



**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DE
ALPHATORQUEVIRUS, ANELLOVIRUS Y PEGIVIRUS COMO
POSIBLE MARCADOR DEL ESTADO INMUNOLÓGICO EN EL
PACIENTE SOMETIDO A TRASPLANTE Y EN EL PACIENTE
CRÍTICO**

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Doctorado en Medicina
Marzo 2024

TESIS DOCTORAL
LORENA FORQUÉ RODRÍGUEZ

Dirigida por:
David Navarro Ortega
y Estela Giménez Quiles



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia
Programa de Doctorado en Medicina

DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DE
ALPHATORQUEVIRUS, ANELLOVIRUS Y PEGIVIRUS
COMO POSIBLE MARCADOR DEL ESTADO
INMUNOLÓGICO EN EL PACIENTE SOMETIDO A
TRASPLANTE Y EN EL PACIENTE CRÍTICO**

LORENA FORQUÉ RODRÍGUEZ



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia
Programa de Doctorado en Medicina

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

D. David Navarro Ortega, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la Graduada Lorena Forqué Rodríguez, titulado “*Utilidad de la cuantificación de ADN de alphatorquevirus, anellovirus y pegivirus como posible marcador del estado inmunológico en el paciente sometido a trasplante y en el paciente crítico*” se ha realizado bajo mi supervisión, habiendo sido aprobado para su presentación como Tesis Doctoral con el fin de obtener el grado de Doctor, siempre que cumpla con la normativa prevista por el Programa de Doctorado en Medicina de la Universidad de Valencia y así lo considere el tribunal designado.



Agradecimientos

El que algo quiere, algo le cuesta y el que la sigue la consigue.

La realización de una tesis doctoral nunca es una tarea fácil, y si a eso le sumamos los desafíos de una pandemia mundial y un cambio de vida a otro país, el camino se complica. Sin embargo, el amor de mi familia, el cariño de mis amigos y el apoyo de mis compañeros han sido factores clave para no perder la guía en los momentos más difíciles.

Por ello, me gustaría agradecer, en primer lugar, a mis padres, cuyos caminos no siempre fueron fáciles, y a pesar de los obstáculos, lucharon incansablemente para darme la mejor educación, oportunidades y valores. Gracias mamá, gracias papá. Gracias también a mi hermana, Silvia, por tu paciencia, tu apoyo incondicional y tu bonita forma de quererme.

A mi gran grupo de amigos de la residencia, sin los cuales no podría imaginarme esta trayectoria. Gracias por compartir grandes anécdotas y formar parte de momentos únicos. En especial a Christopher, Lourdes, Cristina y Óscar por ser mi familia elegida y por ser un pilar constante en estos últimos años. A mi gran amiga y consejera María, por creer en mí cuando yo había dejado de hacerlo.

A mis amigos de Roma, por amortiguar el impacto del cambio de vida y por "avermi supportato e sopportato" en la gran recta final. Grazie mille.

Especial agradecimiento al super equipo "micro", que, ante las adversidades de una dura pandemia, demostró un gran compañerismo, mostrándose invencible y enseñándome que tirar la toalla no es una opción. A Bea, Carlos, Josep, Felipe, Nacho, Dixie, Daff y a todos los residentes y exresidentes que compartieron algún momento de locura y risas. A Colo, por tener ese corazón docente y esa pasión por la micro de la que es inevitable no contagiarse. A Eliseo, por su paciencia infinita y por el apoyo ofrecido. A mi directora de tesis, Estela, por su esfuerzo, dedicación y grandes aportaciones que han hecho posible la realización de esta tesis. Me siento realmente afortunada de que la vida me cruzara con grandes personas como ellas.

Por último, y en especial, mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, David Navarro. No sabría ni por dónde empezar... ¿Y qué decir? Si lo primero que pensé recién llegada a la residencia fue "¿Dónde me he metido?" y ahora no puedo imaginar mi crecimiento, tanto profesional como personal, sin tu influencia, carácter y tu particular forma de ver el mundo. No puedo más que darte las gracias. Gracias por todo, David, y sobre todo, gracias por darme la oportunidad de aprender tanto de ti.

A mis padres y a mi hermana

A mi abuela

Presentación

Esta tesis doctoral se publica como compendio de artículos según dictamina el nuevo Reglamento aprobado sobre el depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, en virtud de lo dispuesto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el cual se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Los artículos de carácter científico que componen esta tesis se encuentran enumerados a continuación siguiendo el orden en el que se presentan:

- I. Fernández-Ruiz M†, Forqué L†, Albert E, Redondo N, Giménez E, López-Medrano F, González E, Polanco N, Ruiz-Merlo T, Parra P, San Juan R, Andrés A, Aguado JM, Navarro D. Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates. *Transpl Infect Dis*. 2022 Feb;24(1): e13771.
- II. Forqué L†, Fernández-Ruiz M†, Albert E, Giménez E, Monzó C, Chaves J, Redondo N, Rodríguez-Goncer I, Ruiz-Merlo T, Parra P, Andrés A, Aguado JM, Navarro D. Dynamics of Human Anelloviruses in Plasma and Clinical Outcomes Following Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2023 Feb 1;107(2):511-520.
- III. Forqué L, Albert E, Piñana JL, Pérez A, Hernani R, Solano C, Navarro D, Giménez E. Monitoring of plasma Torque teno virus, total *Anelloviridae* and Human Pegivirus 1 viral load for the prediction of infectious events and acute graft versus host disease in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting. *J Med Virol*. 2023 Sep;95(9): e29107.
- IV. Forqué L, Albert E, Giménez E, Torres I, Carbonell N, Ferreres J, Blasco ML, Navarro D. Monitoring of Torque Teno virus ADNemia in critically ill COVID-19 patients: May it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol*. 2022 Mar;148: 105082.

$$\left\{ \dot{x} \right\}$$

Abreviaturas y acrónimos

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNemia: Presencia de ADN en sangre.
- ADNss: ADN de cadena sencilla.
- Alo-TPH: Trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.
- ALC: *Absolute lymphocyte counts*, del inglés: recuento absoluto de linfocitos.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ATG: *Anti-thymocyte globulin*, del inglés: globulina antitimocítica.
- AUC: *Area Under the Curve*, del inglés: área bajo la curva.
- AVT: Anellovirus totales.
- CMV: Citomegalovirus.
- EICH: Enfermedad de injerto contra huésped.
- HLA: *Human Leukocyte Antigen*, del inglés: antígeno leucocitario humano.
- HPgV-1: *Human Pegivirus 1*, del inglés: virus del pegivirus humano 1.
- HSC: *Hematopoietic Stem Cells*, del inglés: células madre hematopoyéticas.
- HTS: *High-Throughput Sequencing*, del inglés: secuenciación de alto rendimiento.
- ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*, del inglés: comité internacional de taxonomía de virus.
- IDUs: *Intravenous Drug Users*, del inglés: usuarios de drogas intravenosas.
- IRES: *Internal Ribosome Entry Site*, del inglés: sitio interno de entrada al ribosoma.
- iRAE: *Immune-Related Adverse Events*, del inglés: evento adverso relacionado con inmunosupresión.
- mL: mililitro.
- ORF: *Open Reading Frame*, del inglés: marco de lectura abierto.

- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, del inglés: reacción en cadena de la polimerasa.
- PBMCs: *Pheripheral Blood Mononuclear cells*, del inglés: células mononucleares de sangre periférica.
- RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, del inglés: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa.
- TTV: Torque Teno Virus, entiéndase todas las especies comprendidas dentro del género *Alphatorquevirus*.
- TOS: Trasplante de Órgano Sólido.
- UI: Unidades Internacionales.
- UTR: *Untranslated región*, del inglés: región no traducida del gen.
- VAP: *Ventilation associated pneumonia*, del inglés: neumonía asociada a ventilación.
- VHC: Virus de la Hepatitis C.
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
PRESENTACIÓN	IX
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XI
I. INTRODUCCIÓN	3
I.I PEGIVIRUS HUMANO 1 (HPGV-1)	3
1. HALLAZGOS HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	3
2. CARACTERÍSTICAS DE HPGV-1	4
2.1 ESTRUCTURA Y GENOMA	4
2.2 CICLO REPLICATIVO	6
2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA	7
2.4 TROPISMO	7
3. PREVALENCIA Y TRANSMISIÓN	9
4. HPGV-1 Y SU INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNITARIO	10
5. HPGV-1 COMO BIOMARCADOR DE LA FUNCIÓN INMUNOLÓGICA EN EL TRASPLANTE	11
I.II ANELLOVIRUS TOTALES (AVT) Y TORQUE TENO VIRUS (TTV)	13
1. HALLAZGOS HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	13
2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS	16
2.1 GENOMA Y CÁPSIDE VIRAL	16
2.2 CICLO REPLICATIVO	17
2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA	18
2.4 TROPISMO	19
3. PREVALENCIA Y TRANSMISIÓN	20
4. VIROMA Y ANELLOMA	21
5. ANELLOVIRUS Y SU INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNITARIO	22
6. MÉTODOS DE MONITORIZACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNOLÓGICA EN TRASPLANTE	23
7. ANELLOVIRUS COMO BIOMARCADOR DE LA FUNCIÓN INMUNOLÓGICA EN TRASPLANTE	24
7.1 ANELLOVIRUS Y TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO	24
7.2 ANELLOVIRUS Y TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS	26
8. ANELLOVIRUS Y PACIENTE CRÍTICO CON COVID-19	28
II. HIPÓTESIS	33
III. OBJETIVOS	37
1. EVALUAR LA UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DE ADN DE HPGV-1 PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE INFECCIONES POSTRASPLANTE, EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS CON LA INMUNOSUPRESIÓN Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO, EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE RENAL.	37

2. EVALUAR LA UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DE ADN DE ANELLOVIRUS PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE INFECCIONES POSTRASPLANTE, EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS CON LA INMUNOSUPRESIÓN Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO, EN COMPARACIÓN CON LA CUANTIFICACIÓN DE TTV, EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE RENAL.	38
3. EVALUAR LA UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LAS CARGAS VIRALES PLASMÁTICAS DE TTV, AVT Y HPGV-1 PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE EVENTOS INFECCIOSOS Y ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.	39
4. EVALUAR LA UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA PLASMÁTICA DE ADN DE TTV PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE EVENTOS INFECCIOSOS NOSOCOMIALES QUE CONDUCEN A UN MAL PRONÓSTICO, ASÍ COMO LA MORTALIDAD EN PACIENTES CRÍTICOS CON COVID-19.	40
IV. METODOLOGÍA	43
1. PACIENTES	43
2. MUESTRAS DE PLASMA Y EXUDADO NASOFARÍNGEO	44
3. CUANTIFICACIÓN DE ADN: EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN.	45
3.1 EXTRACCIÓN	45
3.2 AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HPGV-1	46
3.3 AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TTV	48
3.4 AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AVT	50
3. SECUENCIACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.	52
4. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	52
5. DEFINICIONES	53
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
1. UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL DE ADN DE HPGV-1 EN PLASMA PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE INFECCIONES POSTRASPLANTE, EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS CON LA INMUNOSUPRESIÓN Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE RENAL.	59
1.1 CINÉTICA PLASMÁTICA DE LA CARGA VIRAL DE HPGV-1 EN EL TRASPLANTE RENAL	60
1.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR HPGV-1	62
1.3 RELACIÓN ENTRE LA CARGA DE ARN DE HPGV-1 Y LOS RESULTADOS CLÍNICOS EN EL TRASPLANTE RENAL	66
1.4 CORRELACIÓN ENTRE LA CARGA DE HPGV-1 Y TTV	70
2. UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL DE ADN DE ANELLOVIRUS EN PLASMA PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE INFECCIONES POSTRASPLANTE, EVENTOS ADVERSOS RELACIONADOS CON LA INMUNOSUPRESIÓN Y RECHAZO AGUDO DEL INJERTO, EN COMPARACIÓN CON LA CUANTIFICACIÓN DE TTV, EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE RENAL.	77
2.1 CINÉTICA PLASMÁTICA DE LA CARGA VIRAL DE AVT EN EL TRASPLANTE RENAL	78
2.2 FRECUENCIA Y ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS GÉNEROS DE ANELLOVIRUS	82
2.3 CAMBIOS DINÁMICOS EN EL PREDOMINIO DEL GÉNERO DE ANELLOVIRUS	85
2.4 RELACIÓN ENTRE LA CARGA DE ADN DE AVT Y LOS RESULTADOS CLÍNICOS EN EL TRASPLANTE RENAL	86

3. UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LAS CARGAS VIRALES DE TTV, AVT Y HPGV-1 EN PLASMA PARA PREDECIR LA APARICIÓN DE EVENTOS INFECCIOSOS Y EICH EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	95
3.1 CINÉTICA PLASMÁTICA DE LA CARGA VIRAL DE TTV, AVT Y HPGV-1 EN ALO-TPH	96
3.2 MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL DE TTV, AVT, HPGV-1 PARA PREDECIR EVENTOS INFECCIOSOS	98
3.3 MONITORIZACIÓN DE LA CARGA PLASMÁTICA DE TTV, AVT Y HPGV-1 PARA PREDECIR EICHA	102
4. UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA DE ADN DE TTV EN PLASMA PARA PREDECIR EVENTOS INFECCIOSOS NOSOCOMIALES QUE CONDUCE A UN MAL PRONÓSTICO, ASÍ COMO LA MORTALIDAD EN PACIENTES CRÍTICOS CON COVID-19.	108
4.1 CINÉTICA PLASMÁTICA DE LA CARGA VIRAL DE TTV EN PACIENTES CRÍTICOS CON COVID-19	108
4.2 CORRELACIÓN ENTRE LA CARGA DE ADN DE TTV Y NIVELES SÉRICOS DE BIOMARCADORES DE GRAVEDAD DE COVID-19	110
4.3 RELACIÓN ENTRE LA CARGA DE ADN DE TTV Y EVENTOS CLÍNICOS EN EL PACIENTE CRÍTICO CON COVID-19	113
VI. CONCLUSIONES	121
VII. BIBLIOGRAFÍA	125
VII. ANEXOS	139
1. ESCRITO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE SE RECOGEN EN LA TESIS DOCTORAL.	139
2. INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE LA COAUTORÍA DE LAS PUBLICACIONES COMPENDIADAS EN LA TESIS DOCTORAL.	143
VIII. ARTÍCULOS	145

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.I Pegivirus humano 1 (HPgV-1)

1. Hallazgos históricos y clasificación taxonómica

El Pegivirus humano 1 (Human Pegivirus 1), también conocido por la abreviatura HPgV-1, es un virus de ARN que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género Pegivirus. Su denominación inicial fue GBV-C y VHG, debido a que su identificación se llevó a cabo de manera independiente por dos grupos de investigadores en el año 1995.

Los primeros estudios del HPgV-1 se remiten al año 1967, cuando el investigador Friedrich Deinhardt *et al.* (1) realizaban investigaciones sobre casos de pacientes con hepatitis no A, no B. Utilizando un modelo de monos Titís (*Saguinus Labiatus*), se inoculó suero de un cirujano que había presentado un cuadro de hepatitis de etiología desconocida. Posteriormente a la inoculación, estos monos presentaron manifestaciones clínicas de hepatitis, acompañado de la elevación de las enzimas hepáticas y cambios histológicos en el hígado. Al realizar pases de inoculación sucesivos, se demostraría la presencia de un agente transmisible causante de hepatitis al que denominaron “agente GB”, por las iniciales del cirujano del que se aisló (1).

No fue hasta el año 1995, con el desarrollo de nuevas metodologías de biología molecular, que se analizaron de nuevo muestras de monos inoculados, lográndose identificar la secuencia de dos agentes virales relacionados que fueron denominados GBV-A y GBV-B por su relación con el agente GB y fueron incluidos en la familia *Flaviviridae* (2). En la actualidad se sabe que estos dos virus tienen la capacidad de infectar específicamente a primates, aunque sólo GBV-B está relacionado con el desarrollo de hepatitis en estos animales. Ese mismo año, el grupo de investigadores liderado por Simons *et al.* utilizando cebadores degenerados derivados de las secuencias homólogas compartidas por GBV-A y GBV-B y VHC, identificaron un tercer virus en el suero de pacientes con hepatitis de origen desconocido. Este nuevo virus tenía entre un 53% y un 59% de similitud con las secuencias de ácidos nucleicos de GBV-A y GBV-B, respectivamente, y aproximadamente un 47% de homología con las secuencias de VHC. Basándose en la homología de secuencia y el análisis filogenético, el virus se clasificó como un nuevo miembro de la familia *Flaviviridae* y se denominó GBV-C (3).

Simultáneamente, otro grupo de trabajo, liderado por Linnen *et al.*, lo encontró en pacientes con hepatitis crónica y lo denominó Virus de la hepatitis G humano (VHG),

debido a la similitud de su genoma viral con el VHC y otros miembros de la familia *Flaviviridae* (4). El análisis de la secuencia del genoma reveló una alta homología del 96% entre GBV-C y VHG, lo que indicó que eran aislamientos del mismo virus.

En el año 2011, el equipo de Stapleton *et al.* propuso una nueva nomenclatura y sistema de clasificación para el virus. Esta actualización se justificó debido a la falta de evidencia que relacionara al virus con la hepatitis (5) y a la ausencia de pruebas que confirmaran la infección del cirujano GB con dicho virus, lo que cuestionaba la idoneidad del uso de esa nomenclatura. Se sugirió la designación "Pegivirus Humano" (HPgV), dónde "Pe" denota "persistente", destacando su capacidad de generar infección persistente en humanos y la "G" fue adoptada como un recordatorio de las denominaciones históricas previas del virus, VHG y GBV-C. Además, se clasificó el virus en el género "pegivirus" dentro de la familia *Flaviviridae* (6).

En el año 2016, el equipo liderado por Smith *et al.* llevó a cabo una revisión de la taxonomía que fue aprobada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). En esta revisión, propusieron dividir el género Pegivirus en 11 especies (A-H) en función de su diversidad genética, y se designó al Pegivirus Humano 1 (HPgV-1) dentro de la especie Pegivirus C dentro de la familia *Flaviviridae* (7). Esta familia se clasifica dentro del orden *Amarillovirales* dentro del reino *Riboviria*.

Cabe destacar que, recientemente se ha producido un cambio en la nomenclatura de las especies, reemplazando la notación alfabética (A-H) por el formato binomial exigido por la ICTV. De este modo, la especie conocida como Pegivirus C pasa a llamarse *Pegivirus hominis* dentro del género Pegivirus (8).

2. Características de HPgV-1

2.1 Estructura y genoma

El HPgV-1 posee un genoma ARN de cadena sencilla, con polaridad positiva, de aproximadamente 9,3 kb y un único marco de lectura abierto (ORF). El tamaño del virón de HPgV-1 varía entre 50-100 nm. La organización del genoma es muy similar a la del virus de la Hepatitis C (VHC), presentando una región no codificante en el extremo 5' (5'UTR) que conforma la estructura secundaria IRES (del inglés: Internal Ribosome Entry Site). Esta región le permite interactuar directamente con el ribosoma y modular la traducción del genoma viral. Así mismo, el genoma de HPgV-1 también posee una región

no codificante en el extremo 3' (3'UTR), la cual no presenta repeticiones de adenina (poli-A) o uracilos (poli-U)(9).

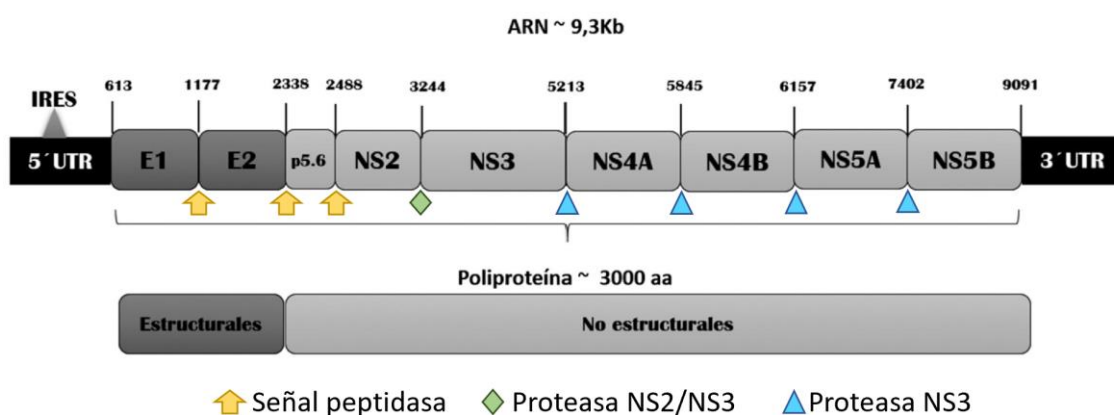


Figura I.1 (Modificada de Arroyave-Ospina JC, et al. *Rev Chilena Infectol.* 2018). Se muestra un genoma ARN de 9,3 kilobases (kb) que contiene regiones no codificantes (UTR; del inglés untranslated regions) en los extremos 5' y 3'. En el extremo 5'UTR (556 nucleótidos) destaca una estructura secundaria denominada IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), la cual regula la traducción de una poliproteína viral de aproximadamente 3.000 aminoácidos (aa). Los números en la parte superior indican la posición en nucleótidos de los segmentos codificantes según la nomenclatura de Worobey y Holmes en 2001 (10).

De acuerdo con la Figura I.1, el genoma del HPgV-1 codifica una poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos, que es procesada proteolíticamente por enzimas virales y celulares para dar lugar a nueve proteínas. Estas proteínas se dividen en dos grupos: dos proteínas estructurales, las glicoproteínas E1 y E2, que forman parte de la envoltura viral; y siete proteínas no estructurales, p5.6, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Algunas de estas proteínas destacan por su función específica en el ciclo de replicación viral. Por ejemplo, la proteína NS3 tiene actividad helicasa y serina-proteasa, lo que es esencial para el procesamiento del polipéptido viral. NS5A es una fosfoproteína que juega un papel en la evasión de la respuesta inmune y se considera indispensable para la replicación viral. Mientras tanto, la proteína NS5B posee actividad ARN polimerasa dependiente de ARN (10).

En cuanto a la estructura de las partículas virales del HPgV-1, estudios de microscopía han demostrado la presencia de una cápside. Sin embargo, aún no se ha logrado confirmar la secuencia de esta proteína, su conformación estructural o la región genómica que la codifica. Se postula que podría surgir de la escisión del extremo N-terminal o de un marco de lectura alternativo (10).

2.2 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del Pegivirus humano 1 (HPgV-1) y sus interacciones específicas con las proteínas celulares y los mecanismos de evasión del sistema inmunológico aún se están investigando. Se cree que HPgV-1 tiene un ciclo de vida similar al de VHC debido a su organización genómica y genes homólogos (10).

La entrada del virus en la célula depende de las glicoproteínas estructurales de la envoltura, E1 y E2. Estas glicoproteínas se liberan de la poliproteína mediante hidrólisis enzimática por señal peptidasa del huésped y forman heterodímeros en la superficie viral. La glicoproteína E2 se une a los receptores celulares, induciendo la fusión de la membrana y permitiendo la entrada del HPgV-1 en las células huésped. Además, esta proteína induce una respuesta inmune humoral y juega un papel importante en la modulación del sistema inmune. Se ha demostrado que altera las vías de señalización de interleucina-2 (IL-2), lo que inhibe parcialmente la activación de los linfocitos T. También inhibe la vía de señalización de interleucina-12, disminuyendo la proliferación de las células NK (11).

Después de la entrada, ocurre la descapsidación y liberación del ARN genómico en el citoplasma celular, seguido de la traducción dependiente de la secuencia IRES ubicada en la región 5'UTR del HPgV-1. Esto genera la poliproteína precursora viral, que luego se procesa y madura mediante proteasas celulares y proteínas virales como NS2, NS3 y NS4A (12).

La escisión de NS2/NS3 está mediada por la proteasa NS2, y la escisión de otras proteínas NS está mediada por la proteasa NS3 con NS4A como cofactor. NS4B es una proteína altamente hidrófoba que puede estar involucrada en la formación de estructuras membranosas que apoyan la replicación del ARN. NS5A es una proteína citoplasmática fosforilada que regula la replicación del ARN, mientras que NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN responsable de la replicación del genoma del virus (12).

Durante la replicación y transcripción del HPgV-1, se establecen interacciones entre proteínas virales y celulares imprescindibles para la replicación eficiente del virus.

Finalmente, una vez generadas nuevas copias del genoma a partir del ARN de cadena negativa, las nuevas partículas virales se ensamblan y se liberan de la célula por gemación (10).

2.3 Diversidad genética

Según la variación en la secuencia de nucleótidos de la región 5'-no traducida (5'-UTR), el HPgV-1 se puede clasificar en varios genotipos principales (13). Hasta la fecha, se han identificado siete genotipos diferentes: el genotipo 1, presente en África y dividido en cinco subgenotipos; el genotipo 2, presente en América del Norte y Europa, dividido en tres subgenotipos; y el genotipo 3, presente en Japón (10). Posteriormente, se descubrió el genotipo 4 en Myanmar y Vietnam (14), seguido del genotipo 5 en Sudáfrica (15). El genotipo 6 se encontró en Indonesia, y más recientemente, el genotipo 7 se identificó en el sudeste de Asia (16).

2.4 Tropismo

El ARN de HPgV-1 se ha detectado en varios tejidos, incluyendo el hígado, el bazo, la médula ósea y las PBMC, que incluyen linfocitos T y B, células NK y monocitos, aunque el mecanismo de transmisión de célula a célula está por dilucidar (17). Se postula que la replicación del virus ocurre principalmente en los linfocitos, y su presencia en diversos tejidos podría ser resultado de la presencia de estas células en dichos tejidos.

Aunque los primeros estudios indicaron que el HPgV-1 era hepatotrópico, numerosos estudios posteriores han demostrado que el HPgV-1 rara vez se detecta en el tejido hepático de las personas infectadas. Además, no se ha encontrado evidencia de enfermedad hepática relacionada con HPgV-1 en diferentes categorías de pacientes durante su seguimiento (18). Varios estudios respaldan esta hipótesis. Por un lado, diversos estudios que intentaron demostrar la replicación del virus en el hígado han arrojado resultados negativos o no concluyentes, a pesar de la alta similitud del HPgV-1 con el virus de la hepatitis C (18–21). Por otro lado, en un estudio realizado por Pessoa *et al.* en 1998 (22), se observó que individuos co-infectados con VHC/HPgV-1, los niveles de ARN del VHC en el hígado eran considerablemente más altos que en el plasma, mientras que para el HPgV-1 se observó lo contrario (22). Estos resultados fueron contradictorios con la expectativa inicial de que el HPgV-1 se replicaría principalmente en el hígado.

En 1999, Fogeda *et al.* (23) demostraron que el virus se replica en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), donde observaron una alta concentración del ARN de HPgV-1 en linfocitos (24).

Posteriormente, en un intento por consolidar la literatura existente sobre el tropismo del pegivirus, Chivero *et al.* propusieron en 2014 el modelo de tropismo presentado en la Figura I.2 (17).

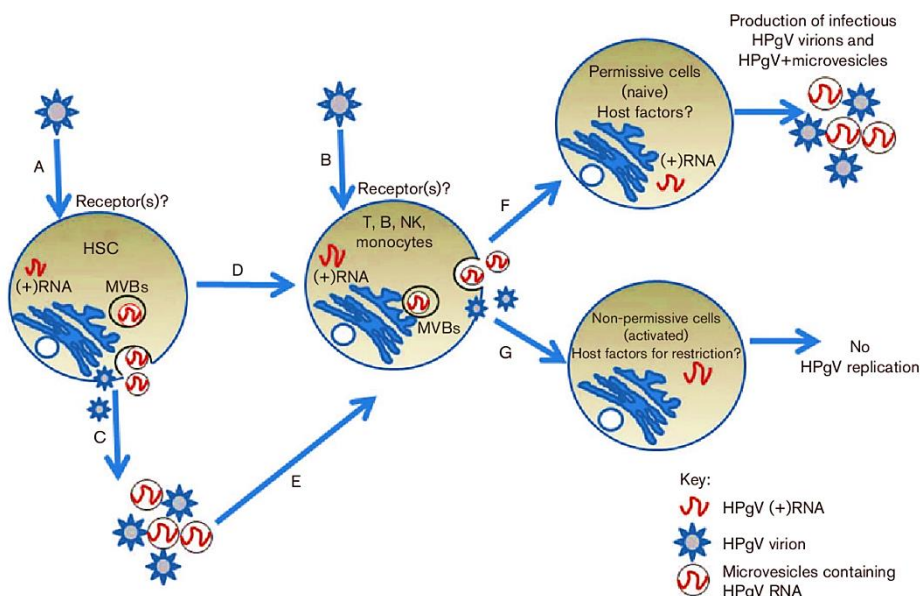


Figura I.2. Modelo de tropismo de HPgV-1. HPgV-1 puede infectar células madre hematopoyéticas (HSC) en el bazo y/o la médula ósea debido a la expresión de un receptor específico que no está presente en células diferenciadas (A) o linfocitos que expresan receptores comunes aún no identificados (B). Si las HSC están infectadas, los genomas de HPgV-1 se pasan durante la diferenciación (D) con la producción de virus de bajo nivel. Alternativamente, las HSC infectadas producen exosomas que entregan ARN a múltiples tipos de células (C, E) que producen virus de bajo nivel. Los factores del huésped promueven (en células en reposo F) o restringen (en células activadas; G) la replicación viral dentro de cada tipo de célula específico. MVB, cuerpos multivesiculares (18).

El estudio llevado a cabo por Chivero *et al.* reveló la presencia del ARN del HPgV-1 en diversas células, incluyendo linfocitos T y B, células NK y monocitos. El virus fue detectado tanto en las células de la sangre periférica de los individuos del estudio como en subpoblaciones purificadas de linfocitos T y B con una pureza superior al 98% (17). Estos hallazgos coinciden con estudios previos realizados por George *et al.* en 2006 (24) y Ruiz *et al.* en 2010 (25), fortaleciendo la evidencia de la presencia del virus en el sistema inmunológico.

Se encontró ARN viral en las subpoblaciones de células T CD4 y CD8, incluyendo las subpoblaciones de células T naïve, de memoria central y de memoria efectora. Se observaron concentraciones más altas de ARN viral en las células T naïve (CD45RA) en

comparación con las células T de memoria central o de memoria efectora, según el estudio de Chivero *et al.* en 2014 (17). Estos resultados sugieren una posible infección selectiva del HPgV-1 en células T que luego se diferencian en células efectoras o de memoria, o también podrían sugerir una infección de células T independientemente de su estado de diferenciación (17).

En conclusión, el HPgV-1 es un virus linfotrópico que se replica tanto en la médula ósea como en los tejidos linfoides, así como en las células mononucleares de la sangre periférica.

3. Prevalencia y transmisión

La infección por el HPgV-1 se adquiere principalmente a través de vías materno-infantiles, sexuales y parenterales, compartiendo modos de transmisión con otros virus como el VHC, VHB y VIH, lo que conduce a una alta prevalencia de coinfecciones. Entre las personas infectadas por el VIH, se ha observado una prevalencia de viremia por HPgV-1 que varía entre el 14% y el 43% (26).

La prevalencia de HPgV-1 en donantes de sangre sanos ha sido estimada en un 3,1% según un metaanálisis reciente (27), aunque existen notables diferencias geográficas, con tasas que van desde el 3,8% en Islandia (28) y el 4,1% en Australia (29), hasta el 18,9% en Sudáfrica (30) y el 21,7% en Brasil (31). Aunque aún no se han caracterizado completamente los factores clínicos asociados con la presencia de HPgV-1 RNA en la sangre, se han identificado tasas más altas en usuarios de drogas por vía intravenosa (IDUs), pacientes con transfusiones de sangre repetidas o aquellos infectados por el VHC.

En pacientes sometidos a trasplantes, ya sean de órganos sólidos o de células madre hematopoyéticas, la prevalencia de HPgV-1 alcanza el 18% (32,33). En el caso de trasplante renal, después de la transición desde la diálisis, la prevalencia es superior y varía entre el 12% y el 47% en diferentes países (34,35).

Aproximadamente el 25% de las personas infectadas presentan viremia persistente por HPgV-1, sin embargo, en la mayoría de los casos, la infección se aclara en un período de 2 años, coincidiendo con el desarrollo de anticuerpos contra la glicoproteína de cubierta E2 (36), como se muestra en la Figura I.3.

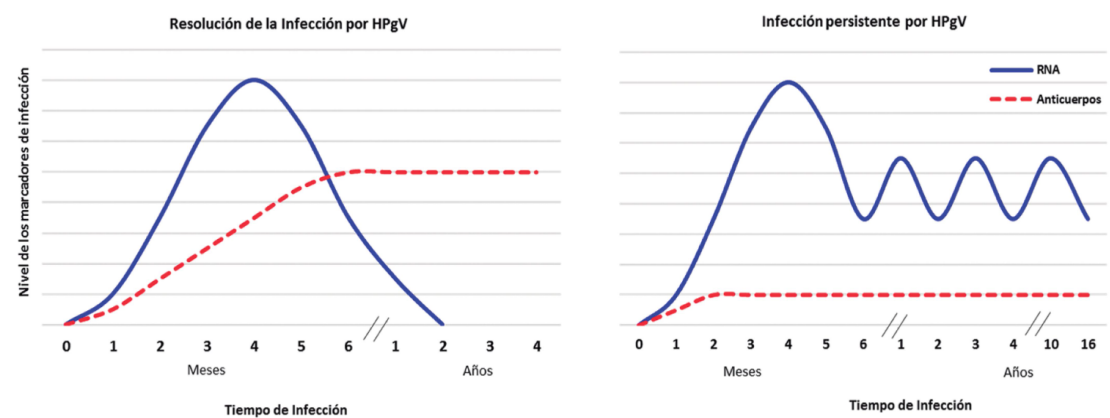


Figura I.3. Cinética de marcadores de infección por HPgV-1. En el panel izquierdo se observa el tipo de infección más frecuente por HPgV-1, hasta en 75% de los casos. La resolución de la infección se caracteriza por la reducción del ARN viral a niveles indetectables en menos de dos años desde la infección, además de un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes anti-E2 de HPgV-1. En el panel derecho, se observa el tipo de infección menos común, que afecta aproximadamente al 25% de los casos. En este escenario, el ARN viral se mantiene detectable durante períodos que superan los dos años, con niveles variables, y los anticuerpos neutralizantes anti-E2 suelen ser generalmente indetectables (10,36).

En general, los anticuerpos E2 contra HPgV-1 no son detectados durante la viremia, sino que se desarrollan después de que el virus ha sido eliminado del organismo. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos E2 indica una infección previa por el virus. La viremia y la presencia de anticuerpos E2 al mismo tiempo son poco comunes en los donantes de sangre, con una frecuencia inferior al 1%, y un poco más frecuentes en individuos infectados por el VIH, con una frecuencia que varía del 1% al 5% (37).

4. HPgV-1 y su interacción con el sistema inmunitario

El HPgV-1 ha atraído considerable atención debido a sus posibles efectos inmunomoduladores beneficiosos, que reducen la activación del sistema inmunitario en pacientes con otras enfermedades virales, como la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), hepatitis B y la enfermedad por el virus del Ébola. Por otro lado, también se ha observado que la viremia por HPgV-1 está asociada con el desarrollo de linfoma no Hodgkin (LNH) (10).

La coinfección de linfocitos humanos con HPgV-1 y VIH ha demostrado inhibir la replicación del VIH. Esto se debe a que el HPgV-1 interfiere de manera específica en la señalización del receptor de células T (TCR), compitiendo con el VIH por las mismas

células diana. A diferencia del VIH, la infección por HPgV-1 no suprime completamente la activación de las células T, lo que sugiere que estas células aún pueden funcionar con un estímulo adecuado. Esto ha llevado a la hipótesis de que el HPgV-1 puede tener un efecto beneficioso en el pronóstico de las personas coinfectadas con el VIH tipo 1 (38).

Además de su influencia sobre células T, el HPgV-1 también modula la funcionalidad de las células NK CD56bright que son las principales productoras de INF-gamma y TNF-alfa.

5. HPgV-1 como biomarcador de la función inmunológica en el trasplante

Los HPgV han sido objeto de extensos estudios debido a su interacción con las células del sistema inmunitario, especialmente en el contexto de los trasplantes de órganos sólidos y hematopoyéticos. Estas investigaciones se centran en comprender cómo los pegivirus afectan la respuesta inmunológica de los receptores de trasplantes y cómo pueden influir en los resultados clínicos. Varios estudios han demostrado que el viroma experimenta cambios al inicio de la inmunosupresión, destacando el aumento tanto de anellovirus como de pegivirus.

En 2001, Filippi *et al.* estudiaron la prevalencia del virus de la hepatitis G en receptores de trasplante renal, concluyendo que la infección por este virus es común en pacientes trasplantados de riñón, con una prevalencia del 24%, y que conlleva un bajo riesgo de enfermedad hepática crónica incluso en el seguimiento a largo plazo (39).

En 2004, Ramos *et al.* encontró una prevalencia global del 14,6% para la infección por pegivirus (GBV-C/VHG) en pacientes con insuficiencia renal crónica y además observó una mayor positividad en los pacientes que habían recibido trasplante renal (16,7%) (40). En otro estudio, Savassi-Ribas *et al.* informaron una prevalencia aún mayor de pegivirus, alcanzando el 36,1% en pacientes sometidos a trasplante renal (41).

Recientemente, Vu *et al.* llevaron a cabo un estudio para analizar el impacto del estado inmunológico alterado en el viroma en el contexto de trasplantes alogénicos, y comunicaron una prevalencia del 42% de infección por HPgV-1 en estos pacientes. Los resultados revelaron que la mediana de la carga viral en los casos positivos varió entre $1,7 \times 10^4$ y $5,2 \times 10^5$ copias/ml de plasma y además no encontraron asociación entre la infección por HPgV-1 y el rechazo o infecciones (42). Numerosos estudios coinciden en

que la infección por pegivirus no parece tener un impacto negativo en la evolución de los receptores de trasplantes (43).

Dada la alta frecuencia de detección de HPgV-1 y el escaso conocimiento sobre su cinética de infección y su potencial función inmunomoduladora, el papel del HPgV-1 como biomarcador en el control de la inmunosupresión representa una novedad en la investigación del viroma en individuos inmunocomprometidos.

I.II Anellovirus totales (AVT) y Torque Teno virus (TTV)

1. Hallazgos históricos y clasificación taxonómica

Los anellovirus son virus pequeños de ADN monocatenario de cadena simple pertenecientes a la familia *Anelloviridae*. Entre ellos, tres géneros principales infectan a los humanos y representan aproximadamente el 70% del viroma: *Alphatorquevirus* (TTV), *Betatorquevirus* (TTMV) y *Gammatorquevirus* (TTMDV) (44).

La historia del descubrimiento de los anellovirus se remonta a 1997, cuando el equipo liderado por Nishizawa *et al.* identificaron un nuevo virus en el suero de un paciente japonés con hepatitis post-transfusional no asociada a los virus de la hepatitis A-G. Este nuevo virus se denominó TTV, por las iniciales del paciente fuente del que se aisló y fue el primer virus que se descubrió de la familia *Anelloviridae* (45).

La primera detección confirmada del TTV se relaciona con el descubrimiento inicial del clon viral N22. Mediante el análisis de representación diferencial se aisló un clon viral (N22) de 500 nucleótidos del suero de un paciente (TT) con hepatitis post-transfusional de etiología desconocida. El clon N22 mostró una escasa homología con cualquiera de las secuencias previamente informadas (46).

Para caracterizar este nuevo clon, se llevó a cabo una serie de análisis. Con el objetivo de averiguar si era un clon de ADN o ARN, se realizó una PCR utilizando los primers diseñados a partir del N22. En uno de los casos, se realizó una transcripción reversa para convertir cualquier posible ARN en ADN complementario. En ambas reacciones de PCR se obtuvo la misma intensidad de señal, lo que confirmó que el N22 era un clon de ADN. Para comprobar que el material genético presente en las muestras del paciente no pertenecía a material genético humano, se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos del clon N22 en cuatro muestras de ADN humano. Como resultado, la secuencia N22 no fue amplificada en ninguna de las muestras, lo que llevó a la conclusión de que la procedencia de dicho material no era de origen humano (46).

Además, dado que la secuencia N22 se fraccionó en gradiente de sacarosa a 1,26 g/cm³ y fue resistente a la DNasa I, se concluyó que estaba encapsulada y, por tanto, era de origen vírico. Asimismo, después del tratamiento con Tween 80, la densidad de la partícula viral no sufrió cambios en el gradiente de sacarosa, lo que llevó a la conclusión de que se trataba de un virus sin envoltura lipídica (45).

Este nuevo virus fue denominado provisionalmente como virus "TT" (TTV) (46). El nombre TT virus fue sustituido por la denominación Torque Teno Virus, de las palabras latinas “torques” y “tenius”, que significan collar y delgado.

Dos años después, en 1999, se descubrió el Torque Teno Mini Virus (TTMV). Las secuencias de TTMV coincidían parcialmente con las de TTV, pero eran notablemente más cortas, lo que llevó a su clasificación como un nuevo virus dentro del género *Anellovirus* (47). Se optó por el término "Anellovirus" debido a la naturaleza circular del genoma de estos virus, ya que la palabra "Anello" proviene del latín y significa "anillo".

En 2005, se descubrió el Torque Teno Midi Virus (TTMDV), cuyo análisis genómico reveló secuencias similares a las de TTV y TTMV, pero con un tamaño intermedio en comparación con los otros dos (48).

Inicialmente, los anellovirus se clasificaron como miembros de la familia *Circoviridae*. Sin embargo, debido a su extrema heterogeneidad genética y ciertas características distintivas en la organización de su genoma, en el año 2009 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) estableció la familia *Anelloviridae* específicamente para estos virus. Actualmente, esta familia no cuenta con un orden designado y se agrupa en el orden *unassigned* del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).

Hasta el año 2020, se conocían únicamente 14 géneros de *Anellovirus*. No obstante, el avance de las nuevas técnicas moleculares, como la secuenciación de alto rendimiento, ha acelerado el descubrimiento de nuevos virus, revelando una asombrosa diversidad viral. En los últimos años, el número de géneros y especies de la familia *Anelloviridae* se ha duplicado (49). Actualmente, esta familia de virus abarca un total de 30 géneros y 156 especies conocidas (Tabla I.1).

Tabla I.1. Lista de géneros y especies de la familia *Anelloviridae*.

Géneros previos (establecidos antes del 2020)	N.º de especies	Géneros recientes (después del 2020)	N.º de especies
<i>Alphatorquevirus</i> (Especie prototipo <i>Torque teno virus 1, TTV</i>)	26	<i>Aleptorquevirus</i>	2
<i>Betatorquevirus</i> (Especie prototipo <i>Torque teno mini virus 1, TTMV</i>)	38	<i>Chitorquevirus</i>	1
<i>Deltatorquevirus</i>	1	<i>Daletorquevirus</i>	1
<i>Epsilontorquevirus</i>	1	<i>Gimeltorquevirus</i>	1
<i>Etatorquevirus</i>	6	<i>Hetorquevirus</i>	1
<i>Gammatorquevirus</i> (Especie prototipo <i>Torque teno midi virus 1, TTMDV</i>)	15	<i>Omegatorquevirus</i>	1
<i>Iotatorquevirus</i>	1	<i>Omicrontorquevirus</i>	1
<i>Kappatorquevirus</i>	2	<i>Pitorquevirus</i>	6
<i>Lambdatorquevirus</i>	5	<i>Psitorquevirus</i>	1
<i>Mutorquevirus</i>	2	<i>Rhotorquevirus</i>	1
<i>Nutorquevirus</i>	1	<i>Sigmatorquevirus</i>	3
<i>Thetatorquevirus</i>	10	<i>Tettorquevirus</i>	1
<i>Zetatorquevirus</i>	1	<i>Upsilonontorquevirus</i>	7
<i>Gyrovirus</i>	10	<i>Wawtorquevirus</i>	6
		<i>Xitorquevirus</i>	2
		<i>Zayintorquevirus</i>	2

Los anellovirus que infectan a humanos y producen infecciones crónicas persistentes se clasifican principalmente en los géneros *Alphatorquevirus* (TTV), *Betatorquevirus* (TTMV) y *Gammatorquevirus* (TTMDV). El termino Anellovirus totales hace referencia a la detección simultanea de estos tres géneros.

Es importante destacar que las especies que componen estos géneros dentro de la familia *Anelloviridae* solo comparten un promedio de aproximadamente el 35% de identidad en la secuencia de nucleótidos. Esta marcada variabilidad genética subraya la diversidad existente en estos virus (50).

2. Características del virus

2.1 Genoma y cápside viral

El genoma de los anellovirus es sencillo y está compuesto por una molécula ADN circular monocatenario (ADNss) de polaridad negativa protegida por una cápsula icosaédrica de unos 30-50 nm de diámetro, cuyo tamaño varía según la especie. Esta cápside, desprovista de envoltura lipídica adicional, está formada por 12 capsómeros (51).

Se observa una variabilidad en el tamaño del genoma entre los diversos aislados, que varía desde 3,6 y 3,9 kb para TTV, 3,2 kb para TTMDV y 2,8 y 2,9 kb para TTMV. A pesar de estas diferencias en el tamaño, todos estos virus mantienen la misma estructura genómica característica con una región codificante que contiene varios marcos de lectura abiertos (ORF) y una región no codificante (UTR) de menor tamaño (51).

En la Figura I.4 se muestra el genoma viral del Torque Teno Virus (TTV), que fue el primer virus descubierto de la familia *Anelloviridae* y que ha servido como un punto de partida para entender la biología y diversidad de los virus de esta familia.

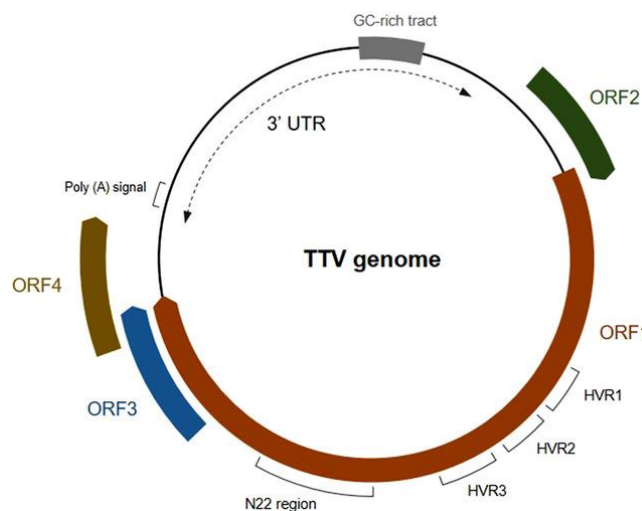


Figura I.4. Representación del genoma viral de torque teno virus (TTV), con cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs) parcialmente superpuestos y una zona no codificante (URT) común con una región rica en guanósina-citosina (GC). ORF1 con tres regiones hipervariables (HVR) y la región N22 (52).

La región UTR contiene un segmento corto de nucleótidos altamente conservado en todos los aislados de anellovirus, que parece controlar la replicación y expresión del virus. Además, contiene una región rica en guanina citosina (GC) de unos 100 nucleótidos (nt), que es importante para la replicación del virus y contiene elementos de transcripción como la secuencia del promotor TATA box (TATAA).

La región codificante contiene al menos cuatro marcos de lectura abiertos, con un ORF1 principal, que contiene las regiones hipervariables (HVR) y un ORF2 superpuesto, así como varios ORF adicionales y un fragmento de arginina N-terminal. Los ORF se superponen parcialmente y sus tamaños difieren ampliamente. Se han identificado al menos 6 proteínas codificadas mediante splicing alternativo, con tamaños que varían entre 12 y 80 KDa.

El ORF1 codifica para la proteína de la cápside putativa y la proteína asociada a la replicación de los anellovirus. En su extremo N-terminal, la proteína ORF1 contiene una región rica en repeticiones de arginina, que es similar a las proteínas Cap de los circovirus. Esta característica sugiere que la proteína ORF1 podría desempeñar un papel importante en el empaquetamiento del ADNss (53). Por su parte, el ORF2 contiene en su extremo N-terminal la secuencia WX 7 HX 3 CX 1 CX5 H altamente conservada, que codifica una proteína capaz de suprimir las vías NF- κ B implicadas en la transcripción de genes. El ORF3 tiene un dominio rico en serina en el extremo C capaz de generar diferentes sitios de fosforilación y se cree que podría estar implicado en el mantenimiento de la infección viral persistente (53).

2.2 Ciclo replicativo

Aunque el mecanismo exacto de replicación de estos virus no ha sido completamente esclarecido, se ha planteado la hipótesis de que utilizan un proceso similar al de otros virus circulares de ADN monocatenario, conocidos como CRESS (Circular Rep-Encoding Single-Stranded). Específicamente, se sugiere que los anellovirus llevan a cabo su replicación a través del mecanismo llamado "replicación en círculo rodante" (rolling circle replication), mediante el cual el virus puede producir múltiples copias de su genoma a partir de una sola molécula de ADN circular. Este proceso podría ser clave para la asombrosa capacidad de replicación de los anellovirus y la rápida producción de nuevas partículas virales. Diariamente, se generan más de 10^{10} partículas virales del Torque Teno virus (TTV), y durante este periodo, aproximadamente el 90 % del virus en el plasma se renueva y reemplaza (51). Es importante destacar que los anellovirus no codifican para una polimerasa viral propia, por lo que dependen de la maquinaria celular del huésped para llevar a cabo su replicación. Como resultado, el virus tiende a infectar preferentemente células que están en proceso de división o induce a dichas células a entrar en la fase de síntesis (Fase-S) para facilitar su replicación (54,55).

2.3 Diversidad genética

La diversidad de la familia *Anelloviridae* es particularmente notable en comparación con otras familias de virus (Figura I.5). Aunque la organización genética de los anellovirus se mantiene relativamente conservada, sus genomas muestran una alta variabilidad de secuencias.

