carga de AUC_{20-30} de ADN de TTV ($\leq 2,8$ copias x día x ml^{-1}) que se asoció, en un análisis univariante, con un incremento del riesgo de sufrir episodios de ADNemia de CMV de alto grado tributarios de tratamiento antiviral, aunque el valor predictivo para este evento fue modesto. El otro factor de riesgo que identificamos en nuestra serie para este tipo de episodios fue una serología frente a CMV donante/receptor D-/R+ respecto a D+/R+, como ya se ha reportado previamente (46). Ningún otro factor, ya fuera el tipo de trasplante, el régimen de acondicionamiento, el uso de ATG, el uso de ciclofosfamida postrasplante o la aEICH, se asoció con ADNemia de alto grado por CMV en nuestra cohorte. Es notorio el alto impacto que ha tenido la inclusión de siete pacientes con $AUC_{20-30}=0$ en el grupo que posteriormente desarrolló ADNemia de CMV de alto nivel. Resulta, sin embargo, de interés destacar que estos pacientes mostraron un incremento modesto o una ausencia de incremento en RAL entre los días 20-30 después del trasplante, fueron clínicamente heterogéneos y no habían sido tratados con ATG, un agente depleccionante de linfocitos T con un fuerte impacto en la dinámica de TTV en SOT (83). Cuatro de estos pacientes recibieron un trasplante cuya fuente fue la sangre de cordón o la médula ósea, o tuvieron una compatibilidad HLA no idéntica. Situaciones, todas ellas, que se asocian con un retraso en la reconstitución de inmunidad T específica frente a virus.

Aunque los datos reportados parecen prometedores, deben ser interpretados con precaución, habida cuenta del escaso número de ADNemias por CMV de alto nivel ($n=17$) incluidas en el análisis. En este contexto, decidimos

no tener en cuenta los episodios de ADNemias de CMV documentados antes del día +30 postrasplante, lo cual supuso aproximadamente el 50% de los episodios, independientemente de si estos finalmente requirieron o no tratamiento antiviral. Esto se justifica por la posibilidad de que la replicación de CMV puede modular la cinética de la carga de CMV, aunque en nuestra serie los datos parecen indicar lo contrario.

Curiosamente, a pesar de que la carga de ADN de TTV se correlaciona, como hemos comentado previamente, con RAL tras el trasplante, en nuestra serie la magnitud de linfocitos absolutos (AUC_{20-30} RAL) no se asoció significativamente con la aparición de episodios de ADNemia de CMV de alto grado. Aunque sí se observaron AUC mayores en pacientes capaces de resolver los episodios de CMV sin necesidad de tratamiento antiviral. Los pacientes incapaces de alcanzar una reconstitución temprana de la inmunidad T frente a CMV tras el trasplante tienen mayor riesgo de desarrollar infección activa por CMV dependiente de tratamiento antiviral para su resolución (65) (66). En este mismo contexto, observamos que los linfocitos T CD8 específicos frente a los antígenos pp65/IE-1, enumerados el día +30 tras el Alo-TPH en pacientes sin ADNemia previa por CMV, mostraban una tendencia hacia una correlación con el AUC_{20-30} de ADN de TTV. Esto sugiere que el AUC_{20-30} de ADN de TTV puede comportarse como un marcador subrogado de reconstitución inmune CMV específica. Sin embargo, esta correlación no alcanzó significación estadística, probablemente debido al escaso número de pacientes de los que se tuvo datos de inmunidad específica, lo cual impide extraer conclusiones robustas al respecto. A pesar de ello, apoyando nuestra hipótesis cabe destacar que también observamos una asociación inversa, aunque tampoco significativa, entre el AUC_{20-30} de ADN de TTV y el pico de ADN de CMV en los episodios de infección activa por este virus. Fuimos incapaces de inferir el riesgo de sufrir uno o más episodios recurrentes de ADNemia por CMV a través del AUC_{20-30} de ADN TTV. Aunque, dado que el riesgo de recurrencias depende en gran medida de la expansión de linfocitos en el episodio inicial de infección activa por CMV, este hecho no fue del todo inesperado.

Tampoco encontramos asociación entre las AUC_{20-30} o AUC_{20-50} y la incidencia de episodios iniciales o recurrentes de EBV. En nuestra cohorte muy

pocos pacientes recibieron rituximab, lo cual impide obtener conclusiones del análisis de este evento. En ausencia de datos de inmunidad específica frente a EBV, especulamos que el espacio de tiempo comprendido entre las mediciones de ADN de TTV puede haber resultado insuficiente para evaluar el nivel de reconstitución de linfocitos T frente al virus, lo cual ocurre a menudo bastante tiempo después del trasplante (84, 85).

Gilles *et al.* (45) encontró el día +30 postrasplante cargas de ADN de TTV significativamente mayores en pacientes con reactivación de CMV, EBV o episodios de aEICH, lo cual refuerza la idea de que la ADNemia de TTV puede ser un marcador subrogado de inmunosupresión. En nuestra serie, la cuantificación de las cargas de TTV pretrasplante, el día +20 o +30 postrasplante, fueron comparables entre ambos grupos (requirieran estos o no terapia antiviral), aunque sí se observó una tendencia con las cargas de ADN de TTV tanto del día +20 cuanto +30 postrasplante. Ambos estudios difieren en las características de la PCR a tiempo real de TTV, CMV y EBV (45). También existen diferencias importantes en las características clínicas de los pacientes incluidos en cada uno de los grupos de comparación. Mientras que en el estudio de Gilles *et al.* (45) todos los pacientes con reactivación de CMV o EBV parecen haber desarrollado aEICH, una condición que origina un incremento significativo de la carga de TTV, como hemos visto previamente, en nuestro estudio los pacientes con y sin infección activa, tanto por CMV como por EBV, ya estuvieran tratados o no, estaban balanceados en términos de incidencia de aEICH.

CMV es un potente agente proinflamatorio e inmunosupresor y, como tal, puede modular la ADNemia de TTV en sangre. Este hecho se pone de manifiesto en individuos sanos. Aquellos con serología positiva para CMV tienen valores de TTV mayores que aquellos con serología negativa, al menos en ciertos rangos de edad (86). A pesar de esto, nosotros no hemos encontrado evidencias que sugirieran que la replicación de CMV pueda influir en la cinética de TTV en los primeros 50 días tras el trasplante alogénico. En primer lugar, ni el incremento de la carga de ADN de TTV tras el injerto (entre los días 20 y 30 tras el trasplante) ni la magnitud de la carga en este intervalo, cuantificada mediante el AUC₂₀₋₃₀ de ADN de TTV, fue aparentemente similar, independientemente de si el paciente sufría ADNemias detectables de CMV antes del día +30 postrasplante o no. En

segundo lugar, no encontramos correlación entre las cargas de ambos virus a lo largo del periodo de estudio. A pesar de ello, consideramos que se requiere una mayor cantidad para corroborar esta asunción.

En la actualidad no disponemos de biomarcadores que permitan inferir el riesgo de los pacientes sometidos a Alo-TPH de sufrir viremias de alto grado por CMV, con la excepción de la cuantificación de niveles de linfocitos T CMV específicos en sangre periférica, que se comporta más como un marcador para predecir protección que como un predictor del riesgo del evento (46). La monitorización temprana de la ADNemia de TTV en este tipo de pacientes puede ser una herramienta útil para satisfacer una necesidad aún no resuelta. Desafortunadamente, un subgrupo de pacientes presenta episodios de infección activa por CMV antes del día +30 postrasplante, aproximadamente un 50% en nuestra serie. Estos no podrían beneficiarse de este biomarcador, al menos tal y como se ha desarrollado aquí.

Por tanto, con todo lo expuesto hasta ahora, consideramos que la dinámica de la ADNemia de TTV en el plasma de los pacientes sometidos a Alo-TPH, en el periodo temprano, puede comportarse como marcador de reconstitución inmune, al contrario de lo observado en el trasplante de órgano sólido (7, 28, 35, 38, 83). Este fenómeno se puede explicar a partir de los siguientes hechos:

- (i) TTV se replica mayoritariamente en los linfocitos(18)
- (ii) La citopenia (linfopenia) que sobreviene tras el acondicionamiento: los regímenes de inducción tras el TOS no generan una linfopenia tan profunda (excepto cuando se usan fármacos depleccionantes de linfocitos T a altas dosis)
- (iii) La repoblación rápida de linfocitos T tras el injerto se asocia con un descenso del riesgo de infección oportunista(46)
- (iv) Existe una correlación directa entre RAL y las ADNemias de TTV en los estadios inmediatamente posteriores al injerto.

No obstante, los episodios de aEICH que requieren altas dosis de corticoides, como hemos comentado previamente, pueden modificar la carga de TTV, lo cual podría desdibujar esta relación. También resulta de interés estudiar si posteriormente la carga de ADN de TTV, una vez alcanzado un estado de equilibrio estacionario, refleja el nivel de inmunosupresión de manera análoga a

como ocurre en el trasplante de órgano sólido, así como si su magnitud está relacionada con la enfermedad de base, el régimen de inmunosupresión o el tipo de trasplante.

Una vez más, las limitaciones de este segundo proyecto fueron, por una parte, su carácter retrospectivo, lo cual hizo imposible conseguir todas las muestras que en un principio se habían planificado; por otro lado, el reducido tamaño de la cohorte, así como, por último, el hecho de que no se dispusiera de todos los datos de inmunidad CMV específica.

En el tercer proyecto (Albert E. J Med Virol 2018) examinamos el comportamiento cinético de las cargas de ADN de TTV en la saliva con el fin de investigar si esta muestra era una alternativa adecuada al plasma para la monitorización del ADN de TTV, dadas las ventajas obvias que esta muestra ofrece sobre el plasma. Otros trabajos desarrollados en individuos sanos mostraron que el ADN de TTV se detecta frecuentemente en saliva (53-55), e incluso que en este medio puede encontrarse en mayor cuantía que en muestras de suero pareadas (54). Aquí hemos examinado la cinética de las cargas de ADN de TTV en muestras de saliva obtenidas de una cohorte de pacientes sometidos a alo-TPH y lo hemos comparado tanto con las ADNemias del virus en plasma como con el RAL. Hasta donde sabemos, ningún estudio previo ha abordado este tema.

Nuestro estudio presenta varios hallazgos de potencial interés biológico y clínico:

(i) El ADN de TTV se ha detectado en mayor proporción en las muestras de saliva que en las de plasma; tal afirmación se cumplió en cada uno de los momentos temporales evaluados y fue particularmente notable poco después del injerto. De hecho, en 10 pacientes detectamos ADN de TTV en la saliva sin ADNemia de TTV concurrente, mientras que solo 2 pacientes tuvieron ADNemia de TTV en ausencia de cargas de ADN de TTV detectables en saliva. En total, hubo 6 pacientes en los que el ADN de TTV no se pudo detectar en la saliva. Como no se realizó una cuantificación del ADN celular total, no pudimos inferir si estos últimos especímenes eran de una calidad adecuada para su cuantificación mediante PCR.

(ii) Las cargas de ADN de TTV en la saliva fueron de mayor magnitud que las cuantificadas en muestras de plasma, nuevamente en todos los tiempos de muestreo estudiados, incluidas las muestras pareadas previas al trasplante. Aunque esto podría deberse al reclutamiento local de linfocitos T (y a la consiguiente secreción de TTV) debido a la mucositis oral, un evento muy prevalente días después del acondicionamiento farmacológico que acompaña al trasplante hematológico. Por otra parte, esta observación también puede indicar que la cavidad oral es un lugar privilegiado para la replicación de TTV. Es de interés destacar que estos datos deben interpretarse con precaución, ya que se utilizaron plataformas diferentes para la extracción del ADN de las muestras de saliva y las de plasma. En esta misma línea, todavía se debate, de hecho, si existe una negatividad real de TTV en la población general; el uso de herramientas de detección y cuantificación más sensibles podría ayudar a resolver el problema

(iii) La cinética de la carga de ADN de TTV en muestras de saliva y plasma fue análoga. En general, se encontró que las cargas de ADN de TTV aumentan de manera constante tras el injerto, alcanzando niveles máximos aproximadamente el día +90 tras el trasplante, en ambos compartimentos; de hecho, las cargas de ADN de TTV en las muestras de saliva y plasma se correlacionaron modesta pero significativamente durante todo el período de estudio, en mayor medida alrededor de los días +30 y +50 postrasplante; sin embargo, la carga de ADN de TTV en la saliva tardó más tiempo en alcanzar niveles superiores a aquellos medidos antes del trasplante.

(iv) La existencia de una correlación directa entre las cargas de ADN de TTV y el RAL tras el injerto ha sido ampliamente documentada, tanto en este trabajo como por otros autores. A este respecto, resulta de interés destacar que el RAL, en esta clase de pacientes, no permite inferir el nivel de protección inmune contra los procesos infecciosos de manera general. De hecho, se ha probado previamente que los RAL no se asocian significativamente con la supervivencia libre de viremia por CMV dentro de los primeros 120 días tras el Alo-TPH (79). Por lo tanto, la monitorización de la carga de ADN de TTV, tanto en saliva como en plasma, no se debe entender como una alternativa al recuento

leucocitario, cuya medición se basa en procedimientos altamente estandarizados y de menor coste.

La principal limitación de este estudio es el tamaño relativamente limitado de la cohorte y, en particular, la falta de disponibilidad de una serie de muestras secuenciales que habíamos planeado analizar. Además, los diferentes tiempos de muestreo no tuvieron la suficiente frecuencia como para diseccionar la cinética temprana del virus en este tipo de muestra tras el régimen de acondicionamiento. Por tanto, los datos presentados aquí sugieren que la monitorización secuencial de la carga de ADN de TTV en muestras de saliva permite la inferencia del grado de repoblación de linfocitos después del injerto, al igual que la monitorización de la carga de ADN de TTV en plasma. Harán falta más estudios para determinar si la monitorización de los niveles de ADN de TTV en muestras de saliva puede ser de alguna utilidad para la inferencia de la reconstitución inmune después de alo-TPH.

En el cuarto proyecto (Albert E. Med Microbiol Immunol 2019) evaluamos la dinámica de ADN de TTV en un periodo tardío tras el trasplante (tras el día 100) así como su utilidad clínica potencial como biomarcador del grado de inmunosupresión. Como hemos comentado, su uso como marcador subrogado de la competencia inmune en receptores SOT está respaldado por una gran cantidad de evidencia (28, 35, 37-40, 83, 87). Sin embargo, discernir la utilidad clínica de la monitorización del virus en el entorno del alo-TPH sigue siendo complicado, lo que probablemente refleja las profundas diferencias biológicas entre ambas modalidades de trasplante. Tal como hemos visto, la magnitud de la carga de ADN de TTV tras el injerto puede comportarse como un marcador de la reconstitución inmunológica, de hecho, hemos relacionado la magnitud de la carga de TTV con el nivel de protección contra la ADNemia de alto grado de citomegalovirus en plasma (CMV). Otros estudios, por el contrario, apuntan a la idea opuesta, según la cual el ADN de TTV en plasma se comportaría como un marcador de inmunosupresión (45, 88). Las observaciones realizadas en este mismo proyecto indican que el grado de inmunosupresión después del trasplante puede modular el nivel de replicación de TTV; de hecho, encontramos, en el primer trabajo, que los pacientes con aEICH grave que recibieron

corticosteroides a dosis altas experimentaron aumentos en la carga de ADN de TTV entre los días + 20 y + 60 tras el trasplante de mayor magnitud que los controles (pacientes con grados 0-I de aEICH), independientemente de los recuentos de RAL. A la luz de estos resultados, postulamos que cuando los niveles de ADN de TTV alcanzan la fase de meseta, lo cual puede devenir una vez los linfocitos han conseguido una repoblación completa, el virus se comportaría como un biomarcador de inmunosupresión, una suposición que otros autores han compartido(88).

En nuestro medio, tal y como refleja este cuarto trabajo, la dinámica de la carga de ADN de TTV durante los primeros 8 meses tras el trasplante ha seguido un patrón que ya había sido descrito previamente (88); se observaron niveles crecientes de ADN de TTV desde aproximadamente el momento del injerto hasta alcanzar su pico máximo el día + 90 postrasplante; y tras este periodo de reconstitución se observaron niveles relativamente estables hasta el día + 210 tras el trasplante, momento en el que disminuyeron ligeramente, aunque siempre con valores por encima de los medidos antes del acondicionamiento. El escaso número de casos en esta serie impidió cualquier análisis significativo de subgrupos que permitiera evaluar el impacto del tipo de enfermedad de base o el régimen de acondicionamiento en la cinética tardía de la carga de ADN de TTV como sí se realizó en el otro estudio(88).

La idea de que la carga de ADN de TTV puede comportarse como un marcador de inmunosupresión después del día + 100 después de alo-TPH se respaldada principalmente por dos observaciones. En primer lugar, las cargas de ADN de TTV medidas entre los días + 120 y + 210 tras el trasplante se correlacionaron inversamente con los valores de RAL pareados. En un estudio reciente(88), se observó esta misma correlación inversa entre estos dos parámetros; en dicho análisis, sin embargo, se tomaron en consideración todos los valores medidos durante el período de seguimiento, es decir, no se realizó un subanálisis que permitiera inferir la dinámica del virus para los tiempos temprano y tardío tras el alo-TPH. En segundo lugar, la mediana del AUC de ADN de TTV entre los días 90 - 210 tras el trasplante fue significativamente mayor en pacientes tratados con prednisona para EICH (aguda, crónica o ambas) que en los controles, incluso se observó una tendencia que correlacionaba este parámetro cinético de ADN de

TTV y la dosis acumulada de corticosteroides empleada. Esta ampliamente demostrado que el uso de glucocorticoides afecta significativamente a la funcionalidad del sistema inmune, de ahí el impacto que observamos entre su uso y la alteración de la cinética del virus. Resulta de interés destacar el hecho de que el tipo de régimen inmunosupresor utilizado para la prevención de EICH no difirió entre los pacientes sometidos a tratamiento con corticosteroides y los que no lo hicieron. En línea con nuestras observaciones, Wohlfarth *et al.* (88) informaron que los pacientes con aEICH que requirieron corticosteroides sistémicos a dosis altas mostraron una tendencia hacia niveles más altos de ADN de TTV a los 4–5 meses después del trasplante que los que no.

La correlación inversa hallada entre las cargas de ADN de TTV y el RAL medidos ambos entre los días + 120 y + 210 después del trasplante puede explicarse, al menos en parte, por el efecto de los corticosteroides que afecta a la redistribución de linfocitos (lo que resulta en linfopenia) y su funcionalidad(89). Es probable que la inmunidad de las células T desempeñe un papel relevante en el control de la replicación de TTV. Este hallazgo también favorece la idea de que los linfocitos T no son el único anfitrión celular para la replicación de TTV (28). De hecho, en esta misma línea, como acabamos de comentar, en general, las cargas de ADN de TTV son significativamente más altas en la saliva que en el plasma y se correlacionan peor con el recuento de linfocitos que aquellas cuantificadas en plasma después del injerto.

Éste ha sido un estudio de tipo exploratorio, cuyo objetivo principal era caracterizar la cinética tardía de la carga de ADN de TTV tras el alo-TPH, no se llevó a cabo, por lo tanto, con el fin de evaluar el valor clínico potencial de las cargas de ADN de TTV como un biomarcador, así como su capacidad para predecir complicaciones relacionadas con la inmunosupresión después del trasplante. Además de su diseño retrospectivo y unicéntrico, las principales limitaciones de este trabajo son el pequeño tamaño de la cohorte, lo que socava la solidez de los análisis estadísticos y la imposibilidad de tener todas las muestras de todos los pacientes para la cuantificación del ADN de TTV, aunque el número de especímenes faltantes representó menos del 10% de los previstos inicialmente para su análisis.

En el último de nuestros proyectos (Fernández-Ruiz M. Am J Transplant 2018) evaluamos la utilidad de la monitorización de TTV, en el ámbito del trasplante del órgano sólido, para la predicción de infecciones postrasplante, infecciones oportunistas o en general cualquier tipo de reacción adversa atribuible a un nivel de inmunosupresión excesivo. En él encontramos una clara asociación entre la cinética del virus y la infección postrasplante que se expresó de la siguiente manera; Todos los pacientes que desarrollaron una infección postrasplante o iRAE a partir del primer mes mostraron valores más altos de ADN de TTV en los meses previos, tanto en el valor individual de la carga de ADN del virus como cuando lo expresamos por medio del AUC que refleja la magnitud acumulativa de estas cargas. Por otro lado, las cargas pretrasplante de estos pacientes fueron mayores en aquellos con una probabilidad menor de sufrir rechazo agudo del injerto. Todo esto refuerza la idea de que la cinética de TTV está fuertemente asociada a la inmunocompetencia del paciente trasplantado. Este trabajo también aporta datos de interés epidemiológicos. (i) Detectamos ADN de TTV en la muestra basal del 96,3% de los pacientes con ESRD (enfermedad renal en fase terminal), lo que indica que la prevalencia en este grupo de población es mayor que en individuos sanos(86, 90, 91), pero similar a otros enfermos crónicos ya sean enfermos con VIH, con hepatitis infecciosa (31, 91, 92) o con enfermedad terminal pulmonar o hepática(83, 93, 94). (ii) Hemos observado una correlación directa entre la edad y la carga de TTV, como ya habían documentado previamente otros autores(86), este hecho se justifica por la falta de control de virus asociada a la inmunosenescencia. En esta misma línea encontramos que los pacientes seropositivos para CMV tenían cargas de ADN de TTV mayores(95).

Atendiendo a la utilidad de la monitorización de la cinética de TTV como marcador de inmunosupresión, encontramos una correlación inversa entre la ADNemia de TTV y el recuento de linfocitos T, CD3+, CD4+ y CD8+ tanto en el primer mes postrasplante como en el tercero. Se cree que los linfocitos T son el principal soporte celular que posibilita la replicación de TTV, esta afirmación se ha basado en la observación de un descenso abrupto en la ADNemia de TTV cuando los pacientes sometidos a trasplante se trataban con fármacos

depleccionantes de linfocitos T, no hallándose este mismo fenómeno cuando se utilizaban otros fármacos sin esta actividad para los regímenes de inducción(18). En nuestra cohorte, sin embargo, el uso de timoglobulina como terapia de inducción se asoció con mayores cargas de TTV y con tiempos de duplicación menores durante el primer mes postrasplante. El origen de esta discrepancia podría hallarse, por un lado, en el hecho de que la disminución en la carga de ADN de TTV reportada en estudios previos únicamente fue evidente en las primeras dos semanas tras el trasplante(18), es factible que este hecho pueda verse atenuado a medio plazo por la repoblación de linfocitos T. Además, se ha demostrado que el uso de timoglobulina favorece el tránsito hacia el último estado de diferenciación de linfocitos T, lo cual acelera la inmunosenescencia de estas células(96), perjudicando la respuesta inmune específica frente a TTV lo que podría justificar estas cargas elevadas. En segundo lugar, porque la dosis de ATG así como el resto de fármacos que componen el esquema de inmunosupresión pueden ser diferentes entre ambas cohortes.

Documentamos un incremento rápido de la carga viral entre los días +7 y +30 postrasplante seguido de una curva menos pronunciada. El pico máximo de carga se alcanzó para la mayoría de los pacientes el tercer mes postrasplante. Estos hallazgos están en concordancia como aquellos publicados previamente por el grupo de Görzer *et al.* (38), que evaluó exhaustivamente la dinámica del virus los primeros treinta días tras el trasplante de pulmón y donde se observó que el virus sufría un retraso de aproximadamente 15 días antes de iniciar su trayectoria ascendente. La línea de regresión que mejor ajustaba a la dinámica del virus era un curva sigmoidea o trifásica, con un incremento moderado que se inicia como hemos comentado, aproximadamente en el día 15. Posteriormente, existe un segundo tramo prácticamente rectilíneo que se prolonga hasta aproximadamente el día 45. Éste es el tramo más pronunciado y correspondería a la fase exponencial de la curva sigmoidea. Por último, una fase donde el incremento desciende progresivamente hasta alcanzar el pico máximo. En nuestra cohorte también encontramos que el tiempo de duplicación en la primera semana fue mayor que en las semanas posteriores hasta el día +30 confirmando este pequeño retraso en el efecto de la inmunosupresión sobre la cinética del virus.

Estudios recientes han reportado una asociación entre cargas indetectables de ADNemia de TTV y un incremento del riesgo de rechazo tras el trasplante de riñón(39), pulmón(41) o hígado(40). En consonancia con nuestros hallazgos, en la cohorte Suiza de Simmonetta *et al*(40), se demostró que la incidencia acumulada de rechazo durante el primer año de seguimiento fue mayor entre los pacientes con cargas indetectables de TTV, que en pacientes con títulos detectables. Sin embargo, apenas disponemos de datos que permitan inferir el valor predictivo positivo de una carga elevada de TTV sobre el riesgo de sufrir infecciones postrasplante. Gozer *et al.*, demostró que el valor de $9,3 \log_{10}$ copias/ml era predictivo para el desarrollo de infecciones en el postrasplante de pulmón, aunque el tiempo de monitorización fue bastante amplio, entre 89 y 364 días(37). Recientemente, sin embargo, Nordén *et al.*, no pudo encontrar esta asociación entre la carga de TTV y el riesgo de infecciones tras el trasplante de pulmón(42). No obstante, es importante destacar que los resultados evaluados diferían entre ambos estudios.

Nosotros observamos que la magnitud de la carga de ADN de TTV medida como AUC estuvo directamente relacionada con el riesgo subsecuente de infección e iRAE e incluso identificamos dos valores umbrales el primer mes tras el trasplante que permitían predecir el riesgo de sufrir estos eventos, fueron el valor de 3,15 y 4,56 \log_{10} copias/ml respectivamente. Dado que el valor predictivo positivo de un test es proporcional a la prevalencia del evento evaluado, las estimaciones de este VPP se vieron limitadas por la baja incidencia acumulada tanto de infección como de iRAE. Sin embargo, el valor predictivo negativo fue sustancialmente mayor, de manera que los pacientes con ADNemias de TTV inferiores al valor umbral presentaron un riesgo muy bajo de sufrir una infección o iRAE postrasplante.

Curiosamente el hecho de que el virus presentara una dinámica ascendente entre los días +7 y +30 actuó como factor predictivo independiente de infección postrasplante. Probablemente esto se deba a que esta dinámica selecciona un subgrupo de pacientes incapaces de controlar la infección por TTV debido una funcionalidad inmunológica deficiente asociada al tratamiento inmunosupresor. De hecho, el tiempo de duplicación de TTV entre los días +7 y +30 postrasplante

fue menor entre los pacientes que posteriormente desarrollaron infecciones postrasplante, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.

Mediante el uso diferenciado de la variable infección postrasplante e iRAE hemos conseguido estudiar la dinámica de TTV desde dos perspectivas complementarias. La primera variable evalúa la susceptibilidad del individuo a la infección, ya que abarca una miscelánea de factores, además de la terapia inmunosupresora, que influyen en este evento, como los procedimientos invasivos, las exposiciones ambientales, etc. Por otra parte, el concepto de iRAE se concibió con el fin de captar de manera más precisa las consecuencias del estado de inmunosupresión tras el trasplante. El hecho de que las diferencias entre las ADNemia de TTV fueran más marcadas entre pacientes con sin esta segunda variable que con la primera justifica esta diferenciación.

Aunque no dispusimos de un grupo de control formal compuesto por sujetos no inmunocomprometidos, contamos con un estudio previo de Kulifaj *et al.* que incluyó 31 voluntarios sanos en los que se midieron las cargas de ADN en plasma y que utilizó el mismo ensayo de PCR que hemos empleado en la presente investigación (97), lo que permite comparaciones válidas. La carga media de ADN de TTV en este grupo de pacientes no inmunocomprometidos fue de $2.8 \pm 1.1 \log_{10}$ copias / mL, valor prácticamente idéntico a lo observado por nosotros en la evaluación previa al trasplante (línea de base) ($2.9 \pm 1.6 \log_{10}$ copias / mL). Los dos valores de corte seleccionados en el primer mes, (3,15 y 4,56 respectivamente) fueron notablemente más altos que la carga de ADN esperada para individuos sanos o pacientes con ESRD antes del trasplante. Esta diferencia fue particularmente evidente (acercándose a $2 \log_{10}$) para el valor umbral orientado a la predicción de iRAE, lo cual concuerda con la mayor capacidad de esta variable para valorar el estado neto de la inmunosupresión.