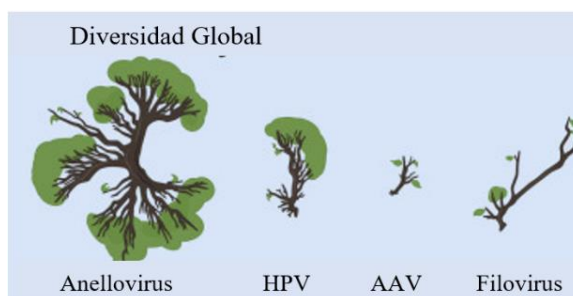


Figura I.5. (Imagen traducida de Arze CA, et al. *Cell Host Microbe*. 2021). Representación de la diversidad genética global de los anellovirus y otras familias de virus, como el virus del papiloma (HPV), virus adenoasociado (AAV) y filovirus que incluye los géneros Ebolavirus, Dianlovirus, Marburgvirus y Cuevavirus (50).

La amplia variación genómica y el mecanismo que la origina en los anellovirus aún son desconocidos, pero se han propuesto varias hipótesis al respecto.

El análisis filogenético sugiere que los anellovirus tienen su origen en una antigua familia de virus y que millones de años de evolución han llevado a la diversidad genética actual (56).

Otra explicación plantea que la gran diversidad de anellovirus podría ser resultado de una rápida evolución causada por una alta tasa de mutación o una frecuente recombinación entre cepas de virus. Es importante destacar que las altas tasas de mutación no son características comunes de los virus de ADN, ya que suelen utilizar las polimerasas de ADN del huésped, que poseen una alta capacidad de corrección de errores. Sin embargo, se ha sugerido que la naturaleza monocatenaria del genoma de los anellovirus y su capacidad para codificar proteínas involucradas en la replicación podrían explicar esta mayor tasa de mutación. Esto sugiere que el TTV podría tener un mecanismo que le permite acumular mutaciones a un ritmo elevado. La mayoría de estas mutaciones y recombinaciones ocurren en las regiones hipervariables (ORF1), que forman parte de la proteína putativa de la cápside. Estos cambios dificultan el reconocimiento del virus por los anticuerpos y provocan respuestas inmunitarias débiles, lo que permite que múltiples cepas coexistan y persistan durante años en un individuo (57).

Recientemente, se ha publicado un estudio que respalda hipótesis previas (56,58,59) y resalta la relevancia crucial de la recombinación como un mecanismo clave para la generación de la amplia diversidad genética observada en la familia *Anelloviridae* (50). Los tres géneros de la familia *Anelloviridae* que infectan a humanos (*Alpha*, *beta* y *gamma torque virus*) abarcan un gran número de especies o genotipos, que a su vez se clasifican en diferentes genogrupos, lo cual confirma, la alta tasa de heterogeneidad del virus (60). Dado que los anellovirus exhiben una gran variabilidad genética, es común que coexistan y persistan múltiples variantes virales en un mismo huésped (61).

En un estudio realizado por Maggi *et al.* se encontró que los individuos con altas cargas virales de TTV presentaban una mayor diversidad de genogrupos del virus en comparación con aquellos con cargas virales más bajas. El género Alphatorquevirus contiene un gran número de genotipos de TTV que a su vez se clasifican en cinco grupos relacionados a distancia (62). Los genogrupos 1 y 3 de TTV fueron los más prevalentes, seguidos por los genogrupos 4 y 5, mientras que el genogrupo 2 fue poco frecuente. Sin embargo, aún queda por dilucidar si existen diferencias biológicas o patógenas entre estos distintos genogrupos (63).

2.4 Tropismo

El ADN de los anellovirus se puede detectar en diversas células y tejidos, incluyendo médula ósea, pulmones, hígado, riñón, bazo, PBMC, linfocitos y páncreas (64,65). También se han detectados niveles altos de anellovirus en saliva y secreciones nasales en comparación con el suero, lo que ha llevado a la consideración del tejido orofaríngeo o las glándulas salivares como posibles sitios de replicación viral (64,66,67).

Los anellovirus son multitrópicos, es decir, se encuentran en casi todos los fluidos y tejidos analizados (61). Sin embargo, parece que los linfocitos T son el sitio principal de replicación del TTV.

Varios autores, como Takahashi *et al.*, han sugerido que la detección de TTV en diferentes órganos puede ser debido a la presencia del sistema inmunitario en dichos órganos, pero que la replicación ocurre principalmente en células mononucleadas de sangre periférica (68). Esta hipótesis fue postulada en 1999 cuando Kanda *et al.* observaron que pacientes con ADNemias de TTV positivas dieron negativo durante el periodo de mielosupresión y volvieron a ser positivos después de la reconstitución del

injerto, lo que sugiere que el TTV podría replicarse principalmente en células hematopoyéticas (69). En el 2010, Maggi *et al.* confirmaron la relevancia de las células hematopoyéticas en el control de la viremia plasmática de TTV en receptores de alo-TPH con acondicionamiento mieloablativo (70).

En el 2015, Focosi *et al.* estudiaron la cinética de TTV en una cohorte 70 pacientes sometidos a trasplante renal o de páncreas durante la inmunosupresión con fármacos depletores de linfocitos T. Observaron que la cinética de la viremia TTV era compatible con la replicación en los linfocitos T y altamente dependiente de la potencia del fármaco anti-células T administrado. Basados en estos hallazgos, confirmaron que los linfocitos T son las principales células competentes para la replicación del virus (71).

3. Prevalencia y transmisión

Los anellovirus tienen una amplia distribución a nivel mundial, detectándose entre el 50% y el 95% de las personas sanas. Su presencia no depende de la edad, la posición socioeconómica ni las condiciones de salud, ya que pueden adquirirse poco después del nacimiento e incluso durante el período prenatal (72).

Casi dos tercios de la población general están infectados con TTV y la prevalencia para TTMV y TTMDV es equivalente, lo que implica que los individuos pueden presentar más de un tipo de anellovirus en sangre u otros tejidos (73–75).

Inicialmente, las tasas de infección por anellovirus documentadas variaban entre el 1% y el 40% en donantes de sangre sanos. Sin embargo, el uso de cebadores más inclusivos para detectar diferentes genotipos ha llevado a un aumento drástico en la prevalencia informada entre los donantes de sangre, acercándose al 100% en algunos estudios. La prevalencia de la infección por TTV, prototipo de la familia *Anelloviridae*, aumenta con la edad, pero parece estabilizarse en la primera infancia (53).

El TTV se transmite eficazmente por vía parenteral, lo que se ha observado en pacientes hemofílicos, usuarios de drogas inyectables, pacientes en hemodiálisis y receptores de trasplantes de órganos. Sin embargo, esta vía de transmisión no puede explicar por sí sola la prevalencia global y la ubicuidad de los virus TTV (51). La presencia de ADN de anellovirus en diversos fluidos y mucosas, como secreciones nasales, saliva, heces, orina y semen, sugiere que las vías que implican contacto directo con estos fluidos y mucosas pueden ser potenciales vías de infección (51).

Las altas tasas de prevalencia de anellovirus documentadas en niños, que varían del 93% en niños de 2 años al 99% en niños de 4 años, sugieren que la infección ocurre a edades tempranas y se piensa que las principales vías de transmisión son la fecal-oral y la vía respiratoria (75). Además, la prevalencia cercana al 40% en neonatos de apenas 6 meses ha llevado a considerar otras vías de transmisión potenciales, como la vía transplacentaria, la leche materna y la sangre del cordón umbilical (72).

Una vez que el virus entra en el organismo, ya sea por una vía u otra, se detecta en sangre en pocas semanas y establece una infección crónica, que generalmente perdura de por vida. Estos virus causan viremia crónica de bajo nivel, la cual se presume estar controlada por el sistema inmunitario competente del huésped. Los resultados negativos en la PCR no necesariamente indican una infección resuelta, ya que podrían ser el resultado de niveles de ADN viral por debajo del umbral de detección de la técnica analítica (72).

4. Viroma y anelloma

El viroma se define como el conjunto de virus que coexisten en el cuerpo humano. Se estima que cada individuo alberga entre 10^{12} - 10^{14} partículas virales y que alrededor de un 70% de este viroma está compuesto por virus de la familia *Anelloviridae* (76,77).

Los anellovirus infectan a la mayoría de las personas sanas y las coinfecciones con múltiples linajes únicos son frecuentes. Se estima que, cada individuo presenta alrededor de 6 linajes diferentes. El conjunto de los diferentes linajes de anellovirus que coexisten se conoce como “anelloma” y es exclusivo de cada individuo (50,53).

Es importante resaltar que el sistema inmunitario juega un papel crucial en el control de la expansión del viroma. Un ejemplo ilustrativo se observa en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que presentan niveles bajos de CD4, donde se evidencia una expansión de títulos virales con alteraciones en el viroma entérico. Este hallazgo destaca el papel fundamental del sistema inmunitario en el control de las poblaciones virales (78).

En el ámbito científico, el estudio del "anelloma global" representa un campo novedoso que requiere de más investigaciones para comprender la totalidad de la diversidad de los anellovirus entre los seres humanos, así como los mecanismos que contribuyen a su diversificación y su potencial impacto en la salud.

5. Anellovirus y su interacción con el sistema inmunitario

Desde su descubrimiento, se han realizado diversos estudios que han buscado establecer asociaciones entre los anellovirus humanos, especialmente el TTV, y diversas enfermedades, como hepatitis, enfermedades respiratorias (64,79), cáncer, trastornos hematológicos (59) y autoinmunes (80–82). Sin embargo, la patogenicidad de estos virus es objeto de controversia y hasta el momento no se ha demostrado su participación directa en dichas enfermedades (51) .

La hipótesis ampliamente respaldada por la comunidad científica sostiene que los anellovirus, que se encuentran de manera ubicua en la sangre de individuos sanos, son virus no patógenos del viroma humano, presentes con alta frecuencia en la población general, y establecen infecciones crónicas con tasas elevadas de replicación viral. Estos virus se clasifican dentro del grupo de los denominados "huérfanos", ya que no se asocian con ninguna enfermedad específica (49) , y dan lugar a una viremia crónica de bajo nivel que se cree está controlada por los sistemas inmunitarios competentes del huésped (82).

La relación entre los anellovirus y el sistema inmunitario ya fue postulada por Zheng *et al.* en 2007, quienes sugirieron, mediante un estudio *in vitro*, que la proteína ORF2 del TTV (aislada de SANBAN, genotipo de TTV perteneciente al genogrupo 3) podría estar implicada en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, debido a su relevante papel como inhibidor de la actividad de NF- κ B. Este factor nuclear NF- κ B es esencial para la expresión de muchos genes relacionados con la inflamación, como IL-6, IL-8 y COX-2, y desempeña un papel central en la regulación de la respuesta inmunitaria (62).

En 2009, Rocchi *et al.*, usando un TTV de genotipo 4, mostraron por primera vez que el ADN de TTV induce a las células inmunitarias a producir y secretar IFN γ , IL6 e IL12. El proceso ocurre a través de la interacción de la región rica en guanosina y citosina presente en los anellovirus y el receptor TLR (TLR9) de la célula huésped, que activa la respuesta inflamatoria mediante la síntesis de moléculas proinflamatorias IFN- α , interleucina (IL)-6 e IL-12). La región rica en heterodímeros no metilados de CpG puede tener una actividad estimuladora (CpG-S) o inhibidora (CpG-I). La frecuencia relativa de estas regiones ricas en GpG pueden diferir entre varias cepas de la misma especie, influyendo también en la forma en la que interactúan y estimulan TLR-9 (83).

La relación entre el Torque Teno Virus (TTV) y el sistema inmunológico ha sido respaldada por múltiples estudios que han evidenciado cambios en los niveles de TTV en pacientes con enfermedades inflamatorias y en individuos con sistemas inmunológicos comprometidos (50).

6. Métodos de monitorización de la función inmunológica en el trasplante

La diferencia en los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y otros sistemas de antígenos polimórficos entre donantes y receptores de órganos pueden llevar a la formación de células T de memoria específicas para los marcadores HLA, las cuales desempeñan un papel clave en el rechazo de órganos. Por ello, la inmunosupresión se presenta como una estrategia esencial para asegurar el éxito de los trasplantes. Sin embargo, los efectos adversos relacionados, tales como la infección por organismos oportunistas, la aparición de nuevos episodios proliferativos o la enfermedad de injerto contra huésped, hacen que sea imperativo un ajuste preciso de la inmunosupresión (84).

En la actualidad, los métodos disponibles para evaluar el nivel de inmunosupresión en pacientes trasplantados son limitados. Los enfoques más comúnmente utilizados se basan en biomarcadores subrogados de inmunosupresión, aunque todos ellos presentan ciertas limitaciones, como la baja sensibilidad, especificidad reducida y ausencia de un protocolo estandarizado. Destacan la monitorización de niveles terapéuticos de los fármacos inmunosupresores, que desempeña un papel crucial en la prevención de los efectos adversos relacionados con su uso y el control de la inmunidad celular y humoral mediante el recuento de las poblaciones linfocitarias T, B y NK e inmunoglobulinas, respectivamente.

Existen otros métodos más sofisticados, como ELISpot o InmuKnow, que nos proporcionan información valiosa sobre la funcionalidad linfocitaria ya sea antígeno o no antígeno específico. Sin embargo, su principal desventaja radica en su naturaleza laboriosa, su elevado coste y la falta de estandarización, lo cual constituye un obstáculo adicional para su implementación en la práctica clínica de rutina (85).

Por tanto, la búsqueda e identificación de nuevos biomarcadores que proporcionen información precisa sobre el estado inmunológico del paciente y que contribuyan a la individualización de las estrategias terapéuticas inmunosupresoras emergen como un factor crítico en la optimización de la supervivencia en pacientes sometidos a trasplante.

7. Anellovirus como biomarcador de la función inmunológica en el trasplante

La monitorización del viroma humano ha emergido como un campo de investigación novedoso y prometedor, con el potencial de identificar nuevos biomarcadores. Debido a la estrecha relación de los anellovirus (AV) con el sistema inmunológico, su alta prevalencia en la población y su papel destacado en el viroma humano, el estudio de los AV como posibles biomarcadores del estado de inmunosupresión se ha convertido en una prioridad en diversos contextos clínicos (50) .

Diversas investigaciones han abordado la posible relación entre los niveles de ciertos anellovirus, el grado de inmunosupresión y la respuesta inmunológica del organismo. Estos estudios han arrojado evidencias que sugieren una conexión entre estos factores. Estos hallazgos son importantes, ya que indican que la carga viral de algunos anellovirus podría servir como un biomarcador útil para evaluar el equilibrio adecuado entre la inmunosupresión y la respuesta inmunitaria, lo cual es crucial para el éxito de los trasplantes (86).

7.1 Anellovirus y trasplante de órgano sólido

En el estudio realizado por De Vlamink *et al.* en 2013, que incluyó a pacientes sometidos a trasplante de corazón o pulmón, se encontró que el Torque Teno Virus (TTV), el virus prototipo de la familia *Anelloviridae*, podría ser un biomarcador relevante. Los resultados de esta investigación revelaron 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. Además, el empleo de estos últimos se asociaba a una reducción en la biodiversidad del viroma, favoreciendo la prevalencia de los anellovirus (76).

En el contexto del trasplante de órgano sólido, se ha observado que la carga de TTV sigue una trayectoria ascendente en los primeros días después del trasplante, alcanzando su concentración máxima aproximadamente a los 90 días posteriores al procedimiento, y luego se mantiene en un estado estacionario a lo largo del tiempo. Este aumento más pronunciado se observa especialmente durante los primeros 30 días y se atribuye al desequilibrio dinámico entre el sistema inmunitario y el TTV, como resultado del tratamiento con fármacos inmunosupresores (87). Además, la concentración del virus durante este estado de equilibrio estacionario se correlaciona positivamente con el nivel

de fármacos inmunosupresores administrados (87,88), lo que sugiere una estrecha asociación entre la inmunosupresión farmacológica y la carga viral de TTV en estos pacientes.

En otros estudios relevantes, Focosi *et al.* informaron que el agotamiento de células T con globulina antitimocitos (ATG) en receptores de trasplante renal resultó en una disminución más pronunciada en la carga de TTV en comparación con el inhibidor de células T menos potente, basiliximab (71). Además, una dosis más alta de ATG tuvo un mayor efecto en la reducción de la carga de TTV que una dosis más baja. Por otro lado, Gorzer *et al.* describieron una disminución temprana similar de la carga de TTV en receptores de trasplante de pulmón después de la inducción con alemtuzumab (89). Es importante destacar que, en estos pacientes, la carga de TTV se considera más como un marcador de inmunosupresión que de reconstitución inmunitaria.

La literatura científica disponible sobre la utilidad de la monitorización de la carga de Anellovirus totales, que incluye la detección simultánea de los tres géneros que infectan a humanos (*Alpha*, *Beta* y *Gamma* torque virus) como marcadores de la función inmunitaria, es limitada. Sin embargo, se han llevado a cabo numerosos estudios que respaldan la utilidad del Torque teno virus (TTV) (*Alphatorquevirus*) como predictor de eventos adversos relacionados con la inmunosupresión, tales como el riesgo de infecciones y el rechazo del trasplante. Por ejemplo, Fernández-Ruiz *et al.* informaron que los receptores de trasplante renal con cargas de ADN de TTV superiores a 3,15 y 4,56 log₁₀ copias/mL presentaron un mayor riesgo de infección o evento adverso relacionado con la inmunosupresión (iRAE), respectivamente, en comparación con los pacientes cuyas cargas virales estaban por debajo de estos valores (90). Por el contrario, los pacientes que experimentaron episodios de rechazo del órgano trasplantado presentaron cargas de TTV más bajas en comparación con aquellos sin rechazo (76). En otro estudio llevado a cabo por Doberer *et al.* se encontró que cada aumento logarítmico en la carga de TTV disminuyó el riesgo de rechazo en un 22%. Además, se observó que las cargas de TTV fueron significativamente más altas entre los receptores de trasplante que padecían infecciones posteriores al procedimiento. Curiosamente, se encontró que el efecto más pronunciado se observó en casos de infección por el virus BK, la enfermedad por citomegalovirus (CMV) y las infecciones causadas por patógenos oportunistas (91). Estos hallazgos respaldan la idea de que el control de la replicación del TTV está principalmente mediado por la respuesta inmunitaria de las células T (92).

A continuación, se muestra la Figura I.6, que busca proporcionar una visión general de los hallazgos clave relacionados con el TTV como biomarcador en el contexto de la inmunosupresión y el trasplante de órganos sólidos.

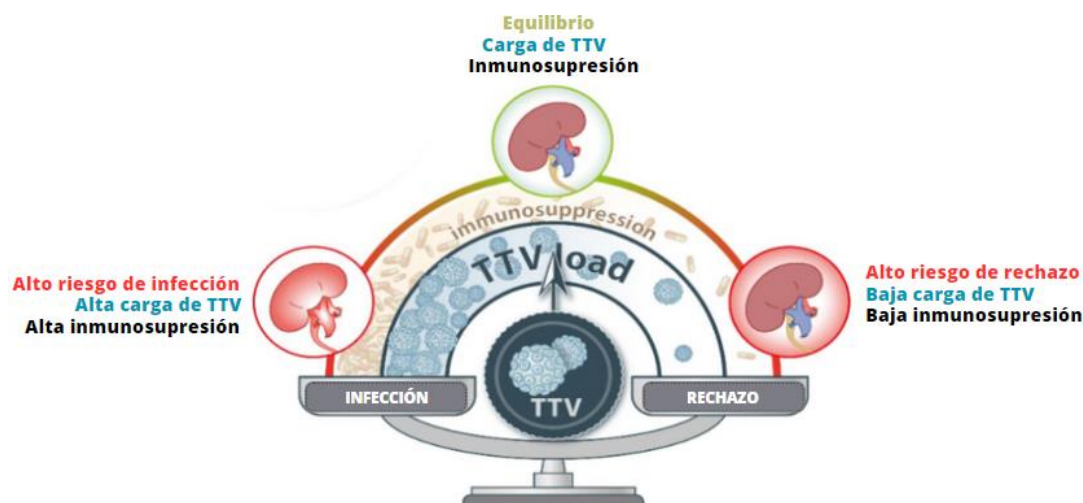


Figura I.6 (Modificada de van Rijn AL, et al. *Rev Med Virol.* 2023). Representación gráfica de la carga de TTV como marcador de inmunosupresión en trasplante de órgano sólido. Una baja carga de TTV indica una inmunosupresión insuficiente y un mayor riesgo de rechazo del injerto, mientras que una carga elevada de TTV se asocia con una inmunosupresión excesiva y un mayor riesgo de complicaciones infecciosas (93).

En la práctica clínica, por lo tanto, la carga de TTV se puede utilizar potencialmente para predecir un mayor riesgo tanto de rechazo como de infección, y para guiar los regímenes de tratamiento inmunosupresor personalizados (93). Existe una amplia base de evidencia experimental que respalda esta afirmación, tanto en el trasplante renal (94–98) como en el trasplante de hígado (99–101) y pulmón (102,103).

La posibilidad de extrapolar estas conclusiones a otros géneros de anellovirus o a la carga de anellovirus totales sigue siendo una incógnita por dilucidar.

7.2 Anellovirus y trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas

En el contexto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (allo-TPH), la cinética de la carga de ADN de TTV y su asociación con eventos clínicos relacionados con el sistema inmunitario es más compleja debido al impacto del agotamiento de los linfocitos derivado del acondicionamiento y del momento de la reconstitución de los linfocitos.

Después del acondicionamiento, se observa una disminución significativa en la carga de ADN de TTV en plasma que, a diferencia de lo que ocurre en el trasplante de órgano sólido, no comienza a elevarse hasta que el injerto no ha alcanzado las condiciones óptimas en la médula ósea para iniciar la proliferación de los subconjuntos de células hematopoyéticas. En este momento la carga de TTV aumenta coincidiendo con el aumento del recuento de linfocitos T (69).

En estos pacientes, la carga viral de TTV alcanza su punto máximo alrededor del día +90 postrasplante, y durante este periodo parece comportarse como un marcador de la reconstitución del sistema inmunitario (104). En otras palabras, la dinámica plasmática de la carga de ADN de TTV parece reflejar la reconstitución inmunológica temprana después del trasplante del alo-TPH, mientras que en etapas posteriores (después del día +100) tras el trasplante, se relaciona más con el grado de inmunosupresión (52).

En virtud de lo mencionado anteriormente, se postula que en el alo-TPH, niveles elevados de TTV podrían indicar una pronta reconstitución del sistema inmunológico, lo cual se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped. Por el contrario, niveles bajos de TTV parecen sugerir una reconstitución insuficiente del sistema inmunológico, lo que podría estar relacionado con un mayor riesgo de desarrollar infecciones (Figura I.7).

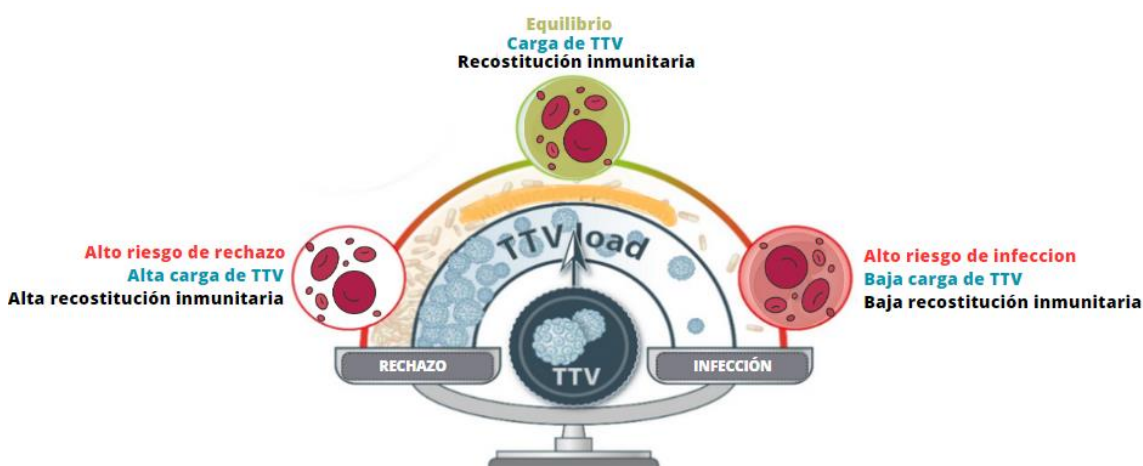


Figura I.7. (Imagen modificada de van Rijn AL, et al. Rev Med Virol. 2023). Esquema gráfico de la carga de TTV como marcador de infección y rechazo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH).

En diversos estudios se ha evidenciado una tendencia hacia una correlación positiva entre las cargas de ADN de TTV y los linfocitos después del injerto, tanto en el contexto de trasplantes de células madre hematopoyéticas alogénicos como autólogos.

Estos hallazgos indican que la reconstitución del injerto proporciona las células diana para la replicación del TTV, lo que sugiere que el aumento de la carga de TTV en el plasma de estos pacientes refleja la repoblación de linfocitos (104).

En un estudio realizado por Albert *et al.* se observó que los pacientes con niveles más bajos de carga viral de ADN de TTV, específicamente $AUC_{20-30} \leq 2,8$ copias x día x ml-1, presentaban un mayor riesgo de experimentar episodios de alta carga viral de CMV que requerían tratamiento antiviral. Sin embargo, se encontró que la carga viral de TTV tenía un valor predictivo modesto para este evento (105). Además, otro trabajo del mismo grupo observó que el incremento en la carga de ADN de TTV es más pronunciado en aquellos pacientes que desarrollan una enfermedad de injerto contra huésped aguda grave (104).

Si bien los resultados de los estudios sugieren asociaciones entre la carga de TTV y ciertos resultados inmunológicos, es importante tener en cuenta que existen múltiples factores que pueden influir en la respuesta inmunológica y en la reconstitución inmunitaria después de un trasplante. Por lo tanto, se requiere una mayor investigación para comprender mejor los mecanismos detrás de estas asociaciones y dilucidar la relación entre la carga de TTV y la competencia inmunitaria en el contexto del trasplante.

8. Anellovirus y paciente crítico con COVID-19

Fuera del ámbito de la población inmunodeprimida, se han identificado cargas significativamente elevadas de anellovirus, en particular de TTV, en plasma y el tracto respiratorio de individuos con trastornos pulmonares crónicos de naturaleza inflamatoria, como el asma, las bronquiectasias crónicas y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en comparación con individuos sanos (79,82,106). Aunque se ha demostrado que el TTV posee la capacidad de estimular respuestas inflamatorias, como se ha evidenciado en estudios *in vitro* (83), también se plantea la posibilidad de que entornos proinflamatorios desencadenen la replicación del TTV.

Es bien conocido que la linfopenia y la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias son características notables en pacientes críticos con COVID-19. Además, estas características se asocian de manera patogénica con el desarrollo y agravamiento del síndrome del distrés respiratorio agudo (SDRA), así como con el daño tisular que culmina en un fallo multiorgánico y, en última instancia, la muerte (107–109).

A pesar de la relevancia de esta potencial relación entre el grado de inmunosupresión y la respuesta inflamatoria en pacientes graves con COVID-19 y su influencia en la replicación de TTV, son escasos los estudios que han explorado este tema en profundidad. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales con el fin de dilucidar si la dinámica de la carga de TTV en pacientes críticos con COVID-19 puede funcionar como un indicador del estado inflamatorio e inmunológico, así como evaluar su posible utilidad como predictor de mal pronóstico en el contexto de pacientes críticos con la COVID-19

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

En el contexto del trasplante, la necesidad de identificar y estudiar nuevos biomarcadores se ha vuelto imperativa para mejorar la monitorización de la función inmunitaria y predecir eventos clínicos relevantes, como el riesgo de rechazo del injerto y la aparición de infecciones. Si bien la carga de TTV ha mostrado potencial como marcador de inmunosupresión en algunos tipos de trasplantes, existen aún desafíos y limitaciones en su aplicabilidad generalizada. Por lo tanto, se postula que la búsqueda y validación de nuevos biomarcadores, incluyendo otros géneros de anellovirus, la carga total de anellovirus y la investigación de otros virus vinculados al sistema inmunitario, como el Pegivirus humano, podría ofrecer una perspectiva más completa y precisa de la dinámica inmunitaria en el trasplante, permitiendo un manejo personalizado y optimizado de la inmunosupresión y mejorando los resultados clínicos en estos pacientes. Además, dado que en pacientes graves con COVID-19 coexisten un cierto grado de inmunosupresión y un estado hiperinflamatorio, y ambas condiciones pueden afectar la replicación de algunos géneros de anellovirus, hipotetizamos que carga viral de TTV podría ser un biomarcador útil para predecir malos resultados clínicos en pacientes críticos con COVID-19.

Esta investigación podría abrir nuevas vías para la estratificación de pacientes y la implementación de terapias más precisas y eficaces, llevando a una mejora significativa en la supervivencia y calidad de vida de pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos, como aquellos sometidos a trasplante y los pacientes críticos con COVID-19.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. Evaluar la utilidad de la monitorización de la carga viral de ADN de HPgV-1 en plasma para predecir la aparición de infecciones postrasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión y rechazo agudo del injerto, en pacientes sometidos a trasplante renal.

Investigaciones anteriores han evidenciado un posible beneficio asociado a la coinfección de HPgV-1 y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En estos casos, se observaron resultados clínicos favorables, como la disminución de la carga viral de VIH, una mayor supervivencia y una mejor respuesta a la terapia antirretroviral, entre otros aspectos destacado (110). Esto podría explicarse mediante la interferencia molecular entre HPgV-1 y VIH durante la entrada en la célula diana. Además, se ha planteado la hipótesis de que la infección crónica por HPgV-1 podría desempeñar un papel en la modulación inmunológica del huésped a través de diversas estrategias de evasión viral (111). En este contexto, varios estudios han investigado los posibles efectos inmunomoduladores en pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos, como el hígado, corazón, pulmón y riñón. Sin embargo, la mayoría de estos estudios están limitados por el tamaño reducido de muestra incluido. Por tanto, nuestro objetivo es evaluar la utilidad de la monitorización del ADN de HPgV-1 como un posible marcador inmunológico en una cohorte significativa de pacientes sometidos a trasplante renal.

Con el objeto de dilucidar lo anteriormente expuesto, en el primer estudio (Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022) se evaluó:

- La prevalencia y cinética postrasplante del ADN de HPgV-1 en pacientes sometidos a trasplante renal.
- La cuantificación de ADN de HPgV-1 en muestras de plasma como posible predictor de infecciones postrasplante, rechazo del injerto y eventos adversos relacionados con la inmunosupresión.
- La correlación de HPgV-1 con parámetros inmunológicos y factores clínicos.
- La correlación entre la viremia de HPgV-1 y la carga de ADN de TTV.

2. Evaluar la utilidad de la monitorización de la carga viral de ADN de anellovirus para predecir la aparición de infecciones postrasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión y rechazo agudo del injerto, en comparación con la cuantificación de TTV, en pacientes sometidos a trasplante renal.

Conforme hemos expuesto previamente, en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido (TOS) y bajo tratamiento inmunosupresor, se ha observado que la familia *Anelloviridae* prevalece sobre otros virus en la sangre periférica. Sin embargo, aún existe un conocimiento limitado acerca de su dinámica postrasplante y las implicaciones clínicas asociadas.

Se ha demostrado que los niveles de ADNemia del TTV, el principal miembro del género *Alphatorquevirus*, varían en función del grado de inmunosupresión, lo que implica que cargas virales altas y bajas se relacionan con un mayor riesgo de infección o rechazo del injerto, respectivamente (39). A la luz de estos hallazgos, especulamos que la cuantificación de los niveles totales de ADN de anellovirus después de un trasplante de órgano sólido (TOS) puede capturar de manera más precisa las variaciones dinámicas en la inmunocompetencia que un único control de ADN de TTV.

Con el objeto de dilucidar lo anteriormente expuesto, en el segundo estudio (Forqué L. Transplantation. 2023) se llevó a cabo:

- Estudio de la dinámica absoluta y relativa de los géneros de anellovirus (*Alpha*, *Beta*, *Gamma torque virus*) en pacientes sometidos a trasplante renal.
- Estudio de la dinámica de ADN de anellovirus totales postrasplante.
- Estudio del valor predictivo de la cuantificación de ADN de anellovirus totales para el desarrollo de eventos adversos relacionados con la inmunosupresión, rechazo del injerto e infecciones graves, en comparación con la cuantificación de TTV en pacientes sometidos a trasplante renal.
- Análisis de la correlación entre la viremia de anellovirus totales y la carga de ADN de TTV.

3. Evaluar la utilidad de la monitorización de las cargas virales de TTV, AVT y HPgV-1 para predecir la aparición de eventos infecciosos y enfermedad de injerto contra huésped en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.

Como mencionamos anteriormente, existe una amplia evidencia experimental que respalda que la carga de *Anelloviridae* en el compartimento sanguíneo se comporta como un marcador sustituto del estado de inmunosupresión en receptores de trasplantes de órganos sólidos (TOS). Sin embargo, la dinámica de la carga de ADN de TTV y su asociación con eventos clínicos relacionados con el sistema inmunitario en el contexto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH) es más compleja debido al agotamiento de linfocitos provocado por el condicionamiento y el momento de la reconstitución de linfocitos.

Por otro lado, la ARNemia de HPgV-1 también parece estar relacionada con el sistema inmunitario del paciente trasplantado. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha informado ningún impacto de la ARNemia de HPgV-1 en los resultados clínicos en el contexto del TPH.

Con el fin de dilucidar estos hallazgos, los objetivos de este tercer estudio (Forqué L. J Med Virol. 2023) fueron los siguientes:

- Caracterizar la cinética plasmática de TTV, AVT y HPgV-1 en pacientes sometidos a TPH.
- Evaluar el valor predictivo de la cuantificación plasmática de AVT, TTV y HPgV-1 para la aparición de eventos infecciosos y la enfermedad de injerto contra huésped en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH).

4. Evaluar la utilidad de la monitorización de la carga de ADN de TTV para predecir la aparición de eventos infecciosos nosocomiales que conducen a un mal pronóstico, así como la mortalidad en pacientes críticos con COVID-19.

En otros contextos clínicos, se ha reportado la presencia de niveles elevados de TTV en el plasma y las vías respiratorias, especialmente en individuos con trastornos pulmonares crónicos de naturaleza inflamatoria, como el asma, las bronquiectasias crónicas o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en comparación con personas sanas. Si bien la capacidad del TTV para desencadenar respuestas inflamatorias, como se ha demostrado en estudios *in vitro*, podría explicar estas observaciones, también es posible que los entornos proinflamatorios impulsen la replicación del TTV.

En este contexto, postulamos que, debido a la presencia de linfopenia y la generación excesiva de citocinas proinflamatorias en casos graves de COVID-19, es posible que ambas condiciones tengan un impacto en la replicación del TTV.

Para respaldar esta hipótesis, en este cuarto estudio (Forqué L. J Clin Virol. 2022 Mar), nos propusimos evaluar los siguientes objetivos:

- Estudio de la cinética de ADN de TTV en plasma en pacientes críticos con COVID-19.
- Análisis de la correlación de la ADNemia de TTV con el recuento absoluto de linfocitos (ALC) y niveles séricos de parámetros inflamatorios como (IL-6, PCR, LDH, D-dímero y ferritina)
- Estudio de la utilidad de la cuantificación de la ADNemia de TTV como indicador predictivo de eventos infecciosos, como bacteriemia, fungemia y neumonía asociada a ventilación mecánica, y su relación con la mortalidad en pacientes críticos con COVID-19.

Además, el TTV es un virus hepatotrópico y se ha asociado históricamente con enfermedad hepática aguda y crónica, aunque faltan pruebas formales que respalden esta suposición (112). A su vez, la lesión hepática aguda se desarrolla con frecuencia en COVID-19 y se asocia con un mal pronóstico. Por ello, en este estudio evaluamos también:

- La asociación de los niveles séricos de transaminasas (GOT/GTT/GPT) con la ADNemia de TTV.

METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

1. Pacientes

Los estudios incluidos en esta tesis doctoral incluyeron cohortes de pacientes sometidos a trasplante, tanto de progenitores hematopoyéticos como de órgano sólido, así como pacientes críticos con COVID-19. Todos estos estudios compartieron la característica metodológica de ser observacionales y monocéntricos, pero difirieron en cuanto al enfoque prospectivo o retrospectivo del análisis.

Tanto el primer estudio (Fernández-Ruiz M. *Transpl Infect Dis.* 2022) como el segundo estudio (Forqué L. *Transplantation.* 2023) utilizaron la misma cohorte de pacientes sometidos a trasplante renal en el Hospital Universitario 12 Octubre de Madrid. Ambos estudios fueron prospectivos e incluyeron pacientes sometidos a trasplante renal en el período comprendido entre los años 2014 y 2016.

El tercer estudio (Forqué L. *J Med Virol.* 2023), llevado a cabo de manera retrospectiva, incluyó una cohorte de pacientes sometidos a trasplante hematopoyético en el Hospital Clínico Universitario de Valencia durante el período comprendido entre los años 2017 y 2021.

El cuarto estudio (Forqué L. *J Clin Virol.* 2022), evaluó de forma prospectiva pacientes diagnosticados con COVID-19 que fueron ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Clínico Universitario de Valencia durante el período comprendido entre los años 2020 y 2021.

La Tabla IV.1 presenta información detallada sobre el número de pacientes incluidos en cada estudio, así como su edad, las fechas de los trasplantes, los días de seguimiento y los centros involucrados.

Tabla IV.1. Características metodológicas del estudio, incluyendo tipo de estudio, centro, tipo de trasplante, número de pacientes, fecha del estudio, número muestras y días de seguimiento.

Estudio	Tipo	Centro	Tipología	N.º de pacientes	Fecha de trasplantes	Nº muestras	Días de seguimiento
Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022	PP	H12OM	Renal	199	Noviembre 2014 - diciembre 2016	1050	365
Forqué L. Transplantation. 2023	PP	H12OM	Renal	195	Noviembre 2014 - diciembre 2016	1027	365
Forqué L. J Med Virol. 2023	RP	HCUV	Alo-TPH	75	Enero 2017- diciembre 2021	364	180
Forqué L. J Clin Virol. 2022	PP	HCUV	NP	50	Octubre 2020 - febrero 2021	NP	NP

Abreviaturas: HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia; H12OM: Hospital 12 Octubre de Madrid; NP: No Procede; PP: Prospectivo; RP: Retrospectivo.

El conjunto de datos clínicos-demográficos de los pacientes incluidos en cada uno de los trabajos viene detallado en cada una de las publicaciones correspondientes. Así mismo, como se detalla en cada artículo, todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia para la realización de las pruebas microbiológicas realizadas sobre los pacientes.

2. Muestras de plasma y exudado nasofaríngeo

Para llevar a cabo estos estudios, se recopilaron muestras de plasma en momentos preestablecidos y se criopreservaron a -80°C hasta su posterior análisis. Con el fin de evitar la degradación del material genético de las muestras, estas se descongelaron únicamente una vez antes de su análisis.

En el primer estudio (Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022) que examinó la dinámica del Pegivirus en pacientes sometidos a trasplante renal, se analizaron un total de 1050 muestras de plasma recogidas en los siguientes momentos específicos: 6 horas antes del trasplante, en el día +7 y en los meses +1, +3, +6 y +12 después del trasplante.

En el segundo estudio (Forqué L. Transplantation. 2023) que examinó la cinética viral de los anellovirus totales, se analizó un total de 1027 muestras de plasma recogidas en los siguientes tiempos preestablecidos: antes del trasplante, en el día +7 y en los meses +1, +3, +6 y +12 después del trasplante. Adicionalmente, se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento (HTS) con el fin de analizar la abundancia genómica absoluta de los *Gammatorquevirus*, *Betatorquevirus* y *Alphatorquevirus* en las muestras de plasma obtenidas antes del trasplante, así como en los meses +1, +3, +6 y +12 posteriores al trasplante

En el tercer estudio (Forqué L. J Med Virol. 2023), se calcularon las cargas virales de TTV, AVT y HPgV-1 en un total de 364 muestras de plasma recolectadas en los siguientes momentos predefinidos: pretrasplante, día del trasplante (línea de base) y en los meses +1, +2, +3, +4 y +6 después del trasplante

En el cuarto estudio (Forqué L. J Clin Virol. 2022) se evaluó la capacidad predictiva de la dinámica del TTV en la aparición de eventos infecciosos y la mortalidad en pacientes en estado crítico con COVID-19. Para este estudio, se recolectaron muestras de plasma semanalmente desde el ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) hasta el alta o fallecimiento del paciente.

Asimismo, en este estudio se recolectaron muestras de exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de COVID-19. Estas muestras fueron recolectadas en el primer día de ingreso en la UCI y posteriormente enviadas al laboratorio de microbiología para su análisis inmediato tras su recepción.

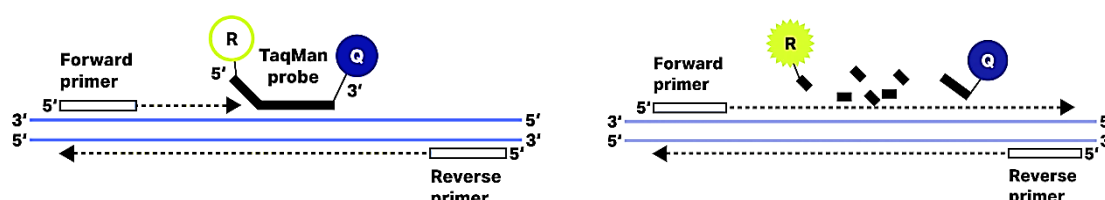
3. Cuantificación de ADN: Extracción y amplificación.

3.1 Extracción

Previa a la cuantificación de la carga viral de Anellovirus Totales (AVT), Pegivirus Humano 1 (HPgV-1) y Torque Teno Virus (TTV), se llevó a cabo un proceso de extracción de ADN. El ADN se extrajo a partir de 200 µL de plasma mediante el kit de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método de extracción se basa en la tecnología BOOM, que emplea partículas de sílice magnéticas para facilitar la extracción del material genético, permitiendo la lisis, fijación, lavados y elución en un único pocillo.

3.2 Amplificación y cuantificación de HPgV-1

La cuantificación del ARN de HPgV-1, que se realizó en el primer y tercer estudio (Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022, Forqué L. J Med Virol. 2023,) en muestras de plasma se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real previamente descrita (113,114) 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 cuantificación del ARN de HPgV-1 en muestras de plasma se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa reversa (RT-PCR) de una sola etapa en el instrumento ABI Prism 7500 (PE Biosystems, Foster City, CA). Esta PCR está dirigida a amplificar la región conservada no traducida en el extremo 5' (5'UTR) (110).

Los primers y la sonda utilizada para la cuantificación del virus HPgV-1 se muestran en la tabla IV.2 (110).

Tabla IV.2. Descripción de la sonda y los primers utilizados para la cuantificación de HPgV-1

Sonda y primers	Posición	Secuencia de oligonucleótidos
Forward primer	96 - 110	5'-GGC GAC CGG CCA AAA-3'
Reverse primer	163 - 188	5'-CTT AAG ACC CAC CTA TAG TGG CTA CC-3'
TaqMan sonda	131 - 158	5'-FAM -TGA CCG GGA TTT ACG ACC TAC CAA CCC T-TAMRA-3'

Las características de la PCR son las siguientes:

Para cada muestra se llevó a cabo una reacción de PCR. Cada reacción contenía 11 µL de ARN extraído previamente de la muestra utilizando el método de extracción mencionado anteriormente. Al eluido se añadió 19 µL de una mezcla de reacción de PCR compuesta por los siguientes componentes: 15 µL de ABI TaqMan Master Mix (2x), 0.75 µL de superscript III RT platinum Taq mix, 0.18 µL de cada uno de los cebadores (forward y reverse) (50 µM, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE. UU.), 0.06 µL de sonda Taqman-ABI (100 µM), 0.3 µL de Rnasin (40 U/µL) y 1.8 µL de agua libre de ARNasas y DNasas (Tabla IV.3).

Tabla IV.3. Composición de la mezcla de reacción de la PCR empleada en el ensayo para la cuantificación de HPgV-1 por muestra analizada.

	Cantidad (µL)/reacción.
TaqMan MMX (2x)	15 µL
Superscript III RT Platinum	0,75 µL
Forward primer (50µM)	0,18 µL
Reverse primer (50µM)	0,18 µL
Sonda TAMRA (fluorescente)	0,06 µL
RV/ t-sin 40U/mL	0,3 µL
ROX diluido 1/10	0,6 µL
H2O	1,8 µL

El protocolo de amplificación empleado (Figura IV.1) consistió en una primera etapa de desnaturalización inicial con unas condiciones de ejecución de 50° C durante 20 minutos y 95° C durante 2 min, seguidos de 40 ciclos a 95° C durante 15 segundos y un último paso de extensión a 58°C durante 1 min.

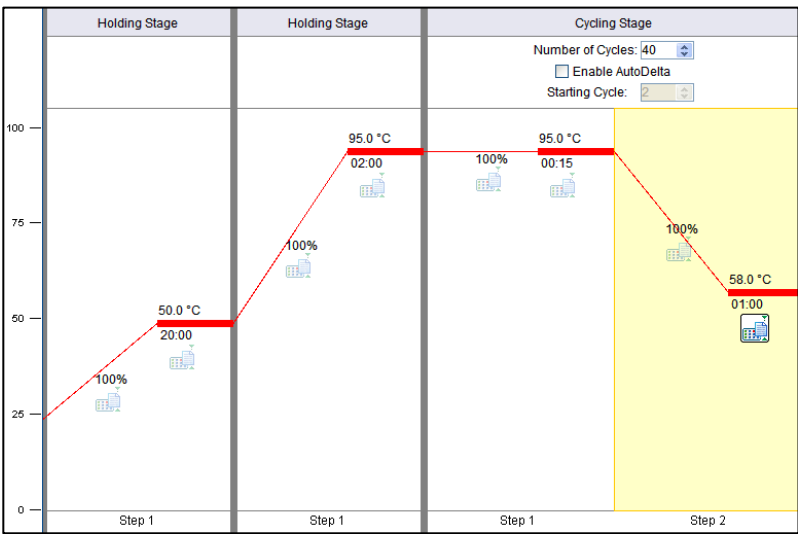


Figura IV.1. Protocolo de PCR de HPgV-1.

La cuantificación, en número de copias por mililitro de muestra, se obtuvo extrapolando el valor de Ct (*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. El estándar consistió en una secuencia del genoma de HPgV (GenBank AF121950) clonada en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) que nos cedió el Profesor J Stapleton (The Iowa City Veterans Affairs Medical Center, Iowa City, IA, USA).

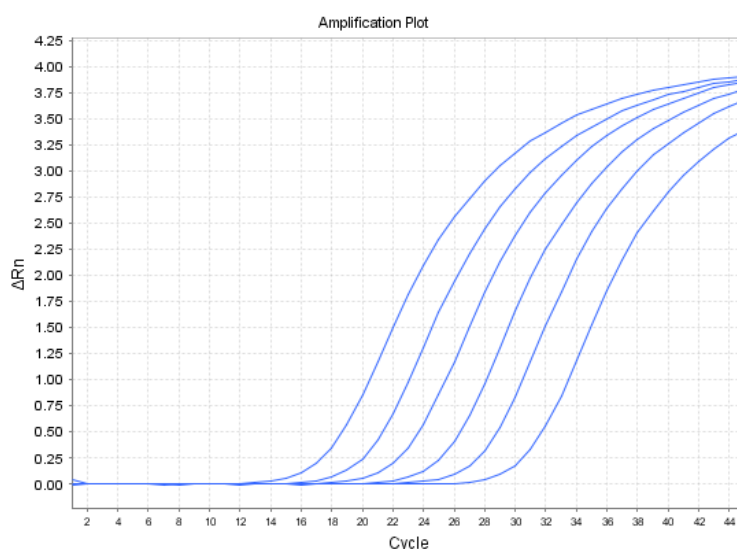


Figura IV.2. Curvas de amplificación correspondientes a las rectas de calibrado entre las concentraciones de 10^6 y 10^2 copias/mL.

De acuerdo con nuestra experiencia, el límite inferior de detección fue de 10 copias/mL, mientras que el límite inferior de cuantificación fue de 25 copias/mL. Las cargas virales se expresaron como copias/ μ L de reacción y como copias/mL de plasma utilizando un factor de conversión de 27.27 copias/ μ L de reacción.

3.3 Amplificación y cuantificación de TTV

La cuantificación de ADN de TTV, realizada en el tercer y cuarto trabajo (Forqué L. J Med Virol. 2023 y Forqué L. J Clin Virol. 2022 Mar), en muestras de plasma se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real

previamente descrita (113,114) utilizando la tecnología TaqMan de Applied Biosystem (PE Biosystems, Foster City, CA, EE. UU), como se ha detallado anteriormente.

Las cargas de ADN fueron cuantificadas utilizando el kit R-gen de TTV (ARGENE range, bioMérieux). Este kit se basa en una técnica de PCR desarrollada por Fabrizio Maggi (64,115). Esta PCR se enfoca en un segmento altamente conservado de la región 5' no traducida (5'UTR) del genoma viral, con más del 90% de identidad entre diversos aislados de TTV. La PCR de TTV, al igual que la de HPgV-1, se llevó a cabo en el sistema ABI Prism 7500 de PE Biosystems, ubicado en Foster City, CA, EE. UU.

Los primers y la sonda utilizados para la cuantificación de TTV se detallan en la Tabla IV.4 (64):

Tabla IV.4. Descripción de los primers utilizados para la cuantificación de TTV.

Sonda y primers	Posición	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') ^a
AMT-S Forward	177 - 194	5'-GTG CCG IAG GTG AGT TTA -3'
AMT-AS Reverse	226 - 239	5'-AGC CCG GCC AGT CC-3'
AMTP-TU TaqMan	205 - 223	5' FAM- TCA AGG GGC AAT TCG GGC T-TAMRA 3'

^aI denota inosina, W denota A o T, K denota G o T, M denota A o C, R denota A o G, Y denota C o T y S denota CoG.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR y la cantidad de eluido de extracción necesaria se detallan a continuación:

Se realizó una reacción de PCR para cada muestra, utilizando 5 µL del eluido de extracción de la muestra y 20 µL de la mezcla de reacción de PCR previamente preparada con los reactivos correspondientes. Las cantidades exactas de los reactivos utilizados en la composición de la mezcla para cada muestra se encuentran detalladas en la siguiente tabla (Tabla IV.5):

Tabla IV.5. Detalle de la composición de la mezcla empleada para la detección de TTV por cada reacción de PCR.