Las limitaciones de este último trabajo, como en los casos anteriores, es que se trata de un estudio monocéntrico, lo cual limita su validez externa. Otras limitaciones son la baja incidencia de iRAE. El tiempo transcurrido entre mediciones, lo que produce un menoscabo en la precisión del tiempo de duplicación calculado. Por último, la PCR empleada, que no permite diferenciar entre genogrupos, de manera que podrían habernos pasado desapercibidas

modificaciones en la proporción de estos genogrupos durante el seguimiento de los pacientes.

Conclusiones

1. En el alo-TPH la carga de TTV en plasma parece comportarse como un marcador subrogado de reconstitución inmunitaria tras en injerto durante los primeros tres meses postrasplante.
2. En el alo-TPH, durante los primeros 3 meses, el área bajo la curva de a carga de ADN de TTV permite predecir el desarrollo de ADNemia de CMV tributaria de tratamiento antiviral anticipado.
3. Las cargas de ADN de TTV cuantificadas una vez alcanzado el estado de equilibrio dinámico, aproximadamente 90 días después de alo-TPH, podrían reflejar el estado neto de inmunosupresión de los pacientes.
4. La monitorización secuencial de la carga de ADN de TTV en muestras de saliva puede resultar de utilidad para inferir el grado de reconstitución inmune en receptores de alo-TPH.
5. La cinética de ADN de TTV puede ser un marcador útil para predecir, no solo el desarrollo de infecciones postrasplante sino también otros eventos adversos atribuibles a la inmunosupresión en pacientes sometidos a trasplante de riñón.

Bibliografía

1. 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. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;241(1):92-7.
2. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 2009;331:1-20.
3. Biagini P. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Current topics in microbiology and immunology*. 2009;331:21-33.
4. Malathi VG, Renuka Devi P. ssDNA viruses: key players in global virome. *Virusdisease*. 2019;30(1):3-12.
5. Rosario K, Duffy S, Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. *Archives of virology*. 2012;157(10):1851-71.
6. King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier; 2011.
7. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(7):589-93.
8. Devalle S, Niel C. Distribution of TT virus genomic groups 1–5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *Journal of medical virology*. 2004;72(1):166-73.
9. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihaescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Archives of virology*. 2015;160(4):893-908.
10. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, et al. Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkkappaB kinases. *Journal of virology*. 2007;81(21):11917-24.
11. Owens, Flores, Di Serio F, Li S, Pallás V, Randles J, et al. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2012. p. 1221-34.
12. Kakkola L, Hedman K, Qiu J, Pintel D. Replication of and protein synthesis by TT viruses. *TT Viruses*: Springer; 2009. p. 53-64.
13. Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, et al. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *Journal of medical virology*. 2000;61(1):165-70.
14. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *Journal of medical virology*. 2001;64(2):190-4.
15. Mariscal LF, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Inigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolomé J, et al. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2002;301(1):121-9.
16. Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, et al. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *Journal of virology*. 2010;84(13):6891-3.
17. Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, et al. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood*. 1999;93(8):2485-90.
18. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *Journal of general virology*. 2015;96(1):115-7.
19. Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, et al. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(9):4807-10.
20. Maggi F, Bendinelli M. Human anelloviruses and the central nervous system. *Reviews in medical virology*. 2010;20(6):392-407.

21. Maggi F, Pifferi M, Tempestini E, Fornai C, Lanini L, Andreoli E, et al. TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *Journal of virology*. 2003;77(16):9081-3.
22. Emre S, Otlu B, Çankaya C, Doganay S, Durmaz R. Transfusion-transmitted virus DNA in serum, tear and aqueous humour of patients undergoing cataract operation. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2007;35(8):759-62.
23. Osioy C, Sauder C. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepatology research*. 2000;16(2):155-62.
24. Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Meschi S, Rocchi J, Fornai C, et al. Rapid increase in total torquetenovirus (TTV) plasma viremia load reveals an apparently transient superinfection by a TTV of a novel group 2 genotype. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(7):2571-4.
25. Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Isola P, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *Journal of virology*. 2001;75(24):11999-2004.
26. Maggi F, Bendinelli M. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *TT Viruses: Springer*; 2009. p. 65-90.
27. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*. 2017;546(7660):646.
28. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155(5):1178-87.
29. Freer G, Maggi F, Pifferi M, Di Cicco ME, Peroni DG, Pistello M. The virome and its major component, Anellovirus, a convoluted system molding human immune defenses and possibly affecting the development of asthma and respiratory diseases in childhood. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:686.
30. Choi J, Bano A, Azzi J. Biomarkers in Solid Organ Transplantation. *Clinics in laboratory medicine*. 2019;39(1):73-85.
31. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS (London, England)*. 2001;15(5):563-70.
32. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, Parner J, Kaae Christensen J, Brasholt MS, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV clinical trials*. 2002;3(4):287-95.
33. Thom K, Petrik J. Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *Journal of medical virology*. 2007;79(1):1-7.
34. Fogli M, Torti C, Malacarne F, Fiorentini S, Albani M, Izzo I, et al. Emergence of exhausted B cells in asymptomatic HIV-1-infected patients naive for HAART is related to reduced immune surveillance. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012.
35. Béland K, Dore-Nguyen M, Gagné M-J, Patey N, Brassard J, Alvarez F, et al. Torque teno virus in children with orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *The Journal of infectious diseases*. 2013.
36. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(4):667-8.
37. Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33(3):320-3.

38. Görzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PloS one*. 2015;10(4):e0122975.
39. Schiemann M, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, Kohlbeck P, Rasoul-Rockenschaub S, Heilos A, et al. Torque Teno Virus Load–Inverse Association with Antibody-Mediated Rejection after Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(2):360.
40. Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, Van Delden C, Giostra E, Morard I, et al. Torque teno virus load and acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2017;101(7):e219-e21.
41. Görzer I, Jaksch P, Strassl R, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2017;36(3):366-8.
42. Nordén R, Magnusson J, Lundin A, Tang K-W, Nilsson S, Lindh M, et al., editors. Quantification of torque teno virus and Epstein-Barr virus is of limited value for predicting the net state of immunosuppression after lung transplantation. *Open forum infectious diseases*; 2018: Oxford University Press US.
43. Focosi D, Maggi F, Albani M, Macera L, Ricci V, Gragnani S, et al. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *Journal of Clinical Virology*. 2010;47(2):189-92.
44. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(3):440-2.
45. Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkiew S, Fish I, et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Medical microbiology and immunology*. 2017;206(5):355-62.
46. Romero PP, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virology*. 2015;10(2):113-34.
47. Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, Socié G, Banks PM, Sobocinski KA, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113(20):4992-5001.
48. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *The Lancet Infectious Diseases*. 2019.
49. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, et al., editors. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Seminars in immunopathology*; 2008: Springer.
50. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Current opinion in hematology*. 2012;19(4):324-35.
51. Gesundheit B, Budowski E, Israeli M, Shapira M, Resnick I, Bringer R, et al. Assessment of CD4 T-lymphocyte reactivity by the Cylex ImmuKnow assay in patients following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2010;45(3):527.
52. Jo Y, Lim J, Kim Y, Han K, Min W-S, Oh E-J. CD4 T-cell function assay using Cylex ImmuKnow and lymphocyte subset recovery following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant immunology*. 2015;33(2):78-83.
53. Ross R, Viazov S, Runde V, Schaefer U, Roggendorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *Journal of clinical virology*. 1999;13(3):181-4.
54. Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura T, Ito M, et al. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible

- transmission route and replication site of TT virus. *Journal of medical virology*. 2000;62(4):531-7.
55. Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(6):2407-8.
 56. Veerman E, Van den Keybus P, Vissink A, Amerongen AN. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *European journal of oral sciences*. 1996;104(4):346-52.
 57. Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Siciliano G, Menichetti F, Tascini C, et al. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *Journal of medical virology*. 2001;65(2):418-22.
 58. Pistello M, Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Freer G, Fornai C, et al. TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *Journal of medical virology*. 2001;63(2):189-95.
 59. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *Journal of virology*. 2003;77(4):2418-25.
 60. Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ, et al. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(2):207-9.
 61. Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia M, Amat P, Clari M, et al. Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone marrow transplantation*. 2013;48(7):1010.
 62. Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(2):654-6.
 63. Solano C, Giménez E, Piñana J, Vinuesa V, Poujois S, Zaragoza S, et al. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(5):718.
 64. Vinuesa V, Solano C, Giménez E, Navarro D. Comparison of the artus Epstein–Barr virus (EBV) PCR kit and the Abbott RealTime EBV assay for measuring plasma EBV DNA loads in allogeneic stem cell transplant recipients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2017;88(1):36-8.
 65. Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J, et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferongamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008;93(9):1434.
 66. Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, De La Camara R, Lopez J, et al. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8+ and CD4+ T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2011;46(11):1437.
 67. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner C, Neiman P, Clift R, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donor, S. *Transplantation*. 1974;18(4):295-304.
 68. Torres A, Sánchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martín C, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *haematologica*. 2001;86(1):24-9.

69. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;64(1):87-91.
70. Solano C, Giménez E, Piñana JL, Albert E, Vinuesa V, Hernández-Boluda JC, et al. Impact of cytomegalovirus DNAemia on overall and non-relapse mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*. 2017;19(4):e12717.
71. Fernández-Ruiz M, Kumar D, Husain S, Lilly L, Renner E, Mazzulli T, et al. Utility of a monitoring strategy for human herpesviruses 6 and 7 viremia after liver transplantation: a randomized clinical trial. *Transplantation*. 2015;99(1):106-13.
72. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. *Clinical infectious diseases*. 2008;46(12):1813-21.
73. San-Juan R, De Dios B, Navarro D, García-Reyne A, Lumbreras C, Bravo D, et al. Epstein-Barr virus DNAemia is an early surrogate marker of the net state of immunosuppression in solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2013;95(5):688-93.
74. Giménez E, Solano C, Vinuesa V, Hernández-Boluda JC, Albert E, Pérez A, et al. Cytomegalovirus DNAemia burden and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an area under a curve-based investigational approach. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(5):805-7.
75. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone marrow transplantation*. 2016;51(3):440.
76. Fabrizio M, Valentina R, Mauro B, Luca CN, Daniele F, Federico P, et al. Changes in CD8+ 57+ T lymphocyte expansions after autologous hematopoietic stem cell transplantation correlate with changes in torquetenovirus viremia. *Transplantation*. 2008;85(12):1867-8.
77. Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(1):107-16.
78. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134(1):17-32.
79. Gutiérrez A, Muñoz I, Solano C, Benet I, Gimeno C, Marugán I, et al. Reconstitution of lymphocyte populations and cytomegalovirus viremia or disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Journal of medical virology*. 2003;70(3):399-403.
80. Pera A, Campos C, Corona A, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Larbi A, et al. CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals. *PloS one*. 2014;9(2):e88538.
81. Pera A, Vasudev A, Tan C, Kared H, Solana R, Larbi A. CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4+ T cell subset coexpressing CD57 and CD154. *Journal of leukocyte biology*. 2017;101(2):555-66.
82. Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM, et al. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *The Lancet Haematology*. 2016;3(3):e119-e27.
83. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(4):667-8.
84. Marshall NA, Howe JG, Formica R, Krause D, Wagner JE, Berliner N, et al. Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96(8):2814-21.

85. Meij P, van Esser JW, Niesters HG, van Baarle D, Miedema F, Blake N, et al. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)—specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood*. 2003;101(11):4290-7.
86. Haloschan M, Bettesch R, Görzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stöckl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age*. 2014;36(5):9716.
87. Jaksch P, Kundi M, Görzer I, Muraközy G, Lambers C, Benazzo A, et al. Torque teno virus as a novel biomarker targeting the efficacy of immunosuppression after lung transplantation. *The Journal of infectious diseases*. 2018;218(12):1922-8.
88. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, Hopfinger G, Goerzer I, Puchhammer-Stoeckl E, et al. Torquetenovirus dynamics and immune marker properties in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective longitudinal study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(1):194-9.
89. Fauci A. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology*. 1975;28(4):669.
90. Biagini P, Gallian P, Touinssi M, Cantaloube J, Zapitelli JP, De Lamballerie X, et al. High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems. *Transfusion*. 2000;40(5):590-5.
91. Saláková M, Němeček V, König J, Tachezy R. Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic. *BMC infectious diseases*. 2004;4(1):56.
92. Garcia-Alvarez M, Berenguer J, Alvarez E, Guzman-Fulgencio M, Cosin J, Miralles P, et al. Association of torque teno virus (TTV) and torque teno mini virus (TTMV) with liver disease among patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2013;32(2):289-97.
93. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S, et al. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2006;25(9):804-8.
94. Bando M, Nakayama M, Takahashi M, Hosono T, Mato N, Yamasawa H, et al. Serum torque teno virus DNA titer in idiopathic pulmonary fibrosis patients with acute respiratory worsening. *Internal Medicine*. 2015;54(9):1015-9.
95. Tu W, Rao S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2111.
96. Crepin T, Carron C, Roubiou C, Gaugler B, Gaiffe E, Simula-Faivre D, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(4):1028-38.
97. Kulifaj D, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, Munteanu E, Pichon N, Dubé M, et al. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *Journal of Clinical Virology*. 2018;105:118-27.

Anexos

- 123 -

Anexo I

Escrito del Director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la tesis doctoral

ARTÍCULO 1

Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. Journal of Clinical Virology. 2017: 94; 22–28

Eliseo Albert (1), Carlos Solano (2,3), Tania Pascual (1), Ignacio Torres (1), Lisa Macera (4), Daniele Focosi (5), Fabrizio Maggi (4), Estela Giménez (1), Paula Amat (2), David Navarro (6).

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

2.- Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

3.- Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

4.- Unidad de Virología, Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

5.- Banco de Sangre del Noroeste de la Toscana, Pisa. Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

6.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Eliseo Albert realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, incluyendo la realización de las PCR, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

3,10

ARTÍCULO 2

The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Bone Marrow Transplantation. 2017; 1–8

Eliseo Albert (1), Carlos Solano (2,3), Estela Giménez (1), Daniele Focosi (4), Ariadna Pérez (2), Lisa Macera (5), Jose Luis Piñana (2), Juan Carlos Hernández-Boluda (2), Fabrizio Maggi (4), David Navarro (1,6).

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

2.- Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

3.- Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

4.- Unidad de Virología, Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

5.- Banco de Sangre del Noroeste de la Toscana, Pisa. Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

6.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Eliseo Albert realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, incluyendo la realización de las PCR, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

4,50

ARTÍCULO 3

Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Journal Medical Virology. 2018; 1-6.

Eliseo Albert (1), Ignacio Torres (1), Alberto Talaya (1), Estela Giménez (1), José Luis Piñana (2), Juan Carlos Hernández-Boluda (2), Daniele Focosi (3), Lisa Macera (4), Fabrizio Maggi (4), Carlos Solano (2,5), David Navarro (1,6).

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

2.- Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

3.- Banco de Sangre del Noroeste de la Toscana, Pisa. Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

4.- Unidad de Virología, Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

5.- Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

6.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Eliseo Albert realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, incluyendo la realización de las PCR, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

1,94

ARTÍCULO 4

Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. American Journal of Transplantation. 2018;1–11.

Mario Fernandez-Ruiz (1,2), Eliseo Albert (3), Estela Giménez (3) Tamara Ruiz-Merlo (1,2), Patricia Parra (1,2), Francisco López-Medrano (1,2) Rafael San Juan (1,2), Natalia Polanco 4), Amado Andrés (4), David Navarro (3,5), José María Aguado (1,2)

1.-Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario “12 de Octubre,” Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España.

2.-Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

3.-Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

4.-Departamento de Nefrología, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España.

5.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

El doctorando, Eliseo Albert, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, incluyendo la realización de la técnica analítica de amplificación de ácidos nucleicos. Participó en el análisis estadístico y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

6,49

ARTÍCULO 5

Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Medical Microbiology and Immunology. 2019: 208; 253-258

Eliseo Albert (1), Carlos Solano (2,3), Estela Giménez (1), Daniele Focosi (4), Ariadna Pérez (2), Lisa Macera (5), José Luis Piñana (2), Eva María Mateo (1), Juan Carlos Hernández Boluda (2), Fabrizio Maggi (5,6), David Navarro (1,7)

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

2.- Servicio Hematología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España

3.- Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

4.- Banco de Sangre del Noroeste de la Toscana, Pisa. Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

5.- Unidad de Virología, Universidad de Pisa Hospital, Pisa, Italia

6.- Department of Translational Research, Universidad de Pisa, Pisa, Italia

7.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Eliseo Albert realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, incluyendo la realización de las PCR, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

3,20

Anexo II

Informe del Director de la tesis doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la tesis doctoral.

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, realizo el presente escrito con el objetivo de justificar la situación del doctorando como coautor en el **artículo 4** (Fernandez-Ruiz M. Am J Transplant 2018) de la presente tesis doctoral.

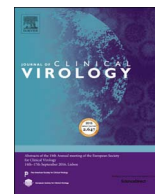
El doctorando, Eliseo Albert, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, incluyendo la realización de la técnica analítica de amplificación de ácidos nucleicos. Participó en el análisis estadístico y revisó el texto definitivo.

Ni el doctorando, Eliseo Albert, ni ninguno de sus coautores han utilizado ninguno de los artículos compendiados en esta tesis ni implícita ni explícitamente para la realización de otras tesis doctorales.



David Navarro Ortega

Artículos



Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients



Eliseo Albert^a, Carlos Solano^{b,c}, Tania Pascual^a, Ignacio Torres^a, Lisa Macera^d, Daniele Focosi^e, Fabrizio Maggi^d, Estela Giménez^a, Paula Amat^b, David Navarro^{a,f,*}

^a Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

^b Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

^c Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

^d Virology Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

^e North-Western Tuscany Blood Bank, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

^f Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Torque Teno virus (TTV)

TTV DNAemia

Allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation (Allo-HSCT)

Immune reconstitution

ABSTRACT

Background: Torque Teno virus (TTV) plasma DNA load directly correlate with the level of immunosuppression in different clinical settings. It is uncertain whether this may be the case in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT).

Objectives: We characterized the dynamics of TTV DNAemia in patients undergoing T-cell replete allo-SCT.

Study design: Retrospective single-center observational study including 72 allo-HSCT patients. Plasma TTV DNA loads were quantified before initiating the conditioning regimen and at different time-points after transplant by real-time PCR. White blood cells (WBC) and absolute lymphocyte counts (ALC) were measured by flow cytometry.

Results: A dramatic drop in plasma TTV DNA load was observed shortly after conditioning. The TTV DNA load increased steadily after engraftment reaching its peak at day +90 after transplant. The increase in TTV DNA load paralleled that of ALC, and was of greater magnitude in patients who developed severe (grades II–IV) acute graft vs. host disease.

Conclusion: Repopulation of lymphocytes early after allo-HSCT correlates with an increase of plasma TTV DNA load. Prospective studies are nevertheless needed to determine whether the kinetics of TTV DNAemia may allow inference of the degree of overall immunocompetence in these patients.

1. Background

Immunodeficiency that follows allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is driven by conditioning regimens and by the allogeneic effect of the graft on host immune cells, these predisposing patients to develop severe viral infections, which continue to be a major cause of morbidity and mortality in this clinical setting [1]. While NK-cell mediated immunity recovers within weeks after transplantation, adaptive immunity reconstitutes at a much slower pace. B- and T-cell counts normalize during the first months after transplantation, but T-cell immunity, in particular, may remain impaired for a longer period of time [2]. Absolute white blood cell (WBC) or lymphocyte counts (ALC), and blood immunophenotyping have been used

to infer the degree of overall functional immune competence in allo-HSCT recipients with suboptimal results [2]. In the last decade, the assessment of CD4⁺ T-lymphocyte reactivity by the ImmunoKnow™ assay has been shown to be a promising approach to predict the occurrence of serious viral infections and graft versus host disease [3,4], although these preliminary findings should be validated prospectively in larger cohorts. Currently, only antigen-specific immunoassays provide reliable information on the level of immune competence against a given pathogen [1].

Torque Teno virus (TTV) is a prototypic *Alphatorquetenovirus* which belongs to the *Anelloviridae* family [5,6]. At least 29 major species have been described, each one consisting of numerous strains. The TTV genome is a circular, negative sense, single-stranded DNA molecule of

Abbreviations: aGvHD, acute graft versus host disease; ALC, absolute lymphocyte counts; Allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; CMV, cytomegalovirus; TTV, Torque Teno virus; WBC, white blood cells

* Corresponding author at: Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Spain/ Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain. E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.001>

Received 16 January 2017; Received in revised form 5 May 2017; Accepted 3 July 2017
1386-6532/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

about 3.8 kb that include at least 4 open-reading frames. The untranslated region (UTR) contains several highly conserved sequences, showing over 90% identity among isolates. TTV causes a chronic-persistent infection in humans (> 90% infected) with no apparent deleterious effect on health, and is kept in check by adaptive T-cell mediated immune mechanisms [5,6]. T lymphocytes appear to be the major site of TTV replication [7–11], although other cell types outside of the hematopoietic compartment may also contribute to the TTV burden [10,12].

An increasing body of experimental evidence suggests that the size of TTV DNAemia may allow inference of the overall functional immune competence in solid organ transplant (SOT) recipients, thus predicting the risk of opportunistic infections and allograft rejection events [13–18]. There is limited information on whether this might be the case in allo-HSCT recipients [10,19,20]. Characterization of the dynamics of TTV DNAemia in allo-HSCT recipients is hence the first step to design appropriate studies to elucidate this issue.

2. Objectives

To analyze the kinetics of plasma TTV DNA load in Allo-HSCT recipients.

3. Study design

3.1. Patients

This retrospective study included 72 non-consecutive patients with different underlying hematological cancers who underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service of the Hospital Clínico Universitario of Valencia between May 2013 and November 2015. The only criterium for patient's exclusion was the lack of available cryopreserved specimens for serial TTV DNA load testing. The median age of patients was 54 years (range, 18–69 years). Demographic, baseline and post-transplant clinical data of the patients are summarized in Table 1. Of interest, 90% of patients were on partial or complete remission of their hematological disease at allo-HSCT. The study period comprised the first 120 days after transplantation. The study was approved by the local Review Board and Ethics Committee. All patients gave written informed consent prior to participate in the study.

3.2. Plasma specimens

Plasma specimens that had been cryopreserved at -80°C (and never thawed before) were retrieved for the analyses described herein. Plasma specimens collected at different time-points prior to and after Allo-HSCT were analyzed. Specifically, we quantified TTV DNA load in samples obtained before the initiation of conditioning (n = 55, (median, day -7; range, day -30 to day -6), around the time of transplantation (n = 30 (median, day +1; range, day 0–day +7), and at different time points afterwards: around day +20 (n = 46, median, day +21; range, day +12–day +27), day +30 (n = 62, median, day +34; range, day +25 to day +43), day +60 (n = 58, median, day +60; range, day +49–day +74), and day +90 (n = 46, median, day +90; range, day +72–day +111).

3.3. White blood cell and lymphocyte counts

Enumeration of absolute WBC and ALC was performed by flow cytometry using the BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Pre-conditioning and post-allo-HSCT (within days +20 to +30, day +60, and day +90) cell counts were available for analyses.

Table 1
Demographic and clinical characteristics of the patients.

Parameter	n (%)
Sex	
Male	38 (52.8)
Female	34 (47.2)
Underlying hematological disease	
Hodgkiński lymphoma	5 (6.9)
Non Hodgkiński lymphoma	15 (20.8)
Acute lymphoblastic leukemia	7 (9.7)
Chronic lymphoblastic leukemia	6 (8.3)
Acute myeloblastic leukemia	19 (26.4)
Chronic myeloblastic leukemia	1 (1.4)
Multiple Myeloma	5 (6.9)
Myelodysplastic syndrome	10 (13.9)
Other	4 (5.6)
Allograft type	
Related	37 (51.4)
Unrelated	35 (48.6)
Matched	49 (68.1)
Mismatched	23 (39.1)
Conditioning regimen	
Myeloablative	13 (18.1)
Non-myeloablative	59 (81.9)
Stem Cell Source	
Peripheral blood	68 (94.4)
Bone marrow	3 (4.2)
Umbilical cord blood	1 (1.4)
Graft vs. host disease prophylaxis regimen	
Cyclosporine A + Methotrexate	26 (36.1)
Cyclosporine A + Methotrexate + Thymoglobulin	2 (2.8)
Cyclosporine A + Mycophenolate mofetil	7 (9.7)
Cyclosporine A + Mycophenolate mofetil + Cyclophosphamide	5 (6.9)
Tacrolimus + Sirolimus	27 (37.5)
Tacrolimus + Cyclophosphamide	2 (2.8)
Tacrolimus + Sirolimus + Thymoglobulin	3 (4.2)

3.4. Quantitation of plasma TTV DNA load

TTV DNA load quantification was carried out with a TaqMan real-time PCR targeting a highly-conserved segment of the untranslated region (UTR) of the viral genome, as previously detailed [8]. The assay is able to quantitate all known genetic variants of TTV. DNA was extracted from 200 μl of plasma with the QIAamp DNA blood Mini QIAcube Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) using the QIAcube extraction platform (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the instructions of the manufacturer. PCR amplification and amplicon detection was done on the ABI Prism 7500 system (PE Biosystems, Foster City, CA, USA). The following primers and probe were used for PCR amplification: forward primer 5'-GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3', position 177–194; reverse primer 5'-AGCCCCGCCAGTCC-3', position 226–239; probe 5'-TCAAGGGGCAATTCGGGCT-3', position 205–223. In our experience, the limit of quantification of the assay was approximately 25 copies/ml and the limit of detection, approximately 10 copies/ml (75% repeatability). All samples from each patient were assayed simultaneously in singlets.

3.5. Definitions

Acute graft versus host disease (aGvHD) was diagnosed and graded as previously reported [21]. Engraftment was defined as an absolute neutrophil count (ANC) of $0.5 \times 10^9/\text{L}$, and a platelet count of $20 \times 10^9/\text{L}$ [22].

3.6. Statistical analysis

Differences between medians were compared using the Mann-Whitney *U* test (two independent variables), the Kruskal Wallis test (more than two independent variables) or the Wilcoxon sum rank test

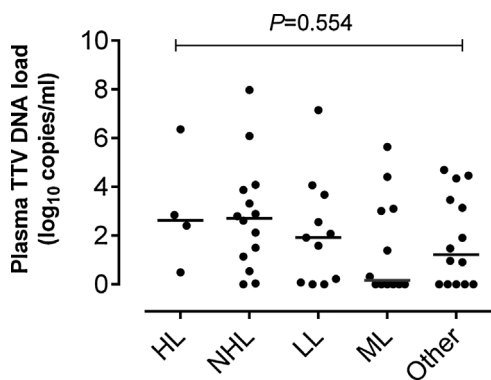


Fig. 1. Pre-conditioning plasma TTV DNA loads according to the underlying hematological disease. ALL, acute lymphoid leukemia; AML, acute myeloid leukemia; HL, Hodgkin lymphoma; NHL, non-Hodgkin lymphoma.

(for dependent variables). Correlations between variables were assessed by the Spearman Rank test. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

4. Results

4.1. Effect of the conditioning regimen on plasma TTV DNA load

We first measured TTV DNA levels in plasma specimens obtained prior to conditioning. Plasma specimens were available from 55 patients. Forty-four out of the 55 patients (80.0%) had detectable TTV DNAemia, of whom 32 displayed TTV DNA loads above the LOQ within a range of 1.40–7.97 \log_{10} copies/ml. As shown in Fig. 1, plasma TTV DNA load levels were comparable ($P = 0.554$) irrespective of the underlying hematological disease.

The potential effect of the conditioning regimen on the kinetics of

TTV DNAemia was next assessed. For this analysis, only patients exhibiting plasma TTV DNA loads above the LOQ of the assay prior to conditioning were taken into account.

Plasma specimens obtained prior to conditioning and at the time of allo-HSCT were available from 12 patients. TTV DNA load was comparable at both time-points ($P = 0.814$). Paired specimens drawn prior to conditioning and at day +20 after transplant were available from 19 patients. Kinetics of TTV plasma DNA load in each patient are shown in Fig. 2A. A decrease in TTV DNA load was observed in 15 out of the 19 patients (median decrease of 3.11 \log_{10} copies/ml; range, 0.49–7.97 \log_{10} copies/ml). TTV DNA load increased in the remaining 4 patients. In these latter patients, engraftment had occurred prior to day +20 (not shown). Overall (Fig. 2B), TTV DNA loads at day +20 were lower than those measured prior to conditioning, although the difference did not reach statistical significance ($P = 0.077$). The above-referred effect was seen irrespective of the type of conditioning (Fig. 2C and D). Nevertheless, the scarce number of patients undergoing myeloablative conditioning in this subgroup analysis ($n = 4$) precluded drawing firm conclusions on this issue. The data thus indicated that overall conditioning resulted in a drop in TTV plasma DNA load, which was noticeable at day +20 after transplant.

The decrease in plasma TTV DNA load paralleled that of ALC but not that of WBC. In fact, a significant correlation was found between ALC (but not WBC) and TTV DNA loads at these two time-points (Fig. 3A and B, respectively).

4.2. Dynamics of plasma TTV DNAemia after engraftment

To investigate the kinetics of plasma TTV DNAemia after engraftment (median day of engraftment in our cohort: day +18) we measured the TTV DNA load at around days +30, +60 and +90 after transplant. Patients undergoing severe aGvHD (grades II–IV) ($n = 18$) were initially excluded from these analyses in order to circumvent the potential

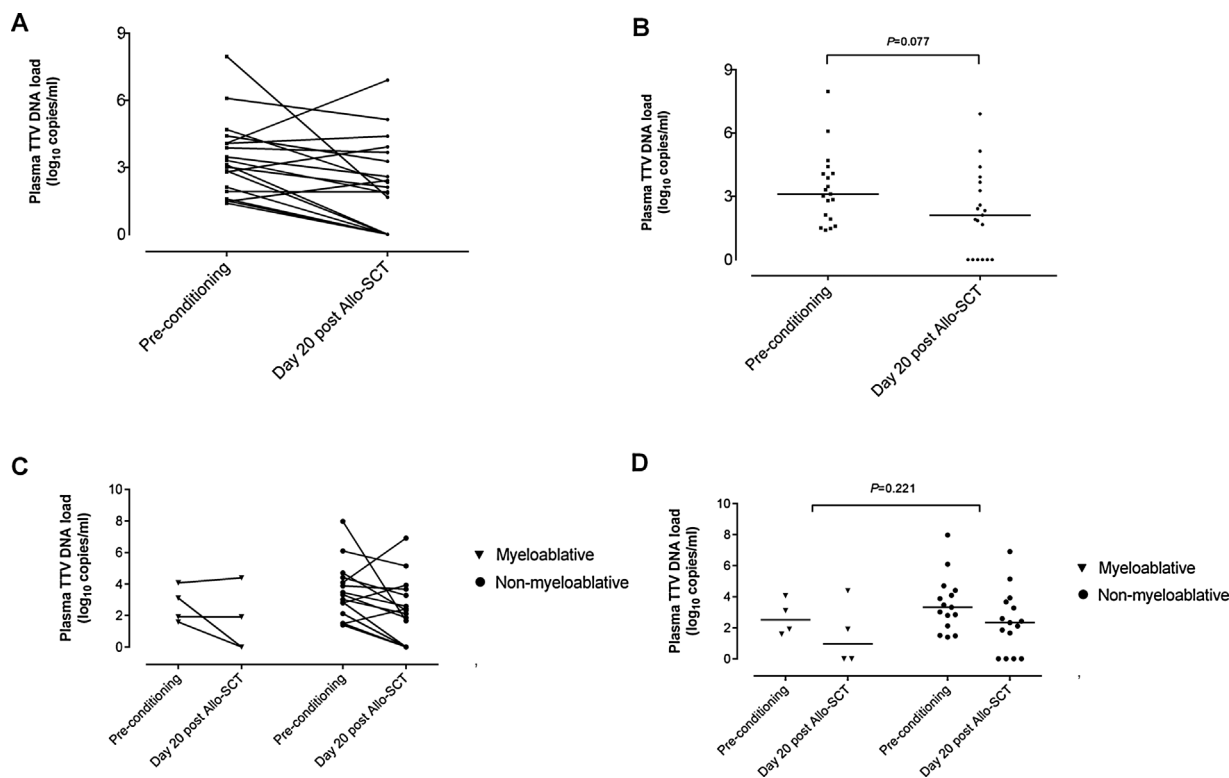


Fig. 2. Effect of the conditioning regimen on plasma TTV DNA load in allo-HSCT recipients. (A) Kinetics of plasma TTV DNA load of each patient with paired specimens obtained prior to conditioning and at day +20 after transplant ($n = 19$). (B) Overall TTV DNA loads at both time-points. (C) Kinetics of plasma TTV DNA load of each patient ($n = 19$) according to the type of conditioning (myeloablative vs. non-myeloablative). (D) Overall TTV DNA loads at both time-points according to the type of conditioning. Bars indicate median values. *P* values for comparisons between groups are shown.

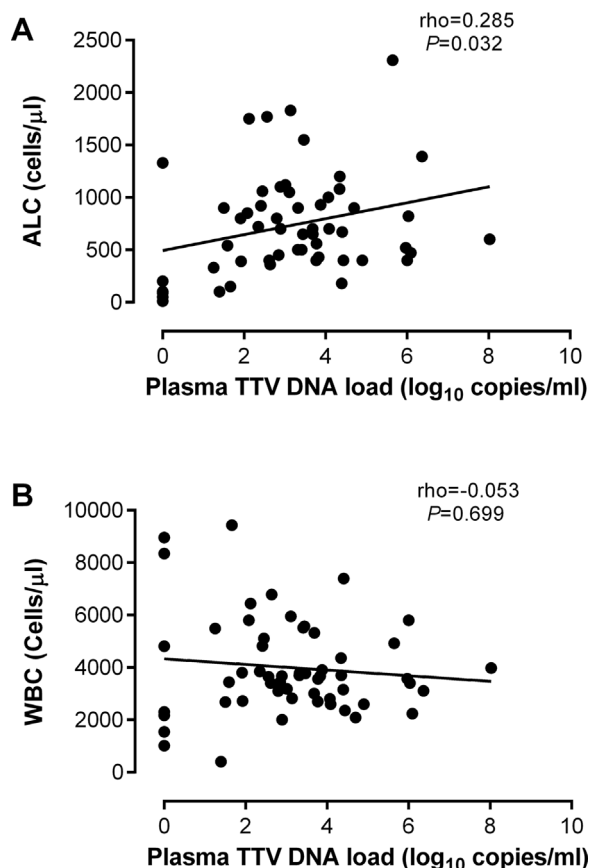


Fig. 3. Correlation between plasma TTV DNA loads and absolute lymphocyte counts (ALC) (A) and white blood cell counts (WBC) (B) measured prior to conditioning and at day +20 (between days +20 and +30 for ALCs and WBCs) after Allo-HSCT. Correlation between these variables was analyzed by the Spearman Rank test. Rho and *P* values are shown.

effect of the use of high doses of corticosteroids on the dynamics of TTV DNAemia. A total of 31 patients had paired specimens obtained at days +20 and +30 after transplant. Ten patients had undetectable TTV DNA load at both time-points. Out of the remaining 21 patients, 16 exhibited an increase in TTV DNA load (median increase of 3.34 log₁₀ copies/ml; range, 2.29–6.03 log₁₀ copies/ml) (Fig. 4A), whereas 5 had decreasing TTV DNA levels. These latter 5 patients had TTV DNA loads at day +20 that ranged from 2.09 to 6.76 log₁₀ copies/ml and displayed no particular clinical profile. As shown in Fig. 4B, overall, TTV DNA load levels at day +30 were significantly higher than those at day +20 (*P* = 0.048).

Twenty-seven patients had paired specimens drawn at days +20 and +60 after transplant. One patient had undetectable TTV DNA loads at both time-points. An increase in TTV DNA load was observed in 22 patients (median increase of 4.43 log₁₀ copies/ml; range, 1.69–7.90 log₁₀ copies/ml) (Fig. 4C). Decreasing TTV DNA loads were seen in the remaining 4 patients. All these latter patients received an HLA-identical allograft. TTV DNA load remained constant in one patient. Overall, TTV DNA load increased significantly between these two time-points (Fig. 4D).

Finally, 23 patients had paired specimens obtained at days +20 and +90 after transplant. An increase in TTV DNA load was observed in 19 patients (median increase of 5.02 log₁₀ copies/ml; range, 2.55–7.12 log₁₀ copies/ml) (Fig. 4E). Decreasing TTV DNA loads were seen in 4 patients. Again, these latter patients received an HLA-identical allograft. Overall, TTV DNA loads quantified at day +90 were significantly higher than those measured at day +20 (Fig. 4F).

Twenty-two patients had TTV DNA loads and ALC and WBC counts measured at days +20 to +30, +60, +90. The increase in TTV DNA

load over time seemed to parallel that of ALCs, but not that of WBCs. In fact TTV DNA loads measured at these time-points tended to correlate positively with ALCs (Fig. 5A), although the correlation did not reach statistical significance (*P* = 0.094). No trend towards a correlation between TTV DNA loads and WBCs was observed (Fig. 5B).

Paired specimens obtained prior to conditioning and at the day +90 were available from 21 patients. TTV DNA loads measured at day +90 were significantly higher than those quantified prior to conditioning (*P* = 0.046).

Overall, the magnitude of the increase of TTV DNA load over time was comparable irrespective of the type of allograft (related vs. unrelated), HLA-matching, and the aGvHD prophylaxis regimen used (data not shown).

4.3. Effect of severe aGvHD on the dynamics of plasma TTV DNAemia

Severe (grades II–IV) aGvHD requiring the administration of high dose corticosteroids occurred in 18 patients at a median of 43.5 days after allo-HSCT (range, day +20–day +99). To assess the potential effect of severe aGvHD and/or its treatment on the dynamics of plasma TTV DNAemia we compared the magnitude of the increase in TTV DNA load between days +20 and +60 in patients who either did or did not (grades 0–I) develop this clinical event within this time frame. A total of 33 patients (grades 0–I, *n* = 27, and grades II–IV, *n* = 6) had paired specimens obtained at these time-points. As shown in Fig. 6A, all but one patient with severe aGvHD experienced an increase in TTV DNA load (median increase of 5.93 log₁₀ copies/ml; range, 3.10 log₁₀–6.19 log₁₀ copies/ml). A drop in TTV DNA load was observed in the remaining patient. In turn, out of the 27 patients with grades 0–I aGvHD, 22 had an increase of TTV DNA load (median, 4.43 log₁₀ copies/ml; range 1.69–7.9 log₁₀ copies/ml), 5 showed decreasing levels, and one patient had undetectable TTV DNA loads at both time-points. Overall, TTV DNA loads at day +60 were higher in patients with severe aGvHD (Fig. 6C) than in patients with grades 0–I GvHD. The difference, nevertheless did not reach statistical significance (*P* = 0.090). In contrast, WBC and ALC counts did not differ significantly between the time-points compared (not shown).

Only 3 patients with severe acute GvHD had paired specimens obtained at days +20 and +90. This precluded any meaningful statistical analysis which was not attempted.

We next investigated whether TTV DNA loads quantified at days +20 and +30 allowed the anticipation of the occurrence of severe acute GvHD. TTV DNA loads quantified either at day +20 or at day +30 in patients with or without subsequent severe aGvHDs were not significantly different (*P* = 0.865 and *P* = 0.452, respectively).

5. Discussion

TTV DNA load in blood has been shown to correlate inversely with the degree of overall immune competence in SOT recipients, hence it has been advocated as a useful parameter for guiding maintenance immunosuppressive therapies in this clinical setting [13–18]. Whether this might be the case for Allo-HSCT recipients has not been fully elucidated yet [10,19,20]. Here we investigated the dynamics of plasma TTV DNAemia early after Allo-HSCT (until day +120) in parallel to that of WBC and ALC. The data presented herein allowed to draw several conclusions. First, TTV DNA loads before conditioning and at the time of transplantation were comparable irrespective of the type of underlying hematological disease. This is somehow in contrast to previously published data [20], suggesting that acute lymphocytic leukemia (ALL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients display substantially higher TTV DNA loads at the time of transplant than patients with other hematological proliferative diseases. The scant number of patients with ALL and NHL in both series, however, precludes drawing firm conclusions on this issue, and thus further studies are warranted to elucidate this apparent discrepancy.

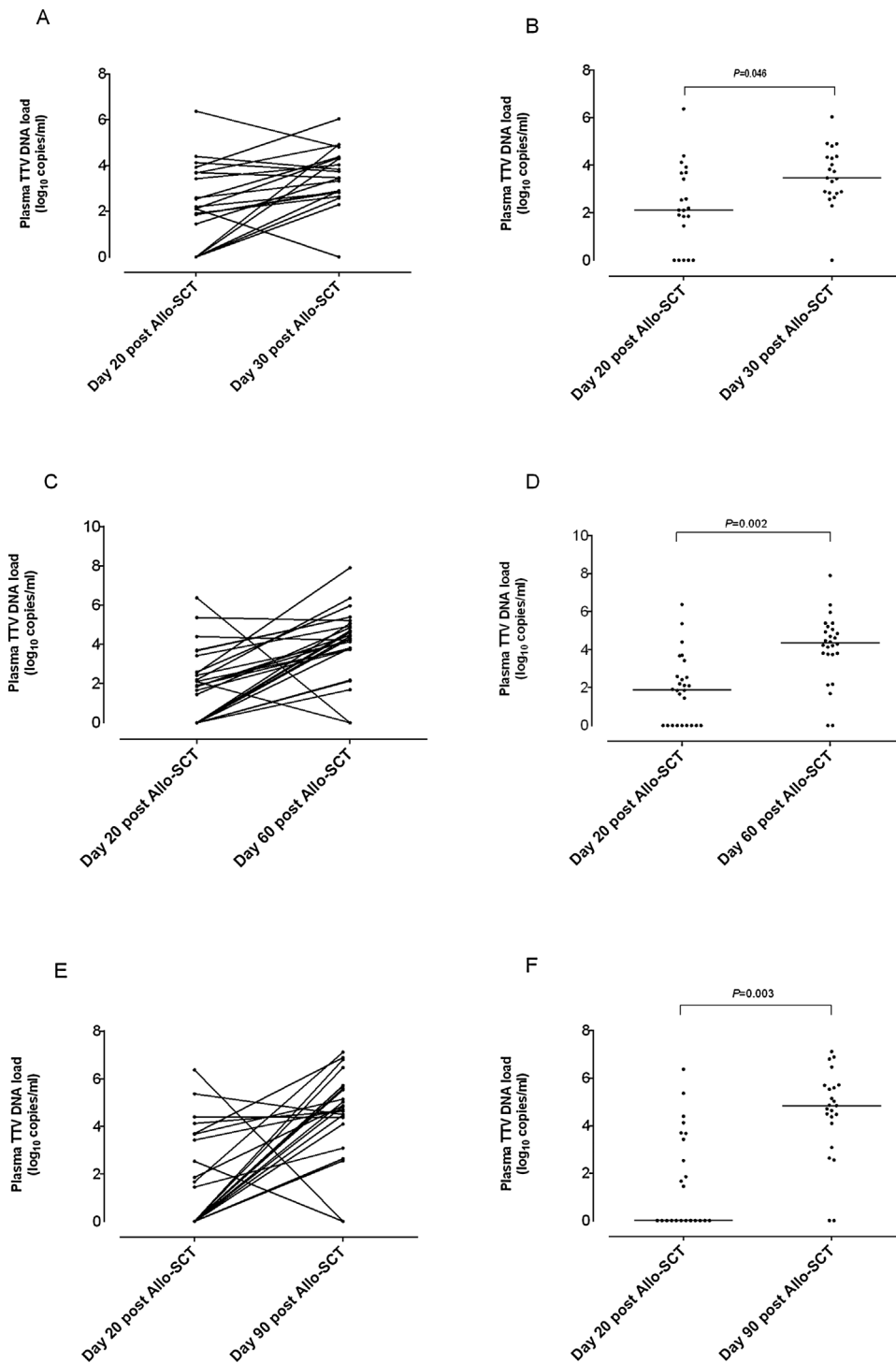


Fig. 4. Dynamics of plasma TTV DNA loads after engraftment in Allo-HSCT recipients not developing severe acute GvHD (grades II–IV). Individual kinetics of plasma TTV DNA loads between days +20 and +30 (A), days +20 and +60 (B) and days +20 and +90 (C). Only data from patients with quantifiable levels of TTV DNA are shown ($n = 21$, $n = 26$, and $n = 23$, respectively) are shown. Comparison of plasma TTV DNA loads between days +20 and +30 (B), days +20 and +60 (D) and days +20 and +90 (F). Bars indicate median values. P values for comparisons between groups are shown.

Second, we showed that plasma TTV DNA load decreases dramatically after conditioning, in parallel to ALC. Previous studies detailing lymphocyte subsets in a few patients (9 in total) reported a similar phenomenon [10,19]. Our data, thus, reinforce the idea that lymphocytes are the major site of TTV replication. In our cohort the drop in TTV DNA load was comparable among patients undergoing either myeloablative or non-myeloablative conditioning.

Third, plasma TTV DNA load increased steadily after engraftment, in parallel to ALC counts, reaching peak levels at around day +90. In fact, a trend towards a positive correlation was observed between ALCs and TTV DNA loads after engraftment. These data supported previous observations made both in the allogeneic [10,20] and the autologous

[23] HSCT settings, and collectively indicated that graft reconstitution provided target competent cells for TTV replication, and suggested that the increase of TTV DNA load in the systemic compartment in Allo-HSCT recipients mirrors the repopulation of lymphocytes. Correlation with an adequate reconstitution of overall immune competence, however, cannot be directly inferred from the data.

Despite the above findings, several lines of experimental evidence also suggested, although did not prove, that the degree of immunosuppression after transplant may modulate the level of TTV replication and hence the magnitude of TTV DNAemia. First, TTV DNA loads at day +90 after transplant were markedly higher than those quantified prior to conditioning. Second, patients with severe aGvHD

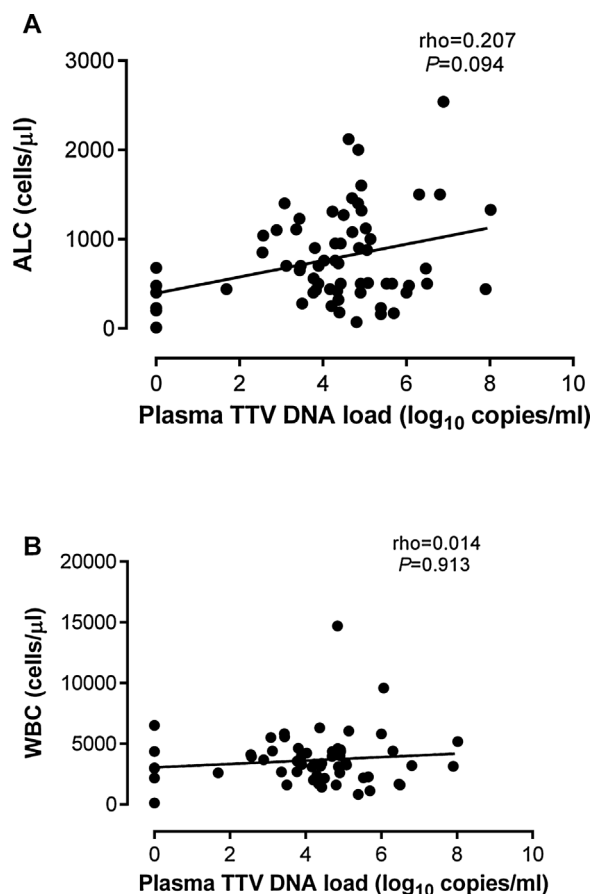


Fig. 5. Correlation between plasma TTV DNA loads and absolute lymphocyte counts (ALC) (A) and white blood cell counts (WBC) (B) measured at days +20, +30, +60 and +90 after transplant. Twenty-two patients had TTV DNA loads and ALC and WBC counts measured at these time points. Correlation between these variables was analyzed by the Spearman Rank test. Rho and P values are shown.

receiving corticosteroids at high doses experienced increases in TTV DNA load between days +20 and +60 of greater magnitude than patients with grades 0-I aGvHD, irrespective of the ALC counts. This difference, however, did not reach statistical significance. This phenomenon was previously observed by Masouridi-Levrat et al. [20].

Interestingly, neither plasma TTV DNA loads measured at day +20 nor at day +30 after allo-HSCT allowed prediction of the subsequent development of severe aGvHD.

In addition, our data failed to show major divergences in the kinetics pattern of TTV DNAemia after engraftment among patients undergoing different type of transplants or receiving different prophylaxis regimens for aGvHD.

In addition to its retrospective design, this study has several limitations. First, in addition to the limited size of the cohort, all sequential specimens planned to be analyzed were not available from a number of patients. Second, lymphocyte immunophenotyping was not performed, thus no inference of the potential functionality of the repopulated lymphocyte subsets could be made. In this regard, TTV DNAemia increase following autologous HSCT was shown to parallel most notably that of circulating CD8⁺CD57⁺ – expressing T lymphocytes [23]. Inasmuch as expression of CD57⁺ is a feature of terminally differentiated T lymphocytes this finding was interpreted as suggesting that TTV DNA load may behave as a surrogate marker of immunodeficiency. The fact is however that the CD8⁺ CD57⁺ T-cell population is quite heterogeneous and includes various functionally antagonistic (functional cytotoxic and immunosuppressive) subsets [24]. In this sense, we previously reported that a significant expansion of this T-cell subset was associated with recovery from CMV viremia and no progression to CMV

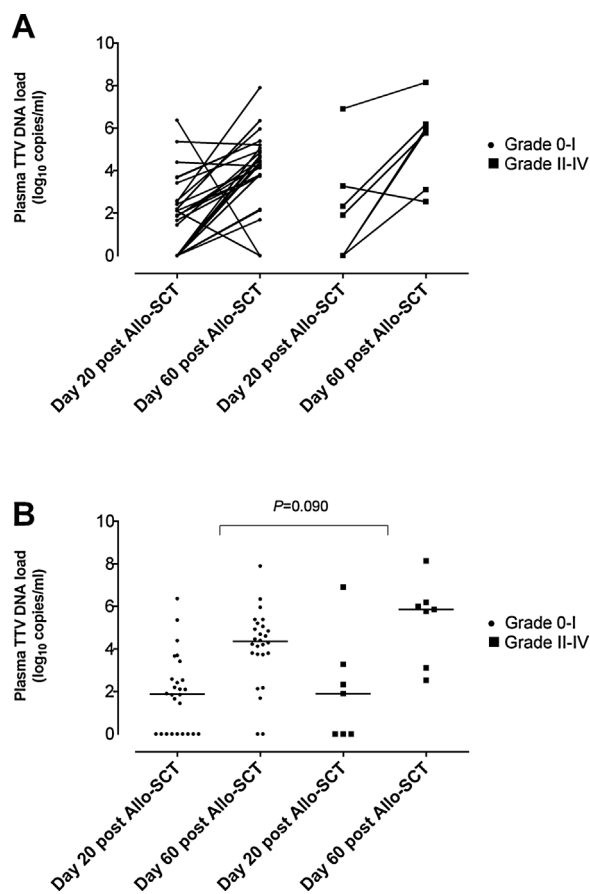


Fig. 6. Effect of severe acute GvHD (grades II–IV) on plasma TTV DNA loads in allo-HSCT recipients. (A) Kinetics of plasma TTV DNA load in patients with (n = 6) or without (n = 27) severe acute GvHD between days +20 and +60 after transplant. (B) Overall TTV DNA loads in patients in both groups at days +20 and +60 after transplant. Bars indicate median values. P values for comparisons between groups are shown.

disease [25]. Furthermore, CD57⁺ is a marker of polyfunctionality in T cells whose expansion is driven by CMV replication [26,27].

Third, the current study was solely designed to characterize the kinetics of TTV DNAemia in allo-HSCT recipients. No attempt was made to correlate the dynamics of TTV DNAemia with the occurrence of clinical or virological events related to the degree of patient's immunosuppression.

Thus, at this point we can only ascertain that TTV DNA load in plasma after engraftment follows a kinetics that parallels that of ALCs, but could not prove whether the overall increase in TTV DNAemia seen over the study period truly reflects a gain or a loss in immunocompetence at early times after allo-HSCT. Despite the above limitations, the data presented herein may be helpful for the design of prospective studies investigating the potential use of plasma TTV DNAemia as an ancillary tool to anticipate the development of clinical events such as severe viral infections and aGvHD.

Competing interests

None declared.

Funding

None.

Author's contribution

EA, TP, IT and EG did PCR analyses, collected and assisted in the

analyses of the data. CS attended the patients, PA did flow cytometry analyses, FM, DF and LM designed the PCR assay and revised the manuscript. DN designed the study, interpreted the data and wrote the manuscript. All authors contributed to the revision of the manuscript and approved the final version.

References

- [1] P. Pérez Romero, P. Blanco, E. Giménez, C. Solano, D. Navarro, An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Future Virol.* 10 (2015) 113–134.
- [2] J. Storek, M. Geddes, F. Khan, B. Huard, C. Helg, Y. Chalandon, et al., Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans, *Semin. Immunopathol.* 30 (2008) 425–437.
- [3] B. Gesundheit, E. Budowski, M. Israeli, M.Y. Shapira, I.B. Resnick, R. Bringer, et al., Assessment of CD4 T-lymphocyte reactivity by the Cylex ImmuKnow assay in patients following allogeneic hematopoietic SCT, *Bone Marrow Transpl.* 45 (2010) 527–533.
- [4] Y. Jo, J. Lim, Y. Kim, K. Han, W.S. Min, E.J. Oh, CD4 T-cell function assay using Cylex ImmuKnow and lymphocyte subset recovery following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Transpl. Immunol.* 33 (2015) 78–83.
- [5] H. Okamoto, History of discoveries and pathogenicity of TT viruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331 (2009) 1–20.
- [6] D. Focosi, G. Antonelli, M. Pistello, F. Maggi, Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 589–593.
- [7] K. Kikuchi, H. Miyakawa, K. Abe, M. Kako, K. Katayama, S. Fukushi, et al., Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient, *J. Med. Virol.* 61 (2000) 165–170.
- [8] F. Maggi, C. Fornai, L. Zaccaro, A. Morrìca, M.L. Vatteroni, P. Isola, et al., TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells, *J. Med. Virol.* 64 (2001) 190–194.
- [9] L.F. Mariscal, J.M. López-Alcorocho, E. Rodríguez-Iñigo, N. Ortiz-Movilla, S. de Lucas, J. Bartolomé, et al., TT virus replicates in stimulated but not in non-stimulated peripheral blood mononuclear cells, *Virology* 301 (2002) 121–129.
- [10] F. Maggi, D. Focosi, M. Albani, L. Lanini, M.L. Vatteroni, M. Petrini, et al., Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia, *J. Virol.* 84 (2010) 6891–6893.
- [11] D. Focosi, L. Macera, U. Boggi, L. Ceccherini Nelli, F. Maggi, Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells, *J. Gen. Virol.* 96 (2015) 115–117.
- [12] M. Desai, R. Pal, R. Deshmukh, D. Banker, Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines, *J. Med. Virol.* 77 (2005) 136–143.
- [13] I. De Vlaminck, K.K. Khush, C. Strehl, B. Kohli, H. Luikart, N.F. Neff, et al., Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy, *Cell* 155 (2013) 1178–1187.
- [14] I. Gorzer, P. Jaksch, M. Kundi, T. Seitz, W. Klepetko, E. Puchhammer-Stockl, Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation, *PLoS One* 10 (2015) e0122975.
- [15] K. Beland, M. Dore-Nguyen, M.J. Gagne, N. Patey, J. Brassard, F. Alvarez, et al., Torque Teno Virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen, *J. Infect. Dis.* 209 (2014) 247–254.
- [16] D. Focosi, L. Macera, M. Pistello, Maggi F. Torquetenovirus, (TTV) viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplantation, *J. Infect. Dis.* 210 (2014) 667–668.
- [17] I. Gorzer, M. Haloschan, P. Jaksch, W. Klepetko, E. Puchhammer-Stockl, Plasma DNA Levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation, *J. Heart Lung Transpl.* 33 (2014) 320–328.
- [18] M. Schiemann, E. Puchhammer-Stöckl, F. Eskandary, P. Kohlbeck, S. Rasoul-Rockenschaub, A. Heilos, et al., Torque teno virus load-inverse association with antibody-mediated rejection after kidney transplantation, *Transplantation (August)* (2016).
- [19] Y. Kanda, Y. Tanaka, M. Kami, T. Saito, T. Asai, K. Izutsu, et al., TT virus in bone marrow transplant recipients, *Blood* 93 (1999) 2485–2490.
- [20] S. Masouridi-Levrat, A. Pradier, F. Simonetta, L. Kaiser, Y. Chalandon, E. Roosnek, Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies, *Bone Marrow Transpl.* 51 (2016) 440–442.
- [21] H. Glucksberg, R. Storb, A. Fefer, et al., Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors, *Transplantation* 18 (1974) 295–304.
- [22] A. Torres, J. Sánchez, D. Lakomsky, et al., Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Haematologica* 86 (2001) 24–29.
- [23] D. Focosi, F. Maggi, M. Albani, L. Macera, V. Ricci, S. Gragnani, et al., Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution, *J. Clin. Virol.* 47 (2010) 189–192.
- [24] M. Strioga, V. Pasukoniene, D. Characiejus, CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease, *Immunology* 134 (2011) 17–32.
- [25] A. Gutiérrez, I. Muñoz, C. Solano, I. Benet, C. Gimeno, I. Marugán, et al., Reconstitution of lymphocyte populations and cytomegalovirus viremia or disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, *J. Med. Virol.* 70 (2003) 399–403.
- [26] A. Pera, A. Vasudev, C. Tan, H. Kared, R. Solana, A. Larbi, CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4+ T cell subset coexpressing CD57 and CD154, *J. Leukoc. Biol.* (August) (2016) pii: jlb.4A0316-112R.
- [27] A. Pera, C. Campos, A. Corona, B. Sanchez-Correa, R. Tarazona, A. Larbi, et al., CMV latent infection improves CD8+ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57+ cells in young individuals, *PLoS One* 12:9 (2) (2014) e88538.