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

El proceso de amplificación consistió en dos etapas repetidas cíclicamente 45 veces. Una primera etapa de desnaturalización (95° C, 15 segundos) y una segunda de extensión (50°, 30 segundos), precedidas ambas por una única etapa de desnaturalización inicial, que consistió en un primer paso de 2 min a 50° C y un segundo paso de 95° C durante 10 min (Figura IV.3)

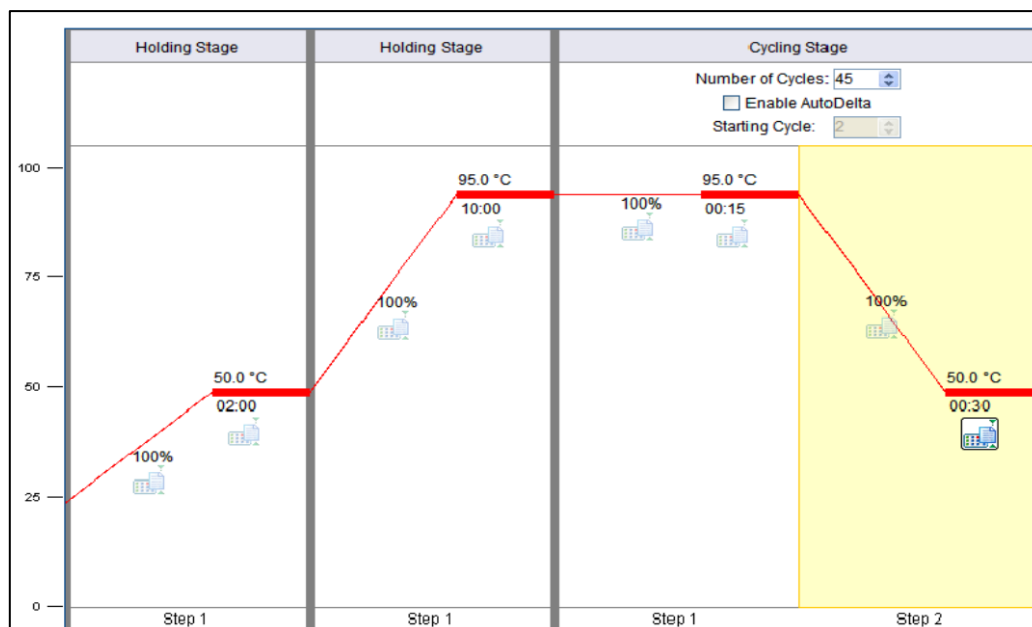


Figura IV.3. Protocolo de PCR de TTV.

El número de copias por mililitro de muestra se obtuvo extrapolando el valor de Ct (Cycle Threshold) de cada una de las muestras en una recta de calibrado. La recta de calibrado se calculó del mismo modo que para HPgV-1.

El estándar utilizado para construir la recta de calibrado consistió en una secuencia del genoma de TTV amplificada con los primers AMTS y AMTAS y clonada en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) descrito previamente por el profesor Fabrizio Maggi y facilitado por él (81).

En este caso, el límite de cuantificación del ensayo también fue 25 copias/ mL y el límite de detección 10 copias/ mL.

3.4 Amplificación y cuantificación de AVT

El ADN de los anellovirus totales se midió en muestras de plasma mediante un ensayo PCR “in-house” dirigido a la región no traducida (UTR), cuyo diseño se basó en un protocolo publicado previamente (116). Este método de PCR específico permite

amplificar simultáneamente los ADN genómicos de los tres géneros de anellovirus que infectan a humanos (*Alphatoquevirus*, TTV, *Betatorquevirus*, TTMV y *Gammatorquevirus*, TTMDV)

Los primers utilizados para la cuantificación de anellovirus totales son los que aparecen en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Descripción de los primers empleados para la cuantificación de Anellovirus totales (AVT).

Primers	Posición	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') ^a
NG779 Forward	99 - 118	5'- ACW KMC GAA TGG CTG AGT TT – 3'
NG781 Reverse	208 - 227	5'- CCC KWG CCC GAR TTG CCC CT – 3'

^a W denota A o T, K denota G o T, M denota A o C, R denota A o G, Y denota C o T, S denota C o G, y B denota C, G, o T.

Se utilizaron 0,5 µL de cada cebador universal (5 µmol/L) y 4 µL de HOT FIREPol ® SolisGreen qPCR Mix (Solis BioDyne, Teaduspargi, Estonia) como agente intercalante y 10 µL de agua libre de RNA para formar una mezcla con un volumen final de 15 µL por muestra como aparece en la Tabla IV.7:

Tabla IV.7. Composición de la mezcla por reacción de PCR empleada en el ensayo para la cuantificación de Anellovirus totales.

HOT FIREPol ® SolisGreen qPCR Mix (oscuridad)	4 µL
Forward (NG779)	0,5 µL
Reverse (NG781)	0,5 µL
H2O	10 µL

A esta mezcla se le añadió posteriormente 5 µL del eluido resultante del proceso de extracción obteniendo un volumen final por pocillo de reacción de 20 µL.

Las condiciones de PCR consistieron en 90 segundos a 95° C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94° C y un minuto a 68° C.

Se construyó una curva estándar por triplicado para cada ejecución y los niveles totales de ADN de anellovirus se expresaron como copias/mL de plasma después de ajustar el método de extracción.

La cuantificación, en número de copias por mililitro de muestra, se obtuvo extrapolando el valor de Ct (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. El límite de detección fue 1,4 copias por reacción.

Se utilizó un plásmido (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, MA) que contiene un segmento de 129 pb de la región no traducida del ADN (desde el nucleótido 99 hasta el 227) del aislado TA278 del genotipo TTV (número de acceso AB008394) para la cuantificación de ADN de los anellovirus totales (116).

3. Secuenciación de alto rendimiento y análisis bioinformático.

Para el segundo estudio (Forqué L. Transplantation. 2023) se amplificaron secuencias genómicas altamente conservadas de los diferentes géneros de *Anelloviridae* mediante un ensayo de PCR multiplex "in-house". Los amplicones se secuenciaron en una plataforma MiSeq® Reagent Kit v2 (300 ciclos) (todos de Illumina, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se excluyeron las secuencias menores a 1 bp y mayores a 150 bp. El alineamiento de secuencias se realizó con la base de datos actualizada hasta marzo de 2018 (disponible en ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/ref_viruses_rep_genomes.tar.gz). Los parámetros de filtrado fueron los siguientes: lecturas superiores a 65 bp y al menos un 85% de coincidencia con la secuencia de referencia.

Para realizar el análisis, se calculó el porcentaje del número de lecturas de los géneros *Alpha*, *Beta* y *Gammatorquevirus* a partir del número total de lecturas realizadas en cada muestra determinada. El número de recuentos de lecturas para cada género fue proporcional a la carga de ADN respectiva en esa muestra (115).

4. Parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos como el recuento de leucocitos, linfocitos totales y subpoblaciones de linfocitos (CD3+, CD4+ y CD8+), así como los niveles séricos de ferritina, dímero D, proteína C reactiva, interleucina-6, lactato deshidrogenasa, gamma-glutamyl transferasa, alanina transaminasa y aspartato transaminasa, se obtuvieron a partir de los análisis programados de los pacientes mediante sistemas informáticos.

5. Definiciones

En esta sección se exponen las definiciones de las variables que han sido incluidas en los estudios realizados en la presente tesis doctoral.

En cuanto a las variables incluidas en el primer y segundo trabajo que incluyó a pacientes sometidos a trasplante renal (Fernández-Ruiz M. *Transpl Infect Dis.* 2022 y Forqué L. *Transplantation.* 2023) se encuentran principalmente: **infección postrasplante, evento adverso relacionado con la inmunosupresión (iRAE) y rechazo agudo del injerto.**

El diagnóstico de **infección postrasplante** requería uno o más de los siguientes criterios: a) cultivo positivo de un microorganismo inequívocamente patógeno (p. ej. *Mycobacterium tuberculosis*) a partir de cualquier muestra; b) aislamiento de cualquier microorganismo a partir de una muestra obtenida en condiciones estériles; c) aislamiento de un microorganismo potencialmente patógeno a partir de cualquier muestra asociada con síntomas o signos de infección local o sistémica; y/o d) datos clínicos sugestivos de infección sin aislamiento microbiológico y resolución completa bajo tratamiento antimicrobiano. Solo los episodios que requirieron ingreso hospitalario para la administración de terapia antimicrobiana parenteral se calificaron como **infección grave postrasplante.**

La definición de **iRAE** (del inglés, *immunosuppression-related adverse events*) abarcó la infección oportunista y el cáncer de novo después del trasplante. Se estableció con el propósito de identificar eventos clínicamente relevantes cuya patogenia puede atribuirse a una disfunción en la respuesta inmune mediada por células T (117).

Por otro lado, se consideró **infección oportunista** aquella originada por bacterias intracelulares (*Listeria monocytogenes*, *Nocardia spp.* o micobacterias), herpesvirus (Citomegalovirus [CMV], virus del herpes simple [HSV] y virus varicela-zóster [VZV], virus Epstein Baar [EBV]), levaduras (*Candida spp.* y *Cryptococcus spp.*), hongos (*Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus spp.* y mucorales,) y protozoos (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania spp.*) (118). Se consideraron infecciones oportunistas la nefropatía asociada a poliomavirus BK, enfermedad por citomegalovirus y la infección fúngica invasiva.

La **nefropatía asociada al poliomavirus BK**, se definió como una infección y lesión en el tejido renal causada por el poliomavirus BK, con el potencial de ocasionar

disfunción del injerto renal y, en situaciones más severas, pérdida del injerto. Se consideró demostrada cuando se evidenciaron cambios citopáticos en las células epiteliales tubulares, confirmados posteriormente mediante técnicas de inmunohistoquímica o hibridación in situ. Por otro lado, se consideró probable cuando se detectó una ADNemia plasmática superior a $4,0 \log_{10}$ copias/ml, con un aumento en al menos una de las dos mediciones realizadas en un período inferior o igual a 3 semanas (119).

El **diagnóstico de enfermedad por CMV** se diagnosticó según criterios clínicos y de laboratorio previamente informados por Ljungman *et al.* Esta requería infección activa por CMV, es decir, detección o aislamiento de proteínas virales o material genético del virus en algún tejido o fluido del organismo y la presencia de síntomas atribuibles. La enfermedad por CMV se clasificó como enfermedad orgánica o síndrome por CMV (120).

La **enfermedad orgánica** comprende las categorías posible, probable y probada, y esta última requería la documentación de la replicación del CMV en muestras del órgano afectado mediante cultivo viral, inmunohistoquímica, histopatología o detección de ADN del virus mediante PCR, en presencia de manifestaciones clínicas atribuibles. El **síndrome por CMV** se definió por la presencia de infección por CMV, más fiebre, más al menos uno de los siguientes: leucopenia (recuento de glóbulos blancos [WBC] $< 3,50 \times 10^3$ células/ μ l si el recuento inicial de WBC era $\geq 4,00 \times 10^3$ células/ μ l o una disminución $> 20 \%$ si el recuento de glóbulos blancos inicial era $< 4,00 \times 10^3$ células/ μ l); linfocitosis atípica ($\geq 5\%$); trombocitopenia (recuento de plaquetas $< 100 \times 10^3$ células/ μ l si el recuento inicial fue $\geq 115 \times 10^3$ células/ μ l o una disminución $> 20 \%$ si el recuento inicial de plaquetas fue $< 115 \times 10^3$ células/ μ l); o elevación de ALT o AST de más de 2 veces el límite superior de lo normal (120).

La **enfermedad fúngica invasiva probada o probable** se definió de acuerdo con los criterios actualizados de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosi (EORTC/MSGERC) del 2020 (121).

El **rechazo agudo del injerto** se sospechaba en caso de deterioro repentino y sin explicación de la función del injerto y se diagnosticó por examen histológico si era posible o por respuesta al tratamiento antirrechazo empírico (122).

La **infección persistente por HPgV-1 después del trasplante**, se definió como la demostración de ARN de HPgV-1 en todas las muestras analizadas obtenidas después del trasplante en un paciente determinado.

En cuanto a las variables incluidas en el tercer trabajo que incluyó a pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Forqué L. J Med Virol. 2023) se incluyeron: **evento infeccioso** y la **enfermedad de injerto contra huésped**. El evento infeccioso abarcó la neumonía por SARS-CoV-2, la neumonía por CMV y la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, la cistitis hemorrágica asociada al poliomavirus BK y la DNAemia por CMV.

La **neumonía causada por citomegalovirus** probada se diagnosticó según criterios clínicos y de laboratorio previamente informados por Ljungman *et al.* El ADN del CMV se cuantificó en muestras de plasma mediante una PCR de CMV (120).

La **neumonía causada por SARS-CoV-2** se definió como la presencia de síntomas de enfermedad del tracto respiratorio inferior e infiltrados pulmonares en radiografía de tórax o tomografía computarizada de tórax, junto con la detección de ARN de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias utilizando la prueba de RT-PCR para COVID-19.

La **neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii*** se definió como la presencia de síntomas clínicos con hallazgos radiológicos sugestivos, junto con un resultado positivo en la PCR de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de lavado broncoalveolar en ausencia de un diagnóstico alternativo.

La **cistitis hemorrágica asociada al poliomavirus BK** (BKPvV-HC) se definió como inflamación en la vejiga urinaria causada por la infección del virus BK, que puede provocar síntomas como hematuria (presencia de sangre en la orina) y disuria (dolor al orinar). Se diagnosticó siguiendo las directrices clínicas establecidas por la Conferencia Europea sobre Infecciones en Leucemia (ECIL)(123) . La cuantificación del ADN del virus BK se realizó en muestras de plasma utilizando la técnica de PCR específica para el virus BK (PCR de BKV).

En el cuarto trabajo (Forqué L. J Clin Virol. 2022), que incluyó pacientes diagnosticados con COVID-19, las variables principales fueron: **evento infeccioso** y **mortalidad**. El evento infeccioso abarcó la bacteriemia, fungemia y la neumonía asociada a ventilación (VAP), previamente descritas (124,125).

4. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se mostraron como media $\pm$ desviación estándar (DE) para aquellas variables con distribución normal o como mediana con rango intercuartílico (IQR) si no se cumplía el supuesto de normalidad. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas. Las variables categóricas se compararon con la prueba de chi-cuadrado χ^2 .

Se aplicó la prueba t Student o ANOVA para comparar las medias de variables continuas de dos o más grupos, respectivamente, cuando los datos seguían una distribución normal. Por el contrario, se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney, Wilcoxon y Kruskal-Wallis, como alternativa a la prueba t Student y ANOVA para comparar las medianas de dos o más grupos, cuando los datos no siguieron una distribución normal.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) o el coeficiente de correlación de Spearman (rho) para evaluar la relación entre variables continuas, dependiendo de si se asumió una distribución normal y una relación lineal, respectivamente. Las cargas virales se transformaron $\log_{10}$ para el análisis.

Para la identificación de los diferentes factores de riesgo para ciertos eventos clínicos se empleó un análisis de regresión de Cox, univariante y multivariante. El análisis multivariante sólo se permitió para aquellos parámetros con una estimación de valor P menor a 0,1 en el modelo univariante. El área bajo la curva (AUC) de valores plasmáticos de ADN de TTV se calculó con el programa estadístico Graphpad PRISM.

Se informaron los valores de P bivariados, considerándose estadísticamente significativos aquellos iguales o inferiores a 0,05.

En el análisis de la asociación entre los niveles totales de ADN de anellovirus, TTV y Pegivirus y los resultados clínicos, se preservó la relación temporal entre la evaluación del biomarcador y la ocurrencia del evento a predecir.

El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.) y los gráficos se realizaron con Prism versión 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión se presentan en cuatro partes, correspondientes a los objetivos anteriormente presentados. En primer y segundo lugar, se presentan los resultados de los dos primeros estudios donde propusimos dilucidar la utilidad de la monitorización de la carga de ADN de HPgV-1 y AVT como biomarcador de inmunosupresión en una cohorte de pacientes sometidos a trasplante renal. En tercer lugar, con un objetivo análogo al anterior, planteamos esclarecer la utilidad de la monitorización de HPgV-1, AVT y TTV en una cohorte de pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. En cuarto lugar, se presentan los resultados del último estudio en el cual evaluamos la utilidad de la monitorización de la carga de TTV como marcador pronóstico en pacientes críticos con COVID-19.

1. Utilidad de la monitorización de la carga viral plasmática de ADN de HPgV-1 para predecir la aparición de infecciones postrasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión y rechazo agudo del injerto en pacientes sometidos a trasplante renal.

A continuación, se muestran los resultados de este primer estudio (Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022) en el que nos propusimos estudiar la utilidad clínica de la monitorización de HPgV-1 como marcador de la función inmunitaria, debido a su aparente efecto inmunomodulador en pacientes coinfectados con VIH y su capacidad característica para inducir una infección crónica al evadir el sistema inmune.

Para llevar a cabo este estudio, se reclutó una cohorte de 199 pacientes que habían sido sometidos a trasplante renal. De estos, 142 (71,4%) eran hombres y 57 (28,6%) eran mujeres. La edad media de los pacientes fue de $53,9 \pm 15,4$ años. Un total del 94% de los pacientes recibieron un solo trasplante renal, mientras que 9 casos (4,5%) recibieron simultáneamente un doble trasplante renal-páncreas y en 3 casos (1,5%) se llevó a cabo un doble trasplante renal-hígado. Las demás características demográficas y clínicas se describen detalladamente en la Tabla 1 del primer estudio de esta tesis doctoral (Fernández-Ruiz M. Transpl Infect Dis. 2022).

Tras una mediana de seguimiento de 500 días (RIC: 437-543), se registró que un total de cuatro pacientes (2,0%) experimentaron pérdida del injerto, mientras que otro paciente (0,5%) falleció, lo cual resultó en una tasa de supervivencia anual del injerto del 97,9%. En relación con los posibles factores asociados a la infección por HPgV-1, se

observó que dos pacientes (1,0%) tenían antecedentes de consumo de drogas intravenosas (IDUs), 16 pacientes (8,0%) presentaban infección por el virus de la hepatitis C (VHC), y 76 pacientes (38,2%) habían recibido transfusiones de sangre previas al trasplante.

1.1 Cinética plasmática de la carga viral de HPgV-1 en el trasplante renal

Se realizó un análisis del ARN de HPgV-1 en 1050 muestras de plasma con una mediana de seis puntos de seguimiento por paciente (IQR: 5-6). La detección del ARN de HPgV-1 se presentó en el 16,5% (172/1050) de las muestras y en el 26,1% (52/199) de los pacientes. Además, se observó un aumento en la tasa de infección, pasando del 14,7% (25/170) antes del trasplante al 19,1% (34/178) un año después del trasplante ($p=0,07$) (Figura V.1).

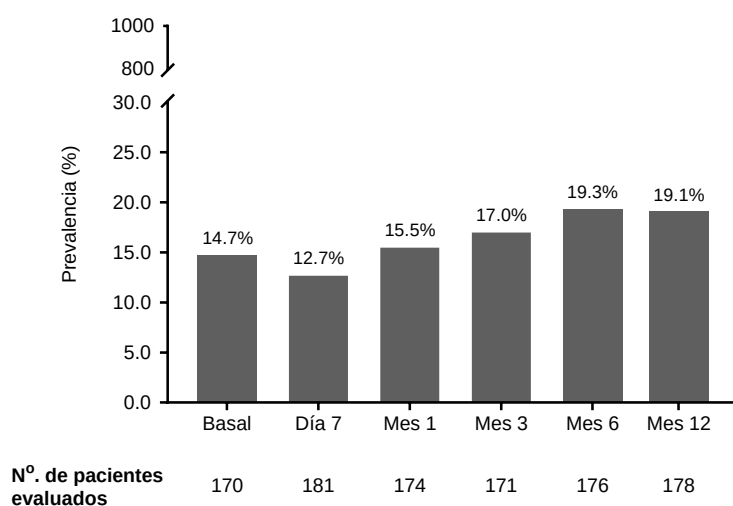


Figura V.1. Prevalencia de ARN de HPgV-1 en plasma calculada en diferentes puntos temporales respecto al trasplante.

En cuanto a las cargas virales de HPgV-1, se observó que solo dos de 52 pacientes (3,8%) mostraron cargas negativas de HPgV-1 después de haber tenido una carga basal positiva.

Además, se encontró que el 13,8% (20/145) de los pacientes que inicialmente tenían una carga basal negativa para HPgV-1 antes del trasplante, presentaron al menos una carga positiva posterior, lo que sugiere una infección postrasplante de novo. Se observó que el 8,5% (17/199) de los pacientes presentaron persistencia de la infección por HPgV-1, la cual se define como la detección continua de ARN de HPgV-1 en todas las muestras analizadas después del trasplante.

Al analizar la cinética de las cargas de ARN de HPgV-1 en 52 pacientes con cargas positivas para HPgV-1, se observó un incremento no significativo en los niveles de ARN de HPgV-1 desde el inicio (antes del trasplante) hasta el mes 12 ($2,2 \pm 1,7$ frente a $3,4 \pm 1,6$ log₁₀ copias/μl; $p = 0,11$), como se representa en la Figura V.2.

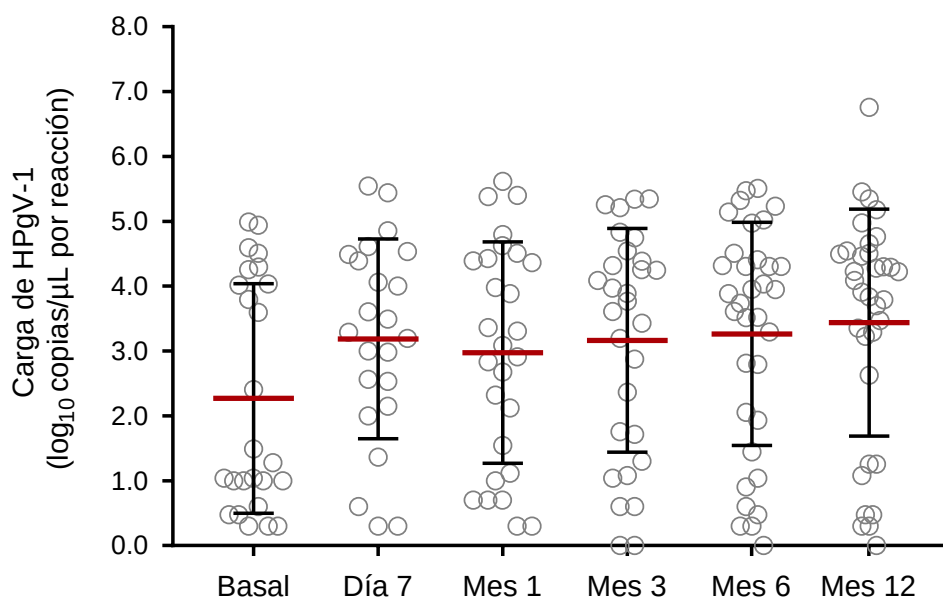


Figura.V.2. Cinética de los niveles plasmáticos de ARN de HPgV-1 desde el momento basal hasta el mes 12 después el trasplante.

La carga máxima de ARN de HPgV-1 durante los tres primeros meses postrasplante fue de $3,3 \pm 1,7$ log₁₀ copias/μl.

En los pacientes evaluables, es decir, aquellos con al menos dos cargas detectables de HPgV-1 durante el primer mes, se observó una variación en la cinética del virus. Como se muestra en la Figura V.3 el 64% (16/25) mostraron una cinética ascendente, representada por la línea roja, mientras que el 36% (9/25) mostraron una cinética estable o descendente, representada por la línea azul. En los primeros 3 meses después del trasplante, se continuó observando esta tendencia. El 75,0% (24/32) de los pacientes mostraron una cinética ascendente, mientras que el 25,0% (8/32) mostraron una cinética estable o descendente.

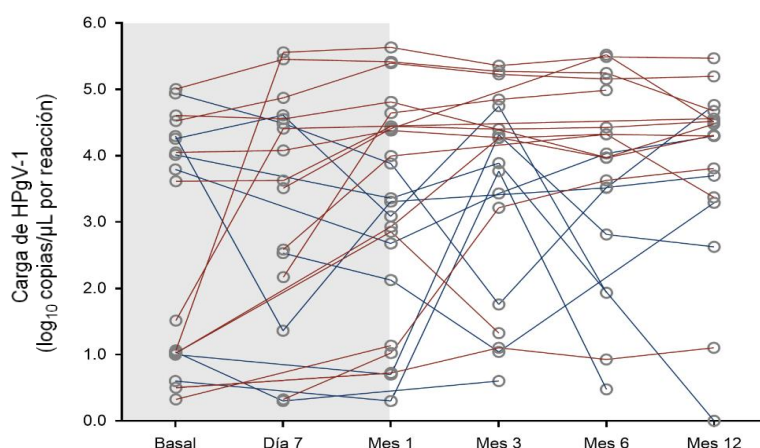


Figura V.3. Trayectorias individuales de los niveles de ARN de HPgV-1 en plasma de acuerdo con la cinética viral durante el primer mes después del trasplante se muestran en el área gris. Las trayectorias ascendentes y no ascendentes (es decir, estables o decrecientes) se muestran en líneas rojas y azules, respectivamente. Solo se consideraron los pacientes con ≥ 2 puntos de monitorización positivos para ARN de HPgV-1 durante el primer mes ($n = 25$). HPgV-1: pegivirus humano tipo 1.

1.2 Factores de riesgo asociados a la infección por HPgV-1

Se llevó a cabo un análisis de regresión logística para investigar la posible asociación entre la infección por HPgV-1 y una serie de factores, tanto demográficos como clínicos. Se estudiaron un amplio conjunto de variables que se encuentran detalladas en la Tabla 1 del primer trabajo de esta tesis doctoral (Fernández-Ruiz M., *Transpl Infect Dis.* 2022). Algunas de estas variables incluyen edad, estado serológico de CMV, diálisis peritoneal, tipo de donante, tipo de trasplante, régimen de inmunosupresión, así como comorbilidades crónicas pretrasplante como hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus, entre otras.

Se observó que los pacientes con cargas detectables de HPgV-1 tenían una edad más baja ($50 \pm 16,1$ frente a $55,1 \pm 15,1$ años; $p = 0,058$).

Además, a través de un análisis univariante inicial, observamos que la presencia de hipertensión pretrasplante y dislipemia actúan como factores protectores contra la infección por HPgV-1 (70% vs 90.5%; $p < 0,001$ y 44% vs 61%; $p = 0.04$, respectivamente). Por otro lado, identificamos cuatro factores de riesgo asociados a la infección por HPgV-1: trasplante previo de órgano sólido (22% frente a 17%; valor de $p = 0.04$), trasplante de doble órgano sólido (16% frente a 2.7%; valor de $p = 0.002$),

donación después de muerte encefálica (DBD) (78% frente a 60%; valor de $p = 0.02$) y la transfusión de hemoderivados durante la cirugía del trasplante (24% frente a 10%; valor de $p = 0.013$). Los resultados del análisis se presentan en la Tabla V.1.

Tabla V.1. Análisis de regresión logística univariante y multivariante de los factores que predicen la detección de ARN de HPgV-1.

	Análisis univariante			Análisis multivariante ^a		
	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
Edad del receptor	0.98 ^b	0.96 – 1.00	0.059	-	-	-
Hipertensión pretrasplante	0.24	0.11 – 0.55	0.001	0.23	0.09 – 0.55	0.001
Dislipemia pretrasplante	0.50	0.26 – 0.96	0.037	-	-	-
Trasplante previo de órgano sólido	2.34	1.01 – 5.47	0.049	-	-	-
Doble trasplante de órgano (riñón-páncreas e hígado-riñón)	6.91	1.98 -24.1	0.002	5.62	1.52 – 20.8	0.010
Donante DBD	2.32	1.10 – 4.89	0.027	2.21	1.00 – 4.88	0.049
Transfusión intraoperatoria de unidades de glóbulos rojos y/o plasma fresco congelado.	5.23	1.76 –15.6	0.016	-	-	-

Abreviaturas: CI: Intervalo de confianza; DBD: donación tras Muerte encefálica; OR: odds ratio. P: P-valor

^a La edad del donante y el régimen de inmunosupresión con azatioprina no se incluyeron en el modelo debido a la existencia de una multicolinealidad significativa con la edad del receptor y el trasplante de dos órganos, respectivamente (valores del factor de inflación de la varianza >2).

^b OR por incremento de un año.

Además, se encontraron diferencias significativas en el número de glóbulos rojos y unidades de plasma fresco congelado transfundidas. Por último, los pacientes con ARN de HPgV-1 detectable recibieron con mayor frecuencia azatioprina dentro del régimen de inmunosupresión primaria (10,0% frente a 2,0%; valor $P = 0,025$).

Con el objetivo de esclarecer de manera más precisa qué variables pueden influir en la infección por HPgV-1, se llevó a cabo un análisis multivariante. En este análisis, se observó que el trasplante de doble órgano (OR: 5.62; IC 95%: 1.52-20.82; valor de $p = 0.010$) y la donación después de muerte encefálica (DBD) (OR: 2.21; IC 95%: 1.00-4.88; valor de $p = 0.049$) se asociaron con la detección del ARN de HPgV-1, mientras que el diagnóstico pretrasplante de hipertensión resultó ser un factor protector (OR: 0.23; IC

95%: 0.09-0.55; valor de $p = 0.001$) (Tabla1). La bondad de ajuste del modelo se evaluó como buena (valor de p de Hosmer-Lemeshow = 0.905), por lo que sugiere que el modelo es adecuado y que las asociaciones encontradas entre las variables son estadísticamente válidas.

En relación con la presencia de ARN de HPgV-1 en diferentes momentos después del trasplante, se evaluaron los parámetros inmunitarios (subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, inmunoglobulinas en suero y factores del complemento) y la función del injerto. Los resultados no mostraron diferencias significativas, excepto por un mayor nivel de IgG en el primer mes entre los receptores positivos para HPgV-1 (908 ± 233 vs. 766 ± 269 mg/dl; valor de $p = 0.012$) (Tabla V.2).

Tabla V.2. Análisis de los parámetros inmunológicos y la función del injerto en pacientes con y sin infección por HPgV-1 en diferentes puntos de tiempo después del trasplante.

Valor de laboratorio (media $\pm$ SD)	Mes 1 después del trasplante			Mes 3 después del trasplante			Mes 6 después del trasplante		
	Infección HPgV-1 (n = 27)	No infección HPgV-1 (n = 146)	P-valor	Infección HPgV-1 (n = 28)	No infección HPgV-1 (n = 142)	P-valor	Infección HPgV-1 (n = 33)	No infección HPgV-1 (n = 142)	P-valor
Recuento ($\times 10^3$ células/μL)									
Células T CD3+	0.85 $\pm$ 0.61	0.99 $\pm$ 0.91	0.337	0.91 $\pm$ 0.56	1.00 $\pm$ 0.72	0.514	1.22 $\pm$ 1.12	1.08 $\pm$ 0.59	0.323
Células T CD4+	0.51 $\pm$ 0.43	0.64 $\pm$ 0.65	0.199	0.48 $\pm$ 0.36	0.57 $\pm$ 0.46	0.343	0.54 $\pm$ 0.34	0.55 $\pm$ 0.37	0.852
Células T CD8+	0.32 $\pm$ 0.25	0.34 $\pm$ 0.29	0.713	0.41 $\pm$ 0.28	0.42 $\pm$ 0.32	0.935	0.46 $\pm$ 0.18	0.49 $\pm$ 0.29	0.464
Niveles (mg/dL)									
Nivel IgG	908 $\pm$ 233	766 $\pm$ 269	0.012	856 $\pm$ 282	808 $\pm$ 268	0.400	929 $\pm$ 265	963 $\pm$ 361	0.611
Nivel IgA	232 $\pm$ 105	190 $\pm$ 101	0.064	193 $\pm$ 107	184 $\pm$ 94	0.695	209 $\pm$ 92	207 $\pm$ 107	0.945
Nivel IgM	91 $\pm$ 48	84 $\pm$ 59	0.574	96 $\pm$ 66	88 $\pm$ 67	0.556	108 $\pm$ 69	103 $\pm$ 79	0.761
Nivel C3	93 $\pm$ 19	96 $\pm$ 20	0.440	98 $\pm$ 22	107 $\pm$ 23	0.067	107 $\pm$ 24	105 $\pm$ 23	0.528
Nivel C4	21 $\pm$ 5	22 $\pm$ 5	0.977	21 $\pm$ 8	24 $\pm$ 7	0.163	23 $\pm$ 6	24 $\pm$ 10	0.663
eGFR (MDRD-4), mL/min/1.72 m²	51.4 $\pm$ 19.5	45.2 $\pm$ 21.5	0.169	49.6 $\pm$ 17.7	48.6 $\pm$ 19.4	0.787	49.2 $\pm$ 18.7	49.3 $\pm$ 18.3	0.964

eGFR: tasa de filtración glomerular estimada; HPgV-1: pegivirus humano tipo 1; MDRD-4: Modificación de la Dieta por Enfermedad Renal-4; SD: desviación estándar.

Además, no se encontró correlación significativa entre estas variables y los niveles de ARN de HPgV-1 (en log10 copias/μl), excepto por el recuento de células T CD3+ en el tercer mes (rho de Spearman: 0,39; p = 0,041), tal y como se refleja en la Tabla V.3. Estos hallazgos indican que la presencia de HPgV-1 no parece tener un impacto significativo en los parámetros inmunitarios y la función del injerto durante el período de seguimiento postrasplante, a excepción del aumento en los niveles de IgG en los pacientes con presencia de HPgV-1 en el primer mes.

Tabla V.3. Correlación entre los parámetros inmunitarios o la función del injerto y los niveles plasmáticos de ARN de HPgV-1 (log₁₀ copias/μl) en pacientes con infección por HPgV-1 en diferentes puntos de tiempo después del trasplante.

	Mes 1 después del trasplante			Mes 3 después del trasplante			Mes 6 después del trasplante		
	n	r Pearson o rho Spearman ^a	P-valor	n	r Pearson o rho Spearman ^a	P-valor	n	r Pearson o rho Spearman ^a	P-valor
Recuento (x10³ células/ μL)									
Células T CD3+	27	-0.045	0.825	27	0.396	0.041	33	0.138	0.442
Células T CD4+	27	-0.020	0.920	27	0.350	0.073	33	0.199	0.267
Células T CD8+	27	-0.015	0.940	27	0.356	0.068	33	-0.028	0.878
Niveles (mg/dL)									
Nivel de IgG	27	0.042	0.837	26	0.366	0.066	33	0.181	0.313
Nivel de IgA	26	-0.103	0.615	26	-0.110	0.593	32	0.177	0.332
Nivel de IgM	27	0.222	0.265	26	0.344	0.086	33	0.265	0.136
Nivel de C3	27	0.033	0.869	27	-0.114	0.572	33	0.107	0.555
Nivel de C4	27	-0.319	0.105	27	-0.020	0.921	33	0.004	0.983
eGFR (MDRD-4)	27	0.125	0.534	28	0.171	0.385	33	0.283	0.110

eGFR: tasa de filtración glomerular estimada; HPgV-1: pegivirus humano tipo 1; MDRD-4: Modificación de la Dieta por Enfermedad Renal-4.

^a Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de correlación de Spearman según la distribución normal o no normal de las variables.

1.3 Relación entre la carga de ARN de HPgV-1 y los resultados clínicos en el trasplante renal

Ciento catorce receptores (57,3%) experimentaron un total de 248 episodios de infección grave posterior al trasplante, lo que represento una tasa de incidencia de 2,55 episodios por 1000 días de trasplante. La mediana del intervalo desde el trasplante hasta el primer episodio de infección grave fue de 38,5 días, con un rango intercuartílico (IQR) de 13,8 a 101 días (Tabla V.4.A).

Asimismo, 47 pacientes (23,6%) desarrollaron 61 episodio de iRAE, con una tasa de incidencia de 0,63 episodios por 1000 días de trasplante. Los síndromes clínicos más comunes fueron la enfermedad por citomegalovirus (CMV), la infección mucocutánea por virus herpes simple (VHS) y el herpes zoster (VZV). La mediana del intervalo hasta el primer episodio de iRAE fue de 90 días, con un IQR de 42 a 235 días. Por último, 23 pacientes (11,6%) experimentaron 27 episodios de rechazo agudo del órgano, lo que represento una tasa de incidencia de 0,28 episodios por 1000 días de trasplante (Tabla V.4.B).

Tabla V.4. A) Síndromes clínicos estudiados y microorganismos implicados en los 248 episodios de infección grave posterior al trasplante. **B)** Descripción de los 61 episodios de iRAE y 27 eventos de rechazo agudo del injerto.

A. síndromes clínicos y agentes causales de los 248 episodios de infección grave postrasplante.		B. Descripción de los episodios de iRAE y rechazo agudo del injerto observados.	
Síndrome clínico	N (%)	iRAE (n=61)	N (%)
Pielonefritis aguda del injerto	61 (24.6)	Infección oportunista	
Síndrome viral	42 (16.9)		
Neumonía e Infección del tracto respiratorio	39 (15.7)		Síndrome viral CMV 22(36,1)
Infección del tracto digestivo	26 (10.5)		Colitis por CMV 4 (6,5)
Infección del sitio quirúrgico	25 (10.1)		Hepatitis por CMV 2 (3.3)
Infección intraabdominal	15 (6.0)		Infección mucocutánea por VHS 8 (13,1)
Infección del torrente sanguíneo relacionada con el catéter	12 (4.8)		Infección por herpes 7 (11,4)
Infección de piel y tejidos blandos	12 (4.8)		BKP y VAN probable 2 (3.3)
Infección del Sistema nervioso central	2 (0.8)		Nocardiosis 1 (1.5)
Otras	14 (5.6)		Aspergilosis invasiva 2 (3.3)
Microorganismos aislados	N (%)		Mucormicosis 1 (1.5)
Bacterias			Criptococosis 1 (1.5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (4.0)		Trichosporonosis invasiva 1 (1.5)

Continúa en la siguiente página

<i>Enterococcus faecium</i>	4 (1.6)	Leishmaniasis visceral	1 (1.5)
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	5 (2.0)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (1.2)		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (0.4)	Postrasplante de novo malignidad	
<i>Nocardia spp.</i>	1 (0.4)	Cáncer de órgano sólido ^a	5 (8.2)
<i>Escherichia coli</i>	26 (10.5)	Cáncer de piel no melanoma ^b	4 (6,6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25 (10.1)		
<i>Enterobacter spp.</i>	5 (2.0)	Rechazo agudo del injerto (n=27)	N (%)
<i>Serratia marcescens</i>	2 (0.8)		
Otras enterobacterias	8 (3.2)	Rechazo agudo mediado por células T	15 (57,7)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18 (7.3)	Rechazo agudo mediado por anticuerpos	5 (19,2)
<i>Clostridium difficile</i>	13 (5.2)	Rechazo celular agudo borderline	5 (19,2)
Polimicrobiano	16 (6.5)	Rechazo no probado por biopsia tratado empíricamente	2 (7,7)
Otros	9 (3.6)		
Diagnostico no microbiológico	29 (11.7)		
Virus			
CMV	28 (11.3)		
HSV-1 and 2	8 (3.2)		
Varicella-zoster virus	7 (2.8)		
Influenza virus	5 (2.0)		
BK polyomavirus	2 (0.8)		
Virus Respiratorio Sincitial	2 (0.8)		
Otros	6 (2.4)		
Hongos			
<i>Candida spp.</i>	9 (3.6)		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 (0.8)		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (0.4)		
<i>Mucorales</i>	1 (0.4)		
<i>Trichosporon spp.</i>	1 (0.4)		
Parásitos			
<i>Leishmania donovani</i> complex	1 (0.4)		

CMV: citomegalovirus; HSV: herpes simplex virus.

BKPvYAN: nefropatía asociada a poliomavirus BK; CMV: citomegalovirus; iRAE: evento adverso relacionado con la inmunosupresión; HSV: virus del herpes simple.

^a Incluye adenocarcinoma colorrectal (3 casos) y carcinoma de células renales de células claras (2 casos).^b Incluye carcinoma de células basales y de células escamosas (2 casos cada uno).

Los resultados del análisis muestran que no se encontraron diferencias significativas en la incidencia acumulada de los resultados del estudio (infección grave postrasplante [Figura V.4.A], iRAE [Figura V.4.B] o rechazo agudo del injerto [Figura V.4.C]) en los diferentes intervalos de tiempo predefinidos después del trasplante (día +7 y los meses 1, 3, 6 y 12 postrasplante), según la presencia o ausencia de ARN detectable de HPgV-1. (Figura V.4)

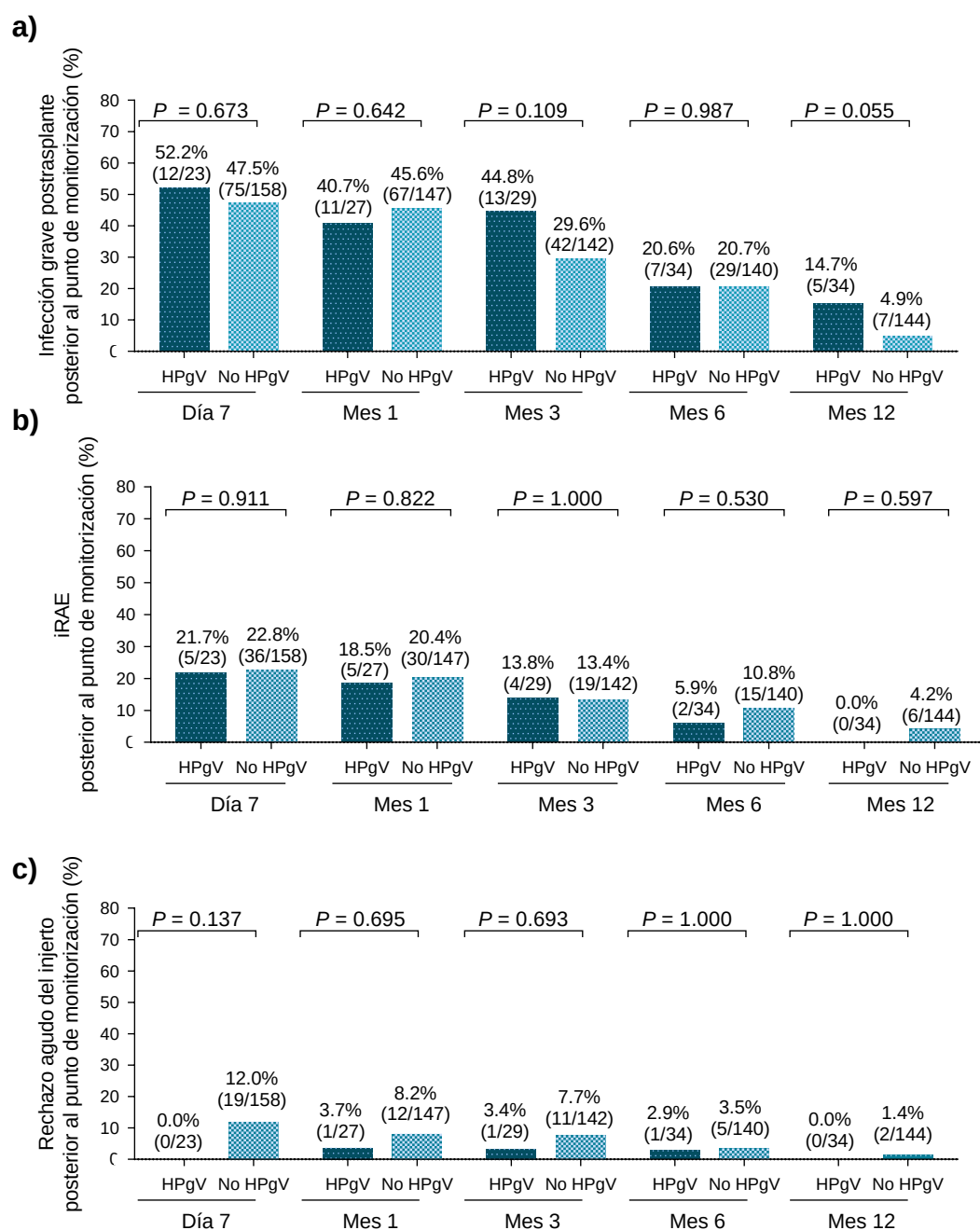


Figura V.4. Tasa de incidencia acumulada de los resultados del estudio según la presencia de ARN de HPgV-1 en plasma detectable en diferentes puntos de tiempo postrasplante: (A) infección grave (es decir, requiere hospitalización y terapia intravenosa), (B) iRAE (es decir, infección oportunista y/o cáncer de novo) y (C) rechazo agudo del injerto.

Tampoco se observaron diferencias significativas en las cargas de ARN de HPgV-1 en plasma entre los receptores que posteriormente desarrollaron resultados del estudio (infección grave, rechazo del injerto o evento adverso relacionado con la inmunosupresión) y aquellos que no desarrollaron ningún evento (Figura V.5).

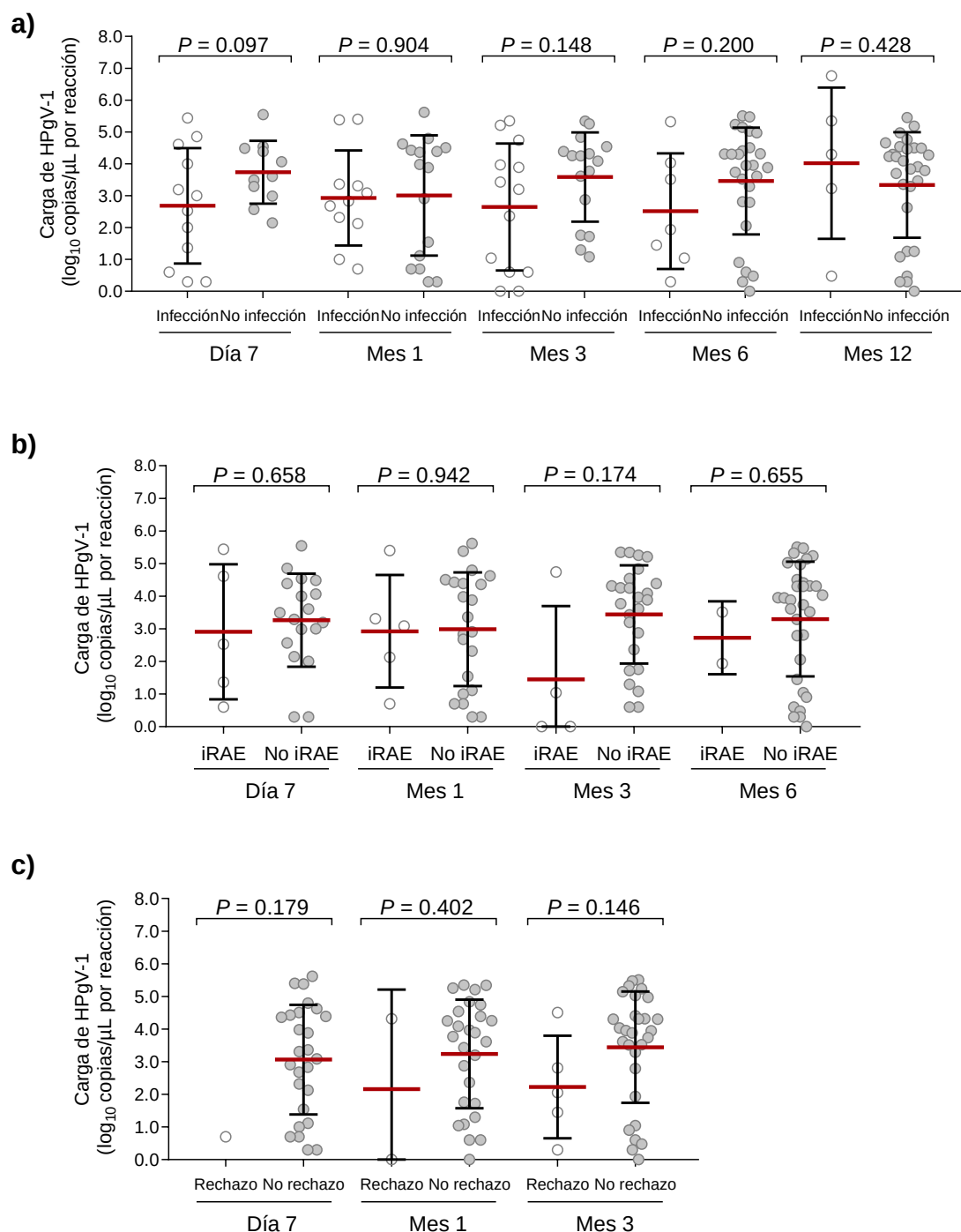


Figura V.5. Comparación de los niveles de ARN de HPgV-1 en plasma en diferentes momentos postrasplante según la aparición posterior de los resultados del estudio: (A) Infección grave postrasplante, (B) iRAE, (C) rechazo agudo del injerto.

Además, la presencia de una infección persistente por HPgV-1 después del trasplante no influyó en la incidencia de los resultados del estudio más allá del primer año (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias según la presencia de viremia de alto nivel de HPgV-1 ($\geq 3,3 \log_{10}$ copias/ μ l)

Sin embargo, se identificó una tendencia interesante: los pacientes con aumentos en los niveles de ARN de HPgV-1 durante el primer mes tuvieron una incidencia menor de infección grave postrasplante más allá de ese punto en comparación con aquellos con trayectorias no ascendentes (31,2 % [5/16] frente a 66,7 % [6/9], respectivamente, $p = 0.115$). Se observó una tendencia similar para la infección grave postrasplante más allá del mes tres (25.0% [6/24] vs. 62.5% [5/8] para los receptores con cinética ascendente y no ascendente, respectivamente, durante los primeros 3 meses; $p = 0.088$).

1.4 Correlación entre la carga de HPgV-1 y TTV

También nos propusimos investigar la posible correlación entre la infección por HPgV-1 y la infección por TTV. Dado que cada vez más evidencia respalda el papel de la cinética de replicación del TTV como un indicador del estado de inmunocompetencia posterior al trasplante (56–58), consideramos importante explorar esta asociación.

Los resultados obtenidos revelaron que no hubo diferencias significativas en las cargas de ADN de TTV en función de la presencia o ausencia de ARN de HPgV-1 detectable en cualquiera de los puntos de seguimiento (Figura V.6).

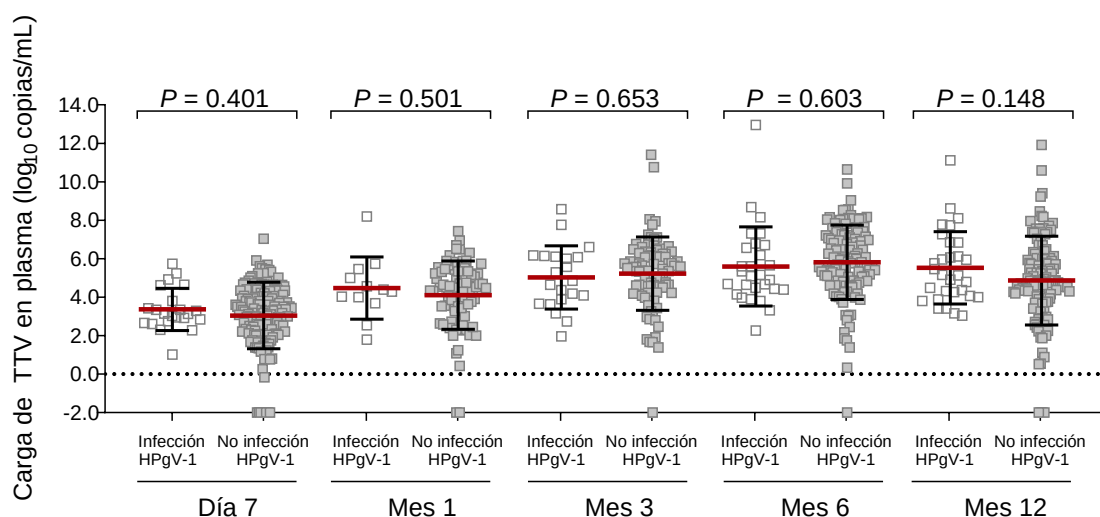


Figura V.6. Comparación de las cargas virales de TTV en plasma en distintos momentos posteriores al trasplante según la presencia de infección por HPgV-1. Las barras rojas representan los valores medios y los bigotes indican las desviaciones estándar. HPgV-1: pegivirus humano tipo 1; TTV: Torque Teno virus.

Además, nuestros análisis no demostraron correlaciones significativas entre el ARN de HPgV-1 en plasma y las cargas de TTV (Tabla V.5).

Tabla V.5. Correlación entre los niveles de HPgV-1 en plasma y las cargas de ADN de TTV medidos simultáneamente en diferentes puntos de tiempo después del trasplante. Ambas variables se transformaron en $\log_{10}$ para el análisis.

Tiempo después del trasplante	n	Coefficiente r de Pearson	P-valor
Basal	25	-0.214	0.303
Día 7	22	-0.132	0.559
Mes 1	12	-0.142	0.660
Mes 3	21	0.024	0.916
Mes 6	28	0.108	0.584
Mes 12	30	-0.143	0.451

El presente estudio representa un esfuerzo para comprender la presencia y las implicaciones clínicas del ARN de HPgV-1 en receptores de trasplante renal en nuestra cohorte. A lo largo de este estudio, encontramos que aproximadamente una cuarta parte de los pacientes mostraron ARN detectable de HPgV-1 en algún momento después del trasplante, y un pequeño porcentaje (8,5%) mantuvo la infección de forma persistente. Cuando se analizaron en diferentes puntos, las tasas de incidencia aumentaron ligeramente del 14,7% antes del trasplante al 19,1% en el mes 12. Se encontró que ciertas variables relacionadas con el procedimiento (trasplante de doble órgano y donación después de muerte encefálica) aumentaron las probabilidades de infección por HPgV-1, mientras que el diagnóstico de hipertensión actuó como factor protector.

Uno de los aspectos más interesantes que exploramos es la relación entre la infección por HPgV-1 y los resultados clínicos posteriores al trasplante. Nuestros análisis revelaron que no hubo diferencias significativas en la incidencia acumulada de infección grave posterior al trasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión o rechazo del injerto entre los pacientes positivos y negativos para HPgV-1. Además, tampoco encontramos correlaciones claras entre los niveles de ARN de HPgV-1 y parámetros inmunitarios o cargas de TTV, lo que sugiere que el virus puede no ejercer un efecto inmunomodulador significativo en el contexto del trasplante renal.

La prevalencia de ARN HPgV-1 de nuestra cohorte de pacientes (26,1%) se encuentra en consonancia con resultados reportados de pacientes sometidos a trasplante renal en Brasil (16,7% - 36,1%) (40,41) y pacientes sometidos a trasplante de corazón (36%) y de pulmón (18%) en Alemania y Australia. Las cifras correspondientes en el contexto del trasplante de hígado parecen ser más bajas (~14% en estudios realizados en Japón e Irán). Incluso considerando la existencia de amplias variaciones geográficas, estas tasas están muy lejos de las observadas en donantes de sangre sanos no inmunocomprometidos, con estimaciones combinadas de 1.7% en América del Norte y 2.3% en Europa (27). También se han encontrado diferencias significativas en la prevalencia de la infección por HPgV-1 entre receptores de trasplante hepático y pacientes sometidos a hepatectomía (127). Además, la prevalencia de HPgV-1 en individuos infectados por el VIH es mayor que en donantes sanos y comparable a la de receptores de TOS (64). Estos resultados sugieren colectivamente que el deterioro del estado inmunológico ejerce un impacto negativo sobre la capacidad de eliminar el ARN de HPgV-1 después de la infección, lo que resulta en replicación persistente, y que la

cantidad de inmunosupresión se correlaciona inversamente con las tasas de prevalencia, que son más altas después del TR que en los receptores de trasplante de hígado, que generalmente están menos inmunosuprimidos.

Son limitados los estudios previos que han investigado las características clínicas asociadas con la infección por HPgV-1 posterior al trasplante, revelando que el género femenino (129) y una edad más joven del receptor (32) son factores de riesgo. En nuestro estudio, la edad del receptor también fue más baja en el grupo positivo para HPgV-1, aunque la diferencia no se mantuvo en el modelo multivariante. En otros estudios realizados en donantes sanos se ha observado una correlación inversa entre la edad y la prevalencia de HPgV-1 (31,130), al cual se ha planteado como resultado de una mayor actividad sexual en personas más jóvenes. En línea con otros autores (131), observamos que los receptores HPgV-1 positivos tenían mayores requerimientos transfusionales intraoperatorios, así como un mayor número de transfusiones pretrasplante. Las pérdidas de sangre intraoperatorias también fueron mayores entre los receptores de trasplante de hígado con infección por HPgV-1 en el estudio de Izumi *et al.* (127). Esto apuntaría a la transmisión por transfusión de hemoderivados o a la potencial infección derivada del donante, ya que el cribado del donante para HPgV-1 no es obligatorio. Sin embargo, después del ajuste multivariante, solo el trasplante de doble órgano —que implica tiempos quirúrgicos prolongados y mayores requerimientos de transfusión perioperatoria— y el uso de órganos de donantes después de muerte encefálica —en comparación con la muerte circulatoria o la donación en vida— se revelaron como predictores independientes de infección por HPgV-1. Hasta donde sabemos, no existen estudios previos que hayan evaluado el impacto del tipo de donante en la tasa de viremia de HPgV-1, aunque se podría plantear la hipótesis de que los donantes después de muerte encefálica (DBD) tienen más probabilidades de haber sido recientemente infectados durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos.

La inesperada asociación negativa observada entre la infección por HPgV-1 y la hipertensión no tiene una explicación clara; sin embargo, es posible que el diagnóstico de esta condición actúe simplemente como un marcador de una edad más avanzada en los pacientes. Es necesario que futuros estudios corroboren ambas asociaciones.

Aunque algunos estudios recientes han investigado si el efecto inmunomodulador que ejerce el HPgV-1 en coinfección con VIH, podría extrapolarse al contexto de los trasplantes de órganos sólidos y de células madre hematopoyéticas, no se han observado

diferencias significativas en términos de supervivencia del injerto o incidencia de rechazo entre los receptores de trasplante renal (132) según el estado del ARN de HPgV-1, ni en términos de supervivencia del paciente o rechazo del injerto en receptores de trasplante cardíaco (133) o hepático (127), ni en la aparición de rechazo agudo o crónico después de trasplante pulmonar (32). Asimismo, el momento del injerto de neutrófilos y la reconstitución inmunitaria celular, así como la supervivencia general y la tasa de enfermedad de injerto contra huésped, fueron comparables entre los receptores de HSCT con HPgV-1 positivo y negativo. Aunque el impacto del HPgV-1 en la incidencia de infección postrasplante se ha investigado escasamente, Izumi *et al.* (32) , no encontraron diferencias en la incidencia de sepsis o infección del sitio quirúrgico después del trasplante de hígado. Un estudio reciente que incluyó a 110 receptores de trasplante de hígado no logró demostrar diferencias en la incidencia de infección por CMV o en el número de episodios de viremia por CMV (32). Nuestro estudio encontró que la infección por HPgV-1 no parece tener un efecto significativo en los resultados del paciente y del injerto en la población de trasplante renal. Además, ampliamos la investigación anterior al analizar la incidencia de iRAE, que es un resultado compuesto de infecciones o malignidades de novo (90,117).

En concordancia con varios estudios previos, nuestros hallazgos también revelan la ausencia de diferencias significativas en cuanto a la supervivencia del injerto o la incidencia de rechazo (41) entre los receptores de trasplante renal con respecto al estado del ARN de HPgV-1. Estos resultados también se han encontrado en otros contextos de trasplantes de órganos sólidos, como trasplante cardíaco, pulmonar y hepático (41,134,135).

Los resultados obtenidos en nuestra cohorte se encuentran en concordancia con el estudio de Graninger *et al.*(32) en receptores de pulmón, que sostiene que la cinética de TTV medida a diferentes tiempos no se ve influenciada por la presencia de viremia de HPgV-1. En contraste con la evolución observada para la ADNemia TTV, que aumenta progresivamente desde el inicio hasta el mes 6 para disminuir ligeramente en el mes 12, lo que refleja cambios dinámicos en la inmunosupresión (89,90), los niveles plasmáticos de ARN de HPgV-1 se mantuvieron bastante estables durante el primer año posterior al trasplante. Estos resultados sugieren que la replicación de HPgV-1 es menos sensible que TTV al uso de agentes depletos de linfocitos como terapia de inducción o al cambio de los niveles mínimos de inhibidores de la calcineurina.

También observamos una interesante tendencia que sugiere una menor incidencia de infección grave en aquellos pacientes que presentaron aumentos en los niveles de ARN de HPgV-1 durante el primer mes después del trasplante. Esta asociación debe tomarse con precaución debido al bajo número de participantes y falta de ajuste y necesitan ser confirmadas en estudios posteriores.

A pesar de los resultados alentadores, este estudio presenta ciertas limitaciones que deben abordarse en futuras investigaciones.

En primer lugar, dadas las variaciones geográficas en las tasas de prevalencia y la distribución genotípica de HPgV-1, la naturaleza monocéntrica del presente estudio dificulta la generalización de nuestros hallazgos a otros entornos con antecedentes epidemiológicos diferentes en la población general. Aunque parece poco probable que el mensaje principal de este estudio, la infección por HPgV-1 y sus presuntos efectos inmunomoduladores no afectan a los resultados postrasplante, se hubiera modificado sustancialmente en base a esta información.

En segundo lugar, el número de episodios de iRAE y rechazo durante los últimos periodos posteriores al trasplante fue bajo, lo que pudo comprometer el poder estadístico del estudio. Otra limitación, es la usencia de ensayos estandarizados para la detección de HPgV-1 o programas piloto de evaluación de la calidad externa, que comprometen a nuestro trabajo y trabajos anteriores al nuestro, para los cuales se espera cierto grado de variabilidad entre laboratorios en los niveles de ARN de HPgV-1. No obstante, nuestra RT-PCR se realizó siguiendo un método bien establecido, lo que refuerza la solidez y la reproducibilidad del ensayo (110).

Finalmente, no podemos confirmar la hipótesis de que la alta tasa de viremia de novo por HPgV-1 postrasplante (13,8%) habría sido el resultado de la transfusión de productos sanguíneos durante la intervención o provenían de los injertos de los donantes ya que estos no se analizaron para ARN de HPgV-1.

Por otro lado, nuestra cohorte es una de las más grandes reportadas hasta la fecha que investigó la infección por HPgV-1 en el contexto de trasplantes de órganos sólidos (SOT), ya que los únicos otros dos estudios que se centraron en la población de trasplante renal incluyeron 12 y 61 receptores (40,132). Nuestro estudio es novedoso al explorar la posible relación entre la viremia de HPgV-1 y el resultado de iRAE, lo que permite capturar eventos clínicamente relevantes que actúan como "señales de alerta" de una

inmunosupresión excesiva (90). Ningún estudio había investigado previamente la correlación entre el nivel de ARN de HPgV-1 y una gran cantidad de parámetros inmunológicos, como las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, los niveles de inmunoglobulinas y los factores del complemento.

En conclusión, esta investigación sugiere que la viremia de HPgV-1 constituye un fenómeno común en la población con trasplante renal con una proporción sustancial de casos presumiblemente atribuible a una infección de novo por transfusión de hemoderivados. Si bien nuestros hallazgos no respaldan la hipótesis de un efecto inmunomodulador similar al observado en pacientes con VIH y tampoco se pudo demostrar una asociación entre los niveles de ARN de HPgV-1 y los parámetros inmunitarios subrogados o directos, vale la pena señalar que este estudio representa un paso importante en la comprensión de la infección por HPgV-1 en el contexto del trasplante renal. Queda por dilucidar si los beneficios clínicos derivados de la coinfección por VIH-HPgV-1 se deben principalmente a la interferencia viral directa o a mecanismos inmunomoduladores y, en este último caso, su posible extrapolación en el contexto del trasplante de órgano sólido.

2. Utilidad de la monitorización de la carga viral plasmática de ADN de anellovirus para predecir la aparición de infecciones postrasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión y rechazo agudo del injerto, en comparación con la cuantificación de TTV, en pacientes sometidos a trasplante renal.

En el contexto del trasplante renal, el TTV, un miembro importante del género *Alphatorquevirus*, ha emergido como un biomarcador relevante del estado neto de inmunosupresión. La familia *Anelloviridae* destaca por su diversidad genética, sin embargo, sus dinámicas postrasplantes y su implicación clínica aún presentan importantes incógnitas.

Este segundo trabajo (Forqué L. Transplantation. 2023) se enfocó en especular sobre la posibilidad de que la cuantificación de los niveles de ADN de AVT después del trasplante pudiera brindar una visión más precisa de las variaciones dinámicas en la inmunocompetencia, en comparación con la monitorización únicamente del ADN de TTV.

Para realizar este estudio, reclutamos una cohorte de 195 pacientes que habían sido sometidos a trasplante renal, de los cuales 139 (71,3%) eran hombres y 56 (28,7%) eran mujeres. La edad media de los pacientes fue de $53,4 \pm 15,1$ años. La comorbilidad crónica más prevalente fue la hipertensión, presente en un 84,5% de los casos. El 71,3% de los pacientes recibieron tratamiento de hemodiálisis. El tipo de donante más prevalente fue el donante tras muerte encefálica, con un 64,1%, y el estado serológico para CMV fue D+ y R+ en el 71,8% de los casos. La profilaxis para CMV se aplicó en el 59,5% de los casos. Las demás características demográficas y clínicas se describen detalladamente en la Tabla 1 del segundo estudio de esta tesis doctoral (Forqué L. Transplantation. 2023).

Tras una mediana de seguimiento de 1978 días (IQR: 989,3-2161,5), 19 (9,7%) pacientes fallecieron y 11 (5,6%) pacientes sufrieron un rechazo del injerto. Las tasas de supervivencia a uno y dos años fueron del 99,5% y el 98,2% respectivamente, mientras que las cifras correspondientes para la supervivencia anual del injerto sin contar las muertes fueron del 98,9% y el 97,0%.

2.1 Cinética plasmática de la carga viral de AVT en el trasplante renal

En el contexto de nuestro estudio, quisimos analizar las cargas de ADN plasmático de AVT obtenidas de un grupo de 195 pacientes sometidos a trasplante renal. Para ello, recolectamos un total de 1027 muestras, realizando una mediana de 6 (IQR: 5-6) mediciones por paciente. Los resultados, presentados en la Figura V.7, revelaron un interesante patrón en los niveles de ADN de AVT a lo largo del tiempo postrasplante.

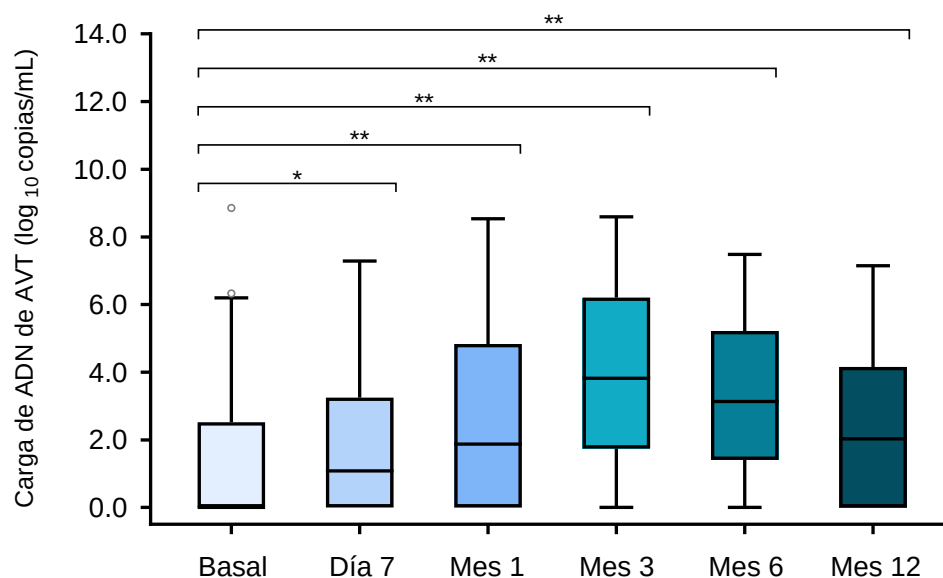


Figura V.7. Cinética de ADN de AVT (expresada en log₁₀ copias/mL) en muestras de plasma obtenidas durante el primer año postrasplante en la cohorte general del estudio (n=195). *P=0,001; **P<0,0001.

Observamos que los niveles de ADN de AVT experimentaron un aumento progresivo desde el inicio del estudio (mediana: 0,0 log₁₀ copias/mL [IQR: 0,0–2,5]) hasta el séptimo día posterior al trasplante (mediana: 1,1 log₁₀ copias/mL [IQR: 0,0–3,3]; P=0,001), y continuaron aumentando progresivamente en el mes 1 (mediana: 1,9 log₁₀ copias/mL [IQR: 0,0–4,8]), hasta alcanzar su punto máximo en el tercer mes postrasplante (mediana: 3,8 log₁₀ copias/mL [IQR: 1,7–6,2]; P<0,0001 en comparación con los niveles iniciales y con los del primer mes).

Después observamos una disminución progresiva en los niveles de ADN de AVT en el sexto mes (mediana: 3,1 log₁₀ copias/mL [IQR: 0,4–5,2] y en el duodécimo mes 2,0 log₁₀ copias/mL [IQR: 0,0–4,2]; P<0,0001 en ambas comparaciones con respecto al tercer mes).

Quisimos estudiar la posible correlación entre los niveles de ADN de AVT y los niveles de ADN de TTV medidos en los mismos puntos de tiempo y encontramos una correlación significativa entre ambas variables, aunque se trató de una correlación de carácter débil a moderado. La Figura V.8 ilustra esta relación observada.

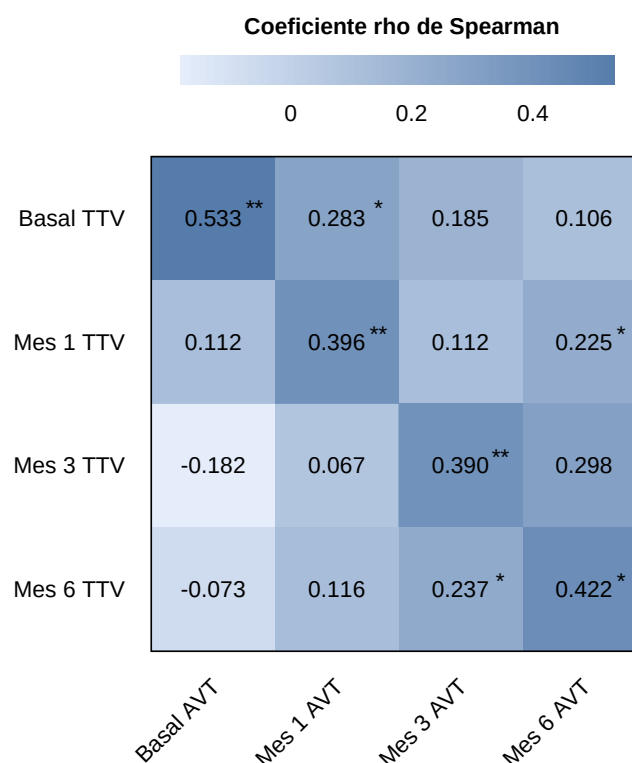


Figura V.8. Heat map de las correlaciones entre los niveles de ADN de AVT y los niveles de ADN de TTV basales y en los meses 1,3 y 6 y posteriores al trasplante en un subgrupo de pacientes con ambas cargas calculadas (n=91). Cada cuadrado representa el coeficiente de correlación rho de Spearman. *P <0,05; **P< 0,001. TTV, torque teno virus. AVT, anellovirus totales.

Durante el análisis de resultados, observamos que el sexo femenino, el estado serológico positivo para CMV y el historial de diálisis previa al trasplante se relacionaron con cargas basales más elevadas de ADN de AVT (Figura V.9). Además, al evaluar el tipo de terapia de inducción administrada, encontramos que aquellos pacientes que recibieron globulina antitimocítica (ATG) mostraron cargas de ADN de AVT significativamente más altas en el día 7 y en los meses 1, 3 y 6 posteriores al trasplante en comparación con los que recibieron basiliximab o no recibieron inducción, tal y como se observa en la figura V.9.

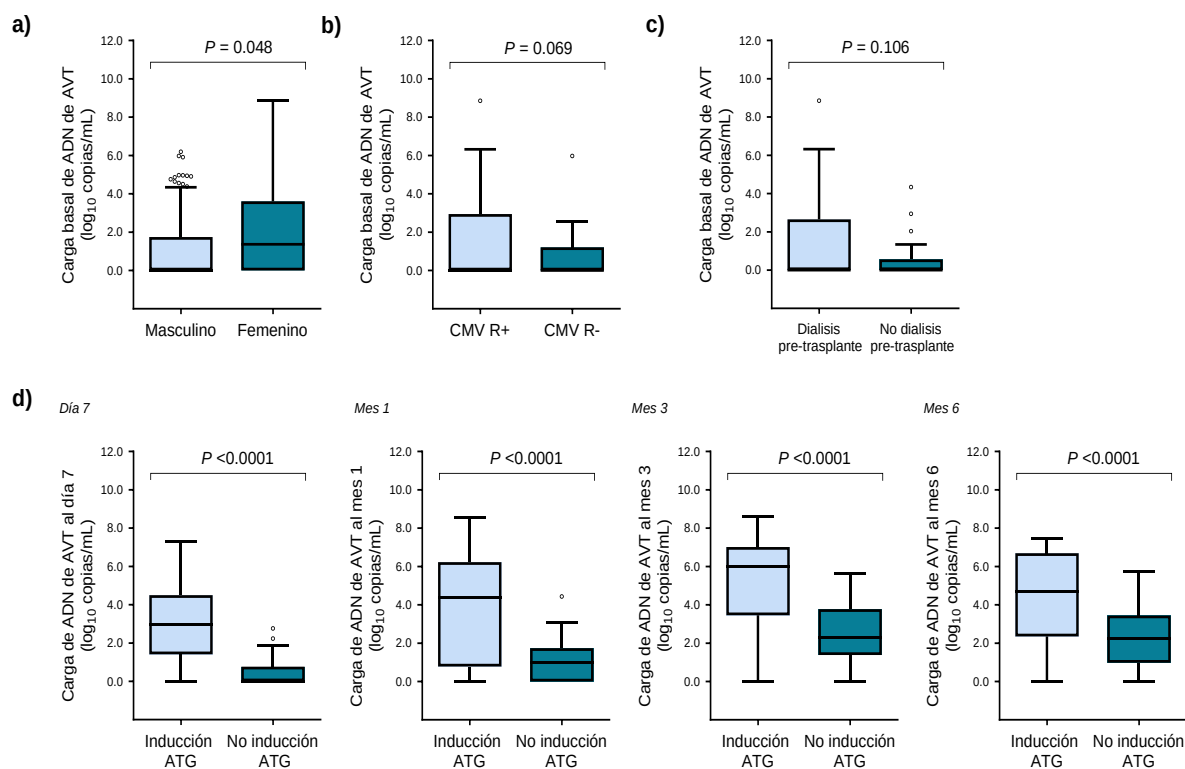


Figura V.9. Cargas basales de ADN de AVT en la cohorte general del estudio (n=195) de acuerdo con: a) género del receptor, b) estado serológico del CMV del receptor, y c) uso de diálisis antes del trasplante; d) cargas de ADN de AVT en el día 7 y en los meses 1,3 y 6 según el tipo de terapia de inducción. ATG, globulina antitimocítica; CMV, citomegalovirus.

Adicionalmente, nuestros análisis revelaron una correlación directa y significativa entre el tiempo de diálisis previa al trasplante (medido en días) y los niveles de ADN de AVT en el momento inicial (rho de Spearman: 0.209; $P = 0.009$) y en el día 7 posterior al trasplante (rho de Spearman: 0.191; $P = 0.02$).

Asimismo, en consonancia con estudios previos que han demostrado al TTV como un marcador indirecto de inmunosupresión (52,90,94), observamos una correlación inversa significativa, aunque de carácter débil, entre los niveles de ADN de AVT y los recuentos absolutos de linfocitos, células T CD3+ y CD8+. En cuanto a la correlación con el recuento total de leucocitos y el subconjunto de células T CD4+, esta fue de magnitud moderada (Tabla V.6)

Tabla V.6. Correlación entre los niveles de ADN de anellovirus totales (expresados como log₁₀ copias/mL) en los meses 1,3,6 y 12 posteriores al trasplante y los parámetros inmunológicos y de laboratorio medidos simultáneamente en la cohorte general del estudio (n=195).

	Carga de ADN de AVT al mes 1		Carga de ADN de AVT al mes 3		Carga de ADN de AVT al mes 6		Carga de ADN de AVT al mes 12	
	Coeficiente de rho Spearman	P-valor	Coeficiente de rho Spearman	P-valor	Coeficiente de rho Spearman	P-valor	Coeficiente de rho Spearman	P-valor
Recuento (x10³ células/ µL)								
Leucocitos totales	-0.245	0.001	-0.155	0.045	-0.220	0.004	-0.162	0.037
Linfocitos absolutos	-0.322	<0.0001	-0.390	<0.0001	-0.364	<0.0001	-0.243	0.002
Células T CD3+	-0.366	<0.0001	-0.390	<0.0001	-0.363	<0.0001	-0.217	0.005
Células T CD4+	-0.382	<0.0001	-0.405	<0.0001	-0.406	<0.0001	-0.310	<0.0001
Células T CD8+	-0.291	<0.001	-0.329	<0.0001	-0.284	<0.001	-0.105	0.178
Niveles (mg/dL)								
IgG	-0.040	0.611	-0.013	0.872	-0.019	0.809	0.087	0.266
IgA	-0.033	0.680	-0.033	0.681	0.014	0.862	-0.027	0.733
IgM	-0.101	0.205	-0.026	0.749	-0.141	0.068	-0.009	0.913
eGFR (MDRD-4)	-0.054	0.490	-0.149	0.053	-0.082	0.282	-0.119	0.128

eGFR: tasa de filtración glomerular estimada; AVT: anellovirus totales; MDRD-4: Modificación de la Dieta por Enfermedad Renal-4.

2.2 Frecuencia y abundancia relativa de los géneros de anellovirus

Quisimos estudiar la abundancia relativa de los diferentes géneros de anellovirus en el contexto del trasplante renal mediante la secuenciación de alto rendimiento (HTS). Para ello analizamos 308 muestras de plasma provenientes de un subgrupo seleccionado al azar de 91 receptores, que representan el 46.7% de la población general de pacientes de nuestro estudio. En detalle, examinamos los resultados de las muestras plasmáticas obtenidas al inicio, así como a los 1, 3 y 6 meses, correspondientes a 70 (76.9%), 81 (89.0%), 78 (85.7%) y 79 (86.8%) pacientes, respectivamente. La Figura V.10 y la Tabla V.7 presentan detalladamente la abundancia relativa de los géneros *Alpha*, *Beta* y *Gammatorquevirus* durante el periodo de estudio.

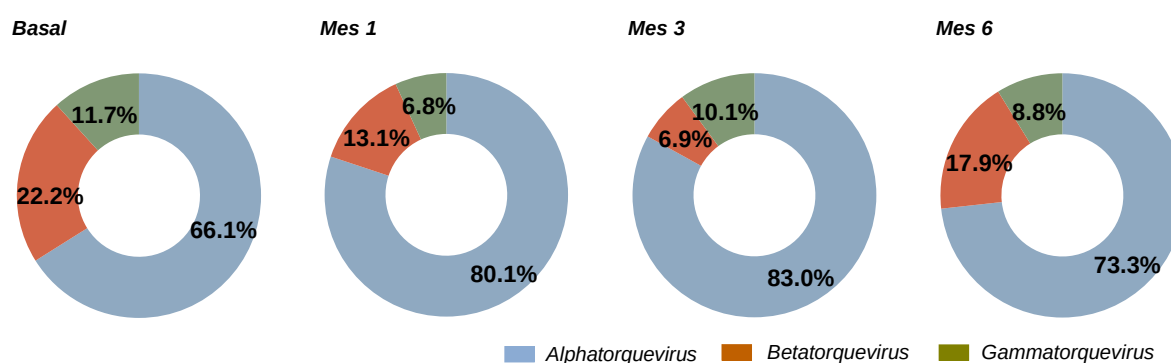


Figura V.10. Abundancia genómica relativa de diferentes géneros de anellovirus en el subgrupo de pacientes con perfiles legibles mediante secuenciación de alto rendimiento (HTS) (n = 91). Los cortes representan los valores medios.

Tabla V.7. Frecuencias absolutas y relativas de los géneros *Alpha*-, *Beta*- y *Gammatorquevirus* durante los primeros 6 meses después del trasplante en el subgrupo de pacientes con perfiles legibles evaluados mediante secuenciación de alto rendimiento (n = 91).

	Tiempos de monitorización (pacientes con resultados de HTS)			
	Basal (n = 70)	Mes 1 (n = 81)	Mes 3 (n = 78)	Mes 6 (n = 79)
Detección de [n (%)]:				
<i>Alphatorquevirus</i>	70 (100.0)	81 (100.0)	78 (100.0)	79 (100.0)
<i>Betatorquevirus</i>	69 (98.6)	80 (98.8)	77 (98.7)	76 (96.2)
<i>Gammatorquevirus</i>	64 (91.4)	78 (96.3)	66 (84.6)	69 (87.3)
Lecturas de % [mediana (IQR)]:				
<i>Alphatorquevirus</i>	76.4 (43.8 – 91.2)	89.8 (73.3 – 96.9)	94.9 (80.3 – 99.9)	89.4 (52.8 – 99.7)
<i>Betatorquevirus</i>	14.2 (3.5 – 32.4)	3.9 (0.7 – 12.8)	0.8 (0.1 – 6.8)	4.4 (0.1 – 29.0)
<i>Gammatorquevirus</i>	5.5 (0.3 – 15.9)	1.2 (0.1 – 5.3)	0.3 (0.0 – 10.6)	0.3 (0.0 – 8.3)
Género predominante[n (%)]:				
<i>Alphatorquevirus</i>	53 (75.7)	71 (87.7)	69 (88.5)	65 (82.3)
<i>Betatorquevirus</i>	10 (14.3)	8 (9.9)	3 (3.8)	10 (12.7)
<i>Gammatorquevirus</i>	7 (10.0)	2 (2.5)	6 (7.7)	4 (5.1)

HTS: Secuenciación de alto rendimiento; IQR: Rango intercuartilico.

El ADN del género *Alphatorquevirus* se detectó en todos los pacientes en cada punto de tiempo, con un aumento significativo en la proporción de recuentos de lecturas con respecto al total desde el inicio (pretrasplante) hasta el primer mes (mediana: 76.4% versus 89.8%; $P = 0.002$), para luego disminuir en el mes 6 (mediana: 89.4%; $P = 0.014$ en comparación con el mes 3). Además, un porcentaje variable de pacientes presentó el género *Beta* y *Gammatorquevirus* en la mayoría de las muestras, aunque en frecuencias y magnitudes inferiores en comparación con el género *Alphatorquevirus*.

Los recuentos de lecturas del ADN del género *Betatorquevirus* disminuyeron progresivamente desde el inicio (mediana del 14.2%) hasta el mes 1 (mediana del 3.9%; $P = 0.003$) y el mes 3 (mediana del 0.8%; $P = 0.007$ en comparación con el mes 1). El género *Alphatorquevirus* predominó sobre los otros 2 géneros en la mayoría de las muestras, ya sea consideradas globalmente (83.8% [258/308]) o en momentos específicos (Tabla V.7). No hubo diferencias significativas en las características demográficas o clínicas según el predominio de un determinado género en ninguno de los puntos de

tiempo (datos no mostrados). Los pacientes que experimentaron infección grave después del trasplante mostraron una tendencia hacia una mayor abundancia relativa del género *Betatorquevirus* en el inicio en comparación con aquellos sin infección (media 17.9% versus 26.5%; $P = 0.083$), sin diferencias en los puntos restantes (Figura V.11). No se observaron diferencias según el desarrollo de iRAE o rechazo agudo del injerto.

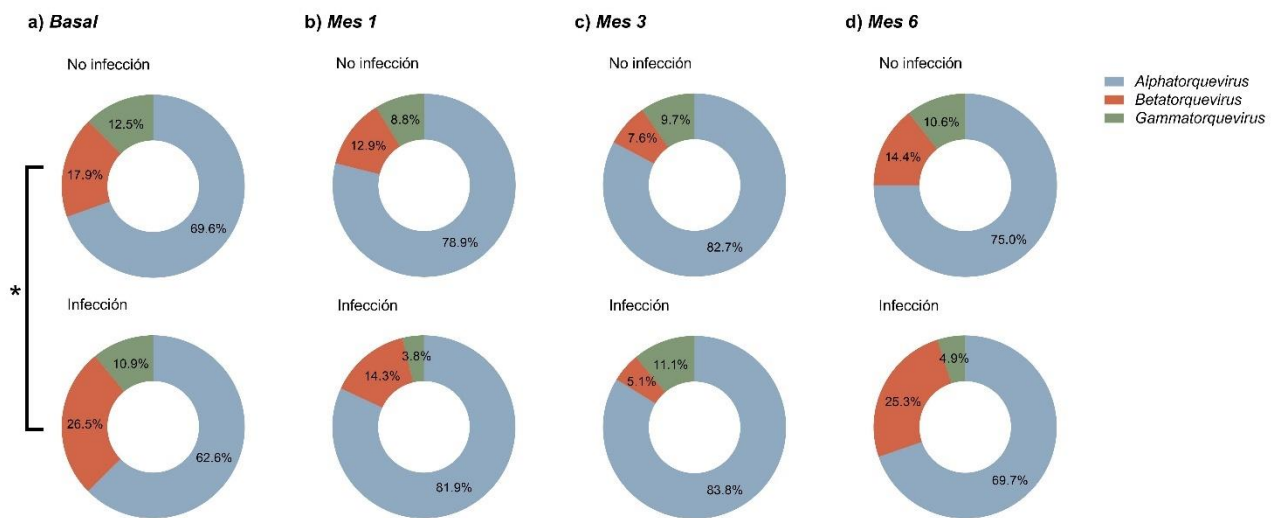


Figura V.11. Comparación de la abundancia genómica relativa de los géneros *Anelloviridae* en diferentes puntos de tiempo según la posterior aparición de infección grave después del trasplante en el subgrupo de pacientes con perfiles legibles de secuenciación de alto rendimiento (HTS) ($n = 91$); *Valor de $p = 0.083$. Los segmentos representan los valores promedio.

También comparamos los niveles ADN de anellovirus totales según el género de anellovirus predominante en cada momento (tabla V.8).

Tabla V.8. Comparación de los niveles de ADN de AVT según el género de anellovirus predominante en el subgrupo de receptores con perfiles de HTS legibles (n=91)

Género predominante	Basal		Mes 1		Mes 3		Mes 6	
	Carga de ADN de AVT ^a	P-valor	Carga de ADN de AVT ^a	P-valor	Carga de ADN de AVT ^a	P-valor	Carga de ADN de AVT ^a	P-valor
<i>Alpha-torquevirus</i>	2.9 ± 1.9	0.056	4.2 ± 2.5	0.248	5.5 ± 2.2	0.509	4.9 ± 2.2	0.148
<i>Beta-torquevirus</i>	2.9 ± 1.5		3.7 ± 2.6		4.6 ± 1.9		4.3 ± 1.7	
<i>Gamma-torquevirus</i>	4.7 ± 1.2		7.0 ± 0.2		4.7 ± 1.6		2.8 ± 2.2	

SD: desviación estándar. AVT: anellovirus totales.

^a Carga de ADN de AVT en log10 copias/mL [media ± SD]

No se observaron diferencias claras más allá de una tendencia no significativa hacia una mayor carga entre los pacientes con predominio de *Gammatorquevirus* al inicio del estudio (Tabla V.8).

2.3 Cambios dinámicos en el predominio del género de anellovirus

Una vez analizada la frecuencia y la abundancia relativa de los anellovirus, en una segunda instancia, nuestro objetivo fue estudiar las variaciones dinámicas del género predominante de anellovirus. Durante el estudio, se identificó al menos un cambio intrapaciente en la frecuencia relativa del género predominante de anellovirus en 31 pacientes (correspondiente al 35,6% de aquellos con al menos una muestra de plasma que proporcionó perfiles HTS legibles), lo que suma un total de 52 cambios de género.

Conforme se detalla en la Tabla V.9, las transiciones desde el género predominante Beta- o *Gammatorquevirus* hacia *Alphatorquevirus* fueron los cambios más comunes observados (25.0% [13/52] y 23.1% [12/52], respectivamente, y generalmente ocurrieron en fases tempranas después del trasplante (entre el inicio y el tercer mes). La transición de predominio de Alpha a *Betatorquevirus* se produjo en el 25.0% (13/52) de los casos, mayormente en momentos posteriores (entre el primer y sexto mes). La transición de predominio de Alpha- a *Betatorquevirus* ocurrió con menos frecuencia (19.2% [10/52]).

Tabla V.9. Cambios en el predominio de los géneros de anellovirus en el subgrupo de pacientes con perfiles legibles evaluados por HTS (n=91)

Tipo de cambio en el género predominante de anellovirus [n (%)]	Tiempo (pacientes con resultados de HTS en ambos puntos de tiempo)			
	Basal → mes 1 (n = 61)	Mes 1 → mes 3 (n = 71)	Mes 3 → mes 6 (n = 72)	Mes 1 → mes 6 (n = 62)
<i>Alphatorquevirus</i> a <i>Betatorquevirus</i>	3 (4.9)	3 (4.2)	5 (6.9)	2 (3.2)
<i>Alphatorquevirus</i> a <i>Gammatorquevirus</i>	2 (3.3)	4 (5.6)	4 (5.6)	0 (0.0)
<i>Betatorquevirus</i> a <i>Alphatorquevirus</i>	6 (9.8)	6 (8.5)	1 (1.4)	0 (0.0)
<i>Betatorquevirus</i> a <i>Gammatorquevirus</i>	0 (0.0)	2 (2.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Gammatorquevirus</i> a <i>Alphatorquevirus</i>	6 (9.8)	2 (2.8)	4 (5.6)	0 (0.0)
<i>Gammatorquevirus</i> a <i>Betatorquevirus</i>	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)
Sin cambio	43 (70.5)	54 (76.1)	57 (79.2)	60 (96.8)

HTS: secuenciación de alto rendimiento.

No se encontraron diferencias significativas en las características clínicas o resultados del estudio entre los pacientes que experimentaron cambios dinámicos en el género predominante de *Anelloviridae* y aquellos que no lo experimentaron.

2.4 Relación entre la carga de ADN de AVT y los resultados clínicos en el trasplante renal

Una vez estudiada la dinámica de la carga de ADN de AVT y el cambio de predominio entre géneros de anellovirus, quisimos estudiar el valor predictivo de la cuantificación de ADN de AVT en plasma para el desarrollo de eventos derivados de la inmunosupresión. Para cumplir con este objetivo, comparamos los niveles de ADN de AVT medidos al inicio y en diferentes puntos de tiempo después del trasplante entre los receptores que posteriormente desarrollaron una infección grave posterior al trasplante, iRAE o rechazo agudo del injerto durante los meses subsiguientes, en contraste con aquellos que no experimentaron tales eventos.

Los eventos que desarrollaron nuestra cohorte de pacientes a lo largo del estudio se detallan en la tabla V.10. En general, 111 receptores (56,9%) fueron diagnosticados con un total de 226 episodios de infección grave (Tabla V.10.A). Cuarenta y seis pacientes (23,6%) experimentaron 59 eventos que se calificaron como evento adverso relacionado con inmunosupresión (iRAE) que incluyó la infección oportunista y el cáncer de Novo. Además, 20 pacientes (10,3%) desarrollaron 22 episodios de rechazo agudo del injerto (Tabla V.10.B). La mediana de los intervalos desde el trasplante hasta el primer episodio de cada uno de estos desenlaces fue de 40 días (IQR: 14-104) para infecciones graves, 91,5 días (IQR: 42,8-235) para iRAE y 94 días (IQR: 19-158,5) para el rechazo agudo del injerto.

Tabla V.10. Características de los episodios de infección grave postrasplante, eventos adversos relacionados con la inmunosupresión (iRAE) y rechazo agudo del injerto.

A. Características clínicas y microbiológicas de los 226 episodios de infección grave postrasplante.		B. Descripción de los episodios de iRAE y rechazo agudo del injerto observados.	
Síndrome clínico	N (%)	iRAE (n=59)	N (%)
Pielonefritis aguda del injerto	56 (24,8)	Infección oportunista	
Síndrome viral	40 (17,7)		
Neumonía e Infección del tracto respiratorio	35 (15,5)		Síndrome viral CMV 21 (35,6)
Infección del tracto digestivo	25 (11,1)		Colitis por CMV 4 (6,8)
Infección del sitio quirúrgico	24 (10,6)		Hepatitis por CMV 2 (3,4)
Infección del torrente sanguíneo relacionada con el catéter	8 (3,5)		Infección mucocutánea por VHS 8 (13,6)
Infección de piel y tejidos blando	15 (6,6)		Infección por herpes 6 (10,2)
Infección del sistema nervioso central	2 (0,9)		BKP y VAN probable 2 (3,4)
Otras	21 (9,3)		Nocardiosis 1 (1,7)
			Aspergilosis invasiva 2 (3,4)
Microorganismos aislados	N (%)		Mucormicosis 1 (1,7)
Bacterias			Criptococosis 1 (1,7)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (4,4)		Trichosporonosis invasiva 1 (1,7)
<i>Enterococcus faecium</i>	4 (1,8)		Leishmaniasis visceral 1 (1,7)
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	5 (2,2)	Postrasplante de novo malignidad	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (1,3)		Cáncer de órgano sólido ^a 5 (8,5)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (0,4)		Cáncer de piel no melanoma ^b 4 (6,8)
<i>Nocardia</i> spp,	1 (0,4)		
<i>Escherichia coli</i>	25 (11,1)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20 (8,8)		
<i>Enterobacter</i> spp,	5 (2,2)		
<i>Serratia marcescens</i>	2 (0,9)		
Otras enterobacterias	9 (2,9)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 (7,1)		

Continúa en la siguiente página

<i>Clostridium difficile</i>	13 (5,8)		
Polimicrobiano	13 (5,8)		
Otros	9 (3,9)		
Diagnostico no microbiológico	14 (6,2)		
Virus			
CMV	28 (12,4)		
HSV-1 and 2	9 (3,9)		
Varicella-zoster virus	5 (2,2)		
Influenza virus	5 (2,2)		
BK polyomavirus	2 (0,9)		
Virus Respiratorio Sincitial	3 (1,3)		
Otros	5 (2,2)		
Hongos			
<i>Candida spp,</i>	11 (4,9)		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 (0,9)		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (0,4)		
<i>Mucorales</i>	1 (0,4)		
<i>Trichosporon spp,</i>	1 (0,4)		
Parásitos			
<i>Leishmania donovani</i>	1 (0,4)		
complex)	1		
<i>Giardia lamblia</i>	(0,4)		
CMV: citomegalovirus; HSV: herpes simplex virus,		BKPyVAN: nefropatía asociada a poliomavirus BK; CMV: citomegalovirus; iRAE: evento adverso relacionado con la inmunosupresión; HSV: virus del herpes simple, ^a Incluye adenocarcinoma colorrectal (3 casos) y carcinoma de células renales de células claras (2 casos), ^b Incluye carcinoma de células basales y de células escamosas (2 casos cada uno),	

Los resultados de la comparación de los niveles de ADN de AVT medidos en diferentes etapas del trasplante entre pacientes que experimentaron eventos y aquellos que no lo hicieron se presentan en la Figura V.12.

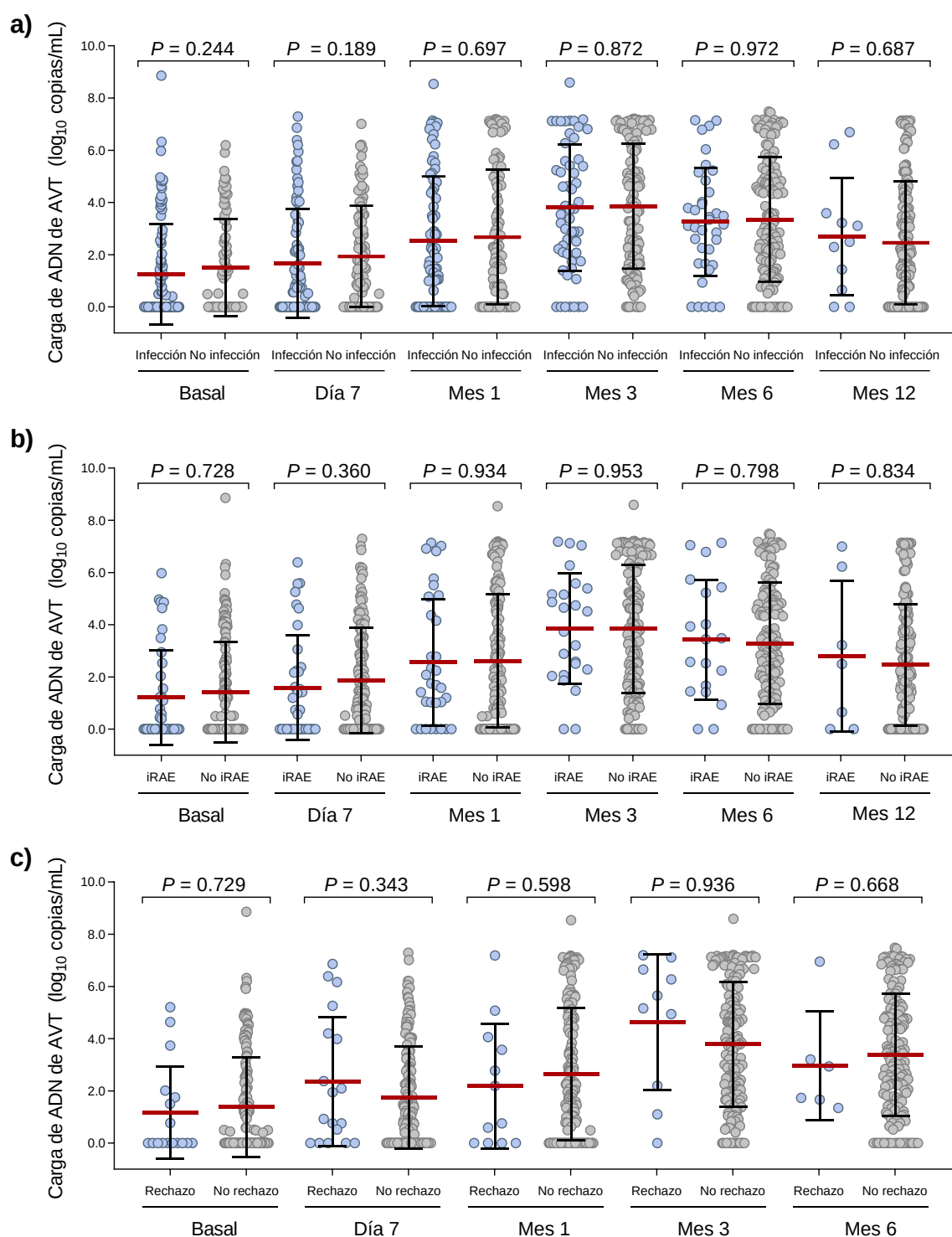


Figura V.12. Comparación de las cargas de ADN de AVT medidas al inicio y en diferentes momentos después del trasplante de acuerdo con la aparición posterior de resultados en la cohorte general del estudio (n=195): (A) infección grave, (B) iRAE, (C) rechazo agudo del injerto. iRAE, evento adverso relacionado con la inmunosupresión.

Como podemos observar, no encontramos diferencias significativas entre las cargas de ADN plasmático para ninguno de estos resultados.