ORIGINAL ARTICLE

The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients

E Albert¹, C Solano^{2,3}, E Giménez¹, D Focosi⁴, A Pérez², L Macera⁵, JL Piñana², JCH Boluda², F Maggi⁴ and D Navarro^{1,6}

Monitoring Torque teno virus (TTV) DNA load helps to estimate the risk of opportunistic infections in solid organ transplant recipients. We investigated whether the early kinetic pattern of plasma TTV DNA load after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) associates with subsequent CMV and EBV DNAemia. This study included 71 allo-HSCT patients. We found that the area under the curve (AUC) for \log_{10} TTV DNA loads quantified by days 20 and 30 after transplantation (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀), was significantly lower ($P=0.036$) in patients who subsequently developed CMV DNAemia requiring preemptive antiviral therapy ($n=17$) than in those who did not ($n=8$) or had no CMV DNAemia ($n=19$). Patients displaying TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ ≤ 2.8 copies \times days \times mL⁻¹ were more likely to have high-level CMV DNAemia. A trend towards a direct correlation between TTV DNA AUC₂₀₋₃₀ and CMV-specific interferon- γ CD8+ T-cell counts by day +30 was noted ($P=0.095$). However, this dynamic parameter was not useful for anticipating the occurrence of either CMV recurrences ($n=12$) or EBV DNAemia ($n=34$). In summary, it may be possible to identify a subset of allo-HSCT patients at a high risk of developing high-level CMV DNAemia by analyzing the kinetics of plasma TTV DNA load early after engraftment.

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 30 October 2017; doi:10.1038/bmt.2017.235

INTRODUCTION

Torque teno virus (TTV), a prototypic member of the *Anelloviridae* family, is a circular, negative sense, single-stranded DNA virus that infects the majority of humans worldwide and is refractory to available antiviral agents.^{1,2} Monitoring TTV DNA load in blood may allow physicians to infer the risk of opportunistic infections and allograft rejection events in the solid organ transplant (SOT) setting.^{3–8} In fact, SOT recipients on maintenance immunosuppression with high plasma TTV DNA loads are at increased risk of virus infections, but have a decreased risk of T or B cell-mediated allograft rejection.^{3–9} However, the clinical value of TTV DNA load monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) recipients, if any, remains to be established. A handful of studies has investigated the kinetics of plasma TTV DNAemia after Allo-HSCT.^{10–13} Collectively, these studies clearly demonstrate that TTV DNA load decreases dramatically after conditioning and that, following engraftment, it increases in parallel to absolute lymphocyte (ALC) counts. This supports the assumption that this cell subset is the major site of TTV replication^{14–16} and suggests that TTV DNA load may behave as an immune system reconstitution marker. We hypothesized that the overall size of plasma TTV DNA load measured shortly after engraftment may inversely associate with the risk of viral infections such as those caused by CMV and EBV, whose control is critically dependent upon the acquisition of T-cell immunocompetence.^{17,18}

PATIENTS AND METHODS

Patients

This retrospective single-center study included 71 non-consecutive patients who underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service at the Hospital Clínico Universitario in Valencia between April 2013 and March 2016, as a curative therapy for different hematological cancers. Only adult patients (>18 years old) with plasma samples drawn at predetermined time points (see below for more details) available for TTV DNA testing were included. Of the 71 patients in this cohort, 54 had already been included in a previous study.¹³ The median patient age was 55 years (range 18–70 years); demographic, baseline, and post-transplant clinical data for these patients are summarized in Table 1. The study period comprised the first 120 days after transplantation. For some analyses involving EBV (incidence of recurrent EBV DNAemia), the observation period was extended up to 6 months after allo-HSCT. The study was approved by the Hospital Clínico Universitario (INCLIVA Foundation) review board and ethics committee. All the patients gave their written informed consent prior to participating in the study.

Plasma specimens

Cryopreserved (–80 °C) plasma specimens were retrieved (thawed for the first time) for the analyses described herein. The TTV DNA load was quantified in samples obtained at a median of 20 days (range 14–27 days), 31 days (range 25–35 days), 41 days (range 35–47 days) and 51 days (range 45–64 days) after allo-HSCT.

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain; ²Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain; ³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴North-Western Tuscany Blood Bank, Pisa University Hospital, Pisa, Italy; ⁵Virology Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy and ⁶Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain. Correspondence: Professor D Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain. E-mail: david.navarro@uv.es

Received 2 August 2017; revised 11 September 2017; accepted 12 September 2017

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the patients

Parameter	n (%)
Sex	
Male	42 (59.2)
Female	29 (40.8)
Underlying hematological disease	
Hodgkin's lymphoma	3 (4.2)
Non-Hodgkin's lymphoma	21 (29.2)
ALL	6 (8.3)
CLL	6 (8.3)
AML	15 (21.1)
Multiple myeloma	5 (7.0)
Myelodysplastic syndrome	7 (9.9)
Other	8 (11.3)
Allograft type	
Related	39 (54.9)
Unrelated	32 (45.1)
Matched	50 (70.4)
Mismatched	21 (29.6)
Haploidentical	12 (16.9)
Unrelated	9 (12.7)
Conditioning regimen	
Myeloablative	13 (18.3)
Non-myeloablative	58 (81.7)
Stem cell source	
Peripheral blood	69 (97.2)
Bone marrow	1 (1.4)
Umbilical cord blood	1 (1.4)
GvHD prophylaxis regimen	
Cyclosporine A or tacrolimus ± methotrexate	24 (33.8)
Cyclosporine A or tacrolimus ± mycophenolate mofetil or tacrolimus+sirolimus	29 (40.8)
Regimens including thymoglobulin	4 (5.6)
Regimens including cyclophosphamide	14 (19.7)
CMV serostatus	
D+/R+	41 (57.7)
D+/R-	8 (11.3)
D-/R+	16 (22.5)
D-/R-	6 (8.5)
EBV serostatus	
D+/R+	41 (57.7)
D+/R-	5 (7.0)
D-/R+	3 (4.2)
D/R ^a	18 (25.4)
D/R ^{-a}	4 (5.6)

Abbreviations: D = Donor; R = Recipient. ^aDonor EBV serostatus was not available.

Plasma TTV DNA load quantitation

We quantified the TTV DNA load with a TaqMan real-time PCR kit which amplifies a highly conserved segment of the untranslated region of the viral genome, as previously described.^{13–14} DNA was extracted from 200 µl of plasma with the QIAamp DNA blood Mini QIAcube kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) using the QIAcube extraction platform (Qiagen) following the manufacturer's instructions. PCR amplification and amplicon detection was carried out on an ABI Prism 7500 system (PE Biosystems, Foster City, CA, USA). In our experience, the limit of quantification of the assay is approximately 25 copies/mL, and the limit of detection, nearly 10 copies/mL (75% repeatability/probability). Specimens with undetectable TTV DNA loads were assigned a value of 0 for analysis purposes. All samples from each patient were assayed simultaneously in singlets.

Management of CMV and EBV infection

CMV DNA load monitoring in plasma was performed at least once a week using a RealTime CMV PCR kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA), as previously described.^{18,19} The limits of detection and quantification of this assay are ~20 copies/mL (95% of probability).¹⁹ Preemptive antiviral therapy, either with valganciclovir (most patients) or foscarnet, was initiated upon detection of >1000 copies/mL (1500 IU/mL) or when the CMV DNA doubling time (dt) was ≤2.0 days, whichever came first, as previously reported.^{20–22}

EBV DNAemia was monitored once a week using the artus EBV PCR kit (distributed by Abbott Molecular Inc.). According to the manufacturer, the assay limit of detection is 108 copies/mL (40 IU/mL) and its quantitative range is up to 8.3 log₁₀ IU/mL.²³ Nevertheless, lower EBV DNA loads can be measured with this assay (75% of probability), and we considered these to be true values. Pre-emptive therapy with rituximab was initiated upon documentation of two consecutive plasma EBV DNA loads exceeding 1,000 copies/mL. In some instances the decision to administer rituximab therapy was justified not only on the above criterion, but also at the attending physician's discretion based on clinical grounds, i.e. co-presentation of acute GvHD (aGvHD).

CMV-specific T-cell immunity

CMV-specific interferon-γ-producing CD8⁺ T cells in whole blood were enumerated by flow cytometry to detect intracellular cytokine staining (BD FastImmune, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA), as previously detailed.^{24,25} Two sets of overlapping 15-mer peptides encompassing the entire sequence of the CMV pp65 and IE-1 proteins were simultaneously used for intracellular cytokine staining stimulation.

Definitions

CMV and EBV DNAemia were defined by the detection of CMV or EBV DNA (at any level) in one or more plasma specimens. High-level CMV DNAemia was arbitrarily defined as >1000 copies/mL (prompting the initiation of preemptive antiviral therapy at our center). The overall duration of a given episode of viral DNAemia was the time between the day of first detection of viral DNA in plasma and that of the first negative (undetectable) PCR result; aGvHD was diagnosed and graded as previously reported.²⁶ Engraftment was defined as an absolute neutrophil count of 0.5 × 10⁹/L, and a platelet count of 20 × 10⁹/L.²⁷ HLA mismatch was defined as the presence of at least one disparity in the 10 HLA sites at the A, B, C or DRB1 locus, as determined by high-resolution genotyping, both in siblings or unrelated donors.²⁸

Statistical analysis

The cumulative incidence of CMV and EBV DNAemia was calculated using the cumulative incidence method (marginal probability) with the statistical software R (<http://www.r-project.org/>). Death and relapse of the underlying disease were considered as competitive events. The TTV DNA load area under the curve (AUC) was calculated with the STATGRAPHIC Centurion XVII statistics package (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Differences between the means and medians were compared using the Student *t*-test or the Mann-Whitney *U*-test, respectively. Correlations between variables were assessed using the Pearson's correlation test or the Spearman's rank test, depending upon the distribution of the dataset (parametric or non-parametric, respectively). Univariate and multivariate logistic regressions were used to identify risk factors for certain clinical events. Two-sided exact *P*-values are reported; a *P*-value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

A total of 71 patients with 4 plasma specimens collected at around days 20, 30, 40 and 50 after allo-HSCT were included in this study. The study period was defined as the first to fourth months after transplantation because most episodes of CMV and EBV DNAemia occur within this time window,^{17,18} and so, following local guidelines, frequent (once a week) and systematic CMV and EBV DNA load monitoring is routinely performed during this time period.

CMV DNAemia developed in 52 patients at a median of 24.5 days after transplantation range -7 to 103 days), with a

cumulative incidence of 73.3% (95% confidence interval 66.0–79.3%) within the first 120 days after allo-HSCT. Twenty-seven of these patients (51.9%) developed high-level DNAemia and were treated preemptively with antivirals. All episodes of CMV DNAemia eventually cleared, either with or without antiviral treatment. Twelve patients (23%) had a recurrent (second) episode of CMV DNAemia at a median of 73 days after transplant (range 32–117 days); no patient developed CMV end-organ disease.

EBV DNAemia was detected in 34 of the 71 patients, at a median of 79 days after transplant (range 0–175 days); its cumulative incidence was 49.1 (95% confidence interval 36.4–60.7%). Five out of these 34 patients were treated with rituximab (three patients had two consecutive EBV DNA load measurements >1000 copies/mL and the remaining two patients had grade III aGvHD and were treated at first detection of >1000 EBV DNA copies/mL); all episodes eventually cleared within the observation period. Eleven patients (32.4%) had recurrent episodes (second episode) of EBV DNAemia within the first 6 months after transplantation (median time, 135 days; range day 100–160). No patient developed post-transplant lymphoproliferative disorders.

Kinetics of plasma TTV DNA load, and incidence and features of CMV and EBV DNAemia episodes

Pre-transplant specimens were available from 45 out of the 71 patients, of which 39 had a quantifiable TTV DNA load. Overall, the mean TTV DNA load in these specimens was 2.33 log₁₀ copies/mL (range 0–7.97 log₁₀ copies/mL). Eventually, all patients had at least one specimen that tested positive for TTV DNA by real-time PCR. Most specimens testing positive had TTV DNA loads above the limit of quantitation of the assay. Samples testing ‘undetectable’ (<10 copies/mL) were assigned a TTV DNA load value of 0. There was a correlation between pre-transplant TTV DNA loads and those measured by day 20 ($P=0.614$; $P=0.001$) and 30 ($P=0.354$; $P=0.017$) after transplantation.

We hypothesized that the magnitude of the AUC for log₁₀ TTV DNA loads, quantified between days 20 and 30 (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀) after transplantation (median time to engraftment, 16 days) inversely associated with the risk of subsequent CMV or EBV DNAemia occurrence. It is of interest that the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was comparable, irrespective of the type of transplant and conditioning, HLA-matching, D/R CMV serostatus and the use of cyclophosphamide (post transplant) or anti-thymocyte globulin in the conditioning regimen (Supplementary Table 1). The small number of allografts other than peripheral blood ($n=2$) precluded any meaningful analysis on the impact of the stem cell source on TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀.

We observed that the mean TTV DNA load AUC₅₋₃₀ was lower in patients with subsequent CMV DNAemia (3.3 copies × mL⁻¹; range 0–7.62) than in patients without it (4.4 copies × day × mL⁻¹; range 0–8.43), although the difference did not reach statistical significance (Figure 1a). Nevertheless, the mean TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was significantly lower (Figure 1b) in patients with subsequent high-level CMV DNAemia who were eventually treated preemptively with antivirals ($n=17$) (2.7 copies × days × mL⁻¹; range 0–7.62) than in those who were not treated ($n=8$) or had no documented CMV DNAemia ($n=19$) (4.4 copies × days × mL⁻¹; range 0–8.43). For the above analyses, 27 patients with CMV DNAemia occurring before day 30 were excluded.

As can be observed in Figure 1a, seven patients in the treatment group had TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ = 0. Five out of these patients had quantifiable TTV DNA loads by day 40 and the remaining 2 by had it day 60 after transplant. The ALC increase between days 20 and 30 was lower in these patients than that in patients with TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ > 0 (not shown). None of these patients had been treated with anti-thymocyte globulin and were clinically heterogeneous (Supplementary Table 2).

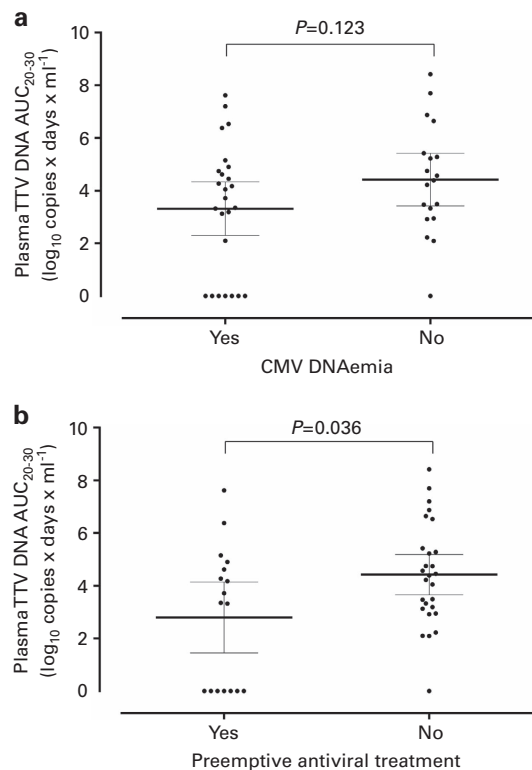


Figure 1. AUC for log₁₀ TTV DNA loads quantified between days 20 and 30 after transplant (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀) in patients with or without CMV DNAemia developing after day 30 post transplant (**a**) and in patients with or without CMV DNAemia episodes after day 30 post-transplant requiring preemptive antiviral therapy, as decided according to local guidelines (**b**). Bars indicating the mean values and the standard deviations as well as P -values for comparisons between groups (Student’s t -tests) are shown.

The TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was not significantly correlated with the duration of CMV DNAemia episodes (median, 51 days; range 18–153) and the peak CMV DNA level within episodes (median, 3.43 log₁₀/mL; range 1.72–6.43), although an inverse trend was noted (Figures 2a and b, respectively).

Of note, the incidence of grades II–IV aGvHD, known to increase TTV DNA load levels,^{12,13} before day 30 post-allo-HSCT and throughout the study, was comparable in patients with or without CMV DNAemia, whether or not they required preemptive antiviral therapy ($P=0.363$ and $P=0.714$, respectively).

A ROC curve was built to define the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ that would best discriminate between patients with or without subsequent high-level CMV DNAemia (Supplementary Figure 1). This value was found to be 2.8 copies × days × mL⁻¹. As can be inferred from Figure 1b, 11 patients had values ≤2.8, of whom 7 developed high-level CMV DNAemia (predictive value for this event, 64%); conversely, 23 out of 33 patients with TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ >2.8 did not develop high-level CMV DNAemia (predictive value for protection, 70%). This threshold value was entered into univariate models and found to be significantly associated with an increased risk of high-level CMV DNAemia, along with the receipt of an allograft from a CMV-seronegative donor (for CMV-seropositive recipients). Both factors, nevertheless, lost significance in multivariate analyses (Table 2).

In contrast to the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀, the ALC log₁₀ count AUC₂₀₋₃₀ was not associated with the occurrence of high-level CMV DNAemia ($P=0.156$), although lower values were observed in these patients (mean, 3.4 cells × days × μL⁻¹ in patients with high-level DNAemia vs 4.43 cells × days × μL⁻¹ in patients without it; $P=0.156$).

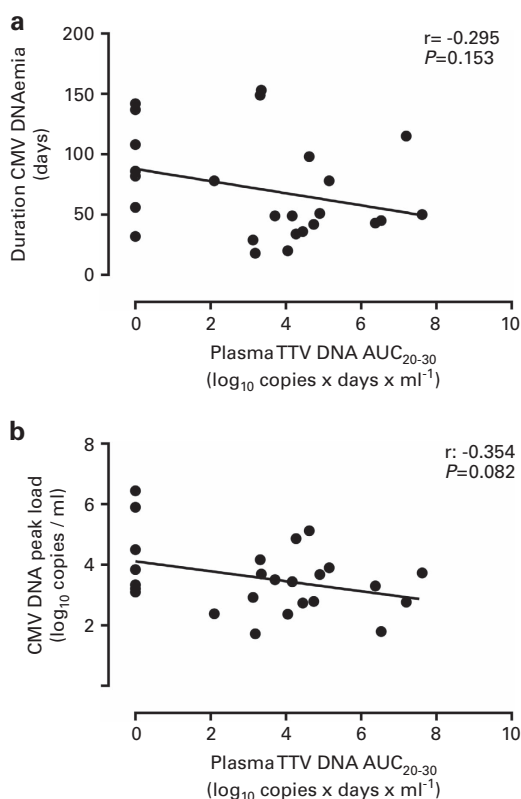


Figure 2. Correlation between the AUC for log₁₀ TTV DNA loads quantified between days 20 and 30 after transplant (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀) and the duration of CMV DNAemia (a) and the plasma peak CMV DNA load (b) during initial (first) episodes. Correlation between these variables was analyzed using the Pearson's test. *R* and *P*-values are shown.

Likewise, neither pre-transplant TTV DNA load nor those quantified by day 20 and by day 30 after allo-HSCT in patients with subsequent high-level CMV DNAemia did differ significantly from that in patients without it, although higher levels were seen in the latter group at days 20 and 30 after transplantation (Table 3).

The incidence of recurrent episodes of CMV DNAemia (second episode) was also not related to the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ (*P* = 0.247; Supplementary Figure 2).

To investigate the relationship between the kinetics of TTV DNA load and the risk of EBV DNAemia we considered the AUCs between day 20 and day 50 after transplantation (TTV DNA load₂₀₋₅₀), in addition to the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀. This is because most EBV DNAemia episodes occurred after day 50; 8 and 4 patients were excluded from these analyses, because they presented EBV DNAemia before days 50 and 30 post transplant, respectively. The TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was comparable in patients with (3.93 copies × days × mL⁻¹; range 0–7.62) or without (4.47 copies × days × mL⁻¹; range 0–9.85) subsequent EBV DNAemia (Figure 3a). Likewise, the TTV DNA load AUC₂₀₋₅₀ (Figure 3b) were not significantly different between groups (6.67 copies × days × mL⁻¹; range 4.18–8.62 in patients with EBV DNAemia and 7.10 copies × days × mL⁻¹; range 0–9.90 in patients without it). In addition, neither TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ nor TTV DNA load AUC₂₀₋₅₀ were correlated with the risk of recurrent EBV DNAemia within the first 6 months after transplantation (*P* = > 0.5). We found no association between either the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ or AUC₂₀₋₅₀ and the occurrence of EBV DNAemia episodes requiring rituximab treatment (*P* = 0.52 and *P* = 0.98, respectively).

Kinetics of plasma TTV DNA load and early reconstitution of CMV-specific T-cell immunity

We next investigated whether TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ did correlate with CMV-specific interferon-γ CD8⁺ T-cell counts enumerated by day +30 after allo-HSCT. Data on CMV-specific

Table 2. Risk factors for CMV DNAemia requiring preemptive antiviral therapy

Variable	Univariate		Multivariate		
	OR (CI 95%)	P-value	OR (CI 95%)	P-value	
Plasma TTV DNA load AUC ₂₀₋₃₀ ≤ 2.8		4.02 (0.96–16.91)	0.05	5.94 (0.91–38.97)	0.06
Allograft type					
Mismatched vs matched		1.45 (0.51–4.13)	0.48	–	–
Related vs unrelated		0.73 (0.27–1.92)	0.52	–	–
Conditioning regimen (myeloablative vs non-myeloablative)		1.62 (0.48–5.50)	0.46	–	–
Conditioning regimen (including ATG vs not including ATG)		1.79 (0.23–13.54)	0.57	–	–
aGvHD (grade II–IV vs 0–I)		2.18 (0.76–6.30)	0.14	–	–
Serostatus CMV vs D–/R–					
D+/R+		2.32 (0.24–21.93)	0.46	–	–
D+/R–		1.66 (0.11–24.56)	0.71	–	–
D–/R+		8.33 (0.77–89.47)	0.08	–	–
Serostatus CMV vs D+/R+					
D–/R+		3.59 (1.07–12.00)	0.04	5.94 (0.90–38.97)	0.06
D–/R–		0.43 (0.04–4.06)	0.46	–	–
D+/R–		0.71 (0.127–4.05)	0.70	–	–
aGvHD prophylaxis regimen	Including CP vs no CP	2.00 (0.61–6.53)	0.25	–	–

Abbreviations: aGvHD = acute GvHD; ATG = anti-thymocyte globulin; CI = confidence interval; CP = cyclophosphamide; OR = odds ratio.

Table 3. Pre-transplant and post-transplant plasma TTV DNA loads and occurrence of CMV DNAemia in allo-HSCT recipients

	TTV DNA load (\log_{10} copies/mL)									
	Pre-allo-HSCT			Day 20 post-allo HSCT			Day 30 post-allo HSCT			
	No.	Median (range)	P-value	No.	Median (range)	P-value	No.	Median (range)	P-value	
CMV DNAemia	Yes	35	1.51 (0.00–7.97)	0.819	27	1.89 (0.00–9.00)	0.245	25	2.48 (0.00–5.67)	0.277
	No	10	2.00 (0.00–6.09)		19	2.52 (0.00–6.91)		19	3.27 (0.00–7.76)	
High-level CMV DNAemia	Yes	17	2.12 (0.00–7.97)	0.251	19	1.85 (0.00–9.00)	0.210	17	2.35 (0.00–5.67)	0.082
	No	28	1.22 (0.00–7.97)		27	2.41 (0.00–6.91)		27	3.27 (0.00–7.76)	

Abbreviations: allo-HSCT = allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; TTV = torque teno virus.

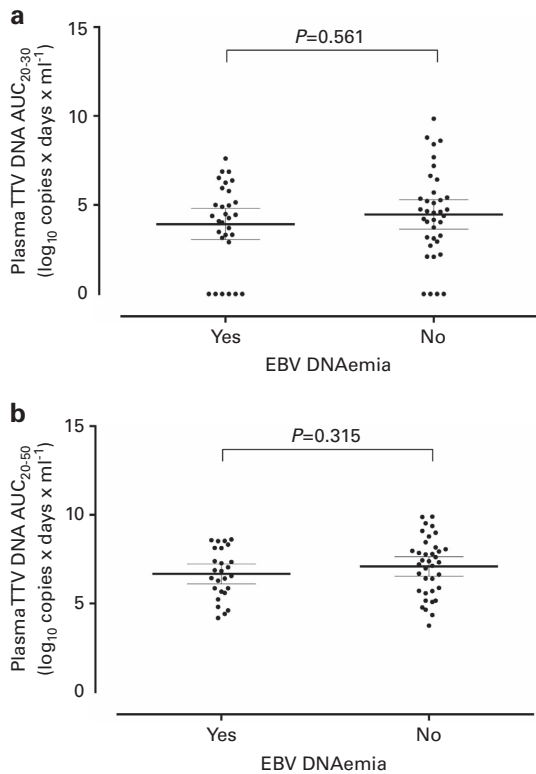


Figure 3. AUC for \log_{10} TTV DNA loads quantified between days 20 and 30 (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀) (a) and between days 20 and 50 (TTV DNA load AUC₂₀₋₅₀) (b) in patients with or without EBV DNAemia developing after days 30 and 50 post transplant, respectively. Bars indicating the mean values and the s.d., as well as P-values for comparisons between groups (Student's t-tests) are shown.

T-cell immunity were available for 21 patients who had not previously presented CMV DNAemia. We noted a non-statistically significant trend towards a direct correlation between TTV DNA AUC₂₀₋₃₀ and peripheral counts of this T-cell subset ($P=0.095$; Figure 4). Of interest, median CMV-specific interferon- γ CD8⁺ T-cell counts were comparable in D-/R and D+/R+ pairs ($P=0.470$).

Interaction between CMV and TTV

To investigate whether the occurrence of CMV DNAemia had any impact on the dynamics of plasma TTV DNA load we compared the difference in TTV DNA loads between day 40 and day 20, and between day 50 and day 20 after allo-HSCT in patients in whom CMV DNAemia did ($n=18$ and $n=21$, respectively) or did not develop ($n=19$) within these time windows. Patients who had

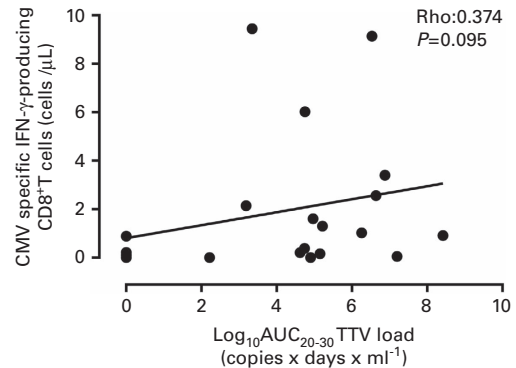


Figure 4. Correlation between the AUC for \log_{10} TTV DNA loads quantified between days 20 and 30 after transplant (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀) and peripheral levels of CMV pp65/IE-1-specific interferon- γ -producing CD8⁺ T cells measured at day 30 after transplant. Correlation between these variables was analyzed using the Spearman rank test. ρ and P-values are shown.

CMV DNAemia, either prior to day +20 or after day +40 or +50, respectively, were excluded from the analyses. Our results indicated that CMV DNAemia had no apparent effect on the kinetics of TTV DNA load ($P=0.461$ and $P=0.748$, respectively). In support of this view, as shown in Supplementary Table 1, the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was comparable ($P=0.195$) in patients with CMV DNAemia developing prior to day 30 after allo-HSCT (mean, 4.5 copies \times days \times mL⁻¹; range 0–9.8) and in patients with no CMV DNAemia within this period of time (mean 3.7 copies \times days \times mL⁻¹). Moreover, no overall correlation was found between TTV DNA and CMV DNA loads over the study period, regardless of whether all plasma specimens or only those yielding quantifiable TTV DNA loads for both viruses were considered for the analyses (Figures 5a and b, respectively).

DISCUSSION

This is the first study to suggest that the overall TTV DNA load quantified early after engraftment, between days 20 and 30 after allo-HSCT (TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀), may be an ancillary parameter to predict the occurrence of subsequent high-level plasma CMV DNAemia. The information derived from this parameter could thus complement that obtained by analyzing the CMV-specific functional T-cell response or the kinetics of CMV DNA load in the blood compartment to more precisely identify patients at risk of developing high-level CMV replication episodes.¹⁷ In the setting of preemptive antiviral therapy, early inception of treatment to avoid exceedingly high CMV loads may improve patient's survival.^{28,29}

Although the size of the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ was not significantly different between patients with or without

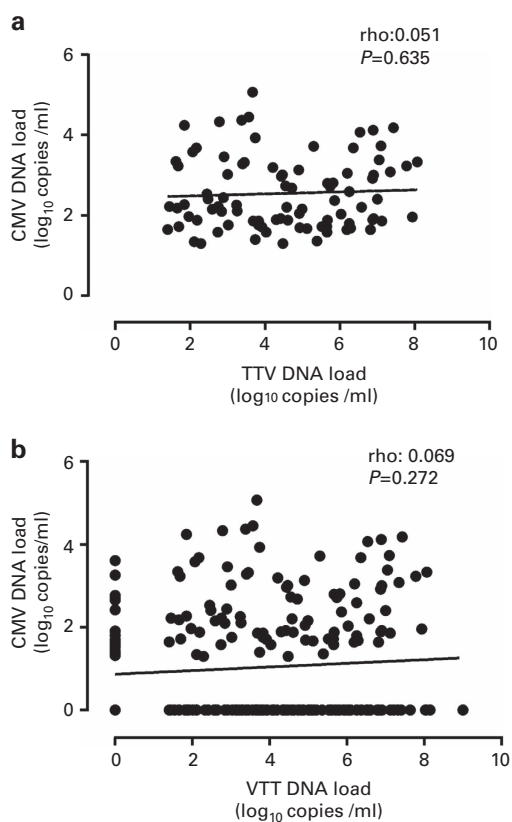


Figure 5. Correlation between the TTV and CMV DNA loads in plasma samples testing positive for both viruses by real-time PCR (a) or in all specimens, including those testing negative for TTV, CMV or both (b). Correlation between these variables was analyzed using the Spearman's rank test. ρ and P -values are shown.

subsequent CMV DNAemia, a trend towards an inverse relationship between these two parameters was evident. Nevertheless, patients who developed episodes of high-level DNAemia that eventually required the inception of preemptive antiviral treatment displayed a significantly lower mean TTV DNA AUC₂₀₋₃₀ than those who were able to clear the infection without the need for therapy or those with no documented CMV DNAemia. This was the case irrespective of the criterion used to trigger the initiation of therapy: either a CMV DNA doubling time ≤ 2 days ($n = 2$) or a CMV DNA load > 1000 copies/mL ($n = 15$). It should be underlined here that the above plasma CMV DNA threshold is commonly applied for triggering the administration of preemptive therapy in this setting.¹⁷

Moreover, we identified a TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ threshold (≤ 2.8 copies \times days \times mL⁻¹) that was associated with an increased risk of high-level CMV DNAemia episodes requiring preemptive antiviral treatment in univariate models, even though it displayed a rather modest predictive value for this event. Likewise, D-/R+/CMV patients were at higher risk of developing such type of episodes when compared to their D+/R+ counterparts, as previously reported.¹⁷ No other factor such as the type of allograft, the conditioning regimen, the use of anti-thymocyte globulin, post-transplant cyclophosphamide, or the occurrence of severe aGvHD was associated with high-level CMV DNAemia in this cohort.

It is worth noting that the inclusion of seven patients displaying TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ = 0 within the group of patients who developed high-level CMV DNAemia had a critical impact on the results. These patients showed a modest or no increase in ALCs between days 20 and 30 after transplantation (not shown), were

clinically heterogeneous and had not been treated with anti-thymocyte globulin, a well known T-cell depleting agent that has a major impact on TTV DNA load kinetics in SOT.⁶ Nevertheless, four of these patients received a bone marrow, cord blood or an HLA-mismatched allograft; all these conditions are known to be associated with a delayed reconstitution of virus-specific T-cell immunity.¹⁷

Although the data reported herein show promise, they should be interpreted with caution, provided that only a relatively scarce number of high-level CMV DNAemia episodes ($n = 17$) were included in the analyses. In this context, we chose not to take into consideration episodes of CMV DNAemia developing prior to day 30 after transplantation (nearly 50%), irrespective of whether or not they ultimately required the inception of antiviral treatment, because the possibility that CMV replication modulates plasma TTV DNA load kinetics could not absolutely be ruled out here, even though our data seemed to indicate that this was not the case, as discussed below.

Interestingly, despite plasma TTV DNA loads correlating with ALC following engraftment,¹³ we found that the magnitude of ALC AUC₂₀₋₃₀ was not associated significantly with the occurrence of high-level CMV DNAemia episodes; nevertheless, higher AUCs were usually seen in patients with self-resolving episodes.

Allo-HSCT patients who fail to reconstitute CMV-specific T-cell immunity early after transplant are known to be at higher risk of developing high-level viremia that eventually requires the inception of antiviral therapy for clearance.^{1,24,25} In this context, we observed that CMV pp65/IE-1-specific CD8⁺ T-cell counts, enumerated by day +30 after transplant in patients with no previous DNAemia, tended to correlate with TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀, hence suggesting that this parameter may behave as a surrogate marker for CMV-specific T-cell reconstitution. However, this correlation did not reach statistical significance, likely because the number of patients in our sample with T-cell immunity data available was limited, thus precluding us from drawing any robust conclusions on this issue. Further supporting the above assumption, we observed a trend towards an inverse association between TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ and CMV DNA peak values within episodes of CMV DNAemia.

We were unable to infer the risk of recurrent CMV DNAemia based upon TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ values. This, nevertheless, was not entirely unexpected, as such a risk is largely dependent on the strength of functional CMV-specific T-cell expansion within the initial episode of virus replication.³⁰⁻³²

We also found no association between the incidence of initial or recurrent episodes of EBV DNAemia and the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀ and AUC₂₀₋₅₀. The limited number of patients receiving rituximab for EBV DNAemia in our cohort precluded any meaningful assessment of the clinical value of TTV DNA load AUCs for predicting this event. In the absence of data on EBV-specific T-cell immunity, we speculate that the time span for TTV DNA load measurements (the longest period between days 20 and 50) may have been insufficient to gauge the level of EBV-specific T-cell reconstitution, which often occurs at later stages after allo-HSCT.^{33,34}

Our data differ from those of Gilles *et al.*³⁵ who found significantly higher TTV DNA loads at day +30 after transplantation in patients with CMV or EBV reactivation and/or aGvHD, thus supporting the idea that TTV DNA load may behave as a surrogate marker for immunosuppression. In our series, TTV DNA loads quantified prior to transplant as well as those those measured at days 20 and 30 after transplantation were comparable in patients with or without subsequent CMV DNAemia (either requiring preemptive antiviral therapy or not), although a trend towards lower TTV DNA load levels by days 20 and 30 after transplantation was observed in the former patients. Nevertheless, these two studies differ in the analytical characteristics of the real-time PCRs used for TTV, CMV and EBV detection and quantification.³⁵

Perhaps more importantly, there are substantial differences in the clinical characteristics of the patients included in each of the comparison groups: in Gilles *et al.*³⁵ all the patients with CMV or EBV reactivation appeared to have developed aGvHD, a condition which leads to a significant increase in TTV DNA load,^{12,13} whereas in our study patients with or without CMV or EBV DNAemia (treated or untreated) were balanced in terms of the incidence of aGvHD.

CMV is a potent pro-inflammatory and immunosuppressive agent¹⁷ and as such it may modulate TTV DNA load in the blood compartment. In fact, CMV-seropositive healthy individuals appear to display higher plasma TTV DNA loads than their CMV-seronegative counterparts, at least within certain age ranges.³⁶ Despite this, we found no evidence suggesting that CMV replication may impact on TTV DNA load kinetics within the first 50 days of allo-HSCT; first, the magnitude of the increase in TTV DNA load early after engraftment (between days 20 and 30 after transplantation) and the overall TTV DNA load within this time frame, captured by the TTV DNA load AUC₂₀₋₃₀, was apparently similar whether or not CMV DNAemia was detectable prior to day 30. Second, we found no correlation between TTV DNA and CMV DNA loads over the study period. Despite the above, and as previously stated, further studies are required to prove this assumption.

No reliable biological marker for identifying allo-HSCT patients at high-risk of high-level viremia is currently available other than functional CMV-specific T-cell levels in peripheral blood and this is better at predicting protection rather than the risk.¹⁷ Early assessment of the kinetics of TTV DNA load may perhaps help to solve this unmet need in a subset of patients. Unfortunately, patients with early-onset CMV DNAemia (either requiring antiviral therapy or not), nearly 50% in this cohort, would certainly not benefit from these analyses, at least in the way they were performed here.

On the basis of the data presented here and elsewhere,¹³ our current working hypothesis postulates that plasma TTV DNA load may behave as a surrogate marker of T-cell immune reconstitution (at least that preventing high-level CMV DNAemia) shortly after engraftment, just the opposite as observed in SOT recipients undergoing maintenance immunosuppression.³⁻⁸ In our view, this can be explained on the basis of the following facts: (i) TTV mainly replicates in lymphocytes;¹⁶ (ii) cytopenia (lymphopenia) ensues following conditioning; immunosuppression induction regimens in SOT do not cause such a profound lymphopenia (unless T-cell depleting agents are used at high doses); (iii) rapid lymphocyte repopulation following engraftment associates with a decreased risk of opportunistic infections;¹⁷ and (iv) a direct correlation exists between ALCs and TTV DNA load shortly after engraftment.¹³

Nevertheless, the occurrence of severe aGvHD requiring early after allo-HSCT, requiring the use of high-dose corticosteroids, known to increase plasma TTV DNA load,^{12,13} may blur this apparent relationship. It remains to be determined whether at later times, once ALC recover and plasma TTV DNA load reaches a plateau (this time point may perhaps vary depending upon the underlying disease, the immunosuppression regimen, the type of allograft), the magnitude of this parameter reflects instead the net state of immunosuppression, as it does in SOT. Studies addressing this issue are currently underway.

The main limitations of this study are its retrospective design, which made it impossible to collect a large number of specimens for the CMV-specific T-cell immunity analyses and, again, the relatively small size of the cohort. Nevertheless, given the potential clinical relevance of our findings, prospective and well-powered studies, which can validate or refute our findings are warranted.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Juan Manuel Moya Serrano for his technical assistance. Estela Giménez holds a Río-Hortega Contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII) (Ref. CM16/00200). This work was presented, in part, at the European Congress of Clinical Virology in Lisbon, 2016.

REFERENCES


- Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; **331**: 1–20.
- Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 589–593.
- De Vlamincck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF *et al*. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* 2013; **155**: 1178–1187.
- Gorzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0122975.
- Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F *et al*. Torque Teno Virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis* 2014; **209**: 247–254.
- Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus (TTV) viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplantation. *J Infect Dis* 2014; **210**: 667–668.
- Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transpl* 2014; **33**: 320–328.
- Schiemann M, Puchhammer-Stockl E, Eskandary F, Kohlbeck P, Rasoul-Rockenschaub S, Heilos A *et al*. Torque Teno virus load-inverse association with antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 2017; **101**: 360–367.
- Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, van Delden C, Giostra E, Morad I *et al*. Torque Teno Virus load and acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2017; **101**: e219–e221.
- Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K *et al*. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* 1999; **93**: 2485–2490.
- Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M *et al*. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol* 2010; **84**: 6891–6893.
- Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 440–442.
- Albert E, Solano C, Pascual T, Torres I, Macera L, Focosi D *et al*. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol* 2017; **94**: 22–28.
- Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrira A, Vatteroni ML, Isola P *et al*. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* 2001; **64**: 190–194.
- Mariscal LF, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolomé J *et al*. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* 2002; **301**: 121–129.
- Focosi D, Macera L, Boggi U, Ceccherini Nelli L, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol* 2015; **96**: 115–117.
- Pérez Romero P, Blanco P, Giménez E, Solano C, Navarro D. An update on the management and prevention of cytomegalovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Future Virol* 2015; **10**: 113–134.
- Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, Socié G, Banks PM, Sobocinski KA *et al*. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009; **113**: 4992–5001.
- Clari MÁ, Bravo D, Costa E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Remigia MJ *et al*. Comparison of the new Abbott real time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **75**: 207–209.
- Solano C, Muñoz-Cobo B, Giménez E, Remigia MJ, Amat P, Clari MA *et al*. Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 1010–1012.

- 21 Giménez E, Muñoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 654–656.
- 22 Solano C, Giménez E, Piñana JL, Vinuesa V, Poujois S, Zaragoza S *et al*. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 718–721.
- 23 Vinuesa V, Solano C, Giménez E, Navarro D. Comparison of the artus Epstein-Barr virus (EBV) PCR kit and the Abbott RealTime EBV assay for measuring plasma EBV DNA loads in allogeneic stem cell transplant recipients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; **88**: 36–38.
- 24 Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R, López J *et al*. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after cytomegalovirus infection. *Haematologica* 2008; **93**: 1434–1436.
- 25 Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, López J *et al*. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(+) and CD4(+) T-cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011; **46**: 1437–1443.
- 26 Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA *et al*. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; **18**: 295–304.
- 27 Torres A, Sánchez J, Lakomsky D, Serrano J, Alvarez MA, Martín C *et al*. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2001; **86**: 24–29.
- 28 Solano C, Giménez E, Piñana JL, Albert E, Vinuesa V, Hernández-Boluda JC *et al*. Impact of cytomegalovirus DNAemia on overall and non-relapse mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2017; **19**: doi: 10.1111/tid.12717.
- 29 Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM *et al*. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* 2016; **3**: e119–e127.
- 30 Tormo N, Solano C, Benet I, Clari MA, Nieto J, de la Cámara R *et al*. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN γ CD8+ and CD4+ T cells is associated with rising levels of pp65 antigenemia and DNAemia during pre-emptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**: 543–549.
- 31 Solano C, Benet I, Remigia MJ, de la Cámara R, Muñoz-Cobo B, Costa E *et al*. Immunological monitoring for guidance of preemptive antiviral therapy for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem-cell transplant recipients: a pilot experience. *Transplantation* 2011; **92**: e17–e20.
- 32 Navarro D, Amat P, de la Cámara R, López J, Vázquez L, Serrano D *et al*. Efficacy and safety of a preemptive antiviral therapy strategy based on combined virological and immunological monitoring for active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients. *Open Forum Infect Dis* 2016; **3**: ofw107.
- 33 Marshall NA, Howe JG, Formica R, Krause D, Wagner JE, Berliner N *et al*. Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2000; **96**: 2814–2821.
- 34 Meij P, van Esser JW, Niesters HG, van Baarle D, Miedema F, Blake N *et al*. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 2003; **101**: 4290–4297.
- 35 Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkwiew S, Fish I *et al*. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* 2017; doi: 10.1007/s00430-017-0511-4.
- 36 Haloschan M, Bettesch R, Görzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stöckl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)* 2014; **36**: 9716.

Supplementary Information accompanies this paper on Bone Marrow Transplantation website (<http://www.nature.com/bmt>)

RESEARCH ARTICLE

Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Eliseo Albert Pharm.D¹ | Ignacio Torres Pharm.D¹ | Alberto Talaya Pharm.D¹ |
 Estela Giménez Pharm.D¹ | José Luis Piñana MD² | Juan Carlos Hernández-Boluda MD² |
 Daniele Focosi MD³ | Lisa Macera MD³ | Fabrizio Maggi MD⁴ | Carlos Solano MD^{2,5} |
 David Navarro MD^{1,6} 

¹Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

²Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain

³Department of Transfusion Medicine, North-Western Tuscany Blood Bank, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

⁴Virology Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

⁵Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

⁶Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain.
 Email: david.navarro@uv.es

Plasma torque teno virus (TTV) DNA load directly correlates with the degree of T-cell immune reconstitution early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Here, the kinetics of oral TTV DNA shedding was examined to assess whether quantitation of TTV DNA load in saliva may either replace or complement that in plasma for predicting lymphocyte (ALC) reconstitution after engraftment. This prospective observational study enrolled 38 nonconsecutive allo-HSCT recipients. Saliva and plasma specimens were collected at baseline (pretransplant) and at around days +30, +50, and +90 after allo-HSCT. TTV DNA was quantitated in both specimen types by real-time PCR. ALCs were measured by cytometry. A total of 104 paired saliva and plasma specimens were available for TTV PCR analyses. TTV DNA was detected more frequently in saliva than in plasma specimens at all time points (overall, 94.2% vs 86.5%). Increasing levels of TTV DNA were seen in both specimen types from day +30 to day +90 after transplantation. Overall, TTV DNA loads were significantly higher in saliva than in plasma specimens ($P = .0002$) and correlated significantly ($P \leq .0001$). A direct correlation between TTV DNA loads in saliva and plasma and ALCs was observed after engraftment ($P = .034$ and $P = .002$, respectively). Future studies should be aimed at determining whether monitoring of oral TTV DNA shedding may be of any utility for inference of immune reconstitution after allo-HSCT.

KEYWORDS

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), immune reconstitution, oral TTV DNA shedding, saliva, torque teno virus (TTV), TTV DNAemia

1 | INTRODUCTION

Torque teno virus (TTV) is a circular, negative-sense, single-stranded DNA virus, which belongs to the *Anelloviridae* family.^{1,2} TTV is ubiquitous and establishes a persistent infection in most humans.^{1,2} Growing evidence indicates that the size of plasma TTV DNAemia directly correlates with the net state of immune competence in allogeneic hematopoietic stem cell transplant

recipients (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [allo-HSCT]), at least in early stages after engraftment. In fact, it has been shown that plasma TTV DNA load decreases dramatically as a result of conditioning and that following engraftment, it increases in parallel to the absolute lymphocyte cell counts (ALCs).³⁻⁶ Moreover, the area under a curve of plasma TTV DNA loads between days +20 and +30 after allo-HSCT allows the estimation of the risk of high-level cytomegalovirus DNAemia.⁷

Nevertheless, the available data also suggest that once the TTV DNA load reaches a plateau, its magnitude may reflect the net state of immunosuppression, as rising plasma TTV DNA levels are seen in episodes of severe acute graft-versus-host disease requiring corticosteroid therapy at high doses.^{5,6,8,9}

Although T lymphocytes appear to be the main target for TTV replication,^{10,11} other cell types of nonhematopoietic origin may also be fully permissive, thus potentially contributing to the TTV burden.^{1,2} Pertinent to this study, TTV DNA is frequently detected in saliva from TTV-infected healthy individuals.¹²⁻¹⁴ Here, we examined the kinetics of TTV DNA load in saliva to gain a further insight into the natural history of TTV in allo-HSCT recipients and investigated whether saliva may be a suitable alternative specimen to plasma for TTV DNA load monitoring to infer the degree of lymphocyte reconstitution after allo-HSCT.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients

This prospective cohort finally consisted of 38 nonconsecutive adult patients who underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service of the Hospital Clínico Universitario of Valencia between April 2013 and December 2014. Only patients from whom paired saliva and plasma specimens could be collected were included. The median age of the patients was 55 years (range 26-69 years). The patients' demographic, baseline, and post-transplant clinical data are summarized in Table 1. The study period comprised the first 100 days after allo-HSCT. This study was approved by the Hospital Clínico Fundación INCLIVA ethics committee and all patients gave written informed consent prior to participating in the study.

2.2 | Saliva and plasma specimens

Paired saliva and plasma specimens were collected before allo-HSCT (median, day -7; range, days -8 to -4), and at the following time points afterwards: median day +33 (range, days +21 to +38), median day +54.5 (range, days +42 to +64), and median day +90 (range, day +68 to +99). Saliva specimens were obtained early in the morning (9-10 AM) by the use of the unstimulated, whole saliva that pools on the floor of the mouth, collected by the passive drool technique in sterile cryovials as previously detailed.¹⁵ Saliva samples visibly contaminated with blood were discarded. The samples were cryopreserved at -20°C and then retrieved for the analyses described herein (the specimens had never been thawed before).

2.3 | Quantitation of TTV DNA load in plasma and saliva specimens

TTV DNA load quantification in both specimen types was carried out with a TaqMan® real-time PCR targeting a highly-conserved segment of the untranslated region of the TTV genome, as previously described.^{6,7} DNA extraction of saliva specimens was

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the patients

Parameter	No of patients (%)
Sex	
Male	22 (57.9)
Female	16 (42.1)
Underlying hematological disease	
Hodgkin's lymphoma	1 (2.6)
Non Hodgkin's lymphoma	14 (36.8)
Acute lymphocytic leukemia	4 (10.5)
Chronic lymphocytic leukemia	3 (7.9)
Acute myeloblastic leukemia	6 (15.8)
Multiple myeloma	2 (5.3)
Myelodysplastic syndrome	6 (15.8)
Other	2 (5.3)
Allograft type	
Related	22 (57.9)
Unrelated	16 (42.1)
HLA-matching	
Matched	26 (68.4)
Mismatched	12 (31.6)
Conditioning regimen	
Myeloablative	5 (13.2)
Reduced intensity	33 (86.8)
Stem cell source	
Peripheral blood	37 (97.3)
Bone marrow	1 (2.7)
GvHD prophylaxis regimen	
Cyclosporine A or tacrolimus ± methotrexate	13 (34.2)
Cyclosporine A or tacrolimus ± mycophenolate mofetil or tacrolimus + sirolimus	18 (47.4)
Including cyclophosphamide	7 (18.4)

aGvHD, acute graft versus host disease; HLA, human leukocyte antigen.

performed using the Nuclisens® nucleic acid extraction kit for the easyMAG® platform (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), following the manufacturer's instructions. A volume of 200 µL of nondiluted saliva specimens was subjected to DNA extraction, yielding an elution volume of 60 µL. PCR amplification and amplicon detection were done on the ABI Prism 7500 system (PE Biosystems, Foster City, CA). Sample processing for TTV DNA quantitation on plasma samples was previously described.^{6,7} The limit of quantitation of the PCR assay was around 25 copies/mL and the limit of detection, approximately 10 copies/mL (75% repeatability). All samples from each patient were assayed simultaneously in singlets.

2.4 | Absolute lymphocyte counts

Enumeration of absolute ALCs was performed by flow cytometry using the BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

TABLE 2 Detection and quantitation of TTV DNA in paired saliva and plasma specimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients

Time of sampling (no. paired specimens)	Specimen type	TTV DNA detectable (yes/no)	TTV DNA load in log ₁₀ copies/mL; mean (range)	ALC log ₁₀ cells/μL; mean (range)
Pretransplant (23)	Saliva	23/0	5.1 (2.0-8.4)	2.9 (2.0-3.26)
	Plasma	20/3	2.6 (0.0-8.0)	
Around day +30 (24)	Saliva	20/4	4.0 (0.0-8.6)	2.7 (0-3.39)
	Plasma	16/8	2.9 (0.0-7.8)	
Around day +50 (32)	Saliva	30/2	4.7 (0.0-8.6)	2.9 (2.48-3.67)
	Plasma	30/2	4.6 (0.0-8.0)	
Day +90 (25)	Saliva	25/0	6.1 (1.4-9.4)	2.9 (2.04-3.79)
	Plasma	24/1	4.7 (0.0-8.0)	

ALC, absolute lymphocyte counts; TTV, torque teno virus.

2.5 | Definitions

Time of engraftment was defined as the first of 3 consecutive days with an absolute neutrophil count of $0.5 \times 10^9/L$ and a platelet count of $>20 \times 10^9/L$ unsupported by transfusion.¹⁶

2.6 | Statistical analysis

The differences between medians were compared using the Student *t* test (2 independent variables), the analysis of variance test (more than 2 independent variables) or the Wilcoxon sum rank test (for dependent variables). Correlations between variables were assessed by the Pearson test. Two-sided exact *P* values are reported. A *P* value $\leq .05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Detection of TTV DNA in paired saliva and plasma specimens

A total of 104 paired saliva and plasma specimens were available for TTV PCR analyses. Of the 38 patients in the cohort, 9 had the full set of specimens ($n = 4$) planned to be drawn, 11 had 3, 17 had 2 and 1 patient had just 1. Thus, 29 patients were unable to produce a sufficient volume of saliva (mainly due to xerostomy) at one or more scheduled collection time points. Pre-transplant, day +30, day +50 and day +90 paired saliva and plasma specimens were available for 23, 24, 32, and 25 patients, respectively. Engraftment was documented at a median of 18 days after transplantation (range 12-23 days). As shown in Table 2, the overall TTV DNA was detected more frequently in saliva than in plasma specimens at all time points (94.2% vs 86.5% of specimens). The maximum difference (83.3 vs 66.7%) was noted shortly after engraftment (around day +30). In detail, TTV DNA was detected in both specimen types in 88 cases,

only in saliva in 10, and only in plasma in 2. TTV DNA was not detected in 4 paired specimens.

3.2 | Kinetics of TTV DNA load in saliva and plasma specimens

Overall, the TTV DNA loads in saliva and plasma specimens over time are depicted in Figure 1. Increasing levels of TTV DNA were seen in both specimen types from day +30 to day +90. Nevertheless, TTV DNA loads above pretransplant levels were reached by day +90 in saliva, whereas in plasma specimens this was already evident by day +30. Overall, TTV DNA loads were significantly higher ($P = .0002$) in saliva than in plasma specimens (mean, 4.96 log₁₀ copies/mL vs 3.79 log₁₀ copies/mL, respectively). This occurred at all evaluable time points (Table 2). Overall, a rather modest ($r = .507$), albeit significant ($P = <.0001$) correlation was observed between TTV DNA loads in saliva and plasma specimens (Figure 2). As shown in Figure 3, maximal correlation was seen by around days +30 and +50 after allo-HSCT.

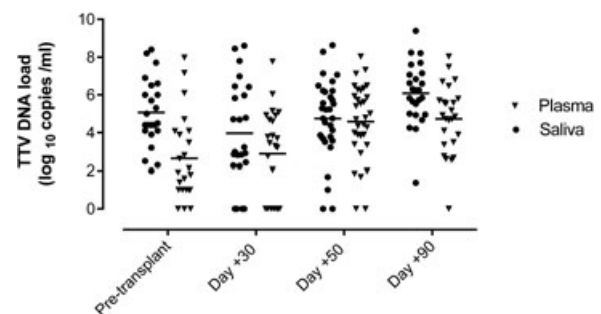


FIGURE 1 Kinetics of TTV DNA load in paired saliva and plasma specimens from allo-HSCT recipients. Bars indicate mean values. allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; TTV, torque teno virus

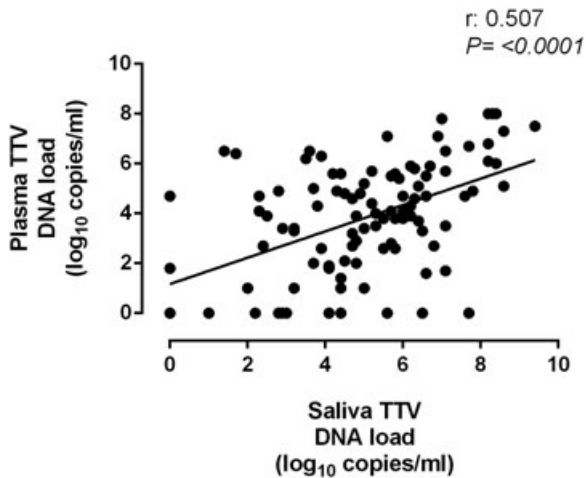


FIGURE 2 Overall correlation between TTV DNA loads quantified in paired saliva and plasma specimens throughout the study period. Correlation between these variables was analyzed by the Pearson test. r and P values are shown. TTV, torque teno virus

3.3 | TTV DNA in saliva and lymphocyte repopulation

All patients had ALCs measured at the time of saliva and plasma sampling. As shown in Figure 4, ALCs increased between days +30 and +50 in parallel to TTV DNA loads in both saliva and plasma specimens. Nevertheless, no further increase in ALC counts was observed later on, whereas the TTV DNA loads in both sample types continued to rise up to day +90. Overall, a significant direct correlation between TTV DNA loads in saliva and ALCs measured between days +30 and +50 was noted ($P = .034$; Supporting Information Figure, panel A). This correlation was rather modest, though, as was that between TTV DNA load in plasma and ALC within the same time frame (Supporting Information Figure, panel B).