En los últimos años, la monitorización de la carga viral de Torque teno virus (TTV) como marcador del estado neto de inmunosupresión después del trasplante de órgano sólido (TOS) ha ganado una importancia significativa, con un creciente número de estudios de apoyo y ensayos en curso destinados a establecer el papel de los niveles de ADN de TTV en la toma de decisiones clínicas (52). Aunque TTV es considerado el miembro prototípico del género *Alphatorquevirus*, es importante destacar que este virus representa solo una fracción de la familia *Anelloviridae*, una familia mucho más amplia y diversa (136).

Se ha demostrado que la inmunosupresión tiene la capacidad de modificar la estructura del viroma sanguíneo (137), lo que ha impulsado nuestro segundo estudio (Forqué L. Transplantation. 2023) para investigar los cambios dinámicos en la abundancia relativa de los géneros principales de la familia *Anelloviridae* (*Alpha-*, *Beta-* y *Gammatorquevirus*), así como la carga de ADN de AVT después del trasplante renal. Nuestro objetivo principal en el presente estudio fue explorar cualquier posible asociación entre estos cambios virales y los resultados clínicos en pacientes sometidos a trasplante renal.

Nuestro estudio arroja varios hallazgos significativos:

En primer lugar, la evolución temporal de los niveles de ADN de AVT posterior al trasplante reflejó esencialmente lo reportado previamente para el virus Torque teno (TTV) (52), con un marcado aumento desde el inicio hasta el tercer mes, seguido de una disminución posterior.

En segundo lugar, el género *Alphatorquevirus* fue predominante en todas las etapas de seguimiento, y su abundancia relativa aumentó después del trasplante. No obstante, un número significativo de pacientes experimentaron un cambio relativo en el género predominante, siendo más común la transición de *Alphatorquevirus* a *Betatorquevirus* y *Gammatorquevirus* en etapas posteriores al trasplante.

En tercer lugar, la correlación observada en los niveles de ADN entre AVT y TTV fue solo moderada. Sin embargo, encontramos que la ADNemia de AVT fue mayor en los pacientes que recibieron agentes reductores de células T, lo que sugiere una correlación inversa con la inmunidad celular.

Finalmente, no observamos asociaciones aparentes entre los resultados clínicos posteriores al trasplante, como infecciones graves, infecciones asociadas al trasplante (iRAE) o rechazo agudo, y la proporción de recuentos de lectura para los géneros *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus* o *Gammatorquevirus* obtenidos mediante secuenciación masiva de alto rendimiento (HTS) o los niveles de ADN de AVT.

Solo unos pocos estudios han investigado los cambios a lo largo del tiempo en la composición de los anellovirus en el contexto de la inmunosupresión posterior al trasplante, y muchos de ellos se centraron en los receptores de alo-TPH (87,115,138,139). Entre estos estudios, el equipo de *Bal et al.* llevó a cabo un pequeño estudio piloto aplicando metagenómica viral por secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing, NGS) en 10 pacientes con mieloma múltiple sometidos a alo-TPH. Encontraron que los TTV constituían los anellovirus más abundantes (91,7%), mientras que los TTMdV (*Betatorquevirus*) y TTMV (*Gammatorquevirus*) estaban presentes en solo el 6,4% y 1,9% de las muestras, respectivamente. Se observaron infecciones mixtas que comprendían al menos dos géneros diferentes en el 61,9% de las muestras positivas para anellovirus. Los autores no encontraron correlaciones significativas con parámetros clínicos o de laboratorio, aunque reconocieron la limitación del pequeño tamaño de la muestra (138).

En un trabajo previo realizado por nuestro equipo con 25 receptores de alo-TPH, los TTV (es decir, *Alphatorquevirus*) predominaron en el 81% de las muestras, mientras que la presencia de TTMVs (*Gammatorquevirus*) y TTMdVs (*Betatorquevirus*) fue mucho menos común (33,3% y 35,7%, respectivamente). El predominio de *Betatorquevirus* y *Gammatorquevirus* se limitó a menos del 10 % de las muestras secuenciadas, de acuerdo con los resultados actuales de nuestro estudio. El seguimiento longitudinal entre muestras de pre-acondicionamiento y post-injerto reveló una transición en el género predominante *Anelloviridae* en 5 de 17 pacientes (29,4%), muy similar al presente estudio (35,6%), aunque no se pudo identificar un patrón de cambio evidente (115). Este último hallazgo contrasta con la frecuente transición a predominio de *Alphatorquevirus* observada en nuestra cohorte, principalmente en los primeros meses. Se ha informado una evolución similar durante el período previo al injerto en pacientes sometidos a alo-TPH(138).

La co-detección en el mismo individuo con más de un género de la familia *Anelloviridae* parece ser común en el contexto del trasplante renal y alo-TPH. Se han

propuesto varias explicaciones para este fenómeno: como la evolución intrahuésped, la infección inicial por múltiples linajes independientes o episodios repetidos de sobreinfección (51). Se estima que cada individuo tiene una mediana de 6 linajes de anellovirus diferentes que da lugar a un "anelloma" personal distintivo (50).

Se plantea la hipótesis de que tanto el procedimiento de trasplante como la terapia inmunosupresora subsiguiente pueden alterar el "anelloma" individual del receptor. Se respalda esta idea con los hallazgos de Abbas *et al.* (140), quienes demostraron que el trasplante de pulmón está asociado con el injerto de la población endógena de anellovirus y el desarrollo de una transferencia bidireccional de linajes entre el injerto y el huésped. Aunque no se han realizado estudios similares que involucren al injerto renal, se ha encontrado que los anellovirus forman una comunidad relevante en el viroma urinario tanto de individuos sanos como de receptores de trasplantes de riñón e hígado (141).

Por lo tanto, especulamos que el aumento observado en la abundancia relativa de *Alphatorquevirus* (del 76,4% al 89,8%) entre las muestras pretrasplante y las muestras del primer mes puede ser parcialmente atribuido a la transferencia del "anelloma" del donante a través del injerto. Además, la inmunosupresión posterior al trasplante podría también influir en este fenómeno, ya que se ha observado un rápido aumento en la abundancia relativa de virus de ADN monocatenarios, con predominio de *Anelloviridae*, después del inicio de la terapia inmunosupresora en trasplantes de pulmón y corazón, seguido de una tendencia opuesta más allá del sexto mes (76).

En línea con estudios previos (87,138), no pudimos identificar una correlación aparente entre la abundancia relativa de los diferentes géneros de *Anelloviridae* a lo largo del primer año y los resultados clínicos, a excepción de una tendencia no significativa hacia una mayor presencia de *Betatorquevirus* basal entre pacientes que experimentan una infección grave. Por otro lado, Blatter *et al.* reportaron asociaciones clínicas dispares en la dinámica de los géneros *Alpha-* y *Betatorquevirus* en una cohorte de 57 receptores pediátricos de trasplante de pulmón. En su caso, el rechazo agudo del injerto fue más común en pacientes con cargas más bajas de *Alphatorquevirus*, mientras que los resultados a largo plazo de muerte, rechazo crónico o retrasplante ocurrieron con mayor frecuencia en pacientes con niveles de *Betatorquevirus* por debajo del valor de la mediana al sexto mes (139). Estos resultados sugieren la necesidad de monitorizar de forma separada los diferentes géneros dentro de la familia *Anelloviridae* como indicadores distintos de la inmunosupresión. No obstante, es importante destacar que el estudio de

Blatter *et al.*, analizó el número de copias del genoma en lugar de la abundancia relativa, por lo que se requiere de investigaciones adicionales para confirmar estos hallazgos (132).

Dada la diversidad genética de la familia *Anelloviridae*, nos preguntamos si la monitorización de los niveles de ADN de los anellovirus totales podría aumentar la capacidad de la carga viral de TTV para predecir resultados clínicamente relevantes. La correlación encontrada entre un estado serológico positivo para CMV y niveles más elevados de viremia al inicio del estudio (antes del trasplante) concuerda con lo previamente reportado para TTV (90,96), al igual que el impacto de la inducción con ATG en la cinética postrasplante (71,95,142). Además, los niveles de ADN de los anellovirus mostraron una correlación inversa con el recuento total de linfocitos y las células T CD3+ y CD8+ en distintos momentos, lo que refleja hallazgos previamente informados para TTV (52,90,94,95).

A pesar de estas similitudes, no pudimos demostrar diferencias significativas en los niveles de anellovirus totales evaluados regularmente hasta el mes 12, en relación con la posterior aparición de infecciones graves, iRAE o rechazo agudo del injerto. Una vez más, es importante considerar la amplia diversidad genética de los anellovirus al interpretar estos resultados negativos. Aunque TTV es el anellovirus más abundante en el viroma sanguíneo humano y prototipo del género *Alphatorquevirus*, existe una variabilidad significativa intragénero e intraespecie, lo que podría enmascarar cualquier correlación entre la carga viral de AVT y los eventos clínicos. Otros investigadores han especulado que el control inmunitario de los anellovirus podría variar según el género y que los niveles de *Betatorquevirus* podrían no reflejar el estado inmunitario relevante para resultados a corto plazo, como infecciones o rechazos (139). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis y sugieren que el papel distintivo de los TTVs (género *Alphatorquevirus*) como biomarcador del estado de inmunocompetencia no necesariamente se extiende a otros anellovirus.

Nuestro estudio ofrece una nueva perspectiva sobre la dinámica de los anellovirus después del trasplante renal, tanto en términos relativos (proporción de lecturas correspondientes a los 3 principales géneros) como en términos absolutos (niveles totales de ADN), en una cohorte de receptores de trasplante renal bien caracterizada y seguida prospectivamente. En contraste con nuestros estudios previos, en este nuevo enfoque de investigación nos centramos en analizar las variaciones longitudinales del anellovirus individual y su posible relación con los resultados clínicos.

Sin embargo, debemos reconocer algunas limitaciones importantes en nuestro estudio. Debido a limitaciones logísticas, realizamos secuenciación de alto rendimiento (HTS) en una subcohorte de 91 receptores, que representaba menos de la mitad de la población total del estudio, lo que pudo haber disminuido el poder estadístico para detectar diferencias en las características clínicas de los pacientes (especialmente para eventos poco comunes como iRAE). Es probable que la diversidad de los anellovirus haya sido subestimada ya que utilizamos cebadores de consenso a nivel de género para *Alpha*, *Beta*- y *Gammatorquevirus*, que no fueron diseñados para identificar otros géneros o diferencias de especies dentro del mismo individuo. Además, aunque el protocolo del ensayo de PCR "in-house" para medir los niveles totales de ADN de los anellovirus se había descrito previamente (116), no podemos descartar que la falta de correlación clínica aparente pueda deberse a su menor sensibilidad u otras consideraciones durante el ensayo. De hecho, la correlación relativamente baja observada entre los anellovirus totales y los niveles de ADN de TTV cuantificados por un protocolo bien establecido apuntaría en esta dirección.

En conclusión, nuestro estudio proporciona evidencia preliminar sobre la amplia diversidad de la familia *Anelloviridae* en receptores de trasplante renal y los cambios dinámicos en la abundancia relativa de los diferentes géneros a lo largo del tiempo. Nuestros resultados no respaldan el uso de la monitorización de ADN de anellovirus totales como herramienta de predicción clínica en el contexto del trasplante renal. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para comprender mejor el impacto de la terapia inmunosupresora en el "anelloma" individual y sus posibles asociaciones clínicas.

3. Utilidad de la monitorización de las cargas virales plasmáticas de TTV, AVT y HPgV-1 para predecir la aparición de eventos infecciosos y EICH en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

En el contexto del alo-TPH, la monitorización de la carga viral plasmática de ciertos virus, como el virus Torque teno (TTV), el *Anelloviridae* total (AVT) y el Human Pegivirus 1 (HPgV-1), ha surgido como una posible herramienta para identificar a los receptores de alo-TPH que podrían estar en mayor riesgo de desarrollar eventos infecciosos o enfermedad aguda de injerto contra huésped (EICHa). Sin embargo, a pesar de la relevancia de este tema, existen datos limitados sobre la utilidad potencial del control de estas cargas virales en la predicción y prevención de complicaciones postrasplante.

Con el objetivo de ampliar nuestra comprensión en este campo, en este tercer estudio (Forqué L. J Med Virol. 2023), llevamos a cabo un seguimiento observacional de 75 receptores de alo-TPH. De estos, 46 (61%) eran hombres y 29 (39%) eran mujeres, con una mediana de edad de 54 años (rango 19-70 años). Entre los casos analizados, la leucemia aguda mieloide fue la enfermedad subyacente más común, representando el 37.3% de los casos, seguida del linfoma no Hodgkin con un 20%. En el 60% de los trasplantes, la donación se realizó entre donantes y receptores con serología positiva para CMV. La profilaxis contra el rechazo de injerto contra huésped (EICH) se llevó a cabo mediante el uso combinado de sirolimus, micofenolato mofetil y ciclofosfamida en el 94% de los casos. Las demás características demográficas y clínicas se encuentran detalladas en la tabla 1 del estudio Forqué L. J Med Virol. 2023.

Durante el seguimiento, monitorizamos las cargas de ADN de TTV en plasma, el ADN de AVT y las cargas de ARN de HPgV-1 en diferentes momentos: antes del trasplante, y en los días +30, +60, +90, +120 y +180 después del trasplante. Los eventos infecciosos considerados fueron neumonía causada por diferentes virus o *Pneumocystis jirovecii*, cistitis hemorrágica asociada a poliomavirus BK (BKPyV-HC) y ADNemia por citomegalovirus.

3.1. Cinética plasmática de la carga viral de TTV, AVT y HPgV-1 en el alo-TPH

Para el análisis de la carga viral, se dispuso de un total de 364 muestras distribuidas de la siguiente manera: 52 muestras se obtuvieron antes del trasplante (pre-acondicionamiento), 45 muestras en el día del trasplante (muestra basal), 64 muestras en el día +30, 65 muestras en el día +60, 61 muestras en el día +90, 44 muestras en el día +120 y 33 muestras en el día +180.

Durante el período de estudio, la gran mayoría de los pacientes presentaron ADN detectable de TTV (73/75) o AVT (64/75) (al menos en una muestra), lo que representó el 97% y 85% de los casos, respectivamente. Observamos que la tasa de detección de TTV y AVT siguió un patrón similar a lo largo del período de estudio, es decir, disminuyó en un 15% en el día +30 en comparación con la carga basal, para luego aumentar progresivamente hasta alcanzar su pico máximo en el día +90 (100% para TTV y 82% para AVT). Los resultados se muestran en la Tabla V.11.

Tabla V.11. Tasa de detección y cargas virales plasmáticas de ADN de Torque teno virus (TTV), ADN de Anellovirus Totales (AVT) y ARN de Pegivirus Humano 1 en diferentes momentos previos o posteriores al trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH)

Tiempo de monitorización de la carga viral (n° de muestras analizadas)	TTV Detección (%), Mediana carga viral [Rango IQR] en log ₁₀ copias/ml	AVT Detección (%), Mediana carga viral [Rango IQR] en log ₁₀ copias/ml	HPgV-1 Detección (%), Mediana carga viral [Rango IQR] en log ₁₀ copias/ml
Pre-trasplante (52)	77%, 4.15 [2.16-5.36]	43%, 0 [0-3.20]	48%, 0 [0-4.78]
Basal (45)	78%, 4.41 [2.96-5.68]	36%, 0 [0-2.54]	42%, 0 [0-4.01]
+30 (64)	63%, 3.40 [0-4.58]	21%, 0 [0-0]	51%, 2.16 [0-4.31]
+60 (65)	94%, 6.24 [4.61-7.50]	65%, 3.0 [0-3.83]	56%, 2.36 [0-4.52]
+90 (61)	100%, 7.29 [6.28-8.11]	82%, 3.97 [3.14-4.98]	59%, 2.72 [0-4.67]
+120 (44)	96%, 7.12 [5.50-8.22]	80%, 3.61 [2.61-4.59]	64%, 4.04 [0-5.35]
+180 (33)	97%, 6.53 [4.85-8.25]	65%, 2.63 [0-4.36]	56%, 3.79 [0-5.02]

TTV, Torque Teno Virus; AVT, Anellovirus Totales; HPgV-1, Pegivirus Humano-1.

La cinética de la carga de ADN de TTV y AVT en el plasma, representada en la Figura V.13, fue comparable, con niveles mínimos y máximos medidos en los días +30 y +90, respectivamente (Figura V.13 y Tabla V.11).

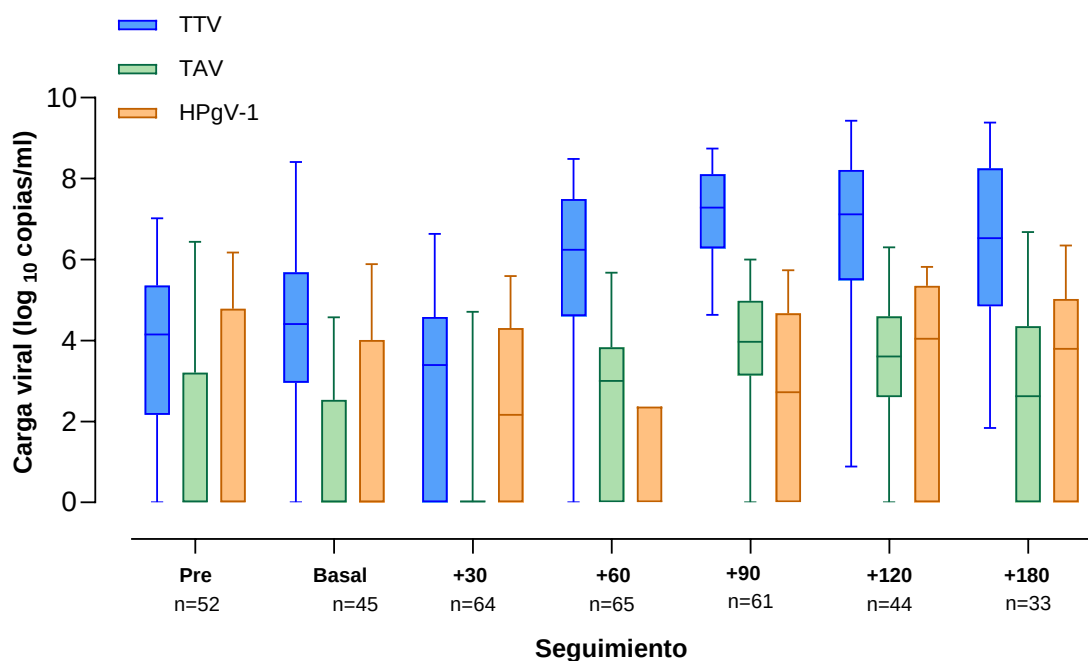


Figura V.13. Cargas virales de TTV, AVT y HPgV-1 en receptores de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas alogénicas a lo largo del período de estudio. Se muestra el número de muestras disponibles en cada punto de monitorización.

Aunque las cargas virales de TTV y AVT mostraron una correlación bastante buena (Rho: 0.71; IC del 95%: 0.66-0.76; $P < 0.001$ -Figura V.14-), las primeras fueron significativamente más altas que las segundas (mediana general de 5.96 log₁₀ copias/ml; rango: 1.11-9.64 vs. mediana general de 3.90 log₁₀ copias/ml; rango: 2.05-7.07; $P = 0.01$) en todos los puntos temporales (Tabla V.11).

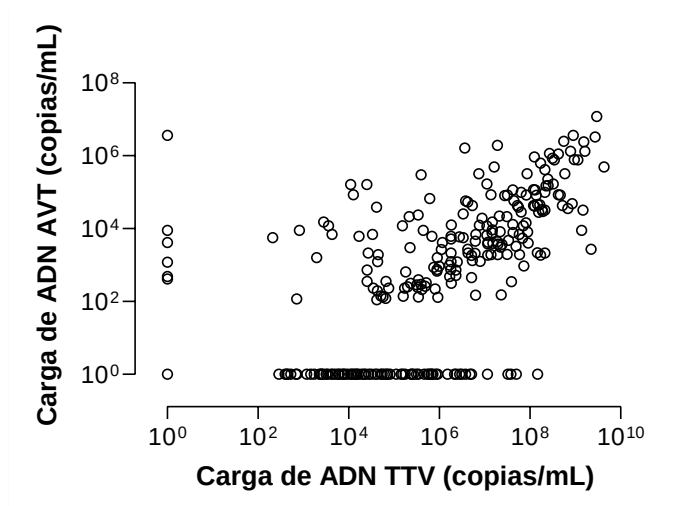


Figura V.14. Correlación entre las cargas plasmáticas de ADN de TTV y AVT en receptores de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.

El HPgV-1 se detectó en al menos una muestra de 50 de los 75 pacientes (66%). La tasa de detección del HPgV-1 se mantuvo estable durante el estudio, con un mínimo del 42% en el día del trasplante y un máximo del 64% en el día +120. Sin embargo, la carga de ARN del HPgV-1 mostró un aumento constante desde antes del trasplante (mediana: 0; rango: 0-4.78 $\log_{10}$ copias/ml) hasta alcanzar su nivel máximo en el día +120 (4.04 $\log_{10}$ copias/ml; rango: 0-5.35) (Figura V.13). No se encontraron variables demográficas o clínicas asociadas con la tasa de detección del TTV, AVT o HPgV-1 en nuestra cohorte (datos no mostrados).

3.2 Monitorización de la carga viral de TTV, AVT, HPgV-1 para predecir eventos infecciosos

En primer lugar, nuestro objetivo fue investigar si las cargas virales de TTV, AVT y HPgV-1, medidas en diferentes momentos antes o después del alo-TPH, diferían entre los pacientes que desarrollaron o no ciertos eventos infecciosos. Dado que se presume que la carga de anellovirus y HPgV-1 está modulada por células T específicas del virus, solo consideramos para los análisis los eventos infecciosos que ocurrieron en la población del estudio durante el período de estudio y que probablemente estuvieron asociados con respuestas deficientes de las células T; concretamente, neumonía (ocurriendo a una mediana de 44 días; rango 4-144 después del trasplante) debida a SARS-CoV-2 (n=3), *Pneumocystis jirovecii* (n=1) o CMV (n=1), ADNemia por CMV (detectada a una mediana de 47 días después del trasplante; rango, -8 a 49) (n=36) y cistitis hemorrágica

asociada al virus BK (BKPyV-HC) (n=18), diagnosticada a una mediana de 21 días después del trasplante (rango, 8-82).

Un total de 40 pacientes (53%) desarrollaron uno o más eventos infecciosos durante los primeros 180 días después del alo-TPH; específicamente, 32 (43%) pacientes tuvieron un episodio de infección durante los primeros 30 días, 6 (8%) entre los días +31 y +60, y 6 (8%) entre los días +61 y +90. Dada la distribución de los eventos infecciosos a lo largo del tiempo, nos centramos en evaluar si las cargas de TTV, AVT y HPgV-1, cuantificadas ya sea antes del trasplante, el día del trasplante en el estado basal o en el día +30, estaban asociadas con la ocurrencia de infecciones que se desarrollaran después de estos puntos temporales. Sin embargo, como se muestra en la Tabla V.12, no encontramos evidencia de tal asociación.

Tabla V.12. Cargas de ADN de TTV, AVT y ARN de HPgV-1, medidas antes o en el momento del alo-TPH, o en el día +30, en pacientes con o sin infecciones y enfermedad aguda de injerto contra huésped ocurridas en los primeros 180 días después del trasplante.

Parámetro viroológico	Eventos infecciosos ^a			Enfermedad Aguda de Injerto Contra Huésped ^b		
TTV (mediana log₁₀ copias/ml) [IQR]	Si	No	P valor	Si	No	P valor
Pre-trasplante	4.41 [2.9-5.5]	3.98 [0-5.2]	0.41	4.00 [0-5.5]	4.29 [3.2-5.3]	0.72
Basal	4.52 [0.8-5.8]	4.05 [3.1-5.5]	0.93	4.31 [3.2-6.5]	4.41 [0-5.6]	0.58
+30	3.80 [2.5-4.51]	3.14 [0-4.6]	0.46	4.53 [3.6-6.1]	2.66 [0-4.4]	0.02
ATV (mediana log₁₀ copias/ml [IQR])	Si	No	P valor	Si	No	P valor
Pre-trasplante	0 [0-4.08]	0 [0-3.08]	0.80	0 [0-3.37]	0 [0-3.33]	0.65
Basal	0 [0-2.57]	0 [0-2.69]	0.64	0 [0-3.31]	0 [0-2.32]	0.21
+30	0 [0-4.32]	0 [0-0]	0.21	0 [0-0]	0 [0-0]	0.47
HPgV-1 (mediana log₁₀ copias/ml [IQR])	Si	No	P valor	Si	No	P valor
Pre-trasplante	2.08 [0-4.33]	0 [0-5.49]	0.71	0 [0-3.26]	3.48 [0-5.48]	0.03
Basal	0 [0-4.21]	0 [0-3.54]	0.61	0 [0-3.61]	0 [0-4.25]	0.49
+30	2.29 [0-4.50]	2.17 [0-4.30]	0.92	2.72 [0-4.59]	0 [0-4.32]	0.69

^aUn total de 39 pacientes tuvieron uno o más eventos infecciosos, incluyendo neumonía causada por SARS-CoV-2 (n=3), Pneumocystis jirovecii (n=1) o Citomegalovirus (n=1), ADNemia por Citomegalovirus (n=36) y cistitis hemorrágica asociada al virus BK (n=18).

^bUn total de 29 pacientes desarrollaron enfermedad aguda de injerto contra huésped (cualquier grado)

De manera similar, se observó una falta de asociación cuando solo se consideraron las cargas virales de pacientes que dieron positivo en la prueba de PCR respectiva (TTV, AVT, HPgV-1) para los análisis (datos no mostrados). Además, desde un punto de vista cualitativo, dar positivo por cualquiera de los virus mencionados antes del trasplante, en el estado basal y en el día +30 no estuvo asociado con la ocurrencia de eventos infecciosos (valores de P que van desde 0.12 hasta 0.87).

Se registraron un número suficiente de episodios tempranos de cistitis hemorrágica asociada al virus BK (n=11) y ADNemia por citomegalovirus (n=36), que ocurrieron en los primeros 30 días después del trasplante, para evaluar de manera independiente la posible asociación entre las cargas de TTV, AVT y HPgV-1 medidas ya sea antes del trasplante o en el estado basal, y la ocurrencia de estos eventos clínicos dentro de este período de tiempo. Si bien no se observaron diferencias significativas entre las cargas de TTV, AVT y HPgV-1 en los pacientes que desarrollaron ADNemia por CMV o no, tanto los niveles de ADN de TTV antes del trasplante como en el día del trasplante (basal) fueron significativamente mayores en los pacientes que posteriormente desarrollaron BKPyV-HC en comparación con aquellos a quienes no se diagnosticó la enfermedad (mediana de 5,26 log₁₀ copias/ml [4,60-7,08] vs. 3,85 log₁₀ copias/ml [0-5,19]; P<0.01 antes del trasplante y mediana de 5,89 log₁₀ copias/ml [4,92-6,86] vs. 3,45 log₁₀ copias/ml [0-5.29] P<0,01 en la línea de base) (Figura V.15).

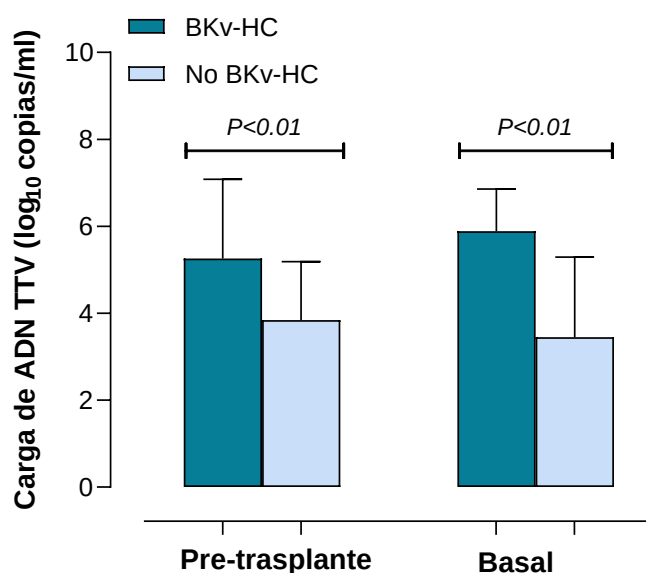


Figura V.15. Asociación de las cargas de ADN del virus Torque Teno (TTV) en plasma y la posterior aparición de la cistitis hemorrágica asociada al poliomavirus BK (BKPyV-HC). Se muestran los valores de P significativos.

Para evaluar la capacidad predictiva de las cargas virales de TTV en pre-acondicionamiento y en el estado basal para la cistitis hemorrágica temprana asociada al poliomavirus BK (BKPyV-HC), realizamos un análisis de curva ROC. Los resultados mostraron que ambas medidas de carga viral de TTV tuvieron una capacidad predictiva similar. Específicamente, se encontró que las cargas virales de TTV en pre-acondicionamiento superiores a 4.40 log₁₀ copias/ml presentaron una sensibilidad del 89% (IC 95%, 54%-99%), una especificidad del 63% (IC 95%, 48%-76%), un valor predictivo positivo (VPP) del 33% y un valor predictivo negativo (VPN) del 96% (AUC 0.78; P<0.001). Estos resultados sugieren que la carga viral de TTV medida antes del trasplante puede ser útil para predecir la aparición temprana de BKPyV-HC. De manera similar, las cargas virales de TTV en el estado basal mayores de 4.58 log₁₀ tuvieron una sensibilidad del 100% (IC 95%, 62%-100%), una especificidad del 65% (IC 95%, 49%-78%), un VPP del 38% y un VPN del 100% (AUC 0.84; P<0.001).

Cuando se consideraron únicamente los pacientes que dieron positivo en la prueba para TTV en los análisis, se observó una tendencia hacia cargas virales más altas antes del trasplante en los pacientes que desarrollaron la cistitis hemorrágica asociada al virus BK (BKPyV-HC) (mediana, 5.26 log₁₀ copias/ml; IQR, 4.68-6.88, frente a mediana, 4.44 log₁₀ copias/ml; IQR, 3.71-5.39; P=0.08). A su vez, los pacientes que desarrollaron BKPyV-HC tenían cargas basales de ADN de TTV significativamente más altas (P=0.02) que aquellos que no lo hicieron (mediana, 5.89 log₁₀ copias/ml; IQR, 5.07-6.65 frente a mediana, 4.58 log₁₀ copias/ml; IQR, 3.39-5.59). En estos pacientes, las cargas virales de TTV en el estado basal mayores a 5.37 log₁₀ copias/ml mostraron una sensibilidad del 75% (IC del 95%, 44.9%-100%), especificidad del 78.4% (IC del 95%, 63.4%-93.3%), valor predictivo positivo (VPP) del 42% (IC del 95%, 21.4-67.4) y valor predictivo negativo (VPN) del 93.5% (IC del 95%, 79.3-98.2) (AUC, 0.78; P=0.018). A su vez, dar positivo o negativo en la prueba para TTV antes del trasplante, en el estado basal o en el día +30 no se asoció con la posterior aparición de BKPyV-HC (valores de P, 1.0, 0.24, 0.14, respectivamente).

Es importante destacar que los análisis de frecuencia revelaron que la recepción de un injerto haploidéntico o HLA-no coincidente era más común entre los pacientes que desarrollaron BKPyV-HC temprana (82% frente a 39%; P=0.03). En contraste, tanto las cargas de AVT pre-acondicionamiento y en estado basal, y las cargas de HPgV-1, eran comparables en ambos grupos de comparación.

3.3 Monitorización de la carga plasmática de TTV, AVT y HPgV-1 para predecir EICHa

Un total de 29 pacientes (39%) desarrollaron EICHa en una mediana de 29 días después del trasplante (rango, 6-133), de los cuales 18 presentaron enfermedad de grado II-IV y recibieron corticosteroides en dosis altas ($>1\text{mg/kg/día}$). En la Tabla V.12 se detallan las cargas plasmáticas de TTV, AVT y HPgV-1 medidas antes del trasplante, en estado basal o en el día +30, tanto en pacientes con EICHa como en aquellos sin esta complicación (cualquier grado).

La carga mediana de ADN de TTV determinada en el día +30 fue significativamente mayor (mediana de $4.53 \log_{10}$ copias/ml vs. $2.66 \log_{10}$ copias/ml; $P=0.02$) en los pacientes que desarrollaron EICHa en comparación con aquellos que no lo hicieron (Figura V.16). Se observó una tendencia similar cuando solo se consideraron los casos de EICHa de grado II-IV (mediana de $5.81 \log_{10}$ copias/ml vs. mediana de $2.79 \log_{10}$ copias/ml; $P<0.001$). El análisis de la curva ROC ($\text{AUC}=0.73$; $P=0.02$) mostró que las cargas virales de TTV por encima de $3.38 \log_{10}$ en el día +30 podrían predecir la aparición de EICHa subsiguiente con una sensibilidad del 90%, una especificidad del 57%, un valor predictivo positivo (VPP) del 28% y un valor predictivo negativo (VPN) del 97%. Asimismo, las cargas virales de TTV por encima de $5.07 \log_{10}$ predijeron la aparición de EICHa de grado II-IV con una sensibilidad del 83% (95% CI; 43.6-97.0), una especificidad del 91% (95% CI, 81.1-96.2), un VPP del 50% (95% CI, 23.7-76.3) y un VPN del 98% (95% CI, 90.1-99.7); ($\text{AUC}=0.88$; $P=0.002$).

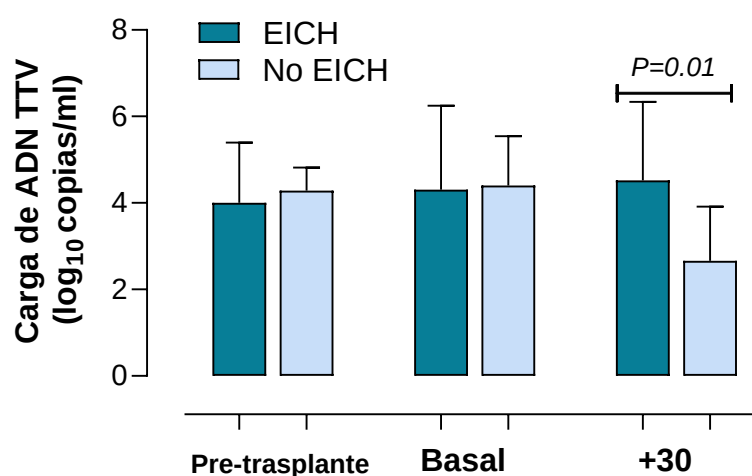


Figura V.16. Asociación de las cargas de ADN del virus Torque Teno (TTV) en plasma y la posterior aparición de la enfermedad aguda de injerto contra huésped (EICHa) de cualquier grado. Se muestran los valores de P significativos.

Entre los pacientes que dieron positivo para el ADN de TTV para el día +30, las cargas de ADN de TTV fueron significativamente más altas ($P=0.017$) en aquellos que desarrollaron EICHa de grado II-IV (mediana, 5.81 log₁₀ copias/ml; IQR, 5.16-6.34 vs. mediana, 4.11 log₁₀ copias/ml; IQR, 3.41-4.71), mientras que las cargas virales eran comparables ($P=0.28$) entre pacientes con o sin EICHa de cualquier grado. En este sentido, las cargas virales de TTV por encima de 5.11 log₁₀ copias/ml predijeron la aparición de EICHa de grado II-IV con una sensibilidad del 83% (95% CI.43.6-97.0), especificidad del 85.0% (95% CI.69.9.1-93.6), VPP del 50% (95% CI.23.7-76.3), y VPN del 96.6% (95% CI.83.3-99.4); (AUC, 0.80; $P=0.019$).

Finalmente, la tasa de detección (cualquier nivel) de ADN de TTV para el día +30 no fue diferente entre pacientes con o sin EICHa de cualquier grado (17/25 vs. 23/39; $P=0.46$) o EICHa de grado II-IV (11/15 vs. 29/49; $P=0.38$). Curiosamente, como se muestra en la Tabla V.12, en general, las cargas de HPgV-1 antes del trasplante, pero no en el estado basal, fueron significativamente más altas ($P=0.03$) en pacientes que no tuvieron EICHa en comparación con aquellos que sí la tuvieron (mediana, 3.48 log₁₀ copias/ml vs. indetectable); esta observación se mantuvo cuando solo se consideraron los episodios de grado II-IV para los análisis (mediana, 2.98 log₁₀ copias/ml vs. indetectable; $P=0.03$) o cuando solo se incluyeron en el análisis los pacientes que dieron positivo para HPgV-1 mediante PCR en este punto de tiempo (mediana, 5.45 log₁₀ copias/ml; IQR 4.19-5.84 vs. mediana, 3-71; IQR, 2.87-4.20; $P=0.003$). En este contexto, es importante destacar que la detección de HPgV-1 antes del trasplante se asoció con una incidencia más baja de EICHa de grado II-IV (detectable en 24 de 44 pacientes sin la enfermedad y en 1 de 8 pacientes con la enfermedad; $P=0.05$).

En este estudio, caracterizamos más a fondo la cinética de las cargas virales de TTV, AVT y HPgV-1 en plasma en pacientes sometidos a alo-TPH e investigamos si las cargas virales estimadas en diferentes momentos después del trasplante podrían predecir la aparición de EICHa grave (o su tratamiento con corticoides) y la aparición de ciertos eventos infecciosos que se desarrollaron en nuestros pacientes y que probablemente estén asociados con respuestas deficientes de las células T. Entre estos eventos infecciosos se encuentran la neumonía debida a SARS-CoV-2, *Pneumocystis jirovecii* o CMV, la cistitis hemorrágica asociada al virus BKPyV y la ADNemia por CMV.

Para cuantificar el ADN de AVT, utilizamos una PCR en tiempo real de tipo "in house" que produjo cargas virales más bajas que las proporcionadas por nuestra PCR en tiempo real para TTV y fue menos sensible (115), a pesar de ser capaz de detectar anellovirus distintos de TTV. Esta observación ya había sido demostrada en nuestro segundo trabajo (Forqué L. Transplantation. 2023) en la cohorte de receptores de trasplantes de órganos sólidos.

En el presente estudio, observamos que la dinámica de la carga viral de TTV siguió un patrón ya conocido en la literatura científica (104,105) con niveles más bajos alrededor del momento del injerto y niveles máximos alcanzados en el día +90. Además, encontramos una correlación significativa entre los niveles de ADN de TTV y AVT (Rho , 0.71), por lo que no es sorprendente que la cinética de la ADNemia por AVT reflejara la de la ADNemia por TTV. En cuanto al HPgV-1, nuestros resultados mostraron que alrededor del 66% de los pacientes presentaron detección de ARN del virus, una cifra ligeramente superior a lo previamente reportado en la literatura (rango, 14 a 61%) (33,42,143,144). Aunque no podemos afirmarlo con certeza, existen varias posibles explicaciones para este hallazgo. Una de ellas podría estar relacionada con el rendimiento analítico de las RT-PCR utilizadas en cada investigación o incluso con la historia de sustitución de componentes sanguíneos entre los pacientes en las distintas cohortes. Estos factores, junto con otros posibles factores desconocidos, podrían haber influenciado los resultados que observamos en nuestro estudio.

Aunque la tasa de detección de HPgV-1 se mantuvo relativamente estable durante todo el período del estudio, la adquisición de novo de HPgV-1 después del trasplante puede haber tenido lugar en algunos pacientes que dieron negativo en la muestra de preacondicionamiento y positivo en una o más muestras postrasplante. Sin embargo, no podemos descartar que estos pacientes ya estuvieran infectados antes del trasplante y

presentaran cargas de ARN de HPgV-1 por debajo del límite de detección del ensayo. Del mismo modo, nuestros datos sugieren que varios pacientes podrían haber adquirido la infección por anellovirus en el periodo postrasplante. Curiosamente, la dinámica de la carga viral del HPgV-1 siguió una tendencia similar en comparación con las cargas de ADN de TTV o AVT, aunque los niveles máximos se detectaron más tarde (día +120). Este hallazgo proporciona evidencia adicional de la naturaleza linfotrópica del HPgV-1 y la importancia de los mecanismos dependientes de células T en el control final de la replicación viral.

En nuestra opinión, las observaciones más relevantes del presente estudio son las siguientes. En primer lugar, aunque las cargas de TTV, AVT y HPgV-1 medidas en diferentes momentos no parecieron anticipar la aparición de eventos infecciosos subsiguientes considerados colectivamente, encontramos que las cargas de ADN de TTV medidas antes del trasplante y en estado basal predecía el riesgo de desarrollar BKPyV-HC temprana (en los primeros 30 días) después del trasplante, independientemente de si se consideraban para los análisis todos los pacientes o solo aquellos que daban positivo por PCR en estos puntos temporales. Específicamente, un valor de corte de carga viral de $TTV \geq 4.40 \log_{10}$ (antes del trasplante) y $\geq 4.58 \log_{10}$ (en estado basal) mostró una alta sensibilidad (89%) y un alto valor predictivo negativo (VPN) (96%) para predecir la BKPyV-HC. Esto sugiere que la carga de ADN de TTV podría comportarse como un marcador indirecto de inmunosupresión causada ya sea por la enfermedad hematológica subyacente, su tratamiento previo al trasplante, el régimen de acondicionamiento utilizado o una combinación de todos estos factores. De manera sorprendente, un punto de corte bastante similar ($\geq 5.01 \log_{10}$ copias/ml) medido en el día +30 predijo la aparición de cistitis hemorrágica asociada al virus (BKPyV-HC) después de un trasplante renal (98). Otros estudios realizados, en el contexto de TOS, también han encontrado una asociación entre altas cargas de ADN de TTV y ADNemia elevada por BKV (97).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las cargas de TTV, AVT y HPgV-1 en los pacientes que desarrollaron ADNemia por CMV (a cualquier nivel) y los que no, lo que concuerda con hallazgos previos de nuestro grupo en relación con las cargas de ADN de TTV (105).

En segundo lugar, observamos que las altas cargas virales de ADN de TTV, medidas en el día +30 después del injerto, estuvieron asociadas con la posterior aparición de EICHa (grados II-IV o todos los grados), independientemente de que se consideraran

para los análisis todos los pacientes analizados o sólo los que dieron positivo por PCR. Cabe destacar que las cargas virales de TTV superiores a $5,07 \log_{10}$ predijeron la aparición de EICH grado II-IV con una sensibilidad elevada (83%) y un VPN muy alto (98%). Esta observación podría explicarse en función de la naturaleza patogénica inmunitaria de la EICHa y el hecho de que la carga de ADN de TTV alrededor del momento del injerto parece reflejar más la reconstitución inmunitaria que la inmunosupresión (104,105). En línea con nuestros hallazgos, Gilles *et al.* (145) informaron altas cargas de ADN de TTV en el día +30 en pacientes que desarrollaron EICHa durante los primeros 100 días después del trasplante. En otros estudios, también se ha observado una relación directa entre los niveles de ADN de TTV y la EICHa (146,147). Sin embargo, Schmitz *et al.* no lograron predecir la aparición de complicaciones clínicas relacionadas con la inmunidad basándose en la monitorización del ADN de TTV (148). Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias en las características clínicas y demográficas de los pacientes en estas cohortes.

En tercer lugar, cabe destacar que la infección por HPgV-1 ha sido asociada con efectos inmunomoduladores y resultados clínicos beneficiosos en individuos infectados con el VIH y el virus del Ébola (149). En el contexto de alo-TPH, en un estudio previo (150), se ha observado que los receptores con viremia por HPgV-1 mostraban un deterioro de la immuno-reconstitución de las células NK, pero no en células T, en comparación con pacientes no virémicos por HPgV-1, lo que sugiere un papel inmunomodulador para el HPgV-1. Sin embargo, hasta el momento, ningún estudio realizado en el contexto del alo-TPH ha reportado una asociación entre el HPgV-1 y cualquier resultado clínico, incluyendo infección, EICHa o supervivencia (42,151). En nuestro estudio, encontramos que las cargas de ARN del HPgV-1 previas al trasplante fueron significativamente más bajas en los pacientes que desarrollaron posteriormente EICHa (todos los grados o grado II-IV) en comparación con los que no la presentaron. Se realizó una observación similar cuando sólo se incluyeron los pacientes que dieron positivo en este momento. Además, los pacientes que dieron positivo para el ARN del HPgV-1 antes del acondicionamiento tuvieron una tasa más baja de EICHa (todos los grados o grados II-IV) en comparación con los pacientes que dieron negativo. En consonancia con esta última observación, Vu *et al.* (42) informaron de una tendencia ($p=0,19$) hacia una menor incidencia de EICHa de grados II-IV en los pacientes que

dieron positivo para el VPHg-1 en el momento del trasplante en comparación con los pacientes que no dieron positivo.

Sin embargo, la interpretación de nuestros hallazgos no es sencilla debido a que las cargas virales medidas en el estado basal o en cualquier momento posterior al trasplante no se asociaron con el riesgo posterior de desarrollar EICHa. Se podría argumentar que la carga de ARN del HPgV-1 previa al trasplante podría reflejar el impacto de la enfermedad subyacente y su tratamiento en el estado de inmunocompetencia, lo que podría influir en el riesgo de EICHa. Sin embargo, debido al tamaño muestral reducido de nuestro estudio, no podemos descartar la posibilidad de que estos resultados sean fruto de una variabilidad aleatoria o casualidad.

La principal limitación de nuestro estudio radica en el tamaño de muestra reducido, lo que limitó nuestra capacidad para evaluar el impacto de diversos factores que podrían asociarse con los resultados clínicos y la carga viral en sangre. Entre estos factores, se incluye la naturaleza de la enfermedad subyacente, el tipo de alo-TPH o el régimen inmunosupresor utilizado, así como, un posible efecto "dosis-dependiente" de la carga de ADN de TTV en el riesgo de BKPyV-HC. Además, dada la naturaleza monocéntrica de nuestro estudio, es incierto si nuestros hallazgos pueden generalizarse a otros centros.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que las cargas de ADN de TTV y ARN de HPgV-1 previas al trasplante o en el estado basal pueden ser de utilidad adicional para identificar a los receptores de alo-TPH con mayor riesgo de BKPyV-HC o EICHa. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para demostrar o refutar esta suposición y obtener una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes implicados.

4. Utilidad de la monitorización de la carga plasmática de ADN de TTV para predecir eventos infecciosos nosocomiales que conducen a un mal pronóstico, así como la mortalidad en pacientes críticos con COVID-19.

Dado que en pacientes graves de COVID-19 coexisten un cierto grado de inmunosupresión y un estado hiperinflamatorio, y ambas condiciones pueden afectar la replicación de TTV, en este estudio exploratorio nos propusimos determinar si la carga viral podría ser un biomarcador útil para predecir malos resultados clínicos en pacientes críticos con COVID-19. Por otro lado, dado que la lesión hepática es frecuente en pacientes con COVID-19 (152) y considerando que el TTV es hepatotrópico, aunque aún no se ha dilucidado completamente su asociación con enfermedades hepáticas (112), nuestro segundo objetivo fue investigar si las cargas de ADN de TTV se correlacionan con los niveles séricos de transaminasas en pacientes críticos con COVID-19.

A continuación, se presentan los resultados de este cuarto y último estudio que forma parte de la presente tesis doctoral (Forqué L. J Clin Virol. 2022). Para este estudio, se reclutaron 50 pacientes graves con COVID-19, de los cuales 34 (68%) eran hombres y 16 (32%) eran mujeres, con una edad media de 65.5 años (rango 21-79). En nuestra cohorte de pacientes, la obesidad e hipertensión fueron las comorbilidades más frecuentes, 52% y 44%, respectivamente. Todos los pacientes requirieron ventilación mecánica durante su ingreso en la UCI y recibieron tratamiento con corticosteroides. La mediana del tiempo de estancia en la UCI fue de 20 días (rango, 5-67). Las demás características clínicas y demográficas se detallan en la tabla 1 del presente estudio (Forqué L. J Clin Virol. 2022). Cabe destacar que todos los casos de COVID-19 en nuestra cohorte de pacientes fueron causados por la variante Wuhan-Hu-1 D614G, confirmada mediante secuenciación del genoma completo (datos no mostrados).

4.1 Cinética plasmática de la carga viral de TTV en pacientes críticos con COVID-19

En una primera fase, nos propusimos caracterizar la cinética plasmática de la carga de ADN de TTV. Para ello, procesamos un total de 194 muestras de plasma de 50 pacientes, con una mediana de 4 muestras por paciente (rango, 2-8), utilizando la técnica de PCR a tiempo real. Se detectó ADN de TTV en una o más muestras en el 57,2 % de los casos (n=111) correspondientes a 38 pacientes (76 %). De los 38 pacientes con ADN

de TTV detectable, 30 presentaron esta positividad al inicio del estudio, con una mediana de 4 días (rango, 1-7 días) después de su ingreso en la UCI. Por otro lado, para los 8 pacientes restantes, la presencia de ADN de TTV se documentó durante su estancia en la UCI.

A continuación, en la Figura V.17 se muestra la evolución de la carga de ADN de TTV y el recuento de linfocitos desde el ingreso en la UCI y a lo largo del periodo de estudio.