4 | DISCUSSION

Previous studies conducted in healthy individuals found that TTV DNA is frequently detected in saliva¹²⁻¹⁴ in which it can be present at higher

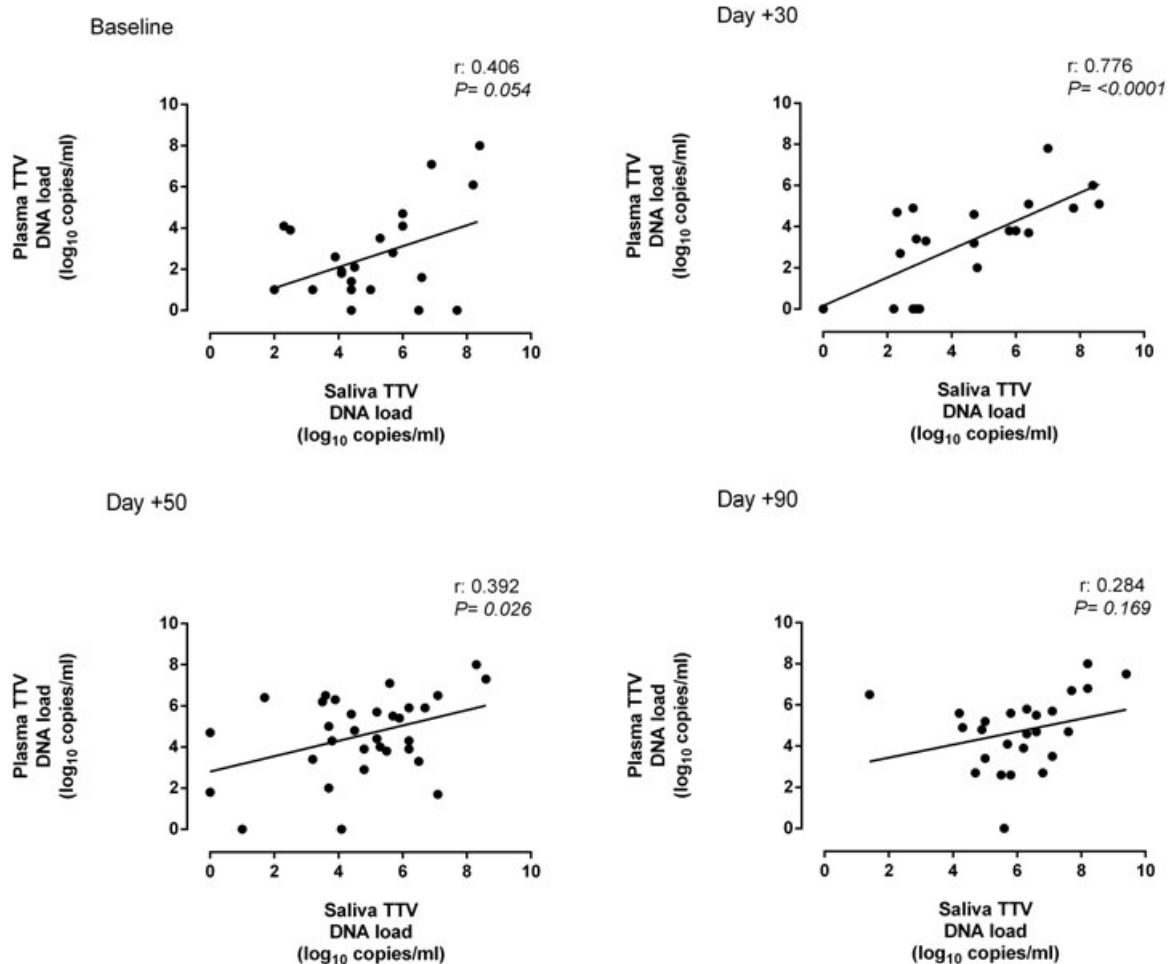


FIGURE 3 Correlation between TTV DNA loads quantified in paired saliva and plasma specimens at different timepoints after allo-HSCT. The correlation between these variables was analyzed by the Pearson test. r and P values are shown. allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; TTV, torque teno virus

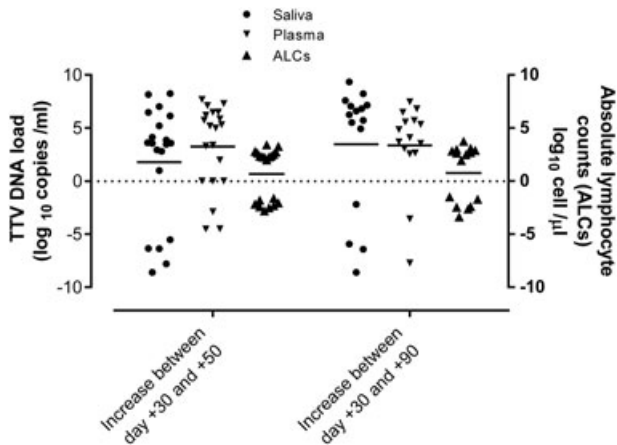


FIGURE 4 Mean increase in TTV DNA loads in saliva and plasma and in absolute lymphocyte counts (ALCs) between days +30 and +50 and between days +30 and +90 following allo-HSCT. Bars indicate mean values. allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; TTV, torque teno virus

levels than in paired serum specimens.¹³ Here we examined the kinetics of oral TTV DNA shedding in a cohort of allo-HSCT recipients and compared it with that of plasma TTV DNAemia and ALCs. To our knowledge, no previous studies have addressed this issue.

Our study presented several findings of potential biological and clinical interest. First, TTV DNA was detected at a higher rate in saliva than in plasma specimens; this held true at all evaluable time points and was particularly noticeable shortly after engraftment. In fact, 10 patients had TTV DNA detected in saliva without concurrent TTV DNAemia, whereas only 2 patients had TTV DNAemia in the absence of oral TTV DNA shedding. In total, there were 6 patients in whom TTV DNA could not be detected in saliva. Since no quantitation of total cellular DNA was performed, we could not infer whether these latter specimens were of a suitable quality for TTV DNA PCR testing.

Second, the TTV DNA loads in saliva were of greater magnitude than those quantified in plasma specimens at all time points, including pretransplant paired specimens. Although this could have been due to local T-lymphocyte recruitment (and consequent TTV shedding) owing to oral mucositis, a highly prevalent event early after allo-HSCT, our observation may also point to the oral cavity as being a privileged site of TTV replication. Nevertheless, our data should be interpreted with caution as different platforms were used for DNA extraction from saliva and plasma specimens. In line with this, it is still debated whether real TTV-negativity exists in the general population;² in this context, the use of more sensitive tools such as digital PCR assays may help resolve the issue.

Third, the kinetics of TTV DNA load in saliva and plasma specimens was fairly comparable. Overall, TTV DNA loads were found to increase steadily following engraftment, reaching peak levels at around day +90 in both compartments; in fact, TTV DNA loads in the saliva and plasma samples correlated modestly, but significantly throughout the study period, in particular by around days +30 and +50; nevertheless, it took longer for TTV DNA load in

saliva than in plasma to reach levels above those measured before transplantation.

Fourth, a direct correlation between ALCs and plasma TTV DNA loads after engraftment has been reported.^{4–6} The data presented herein further support this assumption and extend it to TTV DNA load in saliva. In this context, it is worthy to mention that ALCs do not allow inference of the level of immune protection against all potential deleterious pathogens that threaten these patients. In fact, we previously showed that ALCs were not associated significantly with CMV viremia-free survival within 120 days after allo-HSCT.¹⁷ Thus, monitoring of TTV DNA load in saliva (and naturally in plasma) cannot be viewed as an alternative to ALCs, whose measurement relies on much cheaper and less sophisticated procedures.

The major limitation of this study is the relatively limited size of the cohort, and in particular the lack of availability of a number of sequential specimens we planned to analyze. Additionally, the sampling time points were not frequent enough to dissect short-term kinetics immediately after the conditioning regimen. Future studies should assess the correlation between TTV load in saliva and lymphocyte subsets, and especially pathogen-specific T lymphocytes.

In summary, although preliminary, our data suggest that sequential monitoring of TTV DNA load in saliva specimens allows inference of the degree of lymphocyte repopulation after engraftment, as does plasma TTV DNA load monitoring. Further studies should be conducted to determine whether monitoring of oral TTV DNA shedding may be of any utility for inference of immune reconstitution after allo-HSCT. The ease and noninvasiveness of saliva drawing makes this approach appealing; this should be further explored in prospective studies involving larger cohorts.

ACKNOWLEDGMENTS

Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM16/00200). This work received no public or private funding.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTION

EA, IT and AT performed the experiments. EA, EG analyzed the data. LM, FM and DF contributed to the design of the study and the interpretation of data. JLP, JCH-B and CS attended to patients and interpreted the data. DN designed the study, analyzed the data and wrote the article.

DISCLOSURE

This work received no public or private funding.

ORCID

David Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-3010-4110>

REFERENCES

1. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:1-20.
2. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:589-593.
3. Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, et al. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood*. 1999;93:2485-2490.
4. Maggi F, Focosi D, Albani M, et al. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol*. 2010;84:6891-6893.
5. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51:440-442.
6. 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;94:22-28.
7. Albert E, Solano C, Giménez E, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2017;53:180-187.
8. 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;206:355-362.
9. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, et al. Torquetenovirus dynamics and immune marker properties in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective longitudinal study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24:194-199.
10. Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, et al. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol*. 2001;64:190-194.
11. Mariscal LF, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, et al. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology*. 2002;301:121-129.
12. Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol*. 1999;13:181-184.
13. Deng X, Terunuma H, Handema R, et al. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J Med Virol*. 2000;62:531-537.
14. Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2407-2408.
15. Veerman EC, van den Keybus PA, Vissink A, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci*. 1996;104:346-352.
16. Torres A, Sánchez J, Lakomsky D, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2001;86:24-29.
17. Gutiérrez A, Muñoz I, Solano C, et al. Reconstitution of lymphocyte populations and cytomegalovirus viremia or disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2003;70:399-403.

SUPPORTING INFORMATION


Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Albert E, Torres I, Talaya A, et al. Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2018;1-6. <https://doi.org/10.1002/jmv.25218>



ORIGINAL ARTICLE

Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation

Mario Fernández-Ruiz^{1,2}  | Eliseo Albert³ | Estela Giménez³ | Tamara Ruiz-Merlo^{1,2} | Patricia Parra^{1,2} | Francisco López-Medrano^{1,2} | Rafael San Juan^{1,2} | Natalia Polanco⁴ | Amado Andrés⁴ | David Navarro^{3,5} | José María Aguado^{1,2}

¹Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre," Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

²Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, Spain

⁴Department of Nephrology, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain

⁵Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

Mario Fernández-Ruiz
Email: mario_fdezruiz@yahoo.es

Funding information

Instituto de Salud Carlos III; Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Grant/Award Number: 15/01953; Proyecto Integrado de Excelencia (PIE), Grant/Award Number: 13/00045

The replication kinetics of nonpathogenic anelloviruses belonging to the Alphatorquevirus genus (such as torque teno virus) might reflect the overall state of posttransplant immunosuppression. We analyzed 221 kidney transplant (KT) recipients in whom plasma alphatorquevirus DNA load was quantified by real-time polymerase chain reaction at baseline and regularly through the first 12 posttransplant months. Study outcomes included posttransplant infection and a composite of opportunistic infection and/or de novo malignancy (immunosuppression-related adverse event [iRAE]). Alphatorquevirus DNA loads at month 1 were higher among patients who subsequently developed posttransplant infection ($P = .023$) or iRAE ($P = .009$). Likewise, those with iRAE beyond months 3 and 6 also exhibited higher peak viral loads over the preceding periods. Areas under the curve for \log_{10} alphatorquevirus DNAemia estimated by months 1 or 6 were significantly higher in patients experiencing study outcomes. Alphatorquevirus DNA loads above 3.15 and 4.56 \log_{10} copies/mL at month 1 predicted the occurrence of posttransplant infection (adjusted hazard ratio [aHR]: 2.88; 95% confidence interval [CI]: 1.13-7.36; $P = .027$) and iRAE (aHR: 5.17; 95% CI: 2.01-13.33; $P = .001$). In conclusion, posttransplant monitoring of plasma alphatorquevirus DNA kinetics may be useful to identify KT recipients at increased risk of immunosuppression-related complications.

KEYWORDS

biomarker, clinical research/practice, complication: infectious, complication: malignant, infection and infectious agents, infection and infectious agents – viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology

Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; AUC, area under curve; auROC, area under receiver operating characteristics curve; BKVAN, polyomavirus-associated nephropathy; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; ESRD, end-stage renal disease; HIV, human immunodeficiency virus; HR, hazard ratio; IFI, invasive fungal infection; IQR, interquartile range; iRAE, immunosuppression-related adverse event; KT, kidney transplantation; LLoD, lower limit of detection; LT, lung transplantation; SD, standard deviation; SOT, solid organ transplantation; TTV, torque teno virus.

Mario Fernández-Ruiz and Eliseo Albert contributed equally to the present study.

Senior authors Amado Andrés and David Navarro contributed equally to the present study.

1 | INTRODUCTION

Kidney transplantation (KT) remains the best therapeutic option for end-stage renal disease (ESRD),¹ although middle- and long-term outcomes are still threatened by the development of adverse events attributable to excessive immunosuppression. Therapeutic drug monitoring currently stands as the only strategy to assess the status of immunocompetence after KT.² However, this unidimensional approach remains limited to certain immunosuppressive drugs.³ As a consequence, various biomarkers with or without antigenic specificity have been proposed, with most of them not having yet reached clinical maturity.⁴

The widespread use of high-throughput sequencing methods has provided a revolutionary insight into the composition of human blood virome.⁵ Anelloviruses are small, nonenveloped, single-stranded DNA viruses with a circular, negative-sense genome. They are ubiquitously distributed, exhibit remarkable genetic variability, and occupy the largest fraction ($\approx 70\%$) of blood virome in healthy subjects.⁶ Torque teno virus (TTV), first isolated in 1997 from a Japanese patient with posttransfusion hepatitis,⁷ constitutes the prototype member within the *Anelloviridae* family. TTV belongs to the Alphatorquevirus genus, which comprises at least 29 different genospecies according to the 2011 report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. TTV infection is thought to be acquired in childhood via multiple routes (transplacental, respiratory, fecal-oral, or transfusion) and reaches a prevalence as high as 90% among the adult population.^{8,9} Anelloviruses such as TTV are still considered “orphan” viruses, with no evidence so far supporting a direct causal association with specific clinical manifestations.^{6,8}

Regardless of the nonpathogenic nature of chronic alphatorquevirus infection, increasing interest is being shown in its potential application as a functional marker of immune status.⁶ Plasma alphatorquevirus DNA levels in nonimmunocompromised subjects reflect a long-term steady-state balance between virus replication and the host's immune response, resulting from a high daily turnover rate.^{10,11} Immunosuppressive therapy for solid organ transplantation (SOT),¹²⁻¹⁵ postengraftment phase after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation,¹⁶⁻¹⁹ or CD4⁺ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection^{20,21} lead to an evident increase in alphatorquevirus DNA loads that would in turn correlate with the overall amount of immunosuppression.

It has been suggested that replication kinetics for alphatorquevirus might be a useful tool to identify SOT recipients at increased risk of graft rejection (ie, those with lower DNA loads).²²⁻²⁴ In addition, some authors have reported a direct association between higher DNA loads and posttransplant infection.²⁵ Nevertheless, most of these studies had small sample sizes or were exclusively focused on graft rejection as study outcome. We investigated in a large cohort of KT recipients the clinical value of monitoring alphatorquevirus DNA kinetics to predict the occurrence not only of posttransplant infection, but also of a constellation of complications, such as opportunistic infection or de novo malignancy, whose pathogenesis may be more specifically attributed to

excessive immunosuppression (ie, immunosuppression-related adverse events [iRAEs]).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population and setting

The present prospective, observational, cohort study was performed between November 2014 and December 2016 at the Hospital Universitario “12 de Octubre.” All adult patients with ESRD undergoing KT during this period and providing informed consent were deemed eligible for inclusion. Double organ recipients were excluded. This study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declarations of Helsinki and Istanbul. The local Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol.

2.2 | Study design

Participants were enrolled at the time of KT and followed up for at least 12 months, unless graft loss (retransplantation or permanent return to dialysis) or death occurred earlier. Scheduled follow-up visits were carried out at baseline, every 2 weeks during the first 3 months, and monthly thereafter, as well as whenever clinically indicated. A number of pretransplant, perioperative, and posttransplant variables were recorded by using a standardized case report form. Plasma alphatorquevirus DNA load was quantified at baseline (ie, within 6 hours prior to the transplant procedure), day 7, and months 1, 3, 6, and 12 by a polymerase chain reaction (PCR)-based quantitative nucleic acid amplification test. Descriptions of immunosuppression and prophylaxis regimens are detailed in Supplementary Methods.

The study outcome was the occurrence of overall posttransplant serious infection (defined by the requirement of hospitalization and intravenous antimicrobial therapy) and iRAE, with the latter encompassing the occurrence of opportunistic infection (as defined below) and/or posttransplant de novo malignancy.²⁶

2.3 | Plasma alphatorquevirus DNA load quantification

Blood samples were immediately centrifuged and plasma specimens were preserved at -80°C , with aliquots thawed for the first time for the present analyses. DNA was extracted from 200 μL of plasma with the NucliSENS[®] easyMAG[®] automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), following the manufacturer's instructions. DNA loads were quantified by means of the TTV R-gene[®] kit (ARGENE[®] range, bioMérieux), a real-time PCR assay targeting a highly conserved segment of the 5' untranslated region of the viral genome with $>90\%$ identity across isolates.⁶ Analytical performances of this assay in terms of precision (reproducibility and repeatability), correlation with the in-house PCR assay developed by Maggi et al,²⁷ inclusivity and exclusivity, and linearity have been recently reported²⁸ and are detailed in Supplementary Methods. PCR amplification and

amplicon detection was performed on an ABI Prism 7500 system (PE Biosystems, Foster City, CA). The viral load (in copy numbers per mL) was determined using a standard curve with known copy numbers and \log_{10} -transformed for statistical analyses. The lower limit of detection (LLoD) was 167 copies/mL (95% confidence interval [CI]: 92-581) or $2.2 \log_{10}$ copies/mL (95% CI: 2.0-2.8), with DNA quantitation in the linear range from 2.1×10^2 to 2.1×10^7 copies/mL. Specimens with undetectable DNA loads were assigned a value of 0.01 ($-2.0 \log_{10}$) copies/mL for analysis purposes. All samples from each patient were simultaneously assayed in singlets. Although the taxonomic classification and nomenclature of the *Anelloviridae* family are still discussed, there is general consensus to recommend the term “alphatorquevirus” instead of “TTV” in order to encompass the different genospecies within this genus. Therefore, results of the PCR assay were referred to as plasma alphatorquevirus DNA load.

2.4 | Study definitions

We defined *opportunistic infection* as that due to intracellular bacteria (mycobacteria, *Listeria monocytogenes*, and *Nocardia* spp.), herpesviruses (cytomegalovirus [CMV], herpes simplex virus, and varicella-zoster virus), polyomaviruses (biopsy-proven BK polyomavirus-associated nephropathy [BKVAN]), yeasts (*Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.), molds (invasive aspergillosis and mucormycosis), and parasites (*Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis jirovecii*, and *Leishmania* spp.).²⁹ We also included the diagnosis of presumptive BKVAN (high-level polyomavirus BK replication [plasma viral load $>4 \log_{10}$ copies/mL] at 2 time points 3 or more weeks apart) even in the absence of biopsy-proven nephropathy.³⁰ Surgical site and urinary tract infections due to *Candida* spp. were excluded since such complications are usually related to previous invasive procedures, mucosal breakdown, and indwelling urinary catheters rather than to the patient’s immune status. The diagnosis of *CMV disease* required the demonstration of CMV replication and the presence of attributable symptoms, and was categorized as viral syndrome or end-organ disease according to consensus definitions.³¹ Proven or probable *invasive fungal infection* (IFI) was defined by the European Organization on Research and Treatment in Cancer and the Mycoses Study Group criteria.³² Further study definitions are detailed in Supplementary Methods.

2.5 | Statistical analysis

Quantitative data were shown as the mean \pm standard deviation (SD) or the median with interquartile ranges (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Categorical variables were compared using the χ^2 test. Student *t* test or Mann-Whitney *U* test were applied for continuous variables. Repeated measures were compared with the Student *t* test for paired samples or the Wilcoxon test. Pearson’s correlation coefficient or Spearman’s rank correlation coefficient were used to investigate the correlation between continuous variables.

The optimal cutoff values (ie, that with the highest value for the combined sensitivity and specificity) of plasma alphatorquevirus

DNA loads to predict study outcomes were identified by the Youden’s index³³ in the area under receiver operating characteristics (auROC) curve. In the absence of an external validation cohort, the selected cutoff values were evaluated by bootstrap simulation, which estimated how good the predictive performance of the test (ie, having a plasma DNA load below or above the threshold) would be on a hypothetical set of new patients. To this aim, 1000 bootstrap samples of equal size were generated from the study population by sampling with replacement. Time-to-first-event curves were plotted by the Kaplan-Meier method. Intergroup differences in cumulative incidence curves were compared with the log-rank test, and multivariate Cox regression models were used to evaluate the association between plasma DNA loads and study outcomes. Multicollinearity was assessed using variance inflation factors. Associations were given as hazard ratios (HRs) and 95% CIs.

Plasma alphatorquevirus DNA load area under curve (AUC) was calculated by means of the trapezoid rule.³⁴ As previously described,^{15,35} we estimated the DNA load doubling time according to the formula: $dt = (t_2 - t_1) \times [\ln_2 / \ln(q_2 / q_1)]$, where q_1 and q_2 represent the plasma loads (in copies/mL) at the time of the first and second positive PCR result, respectively, and $(t_2 - t_1)$ the interval (in days) between both dates. Only episodes in which there was an increase between the first and second alphatorquevirus DNA load values of >3 -fold were considered for analysis.

All the significance tests were 2-tailed. The threshold for significance was set at a $P < .05$. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY) and Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the study population

We included 221 KT recipients, whose clinical characteristics are shown in Table 1. The median follow-up was 494 days (IQR: 434-542). Five patients (2.3%) experienced graft loss after a median posttransplant interval of 41 days (IQR: 18-260.5), whereas 2 patients (0.9%) died (1-year survival rate: 98.0%). These patients were censored for follow-up at these points.

Regarding the occurrence of study outcomes, 128 patients (57.9%) developed a total of 287 episodes of posttransplant infection (incidence rate: 2.67 episodes per 1000 transplant-days). The clinical and microbiological characteristics are detailed in Supplementary Results (Table S1). The median interval from transplantation to the first episode was 37.5 days (IQR: 14-99.3). Fifty-one patients (23.1%) had 65 episodes of iRAE (incidence rate: 0.61 episodes per 1000 transplant-days) (Table 2). The median interval to the first episode was 78 days (IQR: 39-235).

3.2 | Kinetics of plasma alphatorquevirus DNA load

The total number of monitoring points for plasma alphatorquevirus DNA was 997 (median of 5 points per patient [IQR: 4-5]). Only

TABLE 1 Demographics and clinical characteristics of the study population (n = 221)

Variable	Value
Age of recipient, y (mean ± SD)	53.9 ± 15.7
Sex of recipient (male) (n [%])	160 (72.4)
Prior or current smoking history (n [%])	90 (40.7)
BMI at transplantation, kg/m ² [mean ± SD] ^a	25.2 ± 4.1
Pretransplant chronic comorbidities (n [%])	
Hypertension	188 (85.1)
Diabetes mellitus	70 (31.7)
Coronary heart disease	22 (10.0)
Other chronic heart disease	39 (17.6)
Peripheral arterial disease	21 (9.5)
Cerebrovascular disease	18 (8.1)
Chronic obstructive pulmonary disease	6 (2.7)
Previous solid organ transplantation (n [%])	29 (13.1)
Underlying end-stage renal disease (n [%])	
Glomerulonephritis	50 (22.6)
Diabetic nephropathy	45 (20.4)
Polycystosis	26 (11.8)
Nephroangiosclerosis	20 (9.0)
Chronic interstitial nephropathy	12 (5.4)
Congenital nephropathy	10 (4.5)
Reflux nephropathy	6 (2.7)
Vasculitis	5 (2.3)
Lupus nephropathy	4 (1.8)
Unknown	26 (11.8)
Other	17 (7.7)
CMV serostatus (n [%])	
D+/R+	157 (71.0)
D-/R+	24 (10.9)
D+/R-	28 (12.7)
D-/R-	8 (3.6)
D unknown/R+	4 (1.8)
Positive EBV serostatus (anti-EBNA IgG) (n [%])	200 (90.5)
Positive HCV serostatus [n (%)]	17 (7.7)
Positive HBsAg status (n [%])	8 (3.6)
Positive HIV serostatus (n [%])	2 (0.9)
Pretransplant renal replacement therapy [n (%)]	194 (87.8)
Hemodialysis	159 (82.0)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	35 (18.0)
Time on dialysis, days (median [IQR])	536 (284-1074)
Highly sensitized recipient (n [%])	21 (8.0)
Age of donor, y [mean ± SD]	52.5 ± 16.1
Gender of donor (male) (n [%])	117 (52.9)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Variable	Value
Type of donor (n [%])	
DBD donor	144 (65.2)
DCD donor	47 (21.3)
Living donor	29 (13.1)
Cold ischemia time, h (mean ± SD)	15.9 ± 8.0
Number of HLA mismatches (median [IQR])	4 (3-5)
Induction therapy (n [%])	
ATG	106 (48.0)
Total dose, mg (mean ± SD)	5.4 ± 2.2
Basiliximab	85 (38.5)
None	30 (13.6)
Primary immunosuppression regimen (n [%])	
Steroids	220 (99.5)
Tacrolimus	221 (100.0)
Mycophenolate mofetil/mycophenolic acid	210 (95.0)
Azathioprine	10 (4.5)
Anti-CMV prophylaxis (n [%])	125 (56.6)
Duration of prophylaxis, days (median [IQR])	103.5 (91-148.5)
Posttransplant complications (n [%])	
Delayed graft function	102 (46.2)
Number of dialysis sessions (median [IQR])	2 (1-3)
Reintervention within the first month	24 (10.9)
NODAT	19 (12.6)
Renal artery stenosis	43 (19.5)
Acute graft rejection ^b	25 (11.4)
Time from transplantation, days (mean ± SD)	112.8 ± 105.1
T cell-mediated acute rejection	13 (5.9)
Antibody-mediated acute rejection	6 (2.7)

ATG, antithymocyte globulin; BMI, body mass index; CMV, cytomegalovirus; D, donor; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; EBV, Epstein-Barr virus; EBNA, EBV nuclear antigen; HLA, human leukocyte antigen; HBsAg, hepatitis B virus surface antigen; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; IQR, interquartile range; NODAT, new-onset diabetes after transplantation; R, recipient; SD, standard deviation.

^aData on BMI not available for 18 patients.

^bIncludes 4 patients with borderline acute rejection and 2 with empirically treated episodes not confirmed by biopsy.

2.4% (24/997) samples were below the LLoD (ie, undetectable load), with rates ranging from 3.7% (7/187) at baseline to 0.6% (1/177) at month 6. There was a progressive increase in viral load from baseline ($2.9 \pm 1.6 \log_{10}$ copies/mL), to peak at month 6 ($5.7 \pm 1.9 \log_{10}$ copies/mL) and slightly decreased at month 12 ($5.0 \pm 2.1 \log_{10}$ copies/mL) ($P < .05$ for all paired comparisons) (Figure 1). Accordingly, viral loads peaked in most patients at month 6 (51.6% [114/221]).