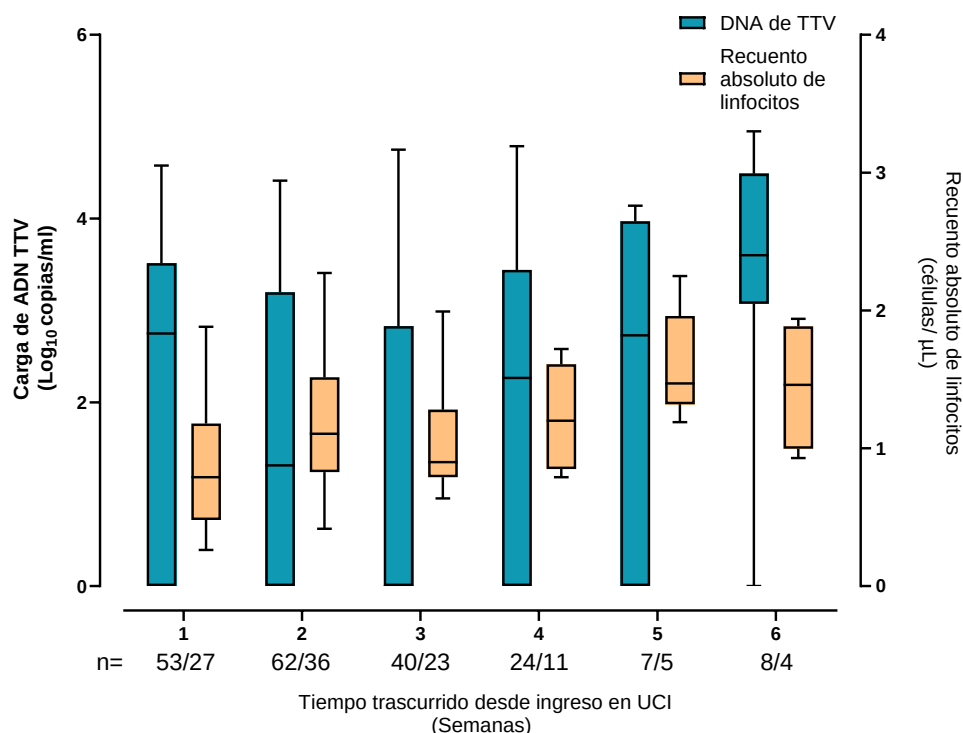


Figura V.17. Representación gráfica de las cargas de ADN de TTV en plasma y el recuento absoluto de linfocitos en pacientes con COVID-19 en estado crítico. Se muestra el número de muestras disponibles para el análisis en los diferentes puntos de tiempo después del ingreso en UCI.

En general, la carga mediana de ADN de TTV al inicio en los 38 pacientes que tuvieron uno o más resultados positivos en la PCR durante su estancia en la UCI fue de 2.8 log₁₀ copias/ml (rango, 0-4.7). La carga de ADN de TTV en plasma tendió a disminuir con el tiempo, alcanzando un nivel bajo en la semana 3, para luego aumentar hasta alcanzar niveles ligeramente más altos, que los medidos al inicio, en la semana ≥ 6. El pico máximo de carga de ADN de TTV se alcanzó después de la semana 4, con un valor máximo de 4.75 log₁₀ copias/ml. Se observó una disminución significativa (P=0.01) de los linfocitos en sangre periférica en la semana 3 después del ingreso en la UCI. Posteriormente, los linfocitos aumentaron de manera constante hasta alcanzar niveles más altos que los presentes al inicio (en las semanas 5/ ≥ 6).

No se observó una relación consistente entre la cinética de la carga de ADN de TTV y la de los linfocitos en sangre periférica; sin embargo, se observó una correlación significativa ($P=0.004$), aunque débil e inversa ($Rho = -0.28$) entre estos dos parámetros (Figura V.18).

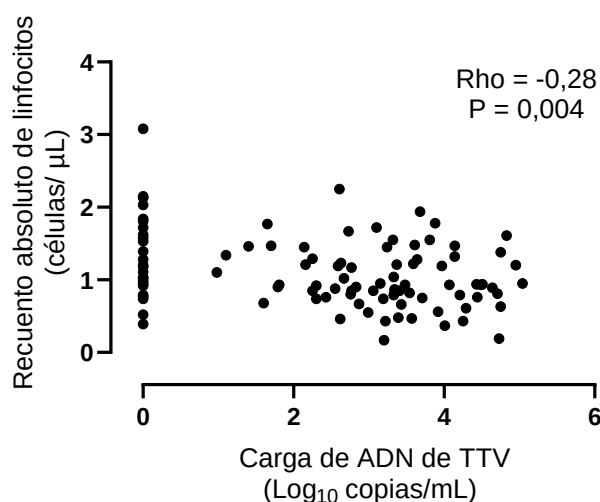


Figura V.18. Correlación entre la carga de ADN de TTV en plasma y los recuentos absolutos de linfocitos en pacientes con COVID-19 en estado crítico. Se muestran los valores de Rho y P.

4.2 Correlación entre la carga de ADN de TTV y niveles séricos de biomarcadores de gravedad de COVID-19

En esta parte de nuestro estudio investigamos si las cargas de ADN de TTV en plasma se correlacionaron con los niveles de ciertos biomarcadores de gravedad, como los marcadores de inflamación (IL-6, ferritina y PCR), actividad procoagulante (Dímero-D) y daño tisular (LDH) en sueros emparejados. Los resultados que obtuvimos se presentan en la Figura V.19.

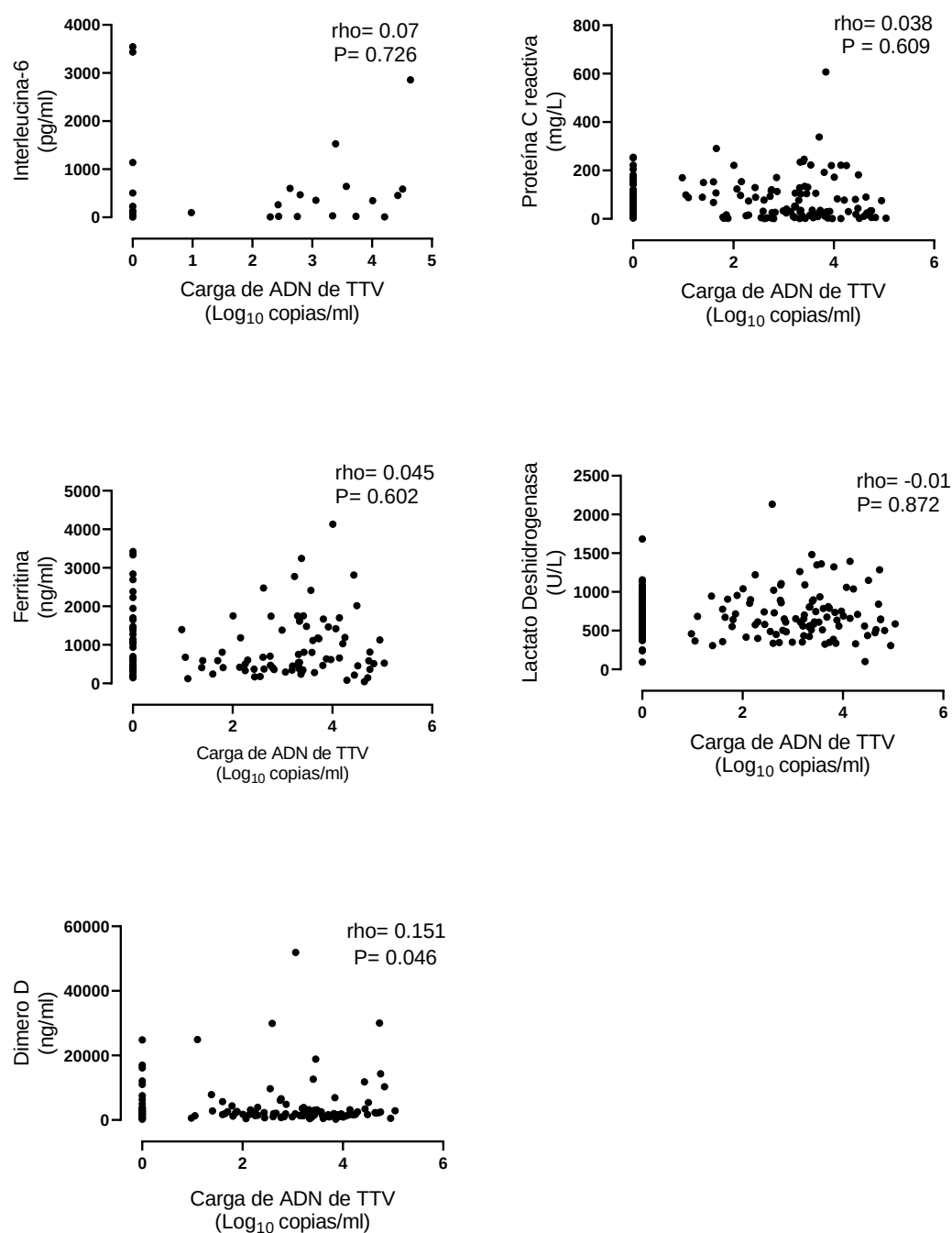


Figura V.19. Correlación entre la carga de ADN de TTV en plasma y los niveles de interleucina-6, ferritina, dímero-D, proteína C reactiva y lactato deshidrogenasa en pacientes con COVID-19 en estado crítico. Se muestran los valores de Rho y P.

Como podemos observar, no se encontró una correlación directa entre la carga de ADN de TTV y los niveles séricos de ninguno de los biomarcadores estudiados.

Considerando que TTV es hepatotrópico y que en pacientes graves con COVID-19 es frecuente observar lesiones hepáticas, también quisimos examinar la posible asociación entre las cargas de ADN de TTV y biomarcadores que podrían indicar la función hepática, como GGT, ALT y AST. Los resultados que obtuvimos se presentan en la Figuras V.20.

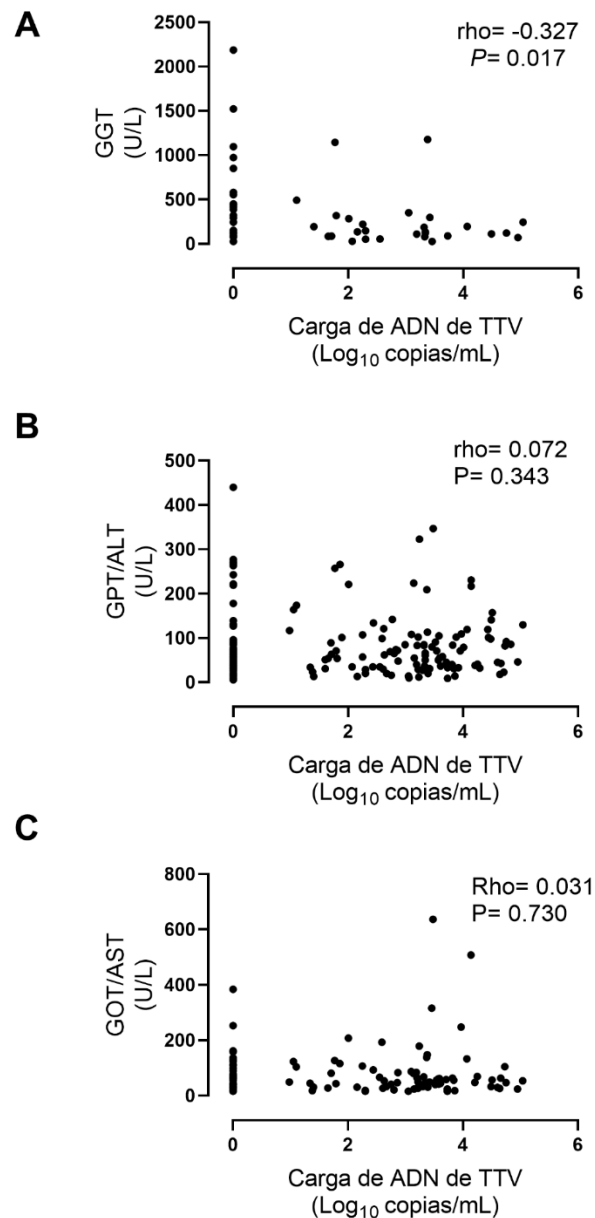


Figura V.20. Correlación entra la carga de ADN de TTV en plasma y los niveles de gamma glutamil transferasa (GGT), alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) en plasma, en pacientes críticos con COVID-19. Se muestran valores de Rho y P.

En nuestro estudio, no se observó una correlación directa entre la carga de ADN de TTV y los niveles séricos de ninguno de estos biomarcadores. Los resultados sugieren que, al menos en nuestra cohorte de pacientes, el ADN de TTV no parece tener una influencia significativa en la severidad de COVID-19 ni en los marcadores de daño tisular y función hepática.

4.3 Relación entre la carga de ADN de TTV y eventos clínicos en el paciente crítico con COVID-19

Como último enfoque de nuestro análisis, tratamos de investigar si la monitorización de la carga de ADN de TTV en plasma podría ser útil para predecir la aparición de ciertos eventos infecciosos nosocomiales (infecciones del torrente sanguíneo y neumonía asociada a la ventilación mecánica), así como la mortalidad en pacientes críticos con COVID-19.

De los 50 pacientes, 28 presentaron uno o más eventos infecciosos durante su estancia en la UCI (**Tabla V.13**). Las infecciones del torrente sanguíneo y la VAP se diagnosticaron con una mediana de 19 días (rango, 4-62) y 10 días (rango, 3-48) respectivamente, después del ingreso en la UCI.

Tabla V.13. Agentes causantes de bacteriemia/fungemia y neumonía asociada a ventilación en pacientes críticos con COVID-19.

Condición clínica	Nº (%)
Neumonía asociada a ventilación	14 (28)
Bacteriemia/fungemia	9 (18)
Neumonía asociada a ventilación y bacteriemia	5 (10)
Agente causante	Nº (%)
Neumonía asociada a ventilación	
<i>Klebsiella</i> spp.	9 (18)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (4)
<i>Enterobacter</i> spp.+ <i>Aspergillus</i> spp.	1 (2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (2)
Sin identificación	1 (2)
Bacteriemia/Fungemia	
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (10)
<i>Candida</i> spp.	4 (8)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (2)

Como se puede apreciar en la Tabla V.14, de manera general, los pacientes con ADN de TTV detectable en plasma (en una o más muestras) durante su estancia en la UCI (n=38) presentaron una mayor incidencia de eventos infecciosos en comparación con aquellos que arrojaron resultados negativos de manera sistemática para el ADN de TTV durante el período de estudio (P=0.013).

Tabla V.14. Detección y carga de ADN de TTV en plasma de pacientes críticos con COVID-19 clasificados por ocurrencia de eventos clínicos y muerte.

Resultado clínico	Parámetros basados en el ADN de TTV			
	Detección de ADN de TTV en plasma durante la estancia en UCI. N° de pacientes (%)	No detección de ADN de TTV en plasma durante la estancia en la UCI. N° de pacientes (%)	Carga de ADN de TTV $\geq 3,3 \log_{10}$ copias/ml dentro de la semana 1 después del ingreso en la UCI. N° de muestras (%) ^a	Carga de ADN de TTV $< 3,3 \log_{10}$ copias/ml dentro de la semana 1 después del ingreso en la UCI. N° de muestras (%) ^a
Evento infeccioso^b	25 (89.2)	3 (10.7)	10 (45.4)	12 (54.5)
Sin evento infeccioso^b	13 (59.0)	9 (40.9)	4 (22.2)	14 (77.7)
Fallecimiento	15	6	7 (43.7)	9 (56.2)
Supervivencia	23	6	7 (29.1)	17 (70.8)

UCI, unidad de cuidados intensivos; TTV, Torque teno virus.

^a Un total de 13 pacientes se les extrajeron dos muestras de plasma dentro de la primera semana después de la admisión en la UCI.

^b Infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia/fungemia), neumonía asociada a ventilación o ambas.

Además, se observó una tendencia (P=0.16) hacia mayores cargas de ADN de TTV al inicio (<7 días después del ingreso en la UCI) en los pacientes que posteriormente desarrollaron eventos infecciosos en comparación con aquellos que no lo hicieron (mediana, 2.5 $\log_{10}$ copias/ml; rango, 0-4.75, vs. mediana, 0 $\log_{10}$ copias/ml; rango, 0-4.25). Los modelos de Cox ajustados por edad, sexo y APACHE II indicaron que la detección cualitativa del ADN de TTV dentro de la primera semana de estancia en la UCI y las cargas de ADN de TTV $\geq 3.3 \log_{10}$ copias/ml se asociaron con un mayor riesgo de eventos infecciosos posteriores (HR 9.28; IC del 95%, 1.29-69.5; P=0.03 y HR, 2.8; IC del 95%, 0.9-5.2; P=0.08, respectivamente).

Un total de 21 de los 50 pacientes fallecieron. La muerte ocurrió en una mediana de 32 días (rango, 19-59) después del ingreso en la UCI.

No se encontraron diferencias significativas en la mortalidad ($P=0.52$) entre los pacientes con ADN de TTV detectable en plasma y aquellos en los que no se detectó (Tabla V.14). Además, la carga de ADN de TTV en la primera semana después del ingreso en la UCI fue similar ($P=0.33$) entre los pacientes que fallecieron y los que sobrevivieron (mediana, 1.74 log₁₀ copias/ml; rango, 0-4.75 vs. mediana, 2.33 log₁₀ copias/ml; rango, 0-4.14). Los fallecimientos se produjeron después del día 19 desde el ingreso en la UCI, lo que nos permitió calcular el área bajo la curva (AUC) de carga de ADN de TTV previa a ese momento en pacientes con 2 o más resultados positivos consecutivos en la PCR, para analizar su asociación con la mortalidad. Con el fin de evitar cualquier sesgo debido a diferentes momentos de muestreo, calculamos las AUC desde una mediana del día 7 (rango, días 4-10) hasta una mediana del día 17 (rango, 14 a 19) desde el ingreso en la UCI (AUC₇₋₁₇) en 27 pacientes, de los cuales 11 fallecieron y 16 sobrevivieron. Como se muestra en la Figura V.21, se observó una clara tendencia ($P=0.05$) hacia una mayor AUC de ADN de TTV₀₋₁₄ en los pacientes que fallecieron (mediana, log₁₀ 25,8 copias × días × mL⁻¹; rango 0–51,5 en comparación con los que no fallecieron (mediana, log₁₀ 2,95 copias × días × mL⁻¹; rango 0–39,9).

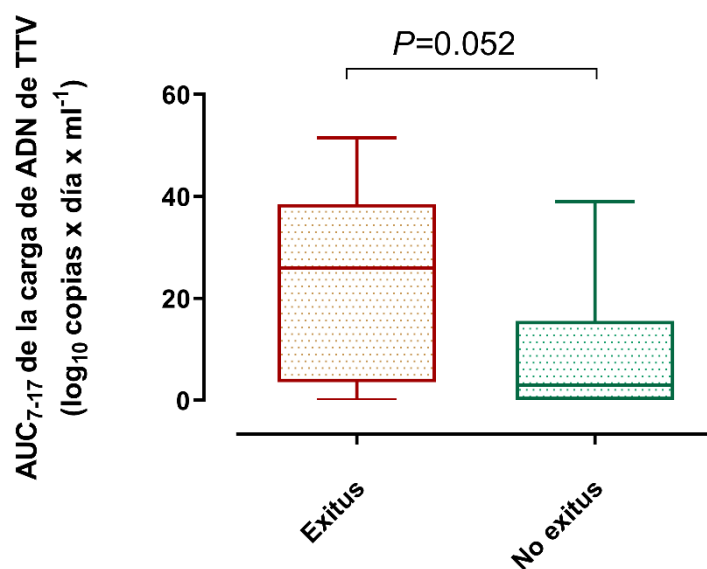


Figura V.21. Box plot que representa el área bajo la curva (AUC) de la carga de ADN de TTV entre el día 7 y 17 (medianas) después del ingreso en UCI, (informado como copias x día x mL⁻¹) de pacientes con COVID-19 en estado crítico que fallecieron o sobrevivieron. Se muestra el P-valor.

En este estudio exploratorio, planteamos la hipótesis de que la monitorización de la carga de ADN de TTV en plasma podría identificar a los pacientes con COVID-19 en estado crítico con mayor riesgo de desarrollar eventos infecciosos nosocomiales que conducen a un mal pronóstico, como infecciones sanguíneas y neumonía asociada a la ventilación mecánica (153,154), así como la mortalidad, condiciones patogénicamente vinculadas a respuestas inmunitarias deficientes o desequilibradas inducidas por el SARS-CoV-2, o ambas.

La carga de ADN de TTV en plasma se correlaciona inversamente con los niveles de ALC periféricos entre 1 y 3 meses después del trasplante renal (90) y en tiempos tardíos ($\geq$ día 100) después del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TPH) (81). Investigamos si esto también ocurría en pacientes críticos con COVID-19. Observamos que, aunque ALC describió una trayectoria típica informada para este grupo de población (156), la trayectoria de la carga de ADN de TTV en plasma no mostró una relación aparente con la de ALC. Sin embargo, se observó una correlación significativa, aunque débil, entre estos dos parámetros.

La naturaleza proinflamatoria in vitro de TTV (83) y el hecho de que la carga de ADN de TTV en el compartimento sanguíneo aumenta en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas en comparación con controles sanos (79,82,106), nos llevó a investigar si se podía documentar una correlación entre los niveles séricos de biomarcadores sustitutos de inflamación o daño tisular, como IL-6, PCR, D-D y LDH, y la carga de ADN de TTV en plasma en pacientes críticos con COVID-19. Sin embargo, no observamos ninguna correlación directa entre las cargas de ADN de TTV en plasma y los niveles séricos de los biomarcadores mencionados en las muestras pareadas. En este sentido, es relevante mencionar que los datos sobre los niveles de IL-6 solo estaban disponibles para 27 muestras de 23 pacientes, y que 9 de estos pacientes estaban en tratamiento con tocilizumab en el momento del muestreo. A pesar de esto, la falta de correlación entre las cargas de ADN de TTV y los niveles séricos de PCR y ferritina, ambos marcadores confiables de un estado hiperinflamatorio en pacientes con COVID - 19, argumenta en contra de que la carga de ADN de TTV sea un buen marcador subrogado de la inflamación en este entorno clínico.

Aunque existe controversia, se ha establecido una relación entre el TTV y enfermedades hepáticas agudas y crónicas tanto en individuos inmunocompetentes como

inmunosuprimidos (112). Dado que la lesión hepática aguda es común en casos graves de COVID-19 (152), decidimos investigar si las cargas de ADN de TTV se relacionaban con los niveles séricos de transaminasas. Sin embargo, no se encontró una correlación directa entre estos parámetros, lo que sugiere que el TTV no tiene un papel significativo en la inducción de daño hepático en pacientes críticamente enfermos de COVID-19.

En pacientes críticos con COVID-19, los eventos de sobreinfección ocurren con frecuencia y empeoran notablemente su pronóstico (153,154). La monitorización de ADNemia de TTV se ha demostrado como una herramienta útil para anticipar la ocurrencia de diversos eventos infecciosos en entornos de trasplante de órganos sólidos y trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas alogénicas (alo-TPH) (90,95,96,105). Nuestros datos sugieren que esto también podría aplicarse a pacientes críticos con COVID-19 en lo que respecta a las infecciones nosocomiales de la corriente sanguínea y la neumonía asociada a la ventilación mecánica (VAP). La relevancia potencial de este hallazgo se basa en dos supuestos debatibles: i) la mayoría, si no todos los adultos, están crónicamente infectados por una o más especies de TTV que pueden acceder al compartimento sanguíneo sin consecuencias clínicas aparentes (44); (ii) la falta de detección de TTV ADNemia, incluso en individuos sanos, puede deberse a limitaciones analíticas (como la insuficiente sensibilidad de las pruebas de PCR actuales), la existencia de reservorios de persistencia viral en órganos y tejidos distintos de la sangre periférica (44,157,158), o ambos; la inmunosupresión natural o iatrogénica puede disminuir la vigilancia inmunitaria de TTV en los sitios de persistencia viral, lo que permite que la TTV ADNemia sea detectable (44). Además, observamos un mayor riesgo de infecciones posteriores en los pacientes que mostraban ADN de TTV detectable en plasma o que presentaban una carga de ADN de TTV $\geq 3,3 \log_{10}$ copias/mL durante la primera semana después del ingreso en la UCI. Si nuestros hallazgos se confirman con estudios más robustos, la monitorización de la carga de ADN de TTV en plasma poco después del ingreso a la UCI podría dar lugar a la administración de profilaxis antimicrobiana dirigida hacia agentes bacterianos y fúngicos oportunistas implicados en infecciones graves.

Por otro lado, niveles altos de ADNemia TTV se han asociado con un mayor riesgo de mortalidad en diferentes entornos, incluyendo la población de edad avanzada (159,160), pacientes sépticos ingresados en UCI antes de la pandemia del SARS-CoV-2 (161) y receptores de alo-TPH (146). En nuestro estudio, se observó una tendencia hacia

una asociación con una mayor tasa de mortalidad para AUC_{7-17} de TTV ADN más elevadas. Sin embargo, esta observación debe ser interpretada con cautela debido a la escasez de eventos de fallecimiento en la cohorte.

Cabe destacar que el presente estudio es meramente exploratorio y no permite establecer conclusiones solidas; no obstante, nuestros hallazgos sugieren que la magnitud de la carga de ADN de TTV en plasma en pacientes críticos con COVID-19 puede reflejar su estado de inmunocompetencia, al igual que en otros entornos clínicos. Además, nuestros resultados sugieren que la monitorización de la carga viral podría ser una herramienta adicional para predecir la aparición de infecciones nosocomiales graves en pacientes críticos con COVID-19 y posiblemente su mortalidad. No obstante, no fue posible abordar si este enfoque permitiera anticipar la reactivación de virus persistentes, como el citomegalovirus o el herpes simplex, los cuales podrían tener un impacto en la supervivencia del paciente.

La relevancia clínica potencial de nuestras observaciones justifica la realización de estudios adicionales que involucren cohortes más amplias y, de ser posible, multicéntricas. Estas investigaciones futuras podrían proporcionar mayor claridad sobre el papel de la carga de ADN de TTV en la evolución clínica de pacientes críticos con COVID-19 y contribuir a una mejor comprensión de su relevancia pronóstica.

CONCLUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

- I. La monitorización de ADN de HPgV-1 en plasma de pacientes sometidos a trasplante renal no parece tener valor predictivo para el desarrollo de infección grave postrasplante, rechazo agudo del injerto o evento adverso relacionado con la inmunosupresión.
- II. La monitorización de ADN de anellovirus totales (AVT) en plasma de pacientes sometidos a trasplante renal no parece tener valor predictivo para el desarrollo de infección grave postrasplante, rechazo agudo del injerto o evento adverso relacionado con la inmunosupresión.
- III. Las cargas de ADN de TTV y ARN de HPgV-1 previas al trasplante o en estado basal pueden ser de utilidad para identificar a los receptores de alo-TPH con mayor riesgo de BKPyV-HC o EICHa.
- IV. La monitorización de la carga de ADN del TTV podría ser una herramienta útil para predecir la aparición de infecciones nosocomiales graves y la mortalidad en pacientes críticos con COVID-19.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med.* 1967;125(4).
2. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8).
3. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel vims-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med.* 1995;1(6).
4. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science (1979).* 1996;271(5248).
5. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JWK, et al. The Incidence of Transfusion-Associated Hepatitis G Virus Infection and Its Relation to Liver Disease. *New England Journal of Medicine.* 1997;336(11).
6. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. Vol. 92, *Journal of General Virology.* 2011.
7. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *Journal of General Virology.* 2016;97(11).
8. Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, Bukh J, de Lamballerie X, Drexler JF, et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. Vol. 168, *Archives of Virology.* Springer; 2023.
9. Chams V, Fournier-Wirth C, Chabanel A, Hervé P, Trépo C. Le virus GB-C ou virus «dit» de l'hépatite G est-il impliqué en pathologie humaine? Vol. 10, *Transfusion Clinique et Biologique.* 2003.
10. Arroyave-Ospina JC, Caicedo MF, Navas MC, Cortés-Mancera FM. Human Pegivirus: Pathogenic potential and non-hodgkin lymphoma development risk. *Revista Chilena de Infectologia.* 2018;35(2).
11. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, et al. GB Virus Type C Envelope Protein E2 Elicits Antibodies That React with a Cellular Antigen on HIV-1 Particles and Neutralize Diverse HIV-1 Isolates. *The Journal of Immunology.* 2010;185(7).
12. Yu Y, Wan Z, Wang JH, Yang X, Zhang C. Review of human pegivirus: Prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. Vol. 13, *Virulence.* 2022.
13. Muerhoff AS, Smith DB, Leary TP, Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'- untranslated and coding region sequences [published erratum appears in *J Virol* 1997 Nov;71(11):8952]. *J Virol.* 1997;71(9).

14. Naito H, Hayashi S, Abe K. The entire nucleotide sequence of two hepatitis G virus isolates belonging to a novel genotype: Isolation in Myanmar and Vietnam. *Journal of General Virology*. 2000;81(1).
15. Muerhoff AS, Leary TP, Sathar MA, Dawson GJ, Desai SM. African origin of GB virus C determined by phylogenetic analysis of a complete genotype 5 genome from South Africa. *Journal of General Virology*. 2005;86(6).
16. Feng Y, Zhao W, Feng Y, Dai J, Li Z, Zhang X, et al. A novel genotype of GB virus C: Its identification and predominance among injecting drug users in Yunnan, China. *PLoS One*. 2011;6(10).
17. Chivero ET, Stapleton JT. Tropism of human pegivirus (Formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: Insights into a highly successful viral infection. Vol. 96, *Journal of General Virology*. 2015.
18. Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, et al. Dynamics of GB virus C viremia early after orthotopic liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C replication. *Hepatology*. 1999;29(1).
19. Cheung RC, Keeffe EB, Greenberg HB. Hepatitis G virus: Is it a hepatitis virus? Vol. 167, *Western Journal of Medicine*. 1997.
20. Petrik J, Guella L, Wight DGD, Pearson GM, Hinton J, Parker H, et al. Hepatic histology in hepatitis C virus carriers coinfectd with hepatitis G virus. *Gut*. 1998;42(1).
21. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfectd with hepatitis C and G viruses. *J Virol*. 1997;71(10).
22. Pessoa MG. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: Evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology*. 1998;27(3).
23. Fogeda M, López-Alcorocho JM, Bartolomé J, Arocena C, Martín MA, Carreño V. Existence of Distinct GB Virus C/Hepatitis G Virus Variants with Different Tropism. *J Virol*. 2000;74(17).
24. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;193(3).
25. Ruiz V, Giordano M, Rivero CW, Minassian ML, Cuestas ML, Trinks J, et al. GB virus C quasispecies detected in plasma and lymphocyte subsets in a natural human infection. *Journal of General Virology*. 2010;91(7).
26. Arroyave JC, Pujol FH, Navas MC, Cortés-Mancera FM. Interaction between HIV-1 and GB virus type-C during coinfection status. *Revista Chilena de Infectología*. 2013;30(1).
27. Yang N, Dai R, Zhang X. Global prevalence of human pegivirus-1 in healthy volunteer blood donors: a systematic review and meta-analysis. Vol. 115, *Vox Sanguinis*. 2020.
28. Löve A, Stanzeit B, Gudmundsson S, Widell A. Hepatitis G virus infections in Iceland. *J Viral Hepat*. 1999;6(3).
29. Moaven LD, Hyland CA, Young IF, Bowden DS, McCaw R, Mison L, et al. Prevalence of hepatitis G virus in Queensland blood donors. *Medical Journal of Australia*. 1996;165(7).

30. Sathar MA, Soni PN, Naicker S, Conradie J, Lockhat F, Gouws E. GB virus C/hepatitis G virus infection in KwaZulu Natal, South Africa. *J Med Virol.* 1999;59(1).
31. Da Mota LD, Finger-Jardim F, Silva CM, Germano FN, Nader MM, Gonçalves CV, et al. High prevalence and autochthonous transmission of human pegivirus (HPgV-1) in blood donors in the extreme southern of Brazil. *J Med Virol.* 2019;91(1).
32. Graninger M, Aberle S, Görzer I, Jaksch P, Puchhammer-Stöckl E. Human pegivirus 1 infection in lung transplant recipients: Prevalence, clinical relevance and kinetics of viral replication under immunosuppressive therapy. *Journal of Clinical Virology.* 2021;143.
33. Li Z, Li Y, Liang Y, Hu L, Chen S. Prevalence and risk factors of human pegivirus type 1 infection in hematopoietic stem cell transplantation patients. *International Journal of Infectious Diseases.* 2019;85.
34. Raengsakulrach B, Ong-aj-yooth L, Thaiprasert T, Nilwarangkur S, Ong-aj-yooth S, Narupiti S, et al. High prevalence of hepatitis G viremia among kidney transplant patients in Thailand. *J Med Virol.* 1997;53(2).
35. Stark K, Meyer CG, Tacke M, Schwarz A, Braun C, Huzly D, et al. Hepatitis G virus RNA and hepatitis G virus antibodies in renal transplant recipients: prevalence and risk factors. *Transplantation.* 1997;64(4).
36. Masuko K, Mitsui T, Iwano K, Yamazaki C, Okuda K, Meguro T, et al. Infection with Hepatitis GB Virus C in Patients on Maintenance Hemodialysis. *New England Journal of Medicine.* 1996;334(23).
37. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB virus type C: A beneficial infection? Vol. 42, *Journal of Clinical Microbiology.* 2004.
38. Hoffmann R, Ruegamer T, Schaubächer J, Rohrhofer A, Kirmeß P, Fiebig KM, et al. Exploring Viral Interference Using Peptides: Molecular Determinants of HIV-1 Inhibition by a Peptide Derived from Human Pegivirus-1 Envelope Protein E2. *ChemMedChem.* 2021;16(8).
39. De Filippi F, Lampertico P, Soffredini R, Rumi MG, Lunghi G, Aroldi A, et al. High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Digestive and Liver Disease.* 2001;33(6).
40. Ramos Filho R, Carneiro MAS, Teles SA, Dias MA, Cardoso DDP, Lampe E, et al. GB virus C/Hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(6).
41. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol.* 2020;92(12).
42. Vu DL, Cordey S, Simonetta F, Brito F, Docquier M, Turin L, et al. Human pegivirus persistence in human blood virome after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019;25(2).
43. Mrzljak A, Simunov B, Balen I, Jurekovic Z, Vilibic-Cavlek T. Human pegivirus infection after transplant: Is there an impact? Vol. 12, *World Journal of Transplantation.* 2022.
44. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. Vol. 22, *Clinical Microbiology and Infection.* 2016.

45. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(1).
46. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. Vol. 331, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2009.
47. Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*. 2000;145(5).
48. Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T, Okamoto H. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *Journal of General Virology*. 2007;88(7).
49. Cebriá-Mendoza M, Arbona C, Larrea L, Díaz W, Arnau V, Peña C, et al. Deep viral blood metagenomics reveals extensive anellovirus diversity in healthy humans. *Sci Rep*. 2021;11(1).
50. Arze CA, Springer S, Dudas G, Patel S, Bhattacharyya A, Swaminathan H, et al. Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host Microbe*. 2021;29(8).
51. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihăescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. Vol. 160, *Archives of Virology*. 2015.
52. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. Vol. 24, *Transplant Infectious Disease*. 2022.
53. Kaczorowska J, Van Der Hoek L. Human anelloviruses: Diverse, omnipresent and commensal members of the virome. Vol. 44, *FEMS Microbiology Reviews*. 2020.
54. Malathi VG, Renuka Devi P. ssDNA viruses: key players in global virome. Vol. 30, *VirusDisease*. 2019.
55. Rosario K, Duffy S, Breitbart M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: Insights gained from metagenomics. Vol. 157, *Archives of Virology*. 2012.
56. Fahsbender E, Burns JM, Kim S, Kraberger S, Frankfurter G, Eilers AA, et al. Diverse and highly recombinant anelloviruses associated with Weddell seals in Antarctica. *Virus Evol*. 2017;3(1).
57. Liou S hao, Cohen N, Zhang Y, Acharekar NM, Rodgers H, Islam S, et al. Anellovirus Structure Reveals a Mechanism for Immune Evasion. *bioRxiv*. 2022;
58. Worobey M. Extensive Homologous Recombination among Widely Divergent TT Viruses. *J Virol*. 2000;74(16).
59. Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K, de Villiers EM. In Vivo and In Vitro Intragenomic Rearrangement of TT Viruses. *J Virol*. 2007;81(17).
60. Fisher M, Nebroski M, Davies J, Janzen E, Sullivan D, Lung O. Discovery and comparative genomic analysis of a novel equine anellovirus, representing the first complete Mutorquevirus genome. *Sci Rep*. 2023;13(1).

61. Kyathanahalli C, Snedden M, Hirsch E. Human Anelloviruses: Prevalence and Clinical Significance During Pregnancy. *Frontiers in Virology*. 2021;1.
62. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, et al. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- κ B Pathways via Interaction with I κ B Kinases. *J Virol*. 2007;81(21).
63. 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. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9).
64. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT Virus in the Nasal Secretions of Children with Acute Respiratory Diseases: Relations to Viremia and Disease Severity. *J Virol*. 2003;77(4).
65. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Sugai Y, Sai T, et al. Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(2).
66. 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. *J Med Virol*. 2000;62(4).
67. 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. *J Med Virol*. 2018;90(9).
68. Takahashi M, Asabe S, Okamoto H, Gotanda Y, Kishimoto J, Tsuda F. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(1).
69. 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).
70. 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).
71. 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).
72. Maggi F, Bendinelli M. Human anelloviruses and the central nervous system. Vol. 20, *Reviews in Medical Virology*. 2010.
73. Shulman LM, Davidson I. Viruses with Circular Single-Stranded DNA Genomes Are Everywhere. *Annu Rev Virol*. 2017;4.
74. Spezia PG, Baj A, Drago Ferrante F, Boutahar S, Azzi L, Genoni A, et al. Detection of Torquetenovirus and Redondovirus DNA in Saliva Samples from SARS-CoV-2-Positive and -Negative Subjects. *Viruses*. 2022;14(11).
75. Väisänen E, Kuisma I, Mäkinen M, Ilonen J, Veijola R, Toppari J, et al. Torque Teno Virus Primary Infection Kinetics in Early Childhood. *Viruses*. 2022;14(6).

76. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. XTemporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155(5).
77. Broecker F, Moelling K. The roles of the virome in cancer. Vol. 9, *Microorganisms*. 2021.
78. Monaco CL, Gootenberg DB, Zhao G, Handley SA, Ghebremichael MS, Lim ES, et al. Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell Host Microbe*. 2016;19(3).
79. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, De Marco E, Fornai C, et al. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(7).
80. Maggi F, Andreoli E, Riente L, Meschi S, Rocchi J, Delle Sedie A, et al. Torquetenovirus in patients with arthritis [1]. Vol. 46, *Rheumatology*. 2007.
81. 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. *J Med Virol* [Internet]. 2001 Oct;65(2):418–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.2051>
82. 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. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. 2018.
83. Rocchi J, Ricci V, Albani M, Lanini L, Andreoli E, Macera L, et al. Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9. *Virology*. 2009;394(2).
84. Senev A, Van Loon E, Lerut E, Coemans M, Callemeyn J, Daniëls L, et al. Association of Predicted HLA T-Cell Epitope Targets and T-Cell–Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *American Journal of Kidney Diseases*. 2022;80(6).
85. Ranieri E, Netti GS, Gigante M. CTL ELISPOT Assay and T Cell Detection. In: *Methods in Molecular Biology*. 2021.
86. Mitchell AB, Glanville AR. Kinetics of ttv-DNA plasma load: A global measure of immune suppression? *Transplantation*. 2019;103(4).
87. Béland K, Dore-Nguyen M, Gagné 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(2).
88. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. Vol. 33, *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2014.
89. 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).
90. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, López-Medrano F, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2019;19(4).

91. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, Haupenthal F, Dermuth F, Görzer I, et al. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients—A prospective observational trial. *American Journal of Transplantation*. 2020;20(8).
92. Fernández-Ruiz M. Torque Teno virus load as a surrogate marker for the net state of immunosuppression: The beneficial side of the virome. Vol. 20, *American Journal of Transplantation*. 2020.
93. van Rijn AL, Roos R, Dekker FW, Rotmans JI, Feltkamp MCW. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation – A systematic review and meta-analysis. Vol. 33, *Reviews in Medical Virology*. 2023.
94. 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).
95. Maggi F, Focosi D, Statzu M, Bianco G, Costa C, Macera L, et al. Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep*. 2018;8(1).
96. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, et al. Quantification of torque teno virus viremia as a prospective biomarker for infectious disease in kidney allograft recipients. *Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(8).
97. Solis M, Velay A, Gantner P, Bausson J, Filipputti A, Freitag R, et al. Torquetenovirus viremia for early prediction of graft rejection after kidney transplantation. *Journal of Infection*. 2019;79(1).
98. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Rodríguez-Goncer I, Andrés A, Navarro D, et al. Early kinetics of Torque Teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. Vol. 22, *Transplant Infectious Disease*. 2020.
99. Ruiz P, Martínez-Picola M, Santana M, Muñoz J, Pérez-del-Pulgar S, Koutsoudakis G, et al. Torque Teno Virus Is Associated With the State of Immune Suppression Early After Liver Transplantation. *Liver Transplantation*. 2019;25(2).
100. 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. Vol. 101, *Transplantation*. 2017.
101. Herrmann A, Sandmann L, Adams O, Herrmann D, Dirks M, Widera M, et al. Role of BK polyomavirus (BKV) and torque teno virus (TTV) in liver transplant recipients with renal impairment. *J Med Microbiol*. 2018;67(10).
102. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(12).
103. 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. Vol. 36, *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2017.
104. 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*. 2017;94.

105. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez 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 Transplant*. 2018;53(2).
106. Xie Y, Xue Q, Jiao W, Wu J, Yu Y, Zhao L, et al. Associations Between Sputum Torque Teno Virus Load and Lung Function and Disease Severity in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8.
107. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(25).
108. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. 2020.
109. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. Vol. 8, *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020.
110. Rydze RT, Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther*. 2012;17(7).
111. ASLAN FG, ALTINDİŞ M. Human Pegivirus (GB Virus Type C) and Its Relationship with HIV. *Viral Hepatit Dergisi*. 2016;22(3).
112. Reshetnyak VI, Maev I V., Burmistrov AI, Chekmazov IA, Karlovich TI. Torque teno virus in liver diseases: On the way towards unity of view. Vol. 26, *World Journal of Gastroenterology*. 2020.
113. Robert T Rydze1 2,3†, Nirjal Bhattarai1 4†, Jack T Stapleton1 2,3,4. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther*. 2012;17:1271–9.
114. 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. *J Virol*. 2003;77(16).
115. Giménez E, Monzó C, Albert E, Fuentes-Trillo A, Seda E, Piñana JL, et al. Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2021;93(8).
116. Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2).
117. 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).
118. 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).

119. Hirsch HH, Randhawa PS. BK polyomavirus in solid organ transplantation—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33(9).
120. 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*. 2017;64(1).
121. Peter Donnelly J, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(6).
122. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell– and antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*. 2020;20(9).
123. Cesaro S, Dalianis T, Rinaldo CH, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(1).
124. Martin-Loeches I, Rodriguez AH, Torres A. New guidelines for hospital-acquired pneumonia/ ventilator-associated pneumonia: USA vs. Europe. Vol. 24, *Current Opinion in Critical Care*. 2018.
125. IDSA guidelines. 2010. <https://www.idsociety.org/practice-guideline/practice-guideline-2010>
126. Rezahosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, Perch M, Ostrowski SR, et al. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. Vol. 33, *Transplantation Reviews*. 2019.
127. Izumi T, Sakata K, Okuzaki D, Inokuchi S, Tamura T, Motooka D, et al. Characterization of human pegivirus infection in liver transplantation recipients. *J Med Virol*. 2019;91(12).
128. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. Vol. 10, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2012.
129. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol*. 2020;92(12).
130. Oliveira LA, Martins RMB, Carneiro MAS, Teles SA, Silva SA, Cardoso DDP, et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(7).
131. Seipp S, Scheidel M, Hofmann WJ, Töx U, Theilmann L, Goeser T, et al. Hepatotropism of GB virus C (GBV-C): GBV-C replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. *J Hepatol*. 1999;30(4).
132. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol*. 2020;92(12).

133. Kallinowski B, Janicki M, Seelig R, Seipp S, Hagel J, Dengler T, et al. Clinical relevance of hepatitis G virus (HGV infection in heart transplant patients. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1999;18(3).
134. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol*. 2020;92(12).
135. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, Wagner TCS, Matuck TA, Monteiro de Carvalho DB, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: A single-center experience. *J Med Virol*. 2020;92(12).
136. Varsani A, Opriessnig T, Celer V, Maggi F, Okamoto H, Blomström AL, et al. Taxonomic update for mammalian anelloviruses (family Anelloviridae). *Arch Virol*. 2021;166(10).
137. Isnard P, Kula T, Fenoel VA, Anglicheau D, Terzi F, Legendre C, et al. Temporal virus serological profiling of kidney graft recipients using VirScan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;166(22).
138. Bal A, Sarkozy C, Josset L, Cheynet V, Oriol G, Becker J, et al. Metagenomic next-generation sequencing reveals individual composition and dynamics of anelloviruses during autologous stem cell transplant recipient management. *Viruses*. 2018;10(11).
139. Blatter JA, Sweet SC, Conrad C, Danziger-Isakov LA, Faro A, Goldfarb SB, et al. Anellovirus loads are associated with outcomes in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2018;22(1).
140. Young JC, Chehoud C, Bittinger K, Bailey A, Diamond JM, Cantu E, et al. Viral metagenomics reveal blooms of anelloviruses in the respiratory tract of lung transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(1).
141. Rani A, Ranjan R, McGee HS, Metwally A, Hajjiri Z, Brennan DC, et al. A diverse virome in kidney transplant patients contains multiple viral subtypes with distinct polymorphisms. *Sci Rep*. 2016;6.
142. Handala L, Descamps V, Morel V, Castelain S, François C, Duverlie G, et al. No correlation between Torque Teno virus viral load and BK virus replication after kidney transplantation. *Journal of Clinical Virology*. 2019;116.
143. Skidmore SJ, Collingham KE, Harrison P, Neilson JR, Pillay D, Milligan DW. High prevalence of hepatitis G virus in bone marrow transplant recipients and patients treated for acute leukemia. *Blood*. 1997;89(10).
144. Rodriguez-lñigo E, Tomás JF, Gómez-García De Soria V, Bartolomé J, Pinilla I, Amaro MJ, et al. Hepatitis C and G virus infection and liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: Results from a prospective study. *Blood*. 1997;90(3).
145. 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. *Med Microbiol Immunol*. 2017;206(5).
146. Pradier A, Masouridi-Levrat S, Bosshard C, Dantin C, Vu DL, Zanella MC, et al. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11.

147. Zanella MC, Vu DL, Hosszu-Fellous K, Neofytos D, Van Delden C, Turin L, et al. Longitudinal Detection of Twenty DNA and RNA Viruses in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Plasma. *Viruses*. 2023;15(4).
148. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The Value of Torque Teno Virus (TTV) as a Marker for the Degree of Immunosuppression in Adult Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT): TTV as a Biomarker in Adult Patients after HSCT. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2020;26(4).
149. Stapleton JT. Human Pegivirus Type 1: A Common Human Virus That Is Beneficial in Immune-Mediated Disease? Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. 2022.
150. Pradier A, Cordey S, Zanella MC, Melotti A, Wang S, Mamez AC, et al. Human pegivirus-1 replication influences NK cell reconstitution after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2023;13.
151. Ljungman P, Halasz R, Hägglund H, Sönnernborg A, Ringdén O. Detection of hepatitis G virus/GB virus C after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(5).
152. Sharma A, Jaiswal P, Kerakhan Y, Saravanan L, Murtaza Z, Zergham A, et al. Liver disease and outcomes among COVID-19 hospitalized patients – A systematic review and meta-analysis. *Ann Hepatol*. 2021;21.
153. Musuuza JS, Watson L, Parmasad V, Putman-Buehler N, Christensen L, Safdar N. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and metaanalysis. *PLoS One*. 2021;16(5 May).
154. Pova P, Martin-Loeches I, Nseir S. Secondary pneumonias in critically ill patients with COVID-19: risk factors and outcomes. Vol. 27, *Current opinion in critical care*. 2021.
155. 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. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(2).
156. Liu Y, Tan W, Chen H, Zhu Y, Wan L, Jiang K, et al. Dynamic changes in lymphocyte subsets and parallel cytokine levels in patients with severe and critical COVID-19. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1).
157. Focosi D, Spezia PG, Macera L, Salvadori S, Navarro D, Lanza M, et al. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(10).
158. Bueno F, Albert E, Piñana JL, Pérez A, Úbeda C, Gómez MD, et al. Kinetics of Torque Teno virus DNA in stools may predict occurrence of acute intestinal graft versus host disease early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2021;23(3).
159. Giacconi R, Maggi F, Macera L, Pistello M, Provinciali M, Gianecchini S, et al. Torquetenovirus (TTV) load is associated with mortality in Italian elderly subjects. *Exp Gerontol*. 2018;112.
160. Giacconi R, Maggi F, Macera L, Spezia PG, Pistello M, Provinciali M, et al. Prevalence and loads of torquetenovirus in the European mark-age study population. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2020;75(10).

161. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. PLoS One. 2014;9(6).

ANEXOS

V.II ANEXOS

1. Escrito de los directores de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral.

Artículo I

Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates. Transplant infectious disease. 2022; 24(1), e13771.

Mario Fernández-Ruiz† (1), Lorena Forqué† (2), Eliseo Alberto (2), Natalia Redondo (3), Estela Giménez (2), Francisco López Medrano (3-1), Esther González (4), Natalia Polanco (4), Tamara Ruiz-Merlo (3), Patricia Parra (3), Rafael San Juan (3-1), Amado Andres (1-4), José María Aguado (3-1), David Navarro (2-5).

1. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España.
2. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
3. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), Madrid, España.
4. Servicio de Nefrología, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), Madrid, España.
5. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Lorena Forqué realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, 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

2.87

Artículo II

Dynamics of Human Anelloviruses in Plasma and Clinical Outcomes Following Kidney Transplantation. Transplantation. 2023; 1;107(2):511-520

Lorena Forqué (1,2), Mario Fernández-Ruiz (2,3,4), Eliseo Albert (1,2), Estela Giménez (1, 2), Carolina Monzó (5), Javier Chaves (5), Natalia Redondo (2,3), Isabel Rodríguez-Goncer (2,3), Tamara Ruiz-Merlo (2,3), Patricia Parra (2,3), Amado Andrés (4,6), José María Aguado (1,2,3,4,5,6,7), David Navarro (1,2,7).

1. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
3. Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), Madrid, España.
4. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España.
5. Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.
6. Servicio de Nefrología, Hospital Universitario "12 de Octubre", Instituto de Investigación Sanitaria Hospital "12 de Octubre" (imas12), Madrid, España.
7. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Lorena Forqué realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, 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

5.39

Artículo III

Monitoring of plasma Torque teno virus, total Anelloviridae and Human Pegivirus 1 viral load for the prediction of infectious events and acute graft versus host disease in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting. *J Med Virol.* 2023;95(9):e29107.

Lorena Forqué (1), Eliseo Albert (1), José Luis Piñana (2), Ariadna Pérez (2), Rafael Hernani (2), Carlos Solano (2,3), David Navarro (1, 4,5) and Estela Giménez (1,4).

1. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
2. Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
3. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.
4. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
5. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Lorena Forqué realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, 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

20.70

Artículo IV

Monitoring of Torque Teno virus ADNemia in critically ill COVID-19 patients: May it help to predict clinical outcomes? Journal of Clinical Virology. 2022;148: 105082.

Lorena Forqué (1), Eliseo Albert (1), Estela Giménez (1), Ignacio Torres (1), Nieves Carbonell (2), José Ferreres (2), María Luisa Blasco (2), David Navarro (3).

1. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Clínico, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
2. Unidad de Cuidados Intensivos Médicos, Hospital Universitario Clínico, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España.
3. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Clínico, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante

Lorena Forqué realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, 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

14.48

2. Informe de los directores 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, realizamos el presente escrito con el objetivo de informar que la doctoranda, Lorena Forqué, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, participó en los análisis estadísticos y revisó los textos definitivos.

Ni la doctoranda, Lorena Forqué, ni ninguno de los 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



Estela Giménez Quiles

ARTÍCULOS



ORIGINAL ARTICLE

Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates

Mario Fernández-Ruiz^{2,#} | Lorena Forque^{3,#} | Eliseo Albert³ | Natalia Redondo¹ | Estela Giménez³ | Francisco López-Medrano^{1,2} | Esther González⁴ | Natalia Polanco⁴ | Tamara Ruiz-Merlo¹ | Patricia Parra¹ | Rafael San Juan^{1,2} | Amado Andrés^{4,2} | José María Aguado^{1,2} | David Navarro^{3,5}

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

² Department of Medicine, School of Medicine Universidad Complutense, Madrid, Spain

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

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

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

Correspondence

Mario Fernández-Ruiz, Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario "12 de Octubre", Centro de Actividades Ambulatorias, 2ª planta, bloque D, Avda. de Córdoba, s/n, postal code 28041, Madrid, Spain.
Email: mario_fdezruiz@yahoo.es

Authors Mario Fernández-Ruiz and Lorena Forque contributed equally to this study.

Funding information

Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation, Grant/Award Number: PI15/01953; European Development Regional Fund; Mario Fernández-Ruiz holds a research contract "Miguel Servet", Grant/Award Number: CP18/00073; Río Hortega, Grant/Award Number: CM18/00221; Estela Giménez holds a research contract "Juan Rodés", Grant/Award Number: JR18/00053; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation, Grant/Award Numbers: PI15/01953, CP18/00073, CM18/00221, JR18/00053; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Numbers: CM18/00221, CP18/00073, JR18/00053, PI15/01953

Abstract

Background: Increasing evidence suggests that infection with the nonpathogenic human pegivirus type 1 (HPgV-1) exerts a clinical benefit in human immunodeficiency virus (HIV) patients, which could be attributable to immunomodulatory effects. Whether this impact can be extrapolated to kidney transplantation (KT) remains largely unknown.

Methods: We measured plasma HPgV-1 RNA by real-time polymerase chain reaction targeting the 5' untranslated region at various points (pretransplantation, day 7, months 1, 3, 6, and 12) in 199 KT recipients. Study outcomes included posttransplant serious infection, immunosuppression-related adverse event (opportunistic infection and/or de novo cancer), and acute graft rejection.

Results: HPgV-1 infection was demonstrated in 52 (26.1%) patients, with rates increasing from 14.7% at baseline to 19.1% by month 12 (p -value = .071). De novo infection occurred in 13.8% of patients with no detectable HPgV-1 RNA before transplantation. Double-organ (liver–kidney or kidney–pancreas) transplantation (odds ratio [OR]: 5.62; 95% confidence interval [CI]: 1.52–20.82) and donation after brain death (OR: 2.21; 95% CI: 1.00–4.88) were associated with posttransplant HPgV-1 infection, whereas pretransplant hypertension was protective (OR: 0.23; 95% CI: 0.09–0.55). There were no significant differences in the incidence of study outcomes according to HPgV-1 status. Plasma HPgV-1 RNA levels at different points did not significantly differ between patients that subsequently developed outcomes and those remaining free from these events. No correlation between HPgV-1 RNA and immune parameters or torque teno virus DNA load was observed either.



Conclusion: Unlike patients living with HIV, HPgV-1 infection does not seem to influence patient or graft outcomes after KT.

KEYWORDS

human pegivirus type 1, immunosuppression, infection, kidney transplantation, outcomes, replication kinetics

1 | INTRODUCTION

Distantly related to the hepatitis C virus (HCV), human pegivirus type 1 (HPgV-1) is a 9.4-Kb single-stranded positive-sense RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family.¹ Initially termed GB virus type C or hepatitis G virus by different groups, HPgV-1 was first identified in a patient with acute “non-A–E hepatitis.”² Further research, however, have failed to demonstrate a pathogenic role for HPgV-1, being therefore assignable to the so-called group of “orphan viruses.” HPgV-1 infection is present worldwide and may be acquired through mother-to-child, sexual, and parenteral routes.³ Seven genotypes and multiple subtypes have been described so far, with genotype 2 being the most prevalent in Europe and North America. The pooled prevalence among healthy blood donors was estimated in a recent meta-analysis at 3.1%,⁴ and notable differences across geographical areas were noted, from 3.8% in Iceland⁵ or 4.1% in Australia⁶ to 18.9% in South Africa⁷ or 21.7% in Brazil.⁸ Although the clinical factors associated with the presence of HPgV-1 RNA in blood are not fully characterized, higher rates have been found in intravenous drug users (IDUs), patients with repeated blood transfusions or those infected with HCV—particularly for the related but distinct species HPgV-2, identified in 2015 and also known as human hepegivirus 1.^{9,10}

The primary replication-permissive cell types for HPgV-1 have not yet been identified, nor the precise mechanisms of cell-to-cell transmission. Despite the initial hypothesis suggesting a causal role for hepatitis,² HPgV-1 has not been isolated in liver tissue samples.¹¹ On the other hand, the lymphotropism of HPgV-1 has been proposed since the virus can be detected in T- and B-cells, natural killer (NK) cells, and the spleen and bone marrow samples from chronically infected individuals.¹² In accordance with this, various case-control studies support an association between HPgV-1 infection and the risk of non-Hodgkin lymphoma.¹³

A growing interest has arisen around the potential benefit of HPgV-1 coinfection in people living with human immunodeficiency virus (HIV). Various studies have reported a positive effect of HPgV-1 viremia on the clinical outcomes of HIV patients, including reduced viral load, longer acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free survival, enhanced response to antiretroviral therapy, decreased risk of vertical transmission, and reduced mortality.^{14–17} These effects have been linked to the molecular interference between HPgV-1 and the process of HIV entry into target cells.¹⁸ In addition, it has been hypothesized that chronic HPgV-1 infection may play a role in host immune modulation through a repertoire of viral evasion strategies.¹²

In view of such intriguing findings involving the HIV population, a few studies have investigated the alleged immunomodulatory effects of HPgV-1 in the setting of solid organ transplantation (SOT), including liver transplant (LT),^{19–21} heart transplant (HT),²² and kidney transplant (KT) recipients.^{23,24} Other authors have focused on hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).^{25,26} Nevertheless, most available studies were limited by small sample sizes or imprecise characterization of outcomes. Therefore, we aimed at analyzing the prevalence, early and long-term viral kinetics, and clinical correlates of HPgV-1 infection in a large cohort of KT recipients, as well as its potential association with the occurrence of posttransplant infection, immunosuppression-related adverse events (irAEs), and acute graft rejection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design

The present research was based on a prospective observational study performed between November 2014 and November 2016 at our institution that investigated the posttransplant kinetics of torque teno virus (TTV).²⁷ In brief, patients ≥ 18 years undergoing KT (either kidney alone or combined organ transplantation) during this period were eligible for inclusion. Participants were enrolled at the time of transplantation and followed up for at least 12 months, unless graft loss (i.e., retransplantation or 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 on a monthly basis thereafter, as well as whenever clinically indicated. Blood samples taken at scheduled times were immediately centrifuged, and plasma samples were stored at -80°C until analysis. Peripheral blood lymphocyte subpopulations (CD3+, CD4+, and CD8+ T-cells) and serum immunoglobulin (IgG, IgA, and IgM) and complement (C3 and C4) levels were assessed at posttransplant months 1, 3, and 6. Pretransplant, perioperative, and posttransplant variables were collected by using a standardized case report form. The local clinical research ethics committee approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all the participants. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declarations of Helsinki and Istanbul.

For the present study, HPgV-1 RNA was measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) on stored samples obtained at baseline (pretransplantation [i.e., within the 6 h prior to the procedure]), day 7, and months 1, 3, 6, and 12 after transplantation. Study

outcomes included posttransplant serious infection (which denoted the requirement of hospitalization and intravenous antimicrobial therapy), iRAE (development of opportunistic infection and/or post-transplant de novo malignancy), and acute graft rejection, as defined below. The concept of iRAE serves as a specific clinical marker of excess of immunosuppression.^{27,28} Details on immunosuppression and prophylaxis regimens are provided in **Supporting Information Methods**.

2.2 | Plasma HPgV-1 RNA quantification

DNA was extracted from 200 μ l of plasma with the NucliSENS easy-MAG automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), following the manufacturer's instructions, with a minimum elution volume of 60 μ l. The quantification of HPgV-1 RNA in plasma specimens was carried out by means of a one-step RT-PCR designed to amplify a conserved HPgV-1 5' untranslated region (UTR) on the ABI Prism 7500 instrument (PE Biosystems, Foster City, CA), as previously described (**Supporting Information Methods**).²⁹ According to our experience, the lower limit of detection was 10 copies/ μ l of reaction, whereas the lower limit of quantification was 25 copies/ μ l of reaction. Viral loads were expressed as copies/ μ l of plasma by using a conversion factor of 27.27 copies/ μ l of reaction.

2.3 | Plasma TTV DNA quantification

TTV DNA loads were quantified at the same time points than HPgV-1 by means of a commercial RT-PCR assay (TTV R-gene kit, ARGENE range, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), as described elsewhere.²⁷

2.4 | Study definitions

Persistent posttransplant HPgV-1 infection was defined by the demonstration of HPgV-1 RNA in all the tested samples obtained after transplantation in a given patient. High-level HPgV-1 viremia was defined on the basis of the mean value of peak RNA levels determined during the first 3 posttransplant months. The term iRAE encompassed opportunistic infections and posttransplant cancer. Opportunistic infection was defined as that due to intracellular bacteria (e.g., mycobacteria, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia* spp.), herpesviruses (cytomegalovirus [CMV], herpes simplex virus [HSV] and varicella-zoster virus), yeasts (*Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.), molds (*Aspergillus* spp. and mucorales), and protozoa (*Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp.).³⁰ Proven (demonstration of cytopathic changes in tubular epithelial cells, later confirmed by immunohistochemistry or in situ hybridization) or presumptive (plasma DNAemia >4.0 log₁₀ copies/ml with an increase in one of two measurements performed within 3 weeks or less) BK polyomavirus-associated nephropathy was also considered.³¹ Only episodes of proven or probable invasive fungal infection were included.³² The diagnosis of CMV disease required the demonstration of CMV replication and the presence of attributable symptoms

and was further classified as viral syndrome or end-organ disease.³³ Acute graft rejection was suspected in case of sudden and otherwise unexplained deterioration of graft function and diagnosed by histological examination.³⁴ If renal biopsy was not possible, empirically treated episodes that responded to steroid boluses were also considered. Additional definitions are provided in **Supporting Information Methods**.

2.5 | Statistical analysis

Quantitative data were shown as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or the median with the interquartile range (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Categorical variables were compared with the χ^2 test. Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test were applied for continuous variables. Repeated measures were compared with the Student's *t*-test for paired samples or the Wilcoxon test. Pearson's or Spearman's rank correlation coefficients were used to assess the correlation between continuous variables. Viral loads were log₁₀ transformed for analysis. Multivariate logistic regression was applied to identify clinical factors predicting posttransplant HPgV-1 infection. Multicollinearity was evaluated by the variance inflation factor, and the goodness of fit of the model was verified with the Hosmer-Lemeshow test. Associations were given as odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). The potential association between HPgV-1 infection at prespecified monitoring points and the subsequent occurrence of study outcomes was investigated both as categorical (detectable or non-detectable HPgV-1 RNA) and continuous variables (plasma RNA levels). The impact of dynamic changes in HPgV-1 loads was also assessed by individual trajectories (ascending or non-ascending [i.e., stable or decreasing] slope) in RNA levels across ≥ 2 consecutive points during the first month and the first 3 months. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the study population

Overall, 199 KT recipients were included (Table 1). After a median follow-up of 500 days (IQR: 437–543), four patients (2.0%) suffered graft loss, and one further patient (0.5%) died, resulting in a 1-year death-censored graft survival of 97.9%. Regarding factors potentially associated with HPgV-1 infection, two patients (1.0%) were previous IDUs, 16 (8.0%) had HCV infection (six were infected with genotype 1a and five with genotype 1b), and 76 (38.2%) had received blood transfusion before transplantation.

3.2 | Study outcomes

One hundred and fourteen recipients (57.3%) had a total of 248 episodes of posttransplant serious infection (incidence rate of 2.55

**TABLE 1** Characteristics of the study population (n = 199)

Variable	
Age of recipient, years (mean $\pm$ SD)	53.9 $\pm$ 15.4
Gender of recipient (male) (n [%])	142 (71.4)
BMI at transplantation, kg/m ² (mean $\pm$ SD) ^a	25.3 $\pm$ 4.2
Previous or current smoking history (n [%])	81 (40.7)
Previous intravenous drug use (n [%])	2 (1.0)
Pretransplant chronic comorbidities (n [%])	
Hypertension	169 (84.9)
Dyslipidemia	113 (56.8)
Diabetes mellitus	59 (29.6)
Coronary heart disease	20 (10.1)
Nonischemic heart disease	32 (16.1)
COPD and/or sleep apnea–hypopnea syndrome	20 (10.1)
Peripheral arterial disease	18 (9.0)
Cerebrovascular disease	17 (8.5)
Previous solid organ transplantation (n [%])	27 (13.6)
Kidney	23 (11.6)
Liver	3 (1.5)
Pancreas	1 (0.5)
Underlying end-stage renal disease (n [%])	
Glomerulonephritis	46 (23.1)
Diabetic nephropathy	39 (19.6)
Polycystic kidney disease	23 (11.6)
Nephroangiosclerosis	16 (8.0)
Chronic interstitial nephropathy	11 (5.5)
Congenital nephropathy	8 (4.0)
Reflux nephropathy	6 (3.0)
Vasculitis	5 (2.5)
Other	20 (10.1)
Unknown	25 (12.6)
CMV serostatus (n [%])	
D+/R+	144 (72.4)
D–/R+	20 (10.1)
D+/R–	26 (13.1)
D–/R–	5 (2.5)
D unknown/R+	4 (2.0)
Positive HCV serostatus (n [%])	16 (8.0)
Positive HBsAg status (n [%])	7 (3.5)
Positive HIV serostatus (n [%])	2 (1.0)
Pretransplant blood transfusion (n [%])	76 (38.2)
Number of transfusions (median [IQR])	3 (2–5)
Pretransplant renal replacement therapy (n [%])	172 (86.4)
Hemodialysis	139 (69.8)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Variable	
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	33 (16.6)
Dialysis vintage, months (median [IQR])	18.1 (9.4–35.1)
Peak panel-reactive antibody >75% (n [%])	12 (4.0)
Age of donor, years (mean $\pm$ SD)	52.9 $\pm$ 15.6
Gender of donor (male) (n [%])	106 (53.3)
Type of donor (n [%])	
DBD donor	129 (64.8)
DCD donor	43 (21.6)
Living donor	27 (13.6)
Cold ischemia time, hours (mean $\pm$ SD)	16.1 $\pm$ 8.2
Intraoperative blood product transfusion (n [%])	27 (13.6)
Number of HLA mismatches (median [IQR])	4 (3–5)
Type of transplantation (n [%])	
Kidney alone	187 (94.0)
Simultaneous kidney–pancreas	9 (4.5)
Simultaneous kidney–liver	3 (1.5)
Induction therapy (n [%])	
ATG	96 (48.2)
Basiliximab	78 (39.2)
None	25 (12.6)
Primary immunosuppression regimen (n [%])	
Prednisone, tacrolimus, MMF/MPA	191 (96.0)
Prednisone, tacrolimus, azathioprine	8 (4.0)
Anti-CMV prophylaxis (n [%])	113 (56.8)
Duration of prophylaxis, days (median [IQR])	102.5 (91–146.8)
Posttransplant complications (n [%])	
Delayed graft function	92 (46.2)
Number of dialysis sessions (median [IQR])	2 (1–3)
Reintervention within the first month	21 (10.6)
New-onset diabetes	17 (8.5)
Atherothrombotic event	11 (5.5)

Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; BMI, body mass index; CMV, cytomegalovirus; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; D, donor; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; HLA, human leukocyte antigen; HBsAg, hepatitis B virus surface antigen; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; IQR, interquartile range; MMF/MPA, mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; R, recipient; SD, standard deviation.

^aData on BMI not available for 17 patients.

episodes per 1000 transplant-days) (detailed in Table S1 in **Supporting Information Results**). The median interval from transplantation to the first episode was 38.5 days (IQR: 13.8–101). Forty-seven patients (23.6%) developed 61 episodes of iRAE (0.63 episodes per 1000 transplant-days), with CMV disease, mucocutaneous HSV infection, and herpes zoster accounting for most of the cases. The median interval to the first iRAE episode was 90 days (IQR: 42–235). Finally,

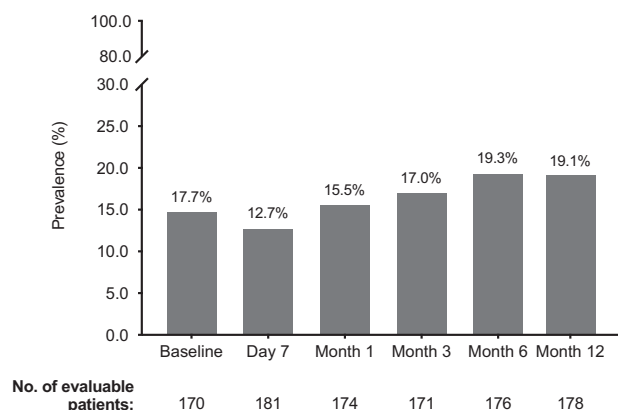


FIGURE 1 Prevalence of detectable plasma HPgV-1 RNA at different time points after transplantation. HPgV-1, human pegivirus type 1

23 patients (11.6%) experienced 27 episodes of acute rejection (0.28 episodes per 1000 transplant-days). Characteristics of iRAE and rejection episodes are detailed in Table S2.

3.3 | Prevalence and posttransplant kinetics of HPgV-1 infection

Overall, HPgV-1 RNA was investigated in 1050 plasma samples, with a median of six monitoring points per patient (IQR: 5–6). The presence of HPgV-1 infection was demonstrated in 16.5% (172/1050) of samples and 26.1% (52/199) of patients. The prevalence according to the time of sampling is shown in Figure 1. The rate of HPgV-1 infection increased from 14.7% (25/170) at baseline (pretransplantation) to 19.1% (34/178) at posttransplant month 12 (p -value = .071). Two of 52 (3.8%) HPgV-1-positive patients had detectable RNA in the baseline sample only. Twenty of 145 patients (13.8%) with no presence of HPgV-1 RNA at baseline had at least one subsequent positive sample, suggesting posttransplant de novo infection. Persistent posttransplant HPgV-1 infection was observed in 8.5% (17/199) of recipients. There was a nonsignificant increase in HPgV-1 RNA levels from baseline (pretransplantation) to month 12 (2.2 ± 1.7 vs. 3.4 ± 1.6 log₁₀ copies/ml; p -value = .110) (Figure 2). Peak HPgV-1 RNA level during the first 3 posttransplant months was 3.3 ± 1.7 log₁₀ copies/ml. Among evaluable patients, 64.0% (8/25) and 36.0% (9/25) showed ascending and nonascending viral kinetics during the first month (Figure S1). The corresponding figures for the first 3 months after transplantation were 75.0% (24/32) and 25.0% (8/32), respectively.

3.4 | Clinical correlates of HPgV-1 infection

We next analyzed demographics and clinical factors associated with HPgV-1 infection at any time after transplantation. Patients with detectable HPgV-1 RNA were younger (50.3 ± 16.1 vs. 55.1 ± 15.1 years; p -value = .058) and less likely to have pretransplant hypertension (70.0% vs. 90.5%; p -value = .0004) and dyslipidemia (44.0%

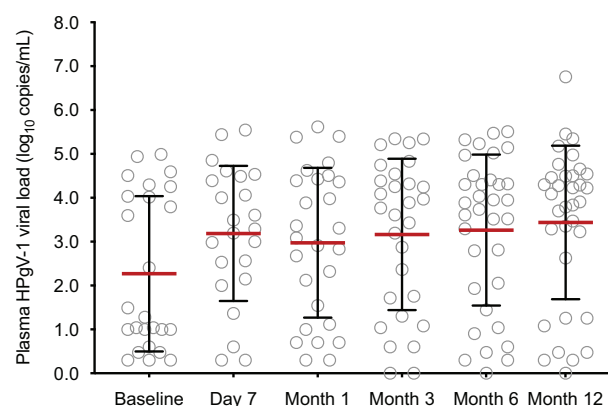


FIGURE 2 Evolution of plasma HPgV-1 RNA levels among HPgV-1-positive patients. Red bars represent mean values, and whiskers indicate standard deviations. HPgV-1, human pegivirus type 1

vs. 61.1%; p -value = .035) as compared to those in which HPgV-1 RNA was not found. Previous SOT was more common among HPgV-1-positive recipients (22.0% vs. 10.7%; p -value = .044), as were double-organ transplantation (16.0% vs. 2.7%; p -value = .002), donation after brain death (DBD) (78.0% vs. 60.4%; p -value = .024), and blood product transfusion during the transplant surgery (24.0% vs. 10.1%; p -value = .013). Significant differences were also observed in the number of red cell and fresh-frozen plasma units transfused. Finally, patients with detectable HPgV-1 RNA more commonly received azathioprine within the primary immunosuppression regimen (10.0% vs. 2.0%; p -value = .025) (Table S3).

In the multivariate model, double-organ transplantation (OR: 5.62; 95% CI: 1.52–20.82; p -value = .010) and DBD (OR: 2.21; 95% CI: 1.00–4.88; p -value = .049) were associated with the detection of HPgV-1 RNA, whereas the pretransplant diagnosis of hypertension was protective (OR: 0.23; 95% CI: 0.09–0.55; p -value = .001). The goodness of fit of the model was evaluated as good (Hosmer–Lemeshow p -value = .905) (Table 2).

There were no significant differences in immune parameters (peripheral blood lymphocyte subpopulations, serum immunoglobulin, and complement factors) or graft function according to the presence of plasma HPgV-1 RNA at different points after transplantation, with the exception of a higher IgG level by month 1 among HPgV-1-positive recipients (908 ± 233 vs. 766 ± 269 mg/dl; p -value = .012) (Table S4). On the other hand, no significant correlations were found between these variables and HPgV-1 RNA levels (in log₁₀ copies/ml), with the exception of the CD3+ T-cell count at month 3 (Spearman's rho: 0.396; p -value = .041) (Table S5).

3.5 | Association between HPgV-1 infection and outcomes

There were no significant differences in the cumulative incidence of study outcomes (posttransplant serious infection, iRAE or acute graft rejection) beyond day 7 and months 1, 3, 6, and 12 after transplantation

TABLE 2 Univariate and multivariate analysis of factors predicting the detection of plasma human pegivirus type 1 (HPgV-1) RNA during the post-transplant period

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis ^a		
	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
Age of the recipient	0.98 ^b	0.96–1.00	.059	–	–	–
Pretransplant hypertension	0.24	0.11–0.55	.001	0.23	0.09–0.55	.001
Pretransplant dyslipidemia	0.50	0.26–0.96	.037	–	–	–
Previous solid organ transplantation	2.34	1.01–5.47	.049	–	–	–
Double-organ transplantation (kidney–pancreas and liver–kidney)	6.91	1.98–24.06	.002	5.62	1.52–20.82	.010
DBD donor	2.32	1.10–4.89	.027	2.21	1.00–4.88	.049
Intraoperative transfusion of red cell units and/or fresh-frozen plasma	5.23	1.76–15.56	.016	–	–	–

Abbreviations: CI, confidence interval; DBD, donation after brain death; OR, odds ratio.

^aDonor age and the use of azathioprine-containing immunosuppression regimen were not included in the model due to the existence of significant multicollinearity with recipient age and double-organ transplantation, respectively (variance inflation factor values >2).

^bOR per 1-year increment.

according to the presence or not of detectable HPgV-1 RNA at each of these prespecified time points (Figure 3).

On the other hand, we found no significant differences in plasma HPgV-1 RNA levels between recipients that subsequently developed study outcomes and those that remained free from events (Figure 4). No differences were observed according to the presence of high-level HPgV-1 viremia ($\geq 3.3 \log_{10}$ copies/ml) either (data not shown). Patients with increasing HPgV-1 RNA levels during the first month, however, had a numerically lower incidence of posttransplant serious infection beyond that point as compared to those with nonascending trajectories (31.2% [5/16] vs. 66.7% [6/9], respectively; p -value = .115). A similar trend was also observed beyond month 3 (25.0% [6/24] vs. 62.5% [5/8] for recipients with ascending and nonascending kinetics during the first 3 months; p -value = .088). The presence of persistent posttransplant HPgV-1 infection did not influence the incidence of study outcomes beyond the first year (data not shown).

3.6 | Correlation between HPgV-1 and TTV viral loads

Finally, the potential correlation between HPgV-1 and TTV infection was also investigated, since growing evidence supports the role of TTV replication kinetics as a surrogate marker of posttransplant immunocompetence status.^{27,35,36} There were no significant differences in TTV DNA loads according to the presence or not of detectable HPgV-1 RNA at any of monitoring points (Figure S2). In addition, no significant correlations were observed between plasma HPgV-1 RNA and TTV loads (Table S6).

4 | DISCUSSION

The presence of HPgV-1 RNA in plasma specimens was demonstrated at some point during the posttransplant period in approximately one

quarter of the KT recipients in the present cohort, and 8.5% of them showed persistent infection. When analyzed at discrete points, rates slightly increased from 14.7% before transplantation to 19.1% at month 12. Certain procedure-related variables (double organ transplantation and DBD) were found to increase the odds of HPgV-1 infection, whereas the diagnosis of hypertension acted as a protective factor. More importantly, we found no significant differences in the cumulative incidence of posttransplant serious infection, iRAE or rejection between HPgV-1-positive and negative patients, nor clear correlation between HPgV-1 RNA levels and immune parameters or TTV loads. Taken together, these findings would not support the hypothesis that HPgV-1 exerts an immunomodulatory effect in the KT setting similar to that postulated for HIV patients.

The prevalence of detectable HPgV-1 RNA by RT-PCR targeting the 5' UTR in our cohort (26.1%) was in line with rates reported in Brazilian KT recipients (16.7%–36.1%)^{23,24} and in HT (36%) and lung transplant (LuT) recipients (18%) from Germany and Austria.^{22,37} The corresponding figures in the LT setting seem to be lower (~14% in studies carried out in Japan²¹ and Iran¹⁹). Even considering the existence of wide geographical variations, these rates are far away from those observed in nonimmunocompromised healthy blood donors, with pooled estimates of 1.7% in North America and 2.3% in Europe.⁴ Significant differences in the prevalence of HPgV-1 infection have also been found between LT recipients and patients undergoing hepatectomy.²¹ On the other hand, the prevalence in HIV-infected individuals is higher than healthy donors and comparable to SOT recipients,¹⁷ although parenteral transmission plays a more relevant role in the epidemiology of HPgV-1 infection in the HIV population.³⁸ These results collectively suggest that the impairment of immune competence exerts a negative impact on the capacity to clear HPgV-1 RNA following infection—resulting in persistent replication—and that the amount of immunosuppression inversely correlates with prevalence rates, which are higher after KT and thoracic organ transplantation than in the typically less immunosuppressed LT recipients.

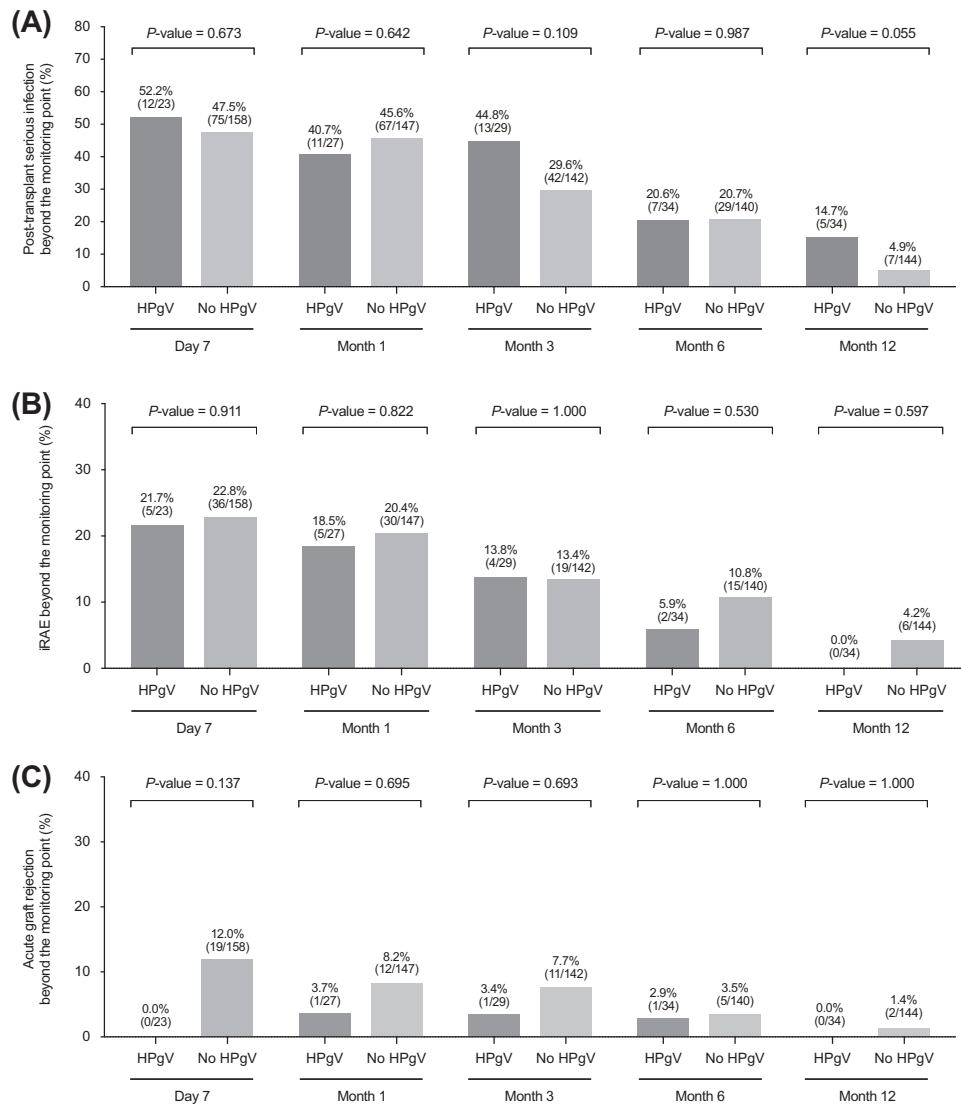


FIGURE 3 Cumulative incidence rates of study outcomes according to the presence of detectable plasma HPgV RNA at different time points after transplantation: (A) serious infection (i.e., requiring hospital admission and intravenous therapy), (B) iRAE (i.e., opportunistic infection and/or de novo malignancy), and (C) acute graft rejection. Rates were calculated by taking the corresponding monitoring point as the beginning of the observation period. HPgV-1, human pegivirus type 1; iRAE, immunosuppression-related adverse event

Few previous studies have investigated the clinical features associated with posttransplant HPgV-1 infection, revealing female gender²⁴ and younger recipient age³⁷ as risk factors. In our study, recipient age was also lower in the HPgV-1-positive group, although the difference was not maintained in the multivariate model. Age was inversely correlated with the prevalence of HPgV-1 infection in some studies performed in healthy blood donors,^{8,39} which has been suggested to be explained by the increased sexual activity in younger people. In line with other authors,²² we observed that HPgV-1-positive recipients had higher intraoperative transfusion requirements, as well as an increased number of pretransplant transfusions. Intraoperative blood losses were also higher among LT recipients with HPgV-1 infection in the study by Izumi et al.²¹ This would point out to the transmission through transfusion of blood products⁴⁰ or the potential donor-derived infection, since donor screening for HPgV-1 is not mandatory.

After multivariate adjustment, however, only double organ transplantation—which implies prolonged surgical times and increased perioperative transfusion requirements—and the use of organs from DBD donors—versus circulatory death or living donation—revealed as independent predictors for HPgV-1 infection. To our knowledge, no prior studies have assessed the impact of the type of donor on the rate of HPgV-1 viremia, although it could be hypothesized that DBD donors are more likely to have been recently infected during their intensive care unit stay. The quite unexpected negative association observed between HPgV-1 infection and hypertension has no evident explanation, although the diagnosis of such condition could simply act as a surrogate for older patient age. Future studies should corroborate both associations.

It has been demonstrated that HPgV-1 inhibits interleukin (IL)-12-dependent interferon- γ release by NK cells⁴¹ and IL-2 release and

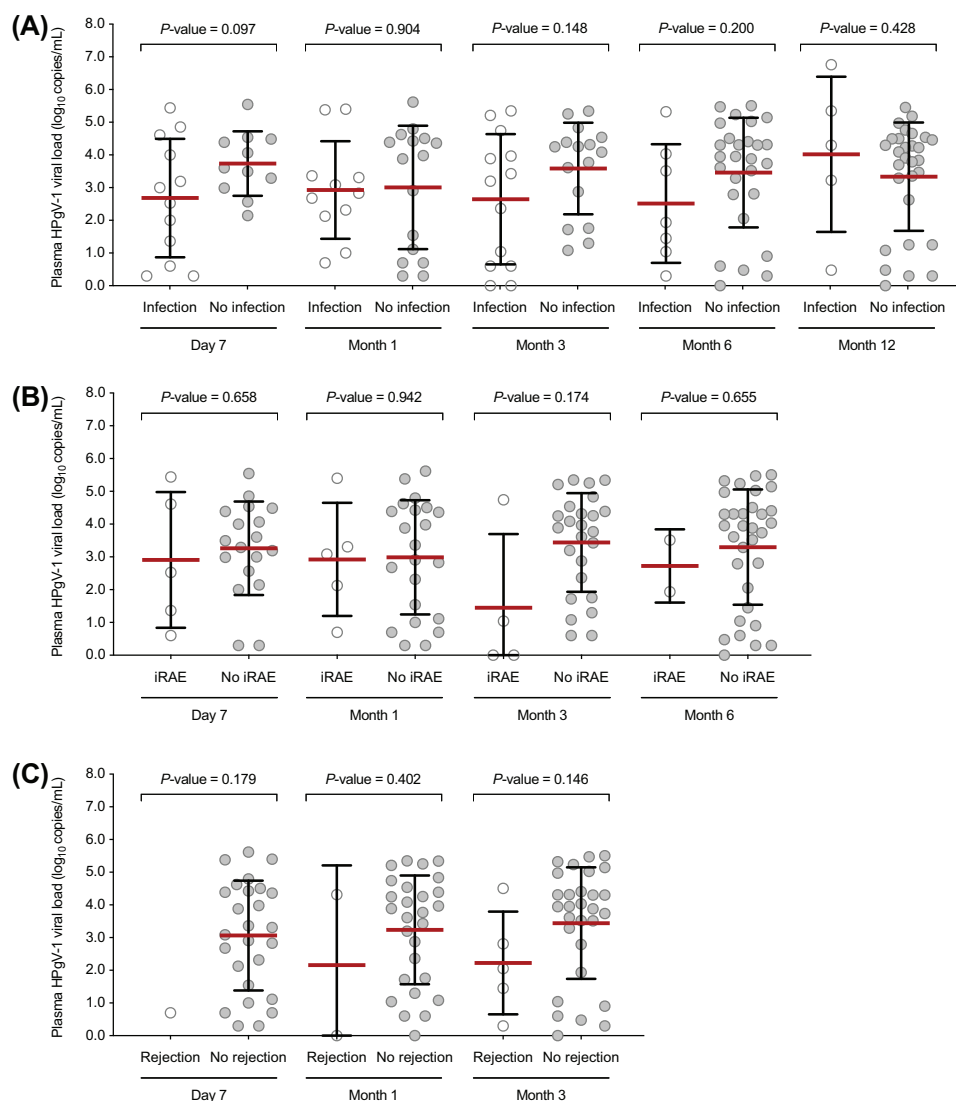


FIGURE 4 Comparison of plasma HPgV-1 RNA levels at different time points according to the subsequent occurrence of study outcomes: (A) serious infection, (B) iRAE, and (C) acute graft rejection. Red bars represent mean values, and whiskers indicate standard deviations. Some comparisons could not be performed due to the absence of events among HPgV-1-positive recipients for the corresponding period. HPgV-1, human pegivirus type 1; iRAE, immunosuppression-related adverse event

upregulation of IL-2 receptor expression by CD4+ and CD8+ T-cells following T-cell receptor activation.⁴² In addition, the expression of the HPgV-1 NS5A protein in CD4+ T-cell line induces the upregulation of Th1 cytokines (tumor necrosis factor- α) and downregulation of Th2 cytokines.⁴³ Patients coinfecting with HIV and HPgV-1 exhibit reduced activation of B-cells, the CD56^{bright}/CD16-subset of NK cells, and monocytes as compared to HIV patients without HPgV-1 viremia.⁴⁴ These and other immunomodulatory actions have been invoked to explain the beneficial relationship observed between persistent HPgV-1 infection and immunological, virological, and clinical outcomes in individuals living with HIV, including longer AIDS-free and overall survival.^{14–17} Not surprisingly, some recent studies have investigated whether this effect may be extrapolated to the SOT and HSCT settings. Nevertheless, no significant differences according to the HPgV-1 RNA status have been observed in terms of graft survival

or incidence of rejection among KT recipients,²⁴ patient survival or graft rejection in HT⁴⁵ or LT recipients,^{21,45} or occurrence of acute or chronic rejection after LuT.³⁷ On the other hand, the timing of neutrophil engraftment and cellular immune reconstitution, overall survival and rate of graft-versus-host disease were comparable between HPgV-1-positive and negative allo-HSCT recipients.²⁵ Although the impact of HPgV-1 on the incidence of posttransplant infection has been scarcely investigated, Izumi et al. reported no differences in the occurrence of sepsis or surgical site infection after LT.²¹ A recent study comprising 110 LuT recipients failed to demonstrate differences in the incidence of CMV infection or in the number of episodes of CMV DNAemia.³⁷ Our study confirms the lack of apparent effect of HPgV-1 infection on patient and graft outcomes in the KT population and expands previous research by analyzing the incidence of iRAE, a composite outcome of opportunistic infection and de novo malignancy.^{27,28}

A nonsignificant trend was noted suggesting that recipients with early expansion of HPgV-1 would have a lower incidence of subsequent infection. Although this potential association merits further investigation, it should be taken with caution due to low numbers involved and lack of adjustment.

We have also attempted to correlate plasma HPgV-1 RNA levels and posttransplant kinetics of TTV, the prototypic member of the *Anelloviridae* family, and a major component of the human virome that has been consistently found to reflect the net state of posttransplant immunosuppression.^{27,35,36,46} In line with the study by Graninger et al. in LuT recipients,³⁷ TTV kinetics at different time points were not influenced by the presence of HPgV-1 viremia in our cohort. In contrast to the evolution observed for TTV DNAemia—which progressively increases from baseline to month 6 to slightly decrease by month 12, reflecting dynamic changes in immunosuppression^{27,47}—plasma HPgV-1 RNA levels maintained quite stable during the first posttransplant year. These kinetics would suggest that HPgV-1 replication is less sensitive than TTV to the use of lymphocyte-depleting agents as induction therapy or to changing trough levels of calcineurin inhibitors.

A number of limitations must be acknowledged. Given geographical variations in prevalence rates and genotypic distribution for HPgV-1, the single-center nature of the present study hampers the generalizability of our findings to other settings with different background epidemiology in the overall population. In this regard, we lack details on the distribution of HPgV-1 genotypes, although it seems unlikely that the main message that can be drawn from our research—HPgV-1 infection and its presumed immunomodulatory effects do not impact posttransplant outcomes—would have been substantially modified on the basis of this information. In fact, the only study to date that has performed HPgV-1 genotyping in a small cohort of KT recipients found no association between specific genotypes and clinical variables.²⁴ The number of iRAE and rejection episodes during late posttransplant periods was low, compromising statistical power. The absence of standardized assays for HPgV-1 detection or external quality assessment pilot programs poses a potential limitation to ours and previous studies, for which some degree of inter-laboratory variability in RNA levels is to be expected. Nevertheless, our RT-PCR was performed following a well-established method, reinforcing assay robustness and reproducibility.²⁹ Finally, the hypothesis that the high rate of posttransplant de novo HPgV-1 viremia (13.8%) would have resulted from transfusion transmitted or donor-derived infection cannot be confirmed, since blood products intraoperatively transfused or graft donors were not tested for HPgV-1 RNA.

On the other hand, our cohort is one of the largest reported to date that investigated HPgV-1 infection in the SOT setting, since the only two other studies focused on the KT population included 12 and 61 recipients.^{23,24} Our study is novel on exploring the potential relationship between HPgV-1 viremia and the composite outcome of iRAE, which allows for capturing clinically relevant events that serve as “red flags” for over-immunosuppression.^{27,28} No studies had previously investigated the correlation between HPgV-1 RNA level and a large number of immune parameters, such as peripheral blood lymphocyte subpopulations, immunoglobulin levels, and complement factors.

Finally, we also correlated HPgV-1 infection with TTV load at various time points.

In conclusion, this hypothesis-generating research suggests that HPgV-1 viremia constitutes a common phenomenon in the KT population, with a substantial proportion of cases being presumably attributable to de novo infection through blood product transfusion. Unlike HIV patients, HPgV-1 infection does not exert an apparent impact on posttransplant outcomes, and the association between HPgV-1 RNA levels and direct or surrogate immune parameters could not be demonstrated either. Whether the clinical benefits derived from HIV-HPgV-1 coinfection are mainly due to direct viral interference or immunomodulatory mechanisms—and, in this latter case, the potential translation to the SOT scenario—remain to be elucidated.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mario Fernández-Ruiz, Lorena Forque, Amado Andrés, José María Aguado, and David Navarro designed research. Lorena Forque, Eliseo Albert, Natalia Redondo, and Estela Giménez performed laboratory assays. Tamara Ruiz-Merlo and Patricia Parra obtained and processed patient samples. Mario Fernández-Ruiz, Francisco López-Medrano, Esther González, Natalia Polanco, and Rafael San Juan performed clinical follow-up. Mario Fernández-Ruiz and Lorena Forque analyzed data. Mario Fernández-Ruiz and Lorena Forque wrote the paper, and Francisco López-Medrano, Rafael San Juan, Amado Andrés, José María Aguado, and David Navarro critically revised the final manuscript.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation (PI15/O1953) — co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe”. Mario Fernández-Ruiz holds a research contract “Miguel Servet” (CP18/00073), Eliseo Albert holds a research contract “Rio Hortega” (CM18/00221), and Estela Giménez holds a research contract “Juan Rodés” (JR18/00053), all from the ISCIII, Spanish Ministry of Science and Innovation.

ORCID

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

Francisco López-Medrano  <https://orcid.org/0000-0001-5333-7529>

Amado Andrés  <https://orcid.org/0000-0003-0238-1364>

José María Aguado  <https://orcid.org/0000-0002-9520-8255>

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

REFERENCES

1. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol*. 2011;92:233-246.
2. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*. 1995;1:564-569.



3. Christensen PB, Fisker N, Mygind LH, et al. GB virus C epidemiology in Denmark: different routes of transmission in children and low- and high-risk adults. *J Med Virol*. 2003;70:156-162.
4. Yang N, Dai R, Zhang X. Global prevalence of human pegivirus-1 in healthy volunteer blood donors: a systematic review and meta-analysis. *Vox Sang*. 2020;115:107-119.
5. Love A, Stanzeit B, Gudmundsson S, Widell A. Hepatitis G virus infections in Iceland. *J Viral Hepat*. 1999;6:255-260.
6. Moaven LD, Hyland CA, Young IF, et al. Prevalence of hepatitis G virus in Queensland blood donors. *Med J Aust*. 1996;165:369-371.
7. Sathar MA, Soni PN, Naicker S, Conradie J, Lockhat F, Gouwes E. GB virus C/hepatitis G virus infection in KwaZulu Natal, South Africa. *J Med Virol*. 1999;59:38-44.
8. Da Mota LD, Finger-Jardim F, Silva CM, et al. High prevalence and autochthonous transmission of human pegivirus (HPgV-1) in blood donors in the extreme southern of Brazil. *J Med Virol*. 2019;91:31-37.
9. Wang H, Wan Z, Xu R, et al. A novel human pegivirus, HPgV-2 (HHpgV-1), is tightly associated with hepatitis C virus (HCV) infection and HCV/human immunodeficiency virus type 1 coinfection. *Clin Infect Dis*. 2018;66:29-35.
10. Smith DB, Becher P, Bukh J, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol*. 2016;97:2894-2907.
11. Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, et al. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol*. 1999;57:114-121.
12. Chivero ET, Stapleton JT. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. *J Gen Virol*. 2015;96:1521-1532.
13. Fama A, Larson MC, Link BK, et al. Human pegivirus infection and lymphoma risk: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2020;71:1221-1228.
14. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2001;345:707-714.
15. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*. 1999;179:783-789.
16. N'Guessan KF, Anderson M, Phinius B, et al. The impact of human pegivirus on CD4 cell count in HIV-positive persons in Botswana. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4:ofx222.
17. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med*. 2006;7:173-180.
18. Koedel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol*. 2011;85:7037-7047.
19. Ebadi M, Yaghobi R, Geramizadeh B, Bahmani MK, Malek-Hosseini SA, Nemayandeh M. Prevalence of HCV and HGV infections in Iranian liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2011;43:618-620.
20. Thijssen M, Tacke F, Beller L, et al. Clinical relevance of plasma virome dynamics in liver transplant recipients. *EBioMedicine*. 2020;60:103009.
21. Izumi T, Sakata K, Okuzaki D, et al. Characterization of human pegivirus infection in liver transplantation recipients. *J Med Virol*. 2019;91:2093-2100.
22. Kallinowski B, Seipp S, Dengler T, Klar E, Theilmann L, Stremmel W. Clinical impact of hepatitis G virus infection in heart and liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2002;34:2288-2291.
23. Ramos Filho R, Carneiro MA, Teles SA, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:639-643.
24. Savassi-Ribas F, Pereira JG, Horta MAP, et al. Human pegivirus-1 infection in kidney transplant recipients: a single-center experience. *J Med Virol*. 2020;92:2961-2968.
25. Vu DL, Cordey S, Simonetta F, et al. Human pegivirus persistence in human blood virome after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:225-232.
26. Li Z, Li Y, Liang Y, Hu L, Chen S. Prevalence and risk factors of human pegivirus type 1 infection in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Int J Infect Dis*. 2019;85:111-113.
27. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alpha-torquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19:1139-1149.
28. 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.
29. Rydze RT, Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and protection against activation-induced T-cell death. *Antivir Ther*. 2012;17:1271-1279.
30. Fernández-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.
31. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528.
32. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71:1367-1376.
33. 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.
34. Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 kidney meeting report (I): updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2020;20:2318-2331.
35. Mitchell AB, Glanville AR. Kinetics of TTV-DNA plasma load: a global measure of immune suppression? *Transplantation*. 2019;103:660-661.
36. Reza Hosseini O, Drabe CH, Sorensen SS, et al. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2019;33:137-144.
37. Graninger M, Aberle S, Gorzer I, Jaksch P, Puchhammer-Stockl E. Human pegivirus 1 infection in lung transplant recipients: prevalence, clinical relevance and kinetics of viral replication under immunosuppressive therapy. *J Clin Virol*. 2021;143:104937.
38. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Rockstroh JK. Role of GB virus C in modulating HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10:563-572.
39. Oliveira LA, Martins RM, Carneiro MA, et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:953-957.
40. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med*. 1997;336:747-754.
41. Chivero ET, Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Stapleton JT. Human pegivirus (HPgV; formerly known as GBV-C) inhibits IL-12 dependent natural killer cell function. *Virology*. 2015;485:116-127.
42. Bhattarai N, McLinden JH, Xiang J, Kaufman TM, Stapleton JT. GB virus C envelope protein E2 inhibits TCR-induced IL-2 production and alters IL-2-signaling pathways. *J Immunol*. 2012;189:2211-2216.
43. Rydze RT, Xiang J, McLinden JH, Stapleton JT. GB virus type C infection polarizes T-cell cytokine gene expression toward a Th1 cytokine profile via NS5A protein expression. *J Infect Dis*. 2012;206:69-72.