We found a significant although weak direct correlation between recipient age and plasma alphatorquevirus DNA loads at baseline

($r = 0.263$; $P = .0002$) and day 7 ($r = 0.151$; $P = .029$), but not thereafter. CMV-seronegative recipients had lower alphatorquevirus loads as compared to those who were seropositive (2.3 ± 1.6 vs $2.9 \pm 1.6 \log_{10}$ copies/mL; $P = .028$). Regarding posttransplant factors, induction therapy with anti-thymocyte globulin (ATG) was associated with higher plasma alphatorquevirus DNA loads through the first 6 posttransplant months, with significant differences at month 3 (5.5 ± 1.8 vs $4.8 \pm 1.9 \log_{10}$ copies/mL; $P = .018$) (Figure S1). We found no impact of the administration of anti-CMV prophylaxis or the primary immunosuppression regimen. Twenty-two patients (10.0%) were converted to an mTOR inhibitor after a median interval of 217 days (IQR: 117.5-306.8). Plasma alphatorquevirus DNA loads did not differ between this subgroup of patients and the rest of the cohort either (data not shown).

3.3 | Correlation between alphatorquevirus DNA loads and immune parameters

In order to better characterize the potential of alphatorquevirus DNA kinetics as a surrogate marker for immunosuppression, we analyzed the relationship between this parameter and absolute counts of peripheral blood lymphocyte populations. At posttransplant month 1, there were significant inverse correlations between the plasma alphatorquevirus DNA load and concurrently measured CD3⁺ ($r = -0.238$; $P = .017$), CD4⁺ ($r = -0.241$; $P = .015$), and CD8⁺ T cell counts ($r = -0.240$; $P = .016$). Such correlations were even more evident by month 3, particularly for CD3⁺ ($r = -0.347$; $P < .0001$) and CD4⁺ T cell counts ($r = -0.330$; $P < .001$) (Figure S2).

3.4 | Alphatorquevirus DNA loads at single points and outcomes

First, we explored the association between plasma alphatorquevirus DNA loads at discrete time points and study outcomes. We found no significant differences in baseline loads between patients with or without posttransplant infection (2.9 ± 1.6 vs $2.8 \pm 1.6 \log_{10}$ copies/mL; $P = .854$) or iRAE (3.1 ± 1.5 vs $2.8 \pm 1.6 \log_{10}$ copies/mL; $P = .369$). Such lack of significance persisted when plasma loads were measured at day 7, either for infection (3.2 ± 1.7 vs $3.1 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .697$) or iRAE (3.5 ± 1.6 vs $3.0 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .148$).

Nevertheless, differences emerged thereafter, when most recipients have reached a stable level of immunosuppression. Plasma alphatorquevirus DNA loads at month 1 were higher among patients who subsequently developed posttransplant infection as compared to those remaining free from this complication (4.6 ± 1.3 vs $3.8 \pm 1.9 \log_{10}$ copies/mL; $P = .023$). Such a difference was also observed between patients developing or not developing iRAE (4.9 ± 1.2 vs $3.9 \pm 1.8 \log_{10}$ copies/mL; $P = .009$) (Figure 2A). Likewise, peak DNA loads during the preceding periods were significantly higher in patients who developed iRAE beyond month 3 (5.6 ± 1.3 vs $4.7 \pm 1.8 \log_{10}$ copies/mL; $P = .007$) or month 6 (6.8 ± 2.0 vs $5.8 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .012$) (Figure 2B), with

a nonsignificant trend at the latter point for posttransplant infection (6.3 ± 1.9 vs $5.8 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .097$).

In view of its potential utility for guiding clinical decisions early after transplantation, we further analyzed the discriminative value of alphatorquevirus DNA loads at month 1. The auROCs for predicting infection and iRAE were 0.624 (95% CI: 0.517-0.732; $P = .029$) and 0.704 (95% CI: 0.588-0.820; $P = .002$), with optimal cutoff values set at 3.15 and 4.56 \log_{10} copies/mL, respectively. The presence of plasma alphatorquevirus DNA loads above these thresholds was associated with higher cumulative incidences of infection (log-rank $P = .009$) and iRAE (log-rank $P = .0006$) (Figure 3). The predictive performance of both cutoff values estimated through 1000 bootstrap samples is detailed in Table 3. Such associations remained significant after multivariate adjustment, both for posttransplant infection (adjusted HR: 2.88; 95% CI: 1.13-7.36; $P = .027$) (Table S2) and iRAE (adjusted HR: 5.17; 95% CI: 2.01-13.33; $P = .001$) (Table S3).

3.5 | Areas under curve for plasma alphatorquevirus DNA and outcomes

We explored the correlation between the cumulative magnitude of alphatorquevirus DNAemia, estimated through the AUC for \log_{10} plasma DNA load, and study outcomes. The AUCs between baseline and month 1 (AUC₀₋₃₀) were significantly higher among patients with posttransplant infection (5.1 ± 1.7 vs $4.6 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .046$) or iRAE (5.4 ± 1.4 vs $4.7 \pm 1.7 \log_{10}$ copies/mL; $P = .015$) beyond that point. Likewise, the AUCs to month 6 (AUC₀₋₁₈₀) were also higher among patients subsequently developing posttransplant infection (8.8 ± 1.3 vs $7.9 \pm 1.6 \log_{10}$ copies/mL; $P = .032$) or iRAE (9.1 ± 1.2 vs $7.9 \pm 1.5 \log_{10}$ copies/mL; $P = .023$) (Figure 4).

3.6 | Kinetics of alphatorquevirus DNA loads and outcomes

Previous studies have suggested that TTV replication kinetics mirrors more accurately the state of immunosuppression than the viral load at a given point.^{15,36} Thus, we investigated whether dynamic changes in alphatorquevirus loads correlates with posttransplant outcomes by separately analyzing the trajectory (ascending or nonascending [ie, stable or decreasing] slope) and magnitude (viral doubling time) of change in plasma alphatorquevirus DNA loads between 2 consecutive monitoring points.

Patients showing an increasing slope of change in alphatorquevirus DNA loads between day 7 and month 1 were more likely to subsequently develop posttransplant infection compared to those with nonascending kinetics (57.3% [47/82] vs 18.8% [3/16]; $P = .005$). A similar nonsignificant trend was also observed for iRAE (26.8% [22/82] vs 6.2% [1/16]; $P = .108$). Increasing kinetics of alphatorquevirus DNA load between both points acted as an independent predictor for posttransplant infection (adjusted HR: 4.29; 95% CI: 1.32-14.04; $P = .016$) (Table S4), with significant differences in terms of cumulative incidence (log-rank $P = .013$) (Figure 5). No

TABLE 2 Clinical description of the 65 episodes of iRAE occurring in the study population

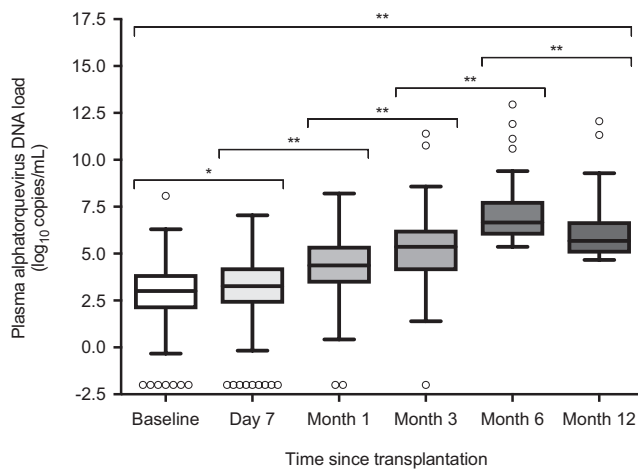
Clinical syndrome	N (%)
Opportunistic infection	54 (83.1)
CMV viral syndrome	25 (38.4)
CMV colitis	4 (6.1)
HSV mucocutaneous infection	9 (13.8)
Herpes zoster	6 (9.2)
Significant BK viremia ^a	3 (4.6)
Nocardiosis	1 (1.6)
Invasive aspergillosis	2 (3.1)
Mucormycosis	1 (1.6)
Cryptococcosis	1 (1.6)
IFI due to <i>Trichosporon</i> spp.	1 (1.6)
Visceral leishmaniasis	1 (1.6)
Posttransplant de novo malignancy	11 (16.9)
Solid organ cancer ^b	7 (10.8)
Nonmelanoma skin cancer ^c	4 (6.1)

CMV, cytomegalovirus; IFI, invasive fungal infection; iRAE, immunosuppression-related adverse event; HSV, herpes simplex virus.

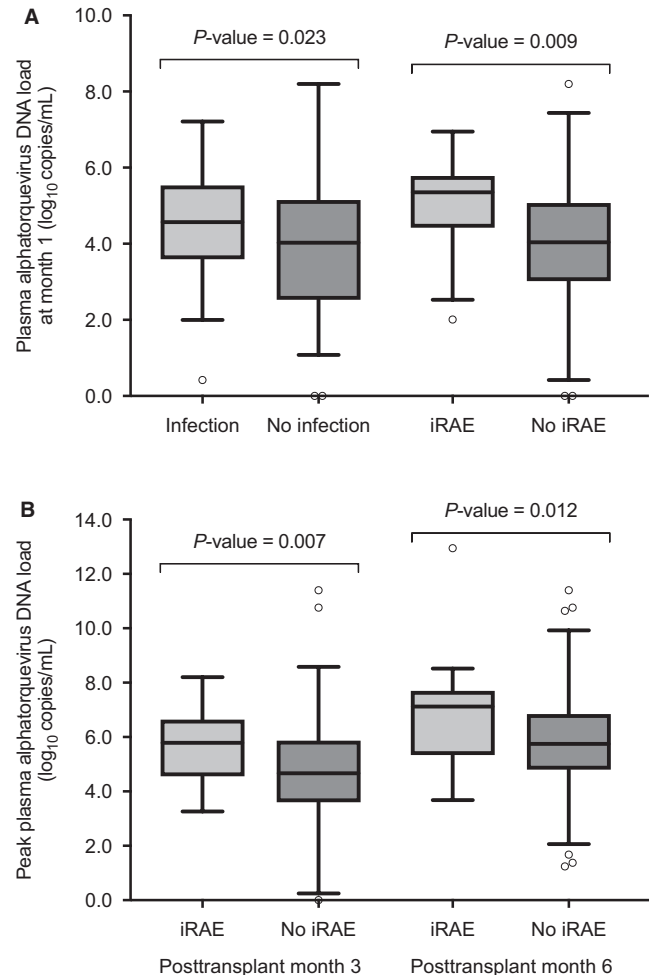
^aPlasma viral load $>4 \log_{10}$ copies/mL at 2 different time points 3 or more weeks apart.

^bIncludes colon adenocarcinoma (3 cases), renal cell carcinoma (2 cases), rectal carcinoma, gastric adenocarcinoma, and prostate adenocarcinoma (1 case each).

^cIncludes basal cell and squamous cell carcinoma (2 cases each).

**FIGURE 1** Kinetics of plasma alphatorquevirus DNA load from baseline to month 12 after transplantation. * $P = .006$; ** $P < .0001$

comparable associations were observed for any of the remaining time intervals, including that immediately after transplantation (ie, from baseline to day 7). This finding is concordant with the sigmoidal-shaped model proposed for TTV DNA kinetics in lung transplant (LT) recipients, in which the increase in viral load exhibits a delay of ≈ 15 days after the initiation of immunosuppression, followed by an

**FIGURE 2** Comparison of plasma alphatorquevirus DNA loads at discrete time points according to the subsequent occurrence of posttransplant events: A, Plasma loads at month 1 in patients with or without infection and iRAE; B, Peak loads during the preceding period in patients with or without iRAE beyond posttransplant months 3 and 6. iRAE, immunosuppression-related adverse event

almost linear increase between days 15 and 45 and a progressive stabilization thereafter.¹⁵ Figure S3 depicts illustrative examples of increasing dynamics of alphatorquevirus DNA loads and relevant posttransplant events.

The lowest doubling time for alphatorquevirus DNA load across different time intervals was observed between day 7 and month 1 (median: 4.9 days [IQR: 3.3-7.6]) (Table S5), in accordance with the aforementioned sigmoidal-shaped course. Doubling times through the first month were lower among patients who received ATG induction, either between baseline and day 7 (4.0 [IQR: 2.1-6.5] vs 7.1 [IQR: 4.3-17.1] days; $P < .0001$) or between day 7 and month 1 (4.0 [IQR: 2.8-6.1] vs 6.3 [IQR: 3.6-9.1] days; $P = .020$) (Figure S4). In view of this significant interaction, we separately analyzed alphatorquevirus doubling times according to the type of induction therapy. There were no differences among ATG-treated patients who did or did not develop posttransplant infection or iRAE. However, doubling times between day 7 and month 1 were

lower for patients who did not receive ATG and developed post-transplant infection as compared to those remaining free from this complication (5.5 [IQR: 3.5-8.4] vs 7.3 [IQR: 5.3-22.4] days; $P = .070$) (Figure S5).

3.7 | Alphatorquevirus DNA loads and graft rejection

Finally, we analyzed the correlation between plasma alphatorquevirus DNA loads and graft rejection. In concordance with the presumed nature of this variable as a marker of immunosuppression, baseline loads were lower (suggesting a higher level of immunocompetence) among patients who developed acute rejection during the first 90 posttransplant days (1.7 ± 2.3 vs 2.9 ± 1.6 \log_{10} copies/mL; $P = .035$). In

addition, the cumulative incidence of rejection was significantly higher among patients with undetectable DNA at baseline (28.6% [2/7] vs 3.3% [6/180]; $P = .030$). After multivariate adjustment, higher plasma alphatorquevirus DNA loads at baseline remained as a protective factor for the development of acute graft rejection (adjusted HR [per 1- \log_{10} copies/mL increase]: 0.69; 95% CI: 0.49 - 0.97; $P = .034$) (Table S6).

4 | DISCUSSION

In the present cohort of KT recipients, a clear association between plasma alphatorquevirus DNA kinetics and posttransplant complications was observed. Patients who developed posttransplant infection or iRAE—a composite outcome encompassing opportunistic infection and de novo cancer—beyond the first month exhibited higher alphatorquevirus DNA loads over the preceding months, either measured at single time points or expressed through the AUC as a proxy to the cumulative magnitude of DNAemia. Such associations still persisted for late-onset events. The demonstration of increasing plasma DNA loads during the first month was found to be particularly informative. On the other hand, recipients with higher pretransplant loads were less likely to experience acute graft rejection. Collectively, these results reinforce the hypothesis linking anellovirus replication kinetics and posttransplant immunocompetence.

Our experience provides additional insight into the epidemiology of alphatorquevirus infection among ESRD patients. First, alphatorquevirus DNA was detectable in 96.3% of plasma specimens collected at baseline, suggesting that the prevalence in this specific population is higher than that reported for healthy individuals in other European countries,^{9,37,38} but similar to the rates found among other chronic patient groups such as HIV- or hepatitis-infected subjects^{20,38,39} or those with end-stage pulmonary or liver disease.^{14,39-41} We observed a direct correlation, although weak, between recipient age and plasma DNA loads, in line with previous studies performed in healthy adults.^{9,37,38} In addition, CMV seropositivity was associated with higher baseline alphatorquevirus loads, as also reported by other authors.⁹ Both findings would support the impact of age- and CMV-associated immunosenescence on the host control of chronic alphatorquevirus infection.⁴²

More relevantly for the potential usefulness of alphatorquevirus DNA kinetics as surrogate marker of posttransplant

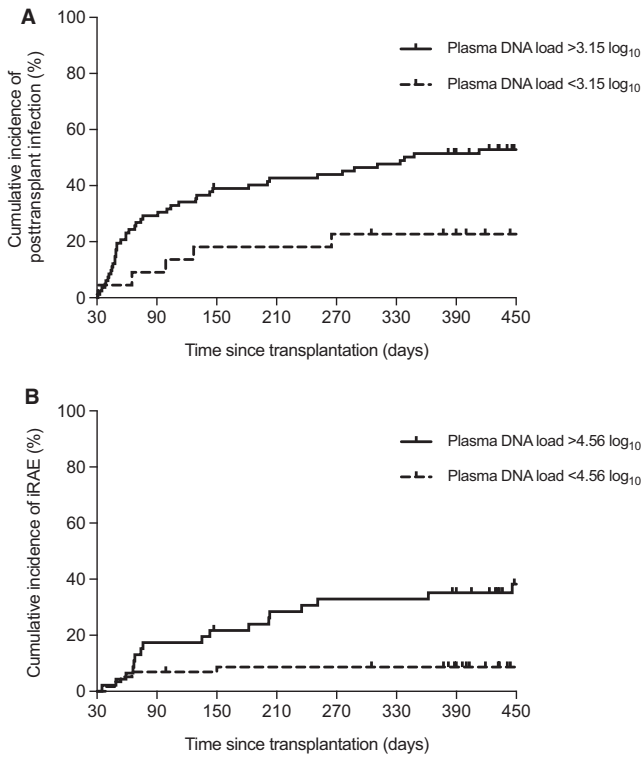


FIGURE 3 Kaplan-Meier curves of cumulative incidence of study outcomes according to plasma alphatorquevirus DNA load at month 1: A, Posttransplant infection (log-rank $P = .009$); B, iRAE (log-rank $P = .0006$). iRAE, immunosuppression-related adverse event

TABLE 3 Predictive performance of plasma alphatorquevirus DNA loads measured at month 1 (with optimally selected cutoff values) for predicting the occurrence of study outcomes in 1000 bootstrap samples

Cutoff value	Predicted posttransplant event	Sensitivity (95% CI) ^a	Specificity (95% CI) ^a	PPV (95% CI) ^a	NPV (95% CI) ^a
Plasma load >3.15 \log_{10} copies/mL	Infection beyond mo 1	89.8% (79.6-98.0)	30.9% (18.2-43.6)	53.8% (42.7-64.6)	77.3% (59.1-95.5)
Plasma load >4.56 \log_{10} copies/mL	iRAE beyond mo 1	76.0% (60.0-92.0)	65.8% (55.7-75.9)	41.3% (28.3-54.3)	89.7% (81.0-96.6)

CI, confidence interval; iRAE, immunosuppression-related adverse event; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

^aMean and 95% bootstrap CI.

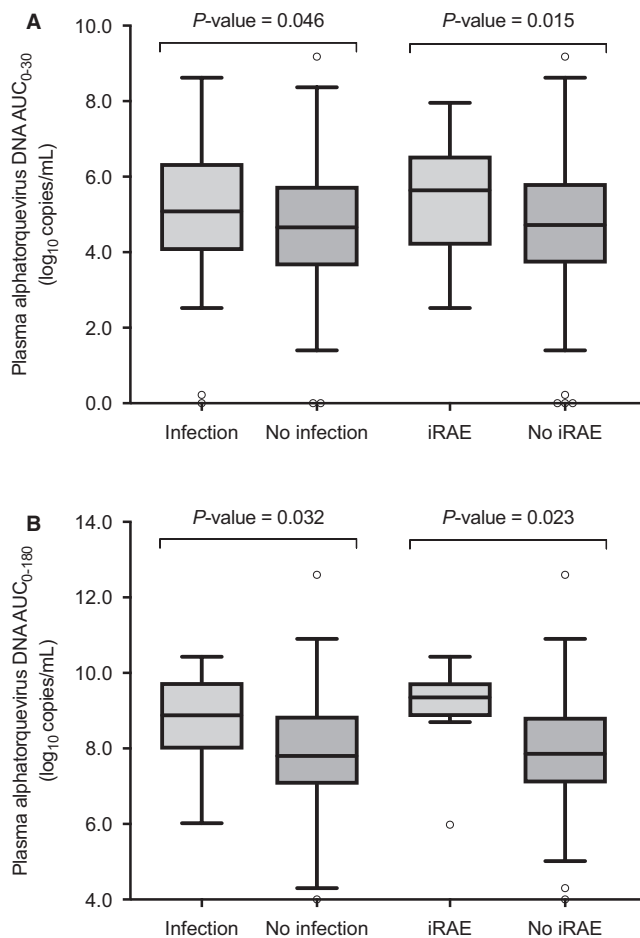


FIGURE 4 Comparison of AUCs for log₁₀ plasma alphatorquevirus DNA loads quantified between baseline and posttransplant month 1 (AUC₀₋₃₀) (A) and 6 (AUC₀₋₁₈₀) (B) according to the subsequent occurrence of infection and iRAE. AUC, area under curve; iRAE, immunosuppression-related adverse event

immunosuppression, we observed a negative correlation between plasma loads and CD3+, CD4+, and CD8+ T cell counts assessed at months 1 and 3. It is commonly believed that alphatorquevirus replication mostly occurs in T lymphocytes, since some authors found a sharp drop in TTV viremia among liver transplant recipients treated with ATG that was not observed in those receiving non-T-cell-depleting induction regimens (ie, basiliximab).^{19,36} We did not replicate, however, such findings since the use of ATG as induction therapy in our cohort was associated with higher viral loads and lower doubling viral times during the first posttransplant months. The exact nature of replication-competent cells for alphatorquevirus remains largely unknown.⁶ The ATG-induced decay in DNA load reported in previous studies was only evident very early (ie, first 2 weeks) after transplantation.³⁶ It is plausible that such an effect could be attenuated in the midterm due to partial T cell repopulation. In addition, it has been shown that ATG induction increases the frequency of late-stage differentiated T cells and accelerates immunosenescence,⁴³ potentially impairing alphatorquevirus-specific immune response. Differences in ATG dosing regimens and

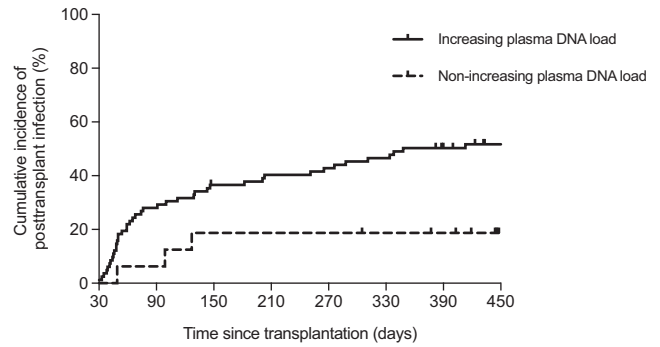


FIGURE 5 Kaplan-Meier curves of cumulative incidence of posttransplant infection according to the observed kinetics of plasma alphatorquevirus DNA load between day 7 and month 1 after transplantation (log-rank *P* = .013)

concurrent immunosuppression may also account for this discrepancy between studies.

The replication kinetics observed in our cohort was similar to that previously reported in LT recipients, with a rapid increase in viral load from days 7 to 30, which was followed by a less pronounced slope thereafter, to peak beyond month 3 in most patients.^{15,44} It should be noted that the alphatorquevirus doubling time was higher during the first posttransplant week than in the subsequent period until day 30, pointing to a certain delay in the triggering effect of iatrogenic immunosuppression on viral replication and shaping a sigmoid-like curve, which has also been observed after LT.¹⁵

Recent studies have reported an association between low or undetectable alphatorquevirus viremia and an increased risk of graft rejection after lung,²⁴ kidney,²³ and liver transplantation.²² Similarly to our experience, data from the Swiss Transplantation Cohort Study showed that 1-year cumulative incidence of rejection among liver transplant recipients with undetectable TTV DNA loads at transplantation were significantly higher than in patients with detectable titers.²² Nevertheless, available information remains scarce regarding the predictive value of high DNA loads to anticipate the occurrence of posttransplant infection, with contradictory results. Görzer et al reported that a cutoff level of 9.3 log₁₀ copies/mL for TTV DNA was predictive for the development of infection after LT, although the monitoring time largely varied from 89 to 364 posttransplant days.²⁵ More recently, Nordén et al failed to find a relationship between alphatorquevirus kinetics and the risk of infectious complications also in LT recipients,⁴⁴ although outcome definitions were somewhat discordant between both studies.

We observed that the magnitude of alphatorquevirus replication (estimated through cross-sectional viral load measurements or AUCs) was directly correlated with the subsequent risk of infection and iRAE, and identified 2 specific thresholds at month 1 for each of these outcomes (3.15 and 4.56 log₁₀ copies/mL, respectively). Since the positive predictive value of a diagnostic test is directly proportional to the prevalence of the condition being

detected, the bootstrap estimates were limited by the low cumulative incidence rates observed beyond posttransplant month 1 for infection or iRAE. On the other hand, the negative predictive values were substantially higher, particularly for iRAE, suggesting that those patients with DNA loads below such thresholds have a very low risk of developing complications attributable to over-immunosuppression. Interestingly, an ascending slope of change (ie, increasing kinetics) in DNA load during the first month acted as an independent predictor for posttransplant infection. It is likely that such replication kinetics identifies a subgroup of recipients particularly unable to control chronic alphatorquevirus infection due to the functional immune impairment associated with posttransplant immunosuppression. In accordance with this notion, viral doubling times between days 7 and 30 were lower—indicating a more explosive viral kinetics—among patients who developed posttransplant infection beyond this latter point, although the difference did not reach statistical significance and disappeared in the presence of ATG induction.

By using overall posttransplant infection and iRAE as separate outcomes, we aimed at investigating the role of alphatorquevirus DNAemia from 2 complementary perspectives. The first outcome constituted a sensitive measure of the recipient's susceptibility to infection since it encompasses a multiplicity of factors, in addition to immunosuppressive therapy, contributing to the occurrence of this complication (ie, surgical and invasive procedures or environmental exposures). On the other hand, the working concept of iRAE was conceived to capture more precisely the distinctive role played by the net state of immunosuppression after transplantation. In support of this hypothesis, we found that the differences in alphatorquevirus DNA loads between patients with or without iRAE were more marked than those according to the occurrence of posttransplant infection.

Although we lacked a formal control group composed of non-immunocompromised subjects, the aforementioned study by Kulifaj et al included 31 healthy volunteers in whom plasma DNA loads were measured by means of the same PCR assay used in the present research²⁸, thus allowing valid comparisons. Interestingly, the mean alphatorquevirus DNA load in this nonimmunocompromised group ($2.8 \pm 1.1 \log_{10}$ copies/mL) was virtually identical to that observed by us at the pretransplant (baseline) assessment ($2.9 \pm 1.6 \log_{10}$). Both selected cutoff values at month 1 were notably higher than the DNA load expected for healthy individuals or ESRD patients prior to transplantation. Such a difference was particularly evident (approaching $2 \log_{10}$) for the iRAE-oriented threshold, in accordance with the ability of this variable to more accurately reflect the net state of immunosuppression.

The present study has limitations, including its single-center design that compromises external generalizability. The real-time PCR assay used did not allow us to investigate the genetic diversity or genogroup distribution within alphatorquevirus-infected patients, which has been shown to evolve with posttransplant immunosuppression.¹³ The number of iRAE episodes analyzed was low, particularly for posttransplant cancer. The accuracy of doubling time

estimates could have been limited by the time elapsed between consecutive DNA load measurements. Finally, the proposed interpretation linking alphatorquevirus viremia and posttransplant complications, although biologically plausible and supported by previous studies, should be taken as merely hypothesis-generating. Our study was exploratory in nature and primarily aimed at investigating the potential application of alphatorquevirus DNA load as a surrogate marker for immunosuppression, rather than proposing a diagnostic tool for clinical decision-making. Since the same dataset was used to both establish and evaluate the cutoff values, the predictive performance of the test may have been overestimated. The external validation would first require international standardization of PCR primers, protocols, blood compartments, and reporting units to enable comparability across different laboratories. It is likely that by assembling larger multicenter cohorts or by performing a patient-level meta-analysis of existing studies, the identification of more specific outcomes (ie, viral opportunistic infection) or at-risk subgroups (ie, patients treated with T cell-depleting agents) could refine the predictive value of alphatorquevirus DNAemia measured early after transplantation.

In conclusion, by means of a large cohort of prospectively followed KT recipients with multiple monitoring points, the present study suggests that plasma alphatorquevirus DNA kinetics may be useful to predict the development not only of posttransplant infection but also of other complications attributable to over-immunosuppression. Alphatorquevirus viremia is emerging as a feasible, comprehensive surrogate biomarker for the overall state of immunosuppression after SOT. The recent introduction of commercial real-time PCR assays, although still pending on technical harmonization and clinical validation, would open the way for implementing serial measurements of alphatorquevirus DNA into the decision-making process involving KT recipients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank bioMérieux for kindly providing the reagents for the measurement of alphatorquevirus DNA load (DNA extraction system and real-time PCR assay) free of charge. This research was supported by "Plan Nacional de I+D+I" and Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [FIS] 15/01953 and Proyecto Integrado de Excelencia [PIE] 13/00045), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016) co-financed by the European Development Regional Fund (EDRF) "A way to achieve Europe." M.F.R. has held a clinical research contract "Juan Rodés" (JR14/00036) from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. D.N. has

received research funds from bioMérieux. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

ORCID

Mario Fernández-Ruiz  <http://orcid.org/0000-0002-0315-8001>

REFERENCES

- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341:1725-1730.
- Wavamunno MD, Chapman JR. Individualization of immunosuppression: concepts and rationale. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13:604-608.
- Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:341-358.
- Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology*. 2014;3:e12. <https://doi.org/10.1038/cti.2014.3>.
- De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155:1178-1187.
- Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:589-593.
- 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;241:92-97.
- Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:1-20.
- Haloschan M, Bettesch R, Gorzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stockl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)*. 2014;36:9716.
- Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2001;75:11999-12004.
- Tyagi AK, Pradier A, Baumer O, et al. Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque Teno virus titers from plasma. *Virology*. 2013;10:191.
- Wolff C, Diekmann A, Boomgaarden M, Korner MM, Kleesiek K. Viremia and excretion of TT virus in immunosuppressed heart transplant recipients and in immunocompetent individuals. *Transplantation*. 2000;69:351-356.
- Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, et al. Torque Teno virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis*. 2014;209:247-254.
- Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F. Torque Teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J Infect Dis*. 2014;210:667-668.
- Gorzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Pretransplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS ONE*. 2015;10:e0122975.
- Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, et al. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood*. 1999;93:2485-2490.
- Focosi D, Maggi F, Albani M, et al. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *J Clin Virol*. 2010;47:189-192.
- 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;94:22-28.
- Albert E, Solano C, Gimenez E, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53:180-187.
- Shibayama T, Masuda G, Ajsawa A, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS*. 2001;15:563-570.
- 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;3:287-295.
- Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, et al. Torque Teno virus load and acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2017;101:e219-e221.
- Schiemann M, Puchhammer-Stockl E, Eskandary F, et al. Torque Teno virus load-inverse association with antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transplantation*. 2017;101:360-367.
- Gorzer I, Jaksch P, Strassl R, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:366-368.
- Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33:320-323.
- San-Juan R, De Dios B, Navarro D, et al. Epstein-Barr virus DNAemia is an early surrogate marker of the net state of immunosuppression in solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2013;95:688-693.
- 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;77:2418-2425.
- Kulifaj D, Durgueil-Larivière B, Meynier F, et al. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: a new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. 2018;105:118-127.
- Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Husain S, et al. Utility of a monitoring strategy for human herpesviruses 6 and 7 viremia after liver transplantation: a randomized clinical trial. *Transplantation*. 2015;99:106-113.
- Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(Suppl 4):179-188.
- Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2017;64:87-91.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813-1821.
- Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3:32-35.
- Gimenez E, Solano C, Vinuesa V, et al. Cytomegalovirus DNAemia burden and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an area under a curve-based investigational approach. *Clin Infect Dis*. 2018;67:805-807 <https://doi.org/10.1093/cid/ciy138>.

35. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med.* 1999;190:177-182.
36. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol.* 2015;96:115-117.
37. Biagini P, Gallian P, Touinssi M, et al. High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems. *Transfusion.* 2000;40:590-595.
38. Salakova M, Nemecek V, Konig J, Tachezy R. Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic. *BMC Infect Dis.* 2004;4:56.
39. Garcia-Alvarez M, Berenguer J, Alvarez E, et al. Association of torque teno virus (TTV) and torque teno mini virus (TTMV) with liver disease among patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32:289-297.
40. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, et al. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:804-808.
41. Bando M, Nakayama M, Takahashi M, et al. Serum torque teno virus DNA titer in idiopathic pulmonary fibrosis patients with acute respiratory worsening. *Intern Med.* 2015;54:1015-1019.
42. Tu W, Rao S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection. *Front Microbiol.* 2016;7:2111. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02111>.
43. Crepin T, Carron C, Roubiou C, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2015;15:1028-1038.
44. Nordén R, Magnusson J, Lundin A, et al. Quantification of Torque Teno virus and Epstein-Barr virus is of limited value for predicting the net state of immunosuppression after lung transplantation. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5:ofy050. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy050>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2018;00:1-11. <https://doi.org/10.1111/ajt.15145>



Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Eliseo Albert¹ · Carlos Solano^{2,3} · Estela Giménez¹ · Daniele Focosi⁴ · Ariadna Pérez² · Lisa Macera⁵ · José Luis Piñana² · Eva María Mateo¹ · Juan Carlos Hernández Boluda² · Fabrizio Maggi^{5,6} · David Navarro^{1,7}

Received: 31 October 2018 / Accepted: 21 February 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Torque teno virus (TTV) plasma DNA load has been consistently shown to be a surrogate biomarker of immunosuppression in solid organ transplant recipients. It is uncertain whether it may behave similarly in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT). Here, we characterized the dynamics of TTV DNAemia in patients undergoing T-cell replete allo-SCT at late times after transplantation (> day + 100). This retrospective single-center observational study included 33 allo-HSCT patients. Plasma TTV DNA loads were quantified by real-time PCR before initiating the conditioning regimen and at different time points after transplant. Absolute lymphocyte counts (ALC) were measured by flow cytometry. Overall, TTV DNA load increased steadily after engraftment, reaching a peak by day + 90; afterwards, it remained relatively constant until day + 210. TTV DNA loads measured within days + 120 and + 210 correlated inversely with paired ALC, while both parameters did correlate directly within days + 20 and + 60. The median TTV DNA area under a curve between days + 90 and + 210 [(AUC)₉₀₋₂₁₀] was significantly higher in patients who received corticosteroids within this time frame for treatment of graft versus host disease (either acute, chronic or both) than in controls ($P=0.025$). In summary, TTV DNA load may mirror the degree of immunosuppression at late times after allo-HSCT.

Keywords Torque teno virus (TTV) DNAemia · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation · Immunosuppression · Biomarker

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00430-019-00586-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Edited by: Matthias J. Reddehase.

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

- ¹ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain
- ² Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain
- ³ Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain
- ⁴ North-Western Tuscany Blood Bank, Pisa University Hospital, Pisa, Italy
- ⁵ Virology Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy
- ⁶ Department of Translational Research, University of Pisa, Pisa, Italy
- ⁷ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

Introduction

The genus Alphatorquevirus belongs to the *Anelloviridae*, which includes 29 species (Torque teno virus-TTV-1 to 29) [1]. These are circular, negative sense, single-stranded DNA viruses, that are lymphotropic, ubiquitous and seemingly apathogenic in humans [1, 2]. There is an increasing body of evidence indicating that TTV DNA load in the blood compartment behaves as a surrogate biomarker of immunosuppression in solid organ transplant recipients, thus allowing estimation of the patient's risk of opportunistic infections and allograft rejection [3–10]. Nevertheless, it is currently uncertain whether TTV DNA load could serve the same purpose in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT). The kinetics of plasma TTV DNA load early after allo-HSCT have been precisely characterized [11–17]. In effect, a dramatic drop in plasma TTV DNA load occurs shortly after conditioning, then it increases steadily following engraftment reaching the peak at around day + 90 after transplant. Whether the magnitude of TTV

DNA load at these early times after allo-HSCT reflects either the degree of overall immunocompetence or the opposite remains a matter of debate [15–17]. In contrast, little is known about both the dynamics of TTV DNA load and its potential clinical value as a marker of immunosuppression late after allo-HSCT (> day + 100). Here, we characterized the dynamics of TTV DNA load within this time frame and investigated whether it is modulated by the use of different immunosuppressive regimens or corticosteroid treatments for graft versus host disease (GvHD).

Materials and methods

Patients

This retrospective single-center study included 33 non-consecutive patients who underwent T-cell replete allo-HSCT at the Hematology Service at the Hospital Clínico Universitario in Valencia between December 2013 and May 2016, as a curative therapy for different hematological cancers (Table 1). Only adult patients (≥ 18 years) with available plasma samples for TTV DNA testing obtained at predetermined time points (see below) were included. As shown in Supplementary Table 1, patients included in the study group were representative of the entire cohort of patients undergoing allo-HSCT at our center during the study period ($n=88$). The median patient's age at the time of transplantation was 56 years (range 19–70 years). The study period comprised the first 8 months after transplantation. The study was approved by the Hospital Clínico Universitario (INCLIVA Foundation) review board and ethics committee. All the patients gave their written informed consent prior to participating in the study.

Plasma specimens

Cryopreserved plasma samples (at -80 °C; never thawed before) were retrieved for the analyses described herein. The specimens had been obtained before the initiation of conditioning (median, day -7 ; range day -30 to day -6) and at different time points after transplantation: day + 20 (range day + 14–day + 24), day + 30 (range day + 25–day + 35), day + 40 (range day + 35–day + 46), day + 50 (range day + 47–day + 55), day + 60 (range day + 56–day + 76), day + 90 (range day + 78–day + 97), day + 120 (range day + 108–day + 141), day + 150 (range day + 142–day + 163), day + 180 (range day + 166–day + 202), and day + 210 (day + 203–day + 256). In all, 333 specimens were available for TTV DNA quantitation. Ten patients had one or more post-transplant missing

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the patients

Parameter	No. (%)
Sex	
Male	16 (48.5)
Female	17 (51.5)
Underlying hematological disease	
Lymphoma	12 (36.4)
Leukemia	12 (36.4)
Myeloma	4 (12.1)
Myelodysplastic syndrome	3 (1.1)
Myelofibrosis	2 (6.1)
Allograft type	
Related	18 (54.6)
Unrelated	15 (45.4)
Human leukocyte antigen-matching	
Matched	17 (51.5)
Mismatched	16 (48.5)
Conditioning regimen	
Myeloablative	6 (18.2)
Reduced intensity	27 (81.8)
Stem cell source	
Peripheral blood	31 (93.9)
Bone marrow	1 (3.0)
Umbilical cord blood	1 (3.0)
Anti-thymocyte globulin use	
Yes	8 (24.2)
No	25 (75.8)
Immunosuppressive regimens used	
Cyclosporine A-based (with methotrexate or mycophenolate)	19 (57.5)
Tacrolimus and sirolimus	14 (42.5)

specimens (total number = 30 samples). Preconditioning specimens were unavailable from 11 patients.

Plasma Torque teno virus DNA load quantitation

TTV DNA load quantification was carried out with a TaqMan real-time PCR targeting a highly conserved segment of the untranslated region (UTR) of the viral genome, thus allowing amplification of all known genetic variants of Alphatorquevirus. Specific details on the procedure have been previously published [14, 15]. All samples from each patient were assayed simultaneously in singlets.

Lymphocyte counts

Enumeration of absolute lymphocyte counts (ALC) was performed by flow cytometry using the BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Statistical analysis

The TTV DNA load area under the curve (AUC) was calculated using the trapezoidal rule with the aid of the STAT GRAPHIC Centurion XVII statistics package (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Differences between medians were compared using the Mann–Whitney *U* test for unpaired specimens or the Wilcoxon *T* test for paired specimens, as appropriate. Correlations between variables were assessed using the Spearman’s rank test. Two-sided exact *P* values are reported; a *P* value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant. The statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Dynamics of plasma TTV DNAemia

All 33 patients had at least one plasma specimen with quantifiable levels of TTV DNA. The kinetics of TTV DNA load in plasma over the study period is shown in Fig. 1. In agreement with previous findings [14], the TTV DNA load was seen to increase steadily (and significantly) from around the time of engraftment (day +20) until day +90, when the peak was reached. Afterwards, TTV DNA load remained

relatively constant until day +210, time at which it dropped slightly; in fact, the median TTV DNA load at day +210 was significantly lower than that quantified at day +90. Overall, the median TTV DNA load by day +210 was of greater magnitude than that measured prior to conditioning, although the difference did not reach statistical significance (*P* = 0.398).

TTV DNA load and absolute lymphocyte counts

As shown in Fig. 2, overall, TTV DNA loads measured by days +120, +150, +180 and +210 correlated inversely with paired ALC (A), while both parameters did correlate directly when measured by days +20, +30, +40, +50 and +60 (medians) (panel B).

Effect of the immunosuppressive regimen and corticosteroids use on plasma TTV DNA load late after transplantation

We first assessed whether the immunosuppressive regimen used for the prevention of GvHD had an impact on TTV DNA load at late times after transplantation, using TTV DNA AUC between days +120 and +210 (AUC₁₂₀₋₂₁₀) as the end-point. We found that the AUC₁₂₀₋₂₁₀ in patients receiving a cyclosporine A-based regimen (median 7.53 log₁₀ copies × days × ml⁻¹; range 4.68–9.57) was not

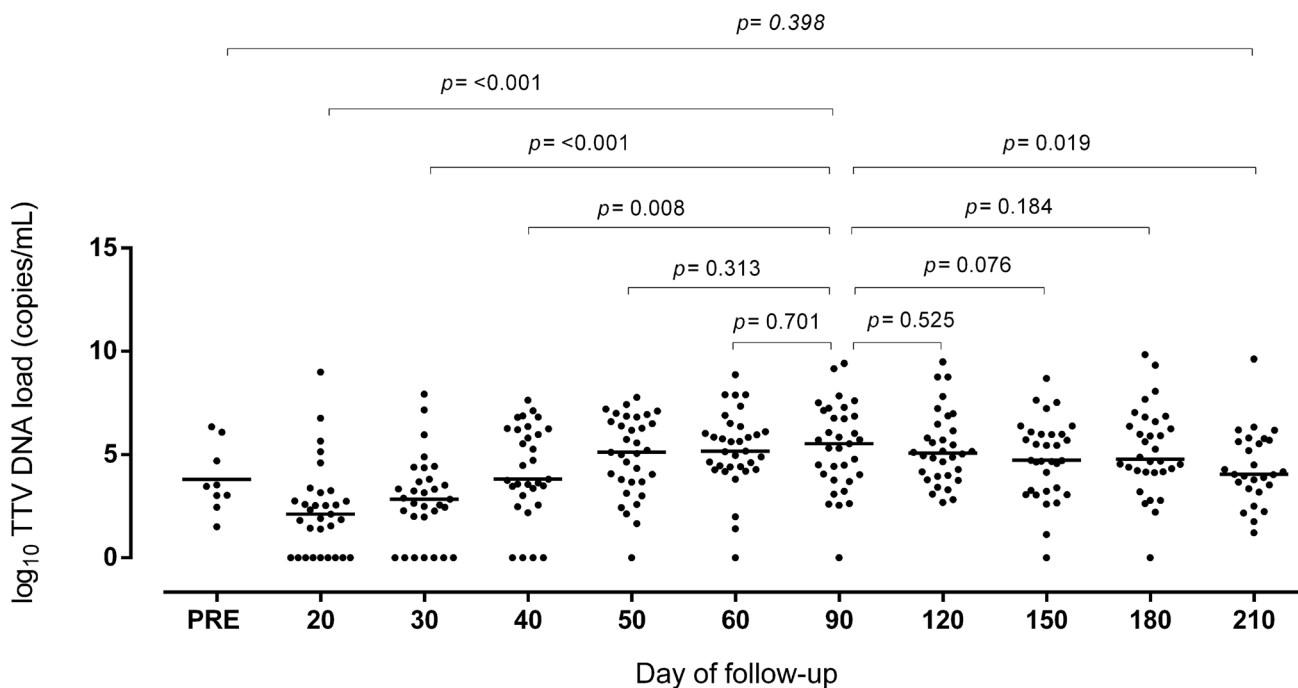


Fig. 1 Dynamics of plasma TTV DNAemia in allo-HSCT recipients. TTV DNA loads were quantified prior to conditioning (PRE) and at different time points following allo-HSCT. Bars indicate the median

values and the standard deviations. Comparative *P* values (Wilcoxon *T* test) are shown

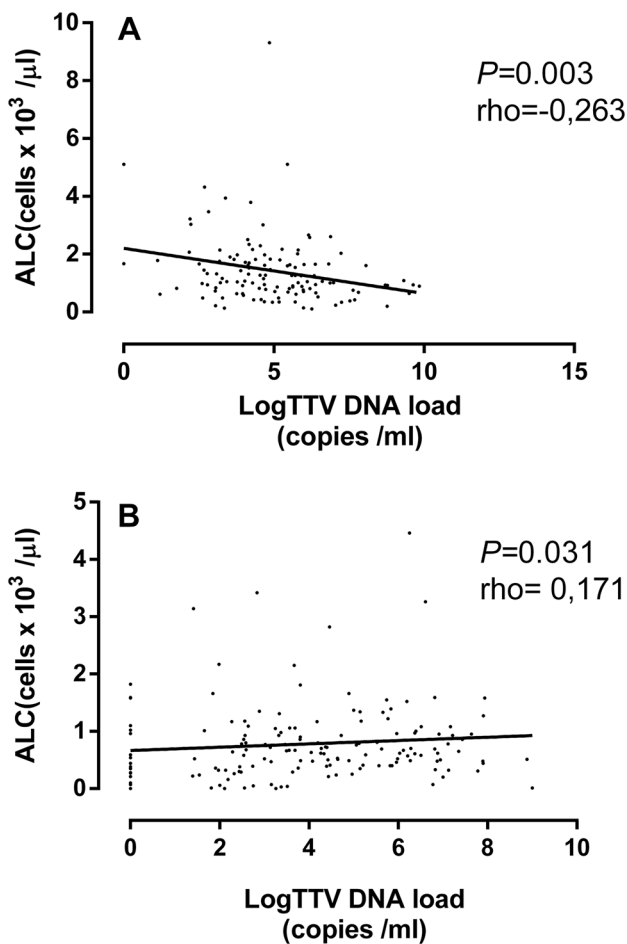


Fig. 2 Correlation between plasma TTV DNA loads and absolute lymphocyte counts (ALC) measured at all time points within days +120 and +210 (**a**) and days +20 and +60 (**b**). Spearman rank correlation coefficients (ρ) and P values are shown

significantly different ($P=0.1$) from that seen in patients treated with tacrolimus and sirolimus (median $8.58 \log_{10}$ copies \times days \times ml $^{-1}$; range 3.93–9.56). We next aimed at assessing the impact of the use of corticosteroid drugs on TTV DNA load late after allo-HSCT. We chose the TTV DNA AUC between late days +90 and +210 (AUC_{90-210}) as the analytical end-point; the AUC allows the estimation of the actual magnitude (“exposure”) of a given parameter over time when measurements are conducted at discrete moments. Out of the 33 patients, 6 were excluded from these analyses because of early relapse of the underlying disease ($n=4$) or premature death ($n=2$). Out of the remaining 27 patients, 12 did not receive corticosteroids at any time during the study period (control group) and 15 did so (test group) because of either, acute GvHD ($n=5$), chronic GvHD ($n=7$) or both ($n=3$). All these latter patients were under corticosteroids therapy within days +90 and +210 (Table 2). As shown in Fig. 3, the median TTV DNA AUC_{90-210} was significantly higher in patients treated with corticosteroids than

in controls ($P=0.025$), yet no significant correlation was seen between this parameter and the total cumulative dose of corticosteroids prescribed, although a trend was noted (ρ , 0.364; $P=0.182$). No significant differences ($P=0.502$) were seen between control and test patients regarding the immunosuppressive regimens used (cyclosporine A-based, eight patients in the control group and seven patients in the test group; tacrolimus plus sirolimus: four patients in the control group and eight patients in the test group).

Discussion

The potential use of TTV DNA load as a surrogate marker of immune competence in SOT recipients is supported by an increasing body of evidence [2–10]. Nevertheless, demonstration of a comparable clinical utility in the allo-HSCT setting remains elusive, likely reflecting the profound biological differences between these two transplant modalities. Namely, we recently suggested that the magnitude of TTV DNA load early after engraftment may behave as marker of immune system reconstitution, as it was found to predict protection from high-level plasma cytomegalovirus (CMV) DNAemia [15]. In contrast, data from two other studies pointed to the opposite idea, whereby plasma TTV DNA would actually be a surrogate marker for immunosuppression [16, 17]. Notwithstanding, we also provided some evidence indicating that the degree of immunosuppression after transplant may modulate the level of TTV replication [14]; in fact, in that previous study [14], we found that patients with severe aGvHD receiving corticosteroids at high doses experienced increases in TTV DNA load between days +20 and +60 of greater magnitude than controls (patients with grades 0-I aGvHD), regardless of ALC counts, a phenomenon also reported by Masouridi-Levrat and colleagues [13]. In light of these latter findings, we postulated that once TTV DNA levels reach the plateau phase, concurrently with full lymphocyte repopulation, at late times after allo-HSCT, it may actually behave as a biomarker of immunosuppression [14, 15], an assumption with which other authors did concur [17]. The data presented herein seemed to support this idea.

In our setting the dynamics of TTV DNA load over the first 8 months after transplantation followed a previously recognized pattern [17]; increasing TTV DNA levels were seen from around the time of engraftment peaking by day +90; then relatively stable levels until day +210 were observed, time at which they dropped slightly, but remained above those measured prior to conditioning. The scarce number of cases in this series precluded any meaningful subgroup analysis evaluating the impact of the type of malignancy or the conditioning regimen on TTV DNA load kinetics as performed in another study [17].

Table 2 Clinical characteristics of patients who underwent corticosteroid treatment and did not relapse or die within the study period

Patient	Corticosteroid use (prednisone)			aGvHD (day of diagnosis after allo-HSCT)	cGvHD (day of diagnosis after allo-HSCT)
	Day of initiation after allo-HSCT	Day of cessation after allo-HSCT	Cumulative dose through day 210 (mg)		
1	116	> 365	5240	116	–
2	120	> 365	3735	–	107
3	97	202	4980	94	265
5	49	104	2940	49	172
6	97	173	3115	–	97
8	24	103	1085	24	–
10	204	266	360	–	170
11	46	213	4470	46	–
12	42	> 365	3361	42	–
14	192	> 365	1080	–	150
15	154	240	1505	–	154
16	28	93	2090	23	–
17	45	195	3265	26	45
18	120	> 365	3775	–	120
19	133	248	1050	–	96

aGvHD acute graft-versus-host disease, cGvHD chronic graft-versus-host disease, allo-HSCT allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

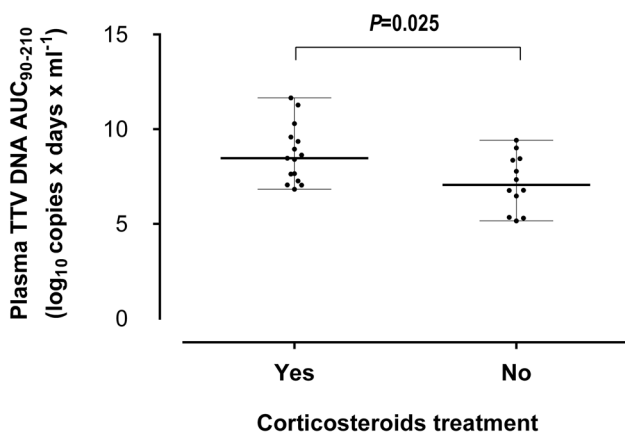


Fig. 3 Area under the curve (AUC) for log₁₀ TTV DNA loads quantified between days +90 and +210 in patients either undergoing or not corticosteroid therapy for graft-versus-host disease. Comparative P value is shown

Two observations supported the idea of TTV DNA load may behave as a marker of immunosuppression after day +100 after allo-HSCT. First, TTV DNA loads measured within days +120 and +210 correlated inversely with paired ALC. In a recent study [17], an inverse correlation was observed between these two parameters; in such analysis, nevertheless, all measured values over the entire follow-up period were taken into consideration, and thus no separate subanalyses for early and late times after allo-HSCT were performed. Second, the use of corticosteroids, known to impair immune functionality, had a profound impact on

TTV DNA dynamics; in fact, median TTV DNA AUC₉₀₋₂₁₀ was significantly higher in patients treated with prednisone for GvHD (acute, chronic or both) than in controls and a trend towards a correlation between this TTV DNA kinetics parameter and the cumulative dose of corticosteroids used was seen. Of interest, the type of immunosuppressive regimen used to prevent the occurrence of GvHD did not differ between patients undergoing corticosteroid treatment and those not doing so. In line with our observations, Wohlfarth and colleagues [17] reported that patients with acute GvHD requiring systemic corticosteroids at high doses showed a trend towards higher TTV DNA levels at 4–5 months after transplantation.

The inverse correlation between TTV DNA loads and paired ALC measured between days +120 and +210 can be explained, at least in part, by the effect of corticosteroids on lymphocyte redistribution (resulting in lymphopenia) and functionality [18], as T-cell immunity is likely to play a major role on the control of TTV replication. This finding also favors the idea that T lymphocytes are not the only cell target for TTV replication [2]. In support of this assumption, we previously reported that, overall, TTV DNA loads were significantly higher in saliva than in plasma specimens and that they correlated to a lesser extent with ALC than TTV DNA loads quantitated in plasma following engraftment [19].

The current study was an exploratory one that was simply aimed at characterizing the kinetics profile of TTV DNA load at late times after allo-HSCT, and in this sense was not undertaken to assess the potential clinical value of TTV

DNA load as a biomarker for predicting post-transplant immune-related complications. Prospective studies are best suited to this purpose and are underway. In addition to its retrospective and unicentric design, main limitations of this study are the limited size of the cohort, which undermined the robustness of statistical analyses, and the impossibility of having all time point specimens from all patients for TTV DNA quantitation, although the actual number of missing specimens represented less than 10% of those planned to subject to analysis.

In sum, our data suggest that TTV DNA loads measured at late times after allo-HSCT may reflect the net state of immunosuppression of patients. Nevertheless, further longitudinal and prospective studies to validate this hypothesis are warranted. Whether TTV DNA load measurements at late times after allo-HSCT may be helpful to predict the occurrence of certain clinical events such as CMV DNAemia recurrences, late CMV disease or post-transplant lymphoproliferative disease, which frequently occur after day 100, remains to be investigated.

Acknowledgements We would like to thank Juan Manuel Moya Serrano for his technical assistance. Estela Giménez holds a Río Hortega Contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII) (Ref. CM16/00200). Eva María Mateo is grateful to Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spanish Government) for a postdoctoral contract “Juan de la Cierva” (Ref. FJCI-2015-25992).

Funding None.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (2018) ICTV. <https://talk.ictvonline.org>
2. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F (2016) Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect* 22:589–593
3. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, Snyder TM, Cornfield DN, Nicolls MR, Weill D, Bernstein D, Valentine HA, Quake SR (2013) Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* 155:1178–1187
4. Gorzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2015) Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One* 10:e0122975
5. Beland K, Dore-Nguyen M, Gagne MJ, Patey N, Brassard J, Alvarez F, Halac U (2014) Torque Teno Virus in children who underwent orthotopic liver transplantation: new insights about a common pathogen. *J Infect Dis* 209:247–254
6. Focosi D, Macera L, Pistello M, Maggi F (2014) Torquetenovirus (TTV) viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplantation. *J Infect Dis* 210:667–668
7. Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2014) Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transpl* 33:320–328
8. Schiemann M, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, Kohlbeck P, Rasoul-Rockenschaub S, Heilos A, Kozakowski N, Görzer I, Kikić Ž, Herkner H, Böhmig GA, Bond G (2017) Torque teno virus load-inverse association with antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 101:360–367
9. Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, van Delden C, Giostra E, Morard I, Mueller N, Muellhaupt B, Valli PV, Semmo N, Seebach J, Chalandon Y, Kaiser L, Roosnek E (2017) Torque teno virus load and acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 101:e219–e221
10. Jaksch P, Kundi M, Görzer I, Muraközy G, Lambers C, Benazzo A, Hoetzenecker K, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E (2018) Torque teno virus as a novel biomarker targeting the efficacy of immunosuppression after lung transplantation. *J Infect Dis* 218:1922–1928
11. Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H (1999) TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* 93:2485–2490
12. Maggi F, Focosi D, Albani M, Lanini L, Vatteroni ML, Petrini M, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Bendinelli M (2010) Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. *J Virol* 84:6891–6893
13. Masouridi-Levrat S, Pradier A, Simonetta F, Kaiser L, Chalandon Y, Roosnek E (2016) Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transpl* 51:440–442
14. Albert E, Solano C, Pascual T, Torres I, Macera L, Focosi D, Maggi F, Giménez E, Amat P, Navarro D (2017) Dynamics of torque teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol* 94:22–28
15. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez A, Macera L, Piñana JL, Boluda JCH, Maggi F, Navarro D (2018) The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transpl* 53:180–187
16. Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkiew S, Fish I, Höller K, Sierra S, Knops E, Kaiser R, Scheid C, Di Cristanziano V (2017) Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* 206:355–362
17. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, Hopfinger G, Goerzer I, Puchhammer-Stöckl E, Rabitsch W (2018) Torquetenovirus dynamics and immune marker properties in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective longitudinal study. *Biol Blood Marrow Transpl* 24:194–199
18. Fauci AS (1975) Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28:669–680
19. Albert E, Torres I, Talaya A, Giménez E, Piñana JL, Hernández-Boluda JC, Focosi D, Macera L, Maggi F, Solano C, Navarro D (2018) Kinetics of torque teno virus DNA load in saliva and plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 90:1438–1443

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.