44. Stapleton JT, Martinson JA, Klinzman D, Xiang J, Desai SN, Landay A. GB virus C infection and B-cell, natural killer cell, and monocyte activation markers in HIV-infected individuals. *AIDS*. 2013;27:1829-1832.
45. Kallinowski B, Janicki M, Seelig R, et al. Clinical relevance of hepatitis G virus (HGV) infection in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18:190-193.
46. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, et al. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients-a prospective observational trial. *Am J Transplant*. 2020;20:2081-2090.
47. 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.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Fernández-Ruiz M, Forque L, Albert E, et al. Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: Replication kinetics and clinical correlates. *Transpl Infect Dis*. 2022;24:e13771. <https://doi.org/10.1111/tid.13771>



Dynamics of Human Anelloviruses in Plasma and Clinical Outcomes Following Kidney Transplantation

Lorena Forqué, PharmD,^{1,2} Mario Fernández-Ruiz, MD, PhD,^{2,3,4} Eliseo Albert, PharmD,^{1,2} Estela Giménez, PhD,^{1,2} Carolina Monzó, MSc,⁵ Javier Chaves, PhD,⁵ Natalia Redondo, PhD,^{2,3} Isabel Rodríguez-Goncer, MD, PhD,^{2,3} Tamara Ruiz-Merlo, BSN,^{2,3} Patricia Parra, CLS,^{2,3} Amado Andrés, MD, PhD,^{4,6} José María Aguado, MD, PhD,²⁻⁴ and David Navarro, MD, PhD^{1,2,7}

Background. Torque teno virus, the major member of the genus *Alphatorquevirus*, is an emerging biomarker of the net state of immunosuppression after kidney transplantation. Genetic diversity constitutes a main feature of the *Anelloviridae* family, although its posttransplant dynamics and clinical correlates are largely unknown.

Methods. The relative abundance of *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus*, and *Gammatorquevirus* genera was investigated by high-throughput sequencing in plasma specimens obtained at various points during the first posttransplant year (n = 91 recipients). Total loads of all members of the *Anelloviridae* family were also quantified by an “in-house” polymerase chain reaction assay targeting conserved DNA sequences (n = 195 recipients). In addition to viral kinetics, clinical study outcomes included serious infection, immunosuppression-related adverse event (opportunistic infection and cancer), and acute rejection.

Results. *Alphatorquevirus* DNA was detected in all patients at every point, with an increase from pretransplantation to month 1. A variable proportion of recipients had detectable *Betatorquevirus* and *Gammatorquevirus* at lower frequencies. At least 1 change in the predominant genus (mainly as early transition to *Alphatorquevirus* predominance) was shown in 35.6% of evaluable patients. Total anelloviruses DNA levels increased from baseline to month 1, to peak by month 3 and decrease thereafter, and were higher in patients treated with T-cell depleting agents. There was a significant albeit weak-to-moderate correlation between total anelloviruses and TTV DNA levels. No associations were found between the predominant *Anelloviridae* genus or total anelloviruses DNA levels and clinical outcomes.

Conclusions. Our study provides novel insight into the evolution of the anellovirus after kidney transplantation.

(*Transplantation* 2022;00: 00–00).

Received 13 April 2022. Revision received 28 May 2022.

Accepted 21 June 2022.

¹ Department of Microbiology, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, Spain.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

³ Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Madrid, Spain.

⁴ Department of Medicine, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

⁵ Genotyping and Genetic Diagnosis Unit, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

⁶ Department of Nephrology, Hospital Universitario “12 de Octubre”, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital “12 de Octubre” (imas12), Madrid, Spain.

⁷ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

L.F. and M.F.-R. equally contributed to the present study. L.F., M.F.-R., A.A., J.M.A., and D.N. participated in the study concept and design; L.F., M.F.-R., E.A., E.G., C.M., J.C., and N.R. performed the laboratory procedures; T.R.M. obtained patient samples; T.M.R. and P.P. processed patient samples and participated in the laboratory procedures; M.F.-R., I.R.-G., A.A., and J.M.A. performed the clinical management of patients; L.F., M.F.-R., N.R., and I.R.-G. collected clinical data; L.F. and M.F.-R. performed statistical analysis; L.F. and M.F.-R. drafted the manuscript; and A.A., J.M.A., and D.N. critically reviewed

the manuscript and provided significant intellectual contributions. All the authors read and approved the final version of the submitted manuscript.

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request to the corresponding author.

The authors declare no conflicts of interest.

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation (PIE13/00045, PI15/01953)—co-financed by European Development Regional Fund (ERDF) “A way to achieve Europe” and by the European Social Fund (ESF) “The ESF invests in your future”. M.F.R. holds a research contract “Miguel Servet” (CP18/00073), E.A. holds a research contract “Rio Hortega” (CM18/00221), and E.G. holds a research contract “Juan Rodés” (JR18/00053), all from the ISCIII, Spanish Ministry of Science and Innovation.

Supplemental Visual Abstract; <http://links.lww.com/TP/C531>

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Correspondence: Mario Fernández-Ruiz, MD, PhD, Unit of Infectious Diseases, Hospital Universitario “12 de Octubre”. Centro de Actividades Ambulatorias, 2ª planta, bloque D. Avda. de Córdoba, s/n. Postal code 28041. Madrid, Spain. (mario_fdezruiz@yahoo.es).

Copyright © 2022 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/0000-00

DOI: 10.1097/TP.0000000000004292

INTRODUCTION

Human anelloviruses are small negative-sense circular replication-associated protein-encoding single-stranded DNA viruses that generate life-span persistent infection in most individuals.¹ Anelloviruses appear to replicate at multiple body organs and tissues and represent a large component of the human virome.^{1,2} To date, no pathogenic effect has been proven, deserving the term of “orphan viruses.”³ One of the distinct features of anelloviruses is their great genetic variability.⁴ In addition to the predominant *Alphatorquevirus*, the family also includes 2 closely related genera that differ in their genome sizes: *Betatorquevirus* (with torque teno mini virus as the prototypic member) and *Gammatorquevirus* (that includes torque teno midi virus [TTMdV], among other species).^{5,6}

The *Anelloviridae* family predominates over other viruses in the peripheral blood compartment from solid organ transplant (SOT) recipients under immunosuppressive therapy,⁷ although their posttransplant dynamics is largely unknown, as are its clinical implications. Torque teno virus (TTV)—the major member of the genus *Alphatorquevirus*—DNAemia has been shown to fluctuate depending upon the net state of immunosuppression, whereby high and low viral loads being associated with an increased risk of infection or graft rejection, respectively.^{8–13} Our group reported that kidney transplant (KT) recipients with TTV DNA loads at month 1 >3.15 and >4.56 log₁₀ copies/mL had a nearly 3- and 5-fold increase in the risk of infection or overimmunosuppression-related adverse event (oIAE), respectively, as compared with patients with viral loads below these thresholds.¹² In addition, we have previously observed wide variations both between and within individuals in the relative genomic abundance of the main genera of the *Anelloviridae* family at different timeframes after hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).¹⁴

In light of these results, we speculated that the quantitation of total anelloviruses DNA levels after SOT may capture dynamic variations in immunocompetence more accurately than the sole monitoring of TTV DNA. By means of a targeted high-throughput sequencing (HTS) approach, we investigated the absolute and relative dynamics of *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus*, and *Gammatorquevirus* genera in blood in a previous cohort of KT recipients.¹² In addition, we developed a polymerase chain reaction (PCR) protocol targeting conserved DNA sequences across human anelloviruses and investigated whether total viral loads of all members of the *Anelloviridae* family returned by this assay would better predict the occurrence of clinical events—serious infection, oIAE, and acute graft rejection—with regard to a PCR method exclusively amplifying alphatorquevirus (TTVs) DNA. Contrary to this initial hypothesis, we have found no apparent associations between clinical outcomes and either the proportion of read counts for *Alpha*-, *Beta*-, or *Gammatorquevirus* or total anelloviruses DNA levels.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Population

This research was carried out at the Hospital Universitario “12 de Octubre” (Madrid, Spain) as a post

hoc analysis of a previous observational study that assessed the predictive role of alphatorquevirus DNA levels.¹² Adult patients (≥18 y) undergoing KT between November 2014 and December 2016 and providing informed consent were eligible for inclusion. Double organ (kidney-pancreas or liver-pancreas) recipients were excluded. The study was performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declarations of Helsinki and Istanbul, and the local Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol.

Blood samples obtained at preestablished time points were immediately centrifuged, and the resulting plasma specimens were stored at –80 °C until further analysis. All the patients were scheduled to be prospectively followed up for 12 mo, unless graft loss (ie, retransplantation or permanent return to dialysis) or death occurred earlier. Beyond that point, the follow-up period was additionally extended in a retrospective manner to complete at least 2 y since the transplantation. Pretransplant, perioperative, and posttransplant variables were prospectively recorded by means of a standardized case report form.

Absolute and relative genomic abundance of the 3 major genera of the *Anelloviridae* family (*Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus*) was investigated by HTS in plasma samples obtained at baseline (within 6 h before the transplant procedure) and months 1, 3, 6, and 12. To capture longitudinal changes over time, only patients with ≥2 consecutive specimens available were selected for the present study. Total anelloviruses DNA levels were also measured at baseline, day 7, and months 1, 3, 6, and 12. In addition to viral kinetics, clinical study outcomes included the development of posttransplant serious infection (that was defined by the requirement of hospitalization and intravenous antimicrobial therapy), oIAE (defined as opportunistic infection and/or posttransplant cancer), and acute graft rejection.

Immunosuppression and Prophylaxis Regimens

Recipients from donors after circulatory death received induction therapy with antithymocyte globulin (ATG-Fresenius, 1.25 mg/kg daily for 5–7 d), with delayed initiation of tacrolimus on posttransplant day 6. Recipients at high immunological risk also received ATG induction for 1 to 3 d with early tacrolimus initiation from day 0. Basiliximab (20 mg on days 0 and 4) with delayed tacrolimus introduction from day 5 was reserved to patients at high risk for tacrolimus-related nephrotoxicity (ie, advanced age or comorbidities). Maintenance immunosuppression consisted of tacrolimus (0.1 mg/kg daily, adjusted to a target trough level of 10–15 ng/mL during the first month and 5–10 ng/mL thereafter); mycophenolic acid (360 mg twice daily); and prednisone (1 mg/kg daily with progressive tapering). Conversion to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor with reduced-dose tacrolimus (target trough level of 3–6 ng/mL) was performed on an individual basis for recipients experiencing tacrolimus-related adverse effects, difficult-to-treat cytomegalovirus (CMV) or BK polyomavirus infection, or malignancy.

Patients at high risk for CMV disease received prophylaxis with oral valganciclovir (900 mg daily) for 3 (R+ receiving induction therapy with ATG) or 6 mo (serology

mismatch [D+/R-]). Intermediate-risk patients (ie, R+ without T-cell-depleting therapy) were monitored every 2 to 4 wks for CMV DNAemia with a PCR-based assay (RealStar CMV PCR kit, Altona Diagnostics, Hamburg, Germany), and preemptive therapy with oral valganciclovir (900 mg/12 h) was given for at least 2 wks in the case of high-level (>1000 IU/mL) or increasing viral loads, according to the clinical guidelines in place at each time.^{15,16} Further details on preoperative antibiotic prophylaxis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis are provided as SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>.

Study Definitions

The definition of oIAE encompassed opportunistic infection and de novo cancer and was constructed to capture clinically relevant events whose pathogenesis may be attributable to impaired T-cell-mediated immunity.^{12,17} Opportunistic infections included those due to intracellular bacteria (eg, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia* spp., or mycobacteria), herpes viruses (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, CMV, and Epstein-Barr virus-related posttransplant lymphoproliferative disease), yeasts (*Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.), molds, *P. jirovecii*, and parasites (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*, and *Leishmania* spp.). Proven or probable invasive fungal disease was defined according to the updated criteria of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group.¹⁸ Proven (demonstration of cytopathic changes in tubular epithelial cells with subsequent confirmation by immunohistochemistry or in situ hybridization) or presumptive (plasma BKPyV DNAemia >4.0 log₁₀ copies/mL with an increase in 1 of 2 measurements within 3 wks or less) BK polyomavirus-associated nephropathy was also considered.¹⁹ Prospectively recorded cases were reclassified in a retrospective way if necessary according to the most recent diagnostic consensus criteria. Further study definitions are available as SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>.

Nucleic Acid Extraction

Total DNA was extracted from a volume of 200 µL of plasma by using the Nuclisens nucleic acid extraction kit for the easyMAG platform (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), following the manufacturer's instructions.

HTS and Bioinformatic Analysis

HTS was conducted as previously described.¹⁴ Briefly, highly conserved genomic sequences of the different *Anelloviridae* genera were amplified by using an “in-house” multiplex PCR assay. Amplicons were sequenced in a MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kit, version 2 (300 cycles) (all from Illumina, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions. Sequences <1 and >150 bp were excluded. The sequence alignment was performed with the database updated to March 2018 (available at ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/ref_viruses_rep_genomes.tar.gz). Filtering parameters were as follows: e value = 0.001, readings above 65 bp, and at least 85% of coincidence with the reference sequence. For analysis purposes, the percentage of read counts of *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus* was calculated from the total number of anelloviruses read counts for a given

sample. The number of read counts for each genus was proportional to the respective DNA load in that sample.¹⁴

Quantitation of Total Anelloviruses and TTV DNA in Plasma

TTV DNA in plasma was quantitated with an “in-house”-developed PCR assay as previously described (SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>).²⁰ Total anelloviruses DNA was measured in plasma specimens by an “in-house” PCR assay targeting the untranslated region, whose design was based on a previously published protocol.²¹ Briefly, 0.5 µL of each universal primer (5 µmol/L) and 4 µL of HOT FIREPol SolisGreen qPCR Mix (Solis BioDyne, Teaduspargi, Estonia) were added to each well (final volume 20 µL). The PCR conditions consisted of 90 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C and 1 min at 68 °C. A plasmid (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, MA) containing a segment of the untranslated region sequence (129 pb [from nucleotide 99 to 227]) of the TA278 isolate of TTV genotype (accession no. AB008394) was used for quantification of total anelloviruses DNA. A standard curve was constructed in triplicate for each run, and total anelloviruses DNA levels were expressed as copies/mL of plasma after adjusting for the extraction method. Both PCR amplifications were performed on the ABI Prism 7500 system (PE Biosystems, Foster City, CA).

Statistical Analysis

Quantitative data were shown as the mean ± SD for those variables with a normal distribution or as the median with interquartile range (IQR) if the assumption of normality was not met. Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies. Categorical variables were compared with the χ^2 test. Student *t*-test, Mann-Whitney U test, or ANOVA were applied for continuous variables. Repeated measures were compared with the Student *t*-test for paired samples or the Wilcoxon test. Pearson's *r* or Spearman's rho correlation coefficients were used to assess the correlation between continuous variables. Viral loads were log₁₀ transformed for analysis. In the analysis of the association between total anelloviruses, DNA levels and clinical outcomes, the temporal relationship between the assessment of the biomarker and the occurrence of the event to be predicted was preserved. Thus, we only included those events diagnosed after the time of blood drawing at baseline, day 7, and months 1, 3, 6, and 12. The corresponding follow-up (time at risk) for each of these discrete periods was not censored.¹² All the significance tests were 2-tailed. Statistical analysis was performed using SPSS, version 20.0 (IBM Corp, Armonk, NY), and graphs were performed with Prism, version 7.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

RESULTS

Study Population and Clinical Outcomes

We included 195 KT recipients (88.2% of the overall cohort from the original study¹²), whose demographics and clinical features are detailed in Table 1. Overall, 111 recipients (56.9%) were diagnosed with a total of 226 episodes of serious infection. Forty-six patients (23.6%) experienced 59 events qualifying for oIAE. Finally, 20 patients

TABLE 1.**Demographics and clinical characteristics of the study population (n = 195)**

Variable	
Age of recipient, y [mean ± SD]	53.4 ± 15.1
Gender of recipient (male) [n (%)]	139 (71.3)
Prior or current smoking history [n (%)]	80 (41.0)
Pretransplant chronic comorbidities [n (%)]	
Hypertension	164 (84.5)
Hypercholesterolemia	110 (56.4)
Diabetes mellitus	56 (28.7)
Coronary heart disease	20 (10.3)
Nonischemic heart disease	31 (15.9)
Peripheral arterial disease	14 (7.2)
Cerebrovascular disease	15 (7.7)
Chronic obstructive pulmonary disease	5 (2.6)
Previous kidney transplantation [n (%)]	25 (12.8)
Underlying end-stage renal disease [n (%)]	
Glomerulonephritis	45 (23.1)
Diabetic nephropathy	36 (18.5)
Polycystosis	24 (12.3)
Nephroangiosclerosis	18 (9.2)
Chronic interstitial nephropathy	11 (5.6)
Congenital nephropathy	9 (4.6)
Reflux nephropathy	6 (3.1)
Vasculitis	5 (2.6)
Lupus nephropathy	3 (1.5)
Unknown	22 (11.3)
Other	16 (8.2)
CMV serostatus [n (%)]	
D+/R+	140 (71.8)
D−/R+	20 (10.3)
D+/R−	27 (13.8)
D−/R−	4 (2.1)
D unknown/R+	4 (2.1)
Positive HCV serostatus [n (%)]	16 (8.2)
Positive HBsAg status [n (%)]	8 (4.1)
Positive HIV serostatus [n (%)]	2 (1.0)
Pretransplant renal replacement therapy [n (%)]	171 (87.7)
Hemodialysis	139 (71.3)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	32 (16.4)
Time on dialysis, d [median (IQR)]	561 (276–1,092)
Highly sensitized recipient [n (%)]	16 (8.2)
Age of donor, y [mean ± SD]	52.2 ± 15.7
Gender of donor (male) [n (%)]	101 (51.8)
Type of donor [n (%)]	
DBD donor	125 (64.1)
DCD donor	44 (22.6)
Living donor	26 (13.3)
Cold ischemia time, h [mean ± SD]	16.1 ± 8.3
Number of HLA mismatches [median (IQR)]	4 (3–5)
Induction therapy [n (%)]	
ATG	98 (50.3)
Basiliximab	70 (35.9)
None	27 (13.8)
Primary immunosuppression regimen [n (%)]	
Prednisone, tacrolimus, MMF/MPA	187 (95.9)
Prednisone, tacrolimus, azathioprine	8 (4.1)
Conversion to mTOR inhibitor [n (%)]	20 (10.3)

Time from transplantation, d [median (IQR)]	240 (124.3–316.3)
Anti-CMV prophylaxis [n (%)]	116 (59.5)
Duration of prophylaxis, d [median (IQR)]	102 (91–147)
Posttransplant complications [n (%)] ^a	
Delayed graft function	91 (46.7)
Reintervention within the first month	19 (9.7)
New-onset diabetes after transplantation	18 (9.2)
Renal artery stenosis	34 (17.4)

CMV, cytomegalovirus; D, donor; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; HLA, human leukocyte antigen; HBsAg, hepatitis B virus surface antigen; HCV, hepatitis C virus; IQR, interquartile range; MMF/MPA, mycophenolate mofetil/mycophenolate sodium; mTOR, mammalian target of rapamycin; R, recipient.

^aOther than posttransplant serious infection, de novo malignancy, or acute rejection.

(10.3%) developed 22 episodes of acute rejection. The median intervals from transplantation to the first episode of each of these outcomes were 40 (IQR: 14–104), 91.5 (IQR: 42.8–235), and 94 d (IQR: 19–158.5), respectively. Details on the episodes of infection, oIAE, and rejection are provided as Supporting Material (Tables S1 and S2, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>). After a median follow-up of 1978 d (IQR: 989.3–2161.5), 19 patients (9.7%), died and 11 (5.6%) suffered graft failure. One- and 2-y survival rates were 99.5% and 98.2%, respectively, whereas the corresponding figures for death-censored graft survival were 98.9% and 97.0%.

Frequency and Relative Abundance of Anelloviridae Genera

A total of 308 samples obtained from a randomly selected subgroup of 91 recipients (46.7% of the overall cohort) yielded readable HTS profiles. In detail, results for plasma specimens at baseline and months 1, 3, and 6 were available for 70 (76.9%), 81 (89.0%), 78 (85.7%), and 79 (86.8%) patients, respectively. The relative abundance of *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus* over the study period is shown in Figure 1 and Table 2. *Alphatorquevirus* DNA was detected in all patients at every time point, with a significant increase in the proportion of read counts relative to the total counts from the baseline (pretransplant) assessment to month 1 (median: 76.4% versus 89.8%; $P = 0.002$), to decrease by month 6 (median: 89.4%; $P = 0.014$ in comparison with month 3). A variable percentage of patients also had detectable *Beta*- and *Gammatorquevirus* in most specimens, although at lower frequencies and magnitudes than the *Alphatorquevirus* genus. The read counts for *Betatorquevirus* DNA decreased from baseline (median of 14.2%) to month 1 (median of 3.9%; $P = 0.003$) and month 3 (median of 0.8%; $P = 0.007$ in comparison with month 1). *Alphatorquevirus* predominated over the remaining 2 genera in the majority of specimens, either considered globally (83.8% [258/308]) or at specific times (Table 2). There were no significant differences in demographics or clinical characteristics according to the predominance of a given genus at any of the time points (data not shown). Patients experiencing posttransplant serious infection showed a trend toward a higher relative abundance of *Betatorquevirus* at baseline than those without infection (median: 17.5% versus 10.4%; $P = 0.083$), with no differences for the remaining points (Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>). No differences were observed according to the development of oIAE (Figure S2, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>) or acute graft

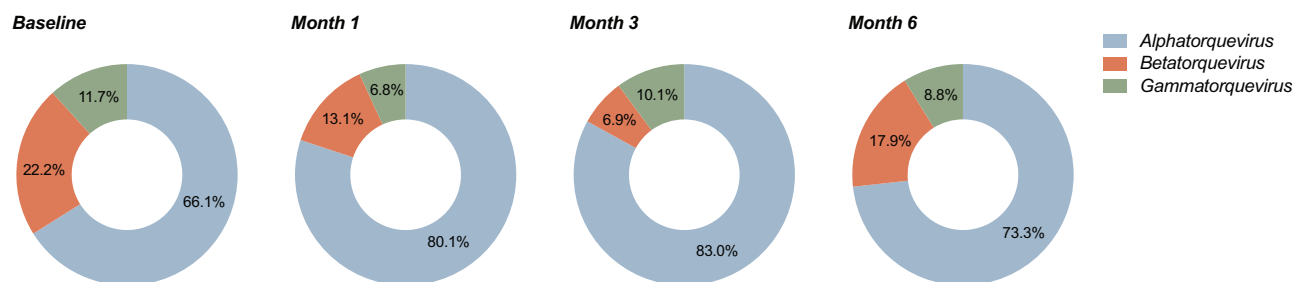


FIGURE 1. Relative genomic abundance of different anellovirus genera in the subgroup of patients with readable profiles by HTS (n = 91). Slices depict the mean values. HTS, high-throughput sequencing.

TABLE 2.

Absolute and relative frequencies of *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus* genera through the first 6 mo after transplantation in the subgroup of patients with readable profiles assessed by HTS (n = 91)

	Timing of sampling (patients with HTS results)			
	Baseline (n = 70)	Month 1 (n = 81)	Month 3 (n = 78)	Month 6 (n = 79)
Detection of <i>Alpha</i> - <i>torquevirus</i> [n (%)]	70 (100.0)	81 (100.0)	78 (100.0)	79 (100.0)
Detection of <i>Beta</i> - <i>torquevirus</i> [n (%)]	69 (98.6)	80 (98.8)	77 (98.7)	76 (96.2)
Detection of <i>Gam</i> - <i>matorevirus</i> [n (%)]	64 (91.4)	78 (96.3)	66 (84.6)	69 (87.3)
<i>Alphatorquevirus</i> reads, % [median (IQR)]	76.4 (43.8–91.2)	89.8 (73.3–96.9)	94.9 (80.3–99.9)	89.4 (52.8–99.7)
<i>Betatorquevirus</i> reads, % [median (IQR)]	14.2 (3.5–32.4)	3.9 (0.7–12.8)	0.8 (0.1–6.8)	4.4 (0.1–29.0)
<i>Gammatorquevirus</i> reads, % [median (IQR)]	5.5 (0.3–15.9)	1.2 (0.1–5.3)	0.3 (0.0–10.6)	0.3 (0.0–8.3)
Predominant genus [n (%)]				
<i>Alphatorquevirus</i>	53 (75.7)	71 (87.7)	69 (88.5)	65 (82.3)
<i>Betatorquevirus</i>	10 (14.3)	8 (9.9)	3 (3.8)	10 (12.7)
<i>Gammatorquevirus</i>	7 (10.0)	2 (2.5)	6 (7.7)	4 (5.1)

HTS, high-throughput sequencing; IQR, interquartile range.

rejection either (Figure S3, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>).

Dynamic Changes in the Predominance of Anelloviridae Genera

At least 1 inpatient change in the relative frequency of detection period resulting in a modification in the predominant *Anelloviridae* genus was demonstrated during the study in 31 patients (35.6% of those with ≥ 1 plasma sample giving readable HTS profiles), accounting from 52 distinct instances of transition. Transitions from predominant *Beta*- or *Gammatorquevirus* to *Alphatorquevirus* were the most common changes observed (25.0% [13/52] and 23.1% [12/52], respectively), and typically occurred early after transplantation (between baseline and month 3). The transition from *Alpha*- to *Betatorquevirus*

predominance occurred in 25.0% (13/52) of cases, mostly at later times (months 1 to 6). The transition from *Alpha*- to *Gammatorquevirus* predominance occurred more rarely (19.2% [10/52]) (Table 3). There were no significant differences in clinical characteristics or study outcomes between patients experiencing or not experiencing dynamic changes in the predominant *Anelloviridae* genus (Table S3, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>).

Dynamics of Total Anelloviruses DNA Levels Following Transplantation

Plasma DNA loads for total anelloviruses were quantified in 1027 samples obtained from the 195 patients included in the overall study cohort, accounting for a median of 6 (IQR: 5–6) measurements per patient. Total anelloviruses DNA levels increased from baseline (median: 0.0 log₁₀ copies/mL [IQR: 0.0–2.5]) to day 7 (median: 1.1 log₁₀ copies/mL [IQR: 0.0–3.3]; $P = 0.001$) and month 1 (median: 1.9 log₁₀ copies/mL [IQR: 0.0–4.8]), to peak at posttransplant month 3 (median: 3.8 log₁₀ copies/mL [IQR: 1.7–6.2]; $P < 0.0001$ for the comparisons of both points with baseline). There was a decrease thereafter through months 6 (median: 3.1 log₁₀ copies/mL [IQR: 1.4–5.2]) and 12 (2.0 log₁₀ copies/mL [IQR: 0.0–4.2]; P

TABLE 3.

Transitions in the predominance of *Anelloviridae* genera in the subgroup of patients with readable profiles assessed by HTS (n = 91)

Type of transition in the predominant anellovi- rus [n (%)]	Timing (patients with HTS results in both time points)			
	Baseline → month 1 (n = 61)	Month 1 → month 3 (n = 71)	Month 3 → month 6 (n = 72)	Month 1 → month 6 (n = 62)
<i>Alphatorquevirus</i> to <i>Betatorquevirus</i>	3 (4.9)	3 (4.2)	5 (6.9)	2 (3.2)
<i>Alphatorquevirus</i> to <i>Gammatorquevirus</i>	2 (3.3)	4 (5.6)	4 (5.6)	0 (0.0)
<i>Betatorquevirus</i> to <i>Alphatorquevirus</i>	6 (9.8)	6 (8.5)	1 (1.4)	0 (0.0)
<i>Betatorquevirus</i> to <i>Gammatorquevirus</i>	0 (0.0)	2 (2.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Gammatorquevirus</i> to <i>Alphatorquevirus</i>	6 (9.8)	2 (2.8)	4 (5.6)	0 (0.0)
<i>Gammatorquevirus</i> to <i>Betatorquevirus</i>	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)
No change	43 (70.5)	54 (76.1)	57 (79.2)	60 (96.8)

HTS, high-throughput sequencing.

<0.0001 for both comparisons with regards to month 3) (Figure 2).

We found a significant—albeit weak to moderate only—correlation between total anelloviruses and TTV DNA levels measured at concurrent time points (Figure 3). Female gender, positive CMV serostatus, and use of dialysis before transplantation were associated with higher baseline loads. Patients receiving induction therapy with ATG also exhibited higher total anelloviruses DNA loads at day 7 and months 1, 3, and 6 than those that received basiliximab or no induction (Figure S4, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>). In addition, there was a significant direct correlation between the time on dialysis before transplantation (in days) and total anelloviruses DNA levels at baseline (Spearman's rho: 0.209; $P = 0.009$) and day 7 (Spearman's rho: 0.191; $P = 0.020$). Concordant with the role as a surrogate marker of immunosuppression that has been previously demonstrated for TTV,⁸⁻¹³ we observed a significant weak inverse correlation between total anelloviruses DNA levels and absolute lymphocyte and CD3+ and CD8+ T-cell counts. The strength of correlation with the total leukocyte count and CD4+ T-cell subset was moderate only (Table S4, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>). We also compared total anelloviruses DNA levels according to the predominant *Anelloviridae* genus at each time point. No clear differences were observed beyond a non-significant trend toward a higher load among patients with *Gammatorquevirus* predominance at baseline (Table S5, SDC, <http://links.lww.com/TP/C530>).

Association Between Total Anelloviruses DNA Levels and Clinical Outcomes

We compared total anelloviruses DNA levels measured at baseline and at different time points after transplantation between recipients that subsequently developed or did not develop posttransplant serious infection, oIAE, or acute graft rejection during the next months. No significant differences in plasma DNA loads were observed for any of these outcomes (Figure 4).

DISCUSSION

Anelloviruses are extremely diverse the *Anelloviridae* family comprises 14 genera (with the recent inclusion of 16 additional genera according to updated taxonomic revisions).²² The usefulness of monitoring for TTV viral load as a marker of the net state of immunosuppression after SOT has gained momentum during recent years, with a growing number of supporting studies and ongoing trials aimed at establishing the role of TTV DNA levels in the clinical decision-making process.⁸ Although TTV is considered the prototypic member of the *Alphatorquevirus* genus, this virus only accounts for a single fraction of the much larger *Anelloviridae* family.²² Because immunosuppression has been shown to modify the blood virome structure,⁷ it was pertinent to investigate dynamic changes in the relative abundance of major genera (*Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus*) and total anelloviruses DNA loads after KT, as well as their potential association with clinical outcomes.

Various findings may be drawn from our study. First, *Alphatorquevirus* genus was predominant across all the time points, and its relative abundance increased following transplantation. Despite this, a nonneglectable number of patients experienced a relative change in the predominant genus, with the transition from *Alphatorquevirus* to *Betatorquevirus* and *Gammatorquevirus* being more common at later times after transplantation. Second, the posttransplant kinetics of total anelloviruses DNA levels essentially mirror that previously reported for TTV,⁸ with a marked rise from baseline to month 3 and a subsequent decrease. Third, the correlation observed in DNA levels between total anelloviruses and TTV was moderate only. Nevertheless, we still found that total anelloviruses DNAemia was higher among patients that received T-cell-depleting agents, suggesting an inverse correlation with the cell-mediated immunity. Finally, no apparent associations were observed between posttransplant outcomes (serious infection, oIAE, or acute rejection) and either the proportion of read counts for *Alpha*-, *Beta*-, or

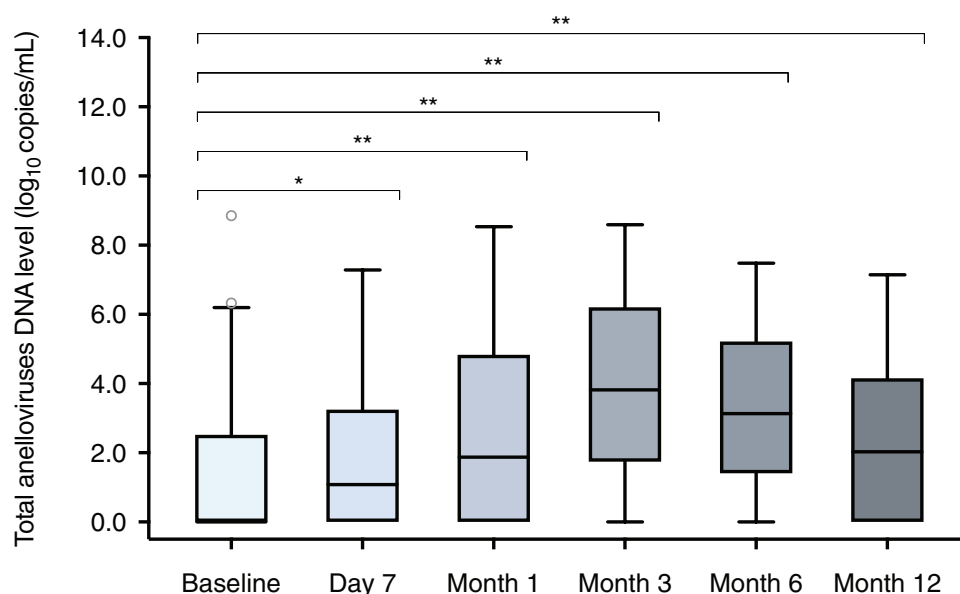


FIGURE 2. Kinetics of total anelloviruses DNA load (expressed as log₁₀ copies/mL) in plasma specimens obtained through the first posttransplant year in the overall study cohort (n = 195). * P for repeated measures = 0.001; ** P for repeated measures <0.0001.

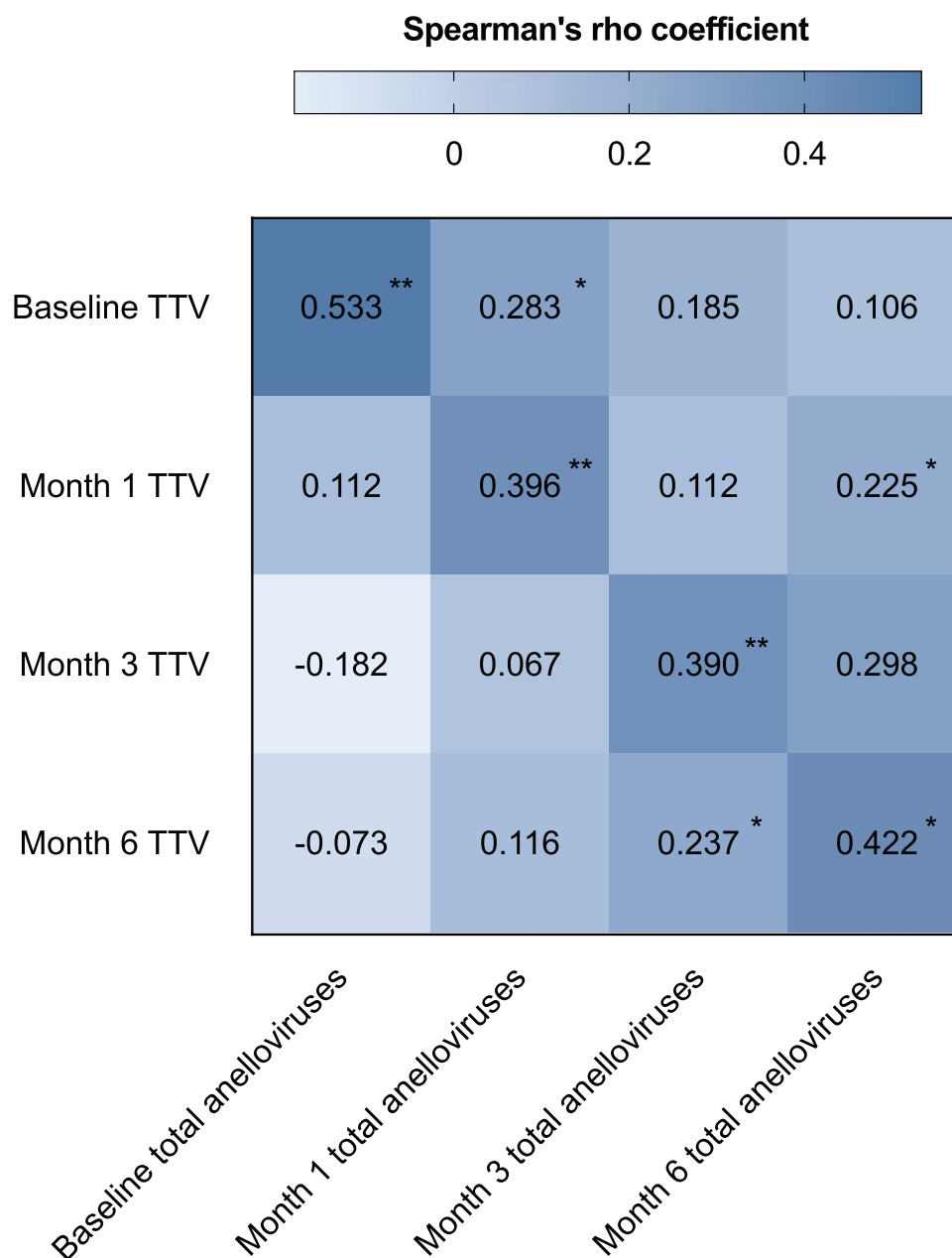


FIGURE 3. Heat map of correlations between total anelloviruses and TTV DNA levels at baseline and posttransplant months 1, 3, and 6 in the subgroup of patients with both parameters quantified ($n = 91$). Each square represents the Spearman's rho correlation coefficient. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. TTV, torque teno virus.

Gammatorquevirus obtained by HTS or total anelloviruses DNA levels.

Only a few studies have investigated the changes over time in anelloviruses composition in the setting of post-transplant immunosuppression, with many of them centered on allo-TPH recipients.^{7,14,23-25} In a small pilot study, Bal et al²³ applied viral metagenomics next-generation sequencing to 10 multiple myeloma patients undergoing allo-HSCT and found that TTVs constituted the most abundant anelloviruses (91.7%), whereas TTMdVs and TTMVs were present in only 6.4% and 1.9% of samples, respectively. Mixed infections comprising at least 2 different genera were common (61.9% of anellovirus-positive samples). The authors found no correlations with clinical or laboratory parameters, although they acknowledged the limitation imposed by the small sample size.²³ In a previous

work by our group with 25 allo-HSCT recipients, TTVs (ie, *Alphatorquevirus*) were predominant in 81% of samples, whereas the presence of TTMVs and TTMdVs was far less common (33.3% and 35.7%, respectively). *Beta-* and *Gammatorquevirus* predominance was limited to <10% of sequenced specimens, in line with the present experience. The longitudinal follow-up between preconditioning and postengraftment samples revealed a transition in the predominant *Anelloviridae* genus in 5 of 17 patients (29.4%), very similar to the present study (35.6%), although no evident pattern of change could be identified.¹⁴ The latter finding is in contrast with the frequent transition to *Alphatorquevirus* predominance observed in our cohort, mainly in the first months. A similar evolution has been reported during the preengraftment period in allo-HSCT cohorts.²³

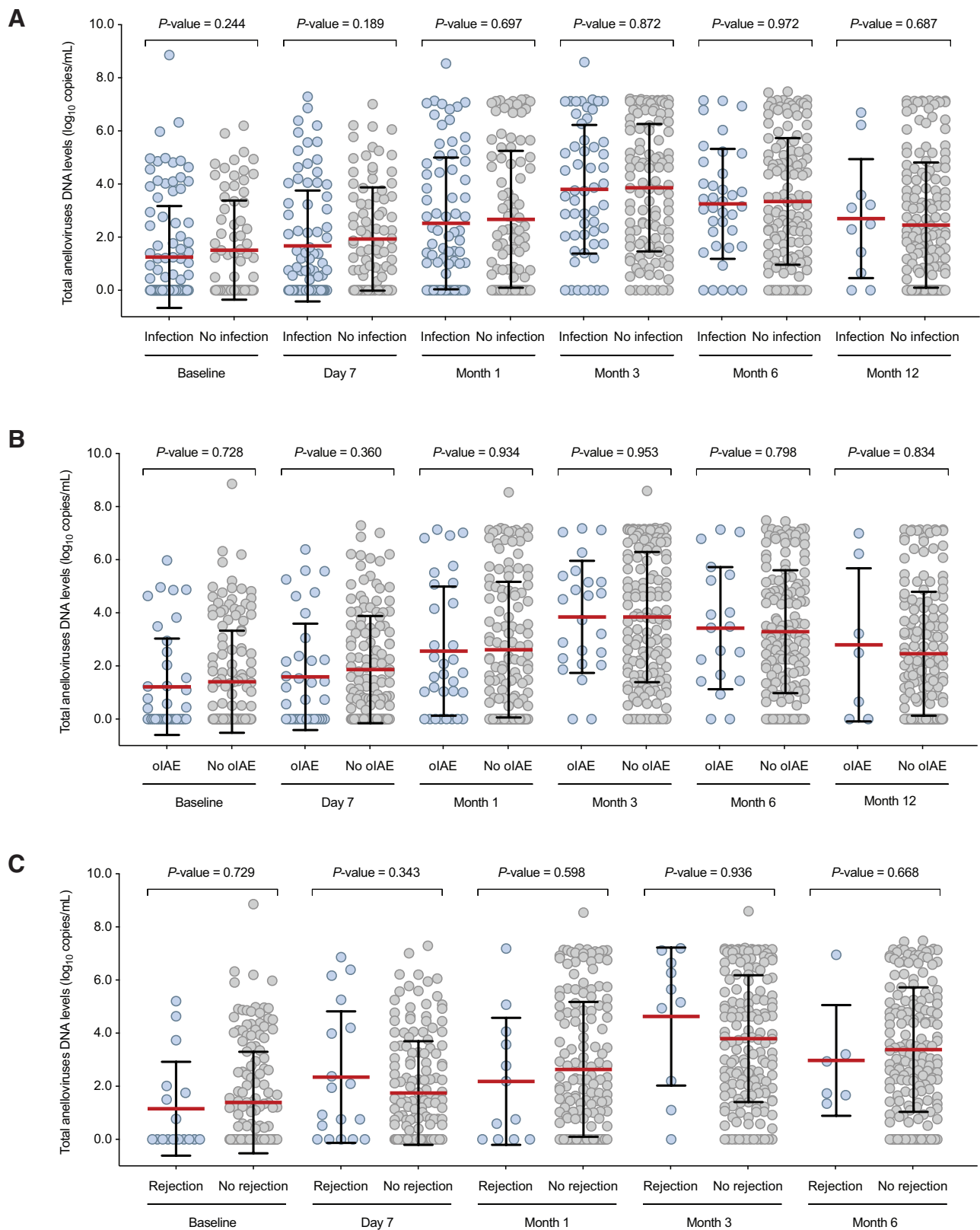


FIGURE 4. Comparison of total anelloviruses DNA loads measured at baseline and different time points after transplantation according to the subsequent occurrence of posttransplant outcomes in the overall study cohort ($n = 195$): (A) serious infection, (B) oIAE, and (C) acute graft rejection. oIAE, overimmunosuppression-related adverse event.

Co-detection in the same individual with >1 genus of the *Anelloviridae* family seems to be the norm in the KT and allo-HSCT settings. Various explanations for this phenomenon have been proposed, such as intrahost evolution,

initial infection by multiple independent lineages, or repeated episodes of superinfection.⁴ The striking genetic diversity observed for *Anelloviridae* in comparison with other viral families has been suggested to be the result

of millions of years of evolution, pointing to an ancient origin.²⁶ A recent study that performed in-depth profiling by means of a targeted amplification enrichment sequencing method revealed that the sequence variety of anelloviruses both between and within healthy individuals is even greater than previously estimated. Such an extensive diversity—with a median of 6 different anellovirus lineages per individual—gives rise to a distinctive personal “anellome.”²⁷

It may be hypothesized that the transplant procedure and the subsequent immunosuppressive therapy alter the recipient’s individual anellome. Abbas et al showed that lung transplantation (LuT) is associated with the engraftment of its endogenous population of anelloviruses and the development of a bidirectional transfer of lineages between the graft and the host.²⁸ We are not aware of similar studies involving the kidney graft, although anelloviruses have been found to constitute a relevant community of the urine virome of healthy individuals²⁹ and KT³⁰ and liver transplant recipients.³¹ Therefore, we speculate that the increase observed between pretransplantation and month 1 samples in the relative abundance of *Alphatorquevirus* (from 76.4% to 89.8%) may be partially explained by the transfer of donor’s anellome within the graft. A complementary explanation would lie on the impact of posttransplant immunosuppression. Indeed, a rapid increase in the relative abundance of single-stranded DNA viruses—with predominance of *Anelloviridae*—after the onset of immunosuppressive therapy has been observed after LuT and heart transplantation, followed by the opposite trend beyond month 6.⁷

In the line of previous studies,^{23,24} we were not able to identify an apparent correlation between the relative abundance of the different *Anelloviridae* genera throughout the first year and the occurrence of clinical outcomes, beyond a nonsignificant trend toward higher *Betatorquevirus* reads at baseline among patients experiencing serious infection. In contrast, Blatter et al reported disparate clinical associations for *Alpha*- and *Betatorquevirus* dynamics in a cohort of 57 pediatric LuT recipients. Acute graft rejection was more common in patients with lower *Alphatorquevirus* levels, whereas the long-term outcomes of death, chronic rejection, or retransplantation occurred more frequently in patients with *Betatorquevirus* levels below the median value at month 6.²⁵ These results would suggest the need for separately monitoring for the different genera within the *Anelloviridae* family as distinct readouts of immunosuppression. It should be noted, however, that the study by Blatter et al analyzed genome copy numbers rather than relative abundance²⁵ and that further confirmatory research should still be conducted.

Given the genetic variety of the *Anelloviridae* family, we wondered whether monitoring of total anelloviruses DNA levels could add to the capacity of TTV viral load to predict clinically relevant outcomes. The association observed between positive CMV serostatus and higher viremia levels at baseline (pretransplantation) was in line with that previously reported for TTV,^{12,32} as was the impact of ATG induction on posttransplant kinetics.^{10,33,34} In addition, anelloviruses DNA levels were inversely correlated with total lymphocyte and CD3+ and CD8+ T-cell counts at various points, echoing findings reported for TTV.⁸⁻¹³ Despite these similarities, we were unable to demonstrate

significant differences in total anelloviruses levels regularly assessed through month 12 according to the subsequent occurrence of serious infection, oIAE, or acute rejection. Once again, the great genetic diversity of anelloviruses should be borne in mind when interpreting these negative findings. Only within the *Alphatorquevirus* genus and by using a 69% threshold of sequence identity in the ORF1 coding region for species demarcation, 35 distinct species are currently recognized.²² Although TTV is the prototypic member of the *Alphatorquevirus* genus and the most abundant anellovirus in the human blood virome, there is still a wide intragenus and interspecies variability that may be obscuring any clinical correlation between total anellovirus DNA viral load and clinical events. Other authors have speculated that the host immune control of anelloviruses may vary by genus and that *Betatorquevirus* levels may not reflect the immune status relevant to short-term outcomes, such as infection or rejection.²⁵ The present results support this notion and point out that the distinct role of TTVs (*Alphatorquevirus* genus) as a biomarker of the immunocompetence status does not necessarily extend to other anelloviruses.

Our study offers a novel insight into the posttransplant dynamics of anelloviruses—both in relative (proportion of read counts corresponding to the 3 major genera) and absolute terms (total DNA levels)—at different timeframes in a well-characterized, prospectively assembled cohort of KT recipients. In contrast to our previous study,¹⁴ we attempted to correlate longitudinal variations in the individual anellome with clinical outcomes. Nevertheless, our study also has some noteworthy limitations. Because of logistical constraints, we performed HTS in a subcohort of 91 recipients that accounted for less than half of the overall study population, which may have reduced the statistical power to detect differences in patient’s clinical features (particularly for uncommon events such as oIAE). It is likely that the diversity of anelloviruses may have been underestimated because we used genus-level consensus primers for *Alpha*-, *Beta*-, and *Gammatorquevirus* that were not intended to identify other genera or intraindividual species-level differences. Finally, although the protocol for the “in-house” PCR assay used for measuring total anelloviruses DNA had been previously described,²¹ we cannot rule out that the lack of apparent clinical correlation may be due to its reduced sensitivity or other intraassay considerations. The relatively low correlation observed between total anelloviruses and TTV DNA levels quantified by a well-established protocol would point in this direction.

In conclusion, the present study provides preliminary evidence on the large diversity of the *Anelloviridae* family among KT recipients and the longitudinal dynamic changes in the relative abundance of the different genera. Our results do not support the value of monitoring for total anelloviruses DNA levels as a clinical prediction tool in the KT setting. Further research, however, should be performed to clarify the impact of immunosuppressive therapy on the individual anellome and its potential clinical associations.

REFERENCES

1. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, et al. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:589–593.

2. Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:514–527.
3. Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:1–20.
4. Spandole S, Cimponeanu D, Berca LM, et al. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch Virol*. 2015;160:893–908.
5. Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, et al. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*. 2000;145:979–993.
6. Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2kb. *J Gen Virol*. 2007;88:1939–1944.
7. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155:1178–1187.
8. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, et al. Viruses, friends, and foes: the case of torque teno virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis*. 2022;24:e13778.
9. Schiemann M, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, et al. Torque teno virus load-inverse association with antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transplantation*. 2017;101:360–367.
10. Maggi F, Focosi D, Statzu M, et al. Early post-transplant torqueteno-virus viremia predicts cytomegalovirus reactivations in solid organ transplant recipients. *Sci Rep*. 2018;8:15490.
11. Jaksch P, Kundi M, Görzer I, et al. Torque teno virus as a novel biomarker targeting the efficacy of immunosuppression after lung transplantation. *J Infect Dis*. 2018;218:1922–1928.
12. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Monitoring of alpha-torquetenovirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19:1139–1149.
13. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, et al. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients-A prospective observational trial. *Am J Transplant*. 2020;20:2081–2090.
14. Giménez E, Monzó C, Albert E, et al. Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2021;93:5167–5172.
15. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013;96:333–360.
16. Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, et al; Spanish Society of Transplantation (SET); Group for Study of Infection in Transplantation of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (GESITRA-SEIMC); Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev (Orlando)*. 2016;30:119–143.
17. 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.
18. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71:1367–1376.
19. Hirsch HH, Randhawa PS; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528.
20. 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.
21. Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol*. 2008;46:507–514.
22. Varsani A, Opriessnig T, Celer V, et al. Taxonomic update for mammalian anelloviruses (family Anelloviridae). *Arch Virol*. 2021;166:2943–2953.
23. Bal A, Sarkozy C, Josset L, et al. Metagenomic next-generation sequencing reveals individual composition and dynamics of anelloviruses during autologous stem cell transplant recipient management. *Viruses*. 2018;10:E633.
24. Béland K, Dore-Nguyen M, Gagné 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.
25. Blatter JA, Sweet SC, Conrad C, et al. Anellovirus loads are associated with outcomes in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2018;22(1):10.1111/ptr.13069.
26. Kaczorowska J, van der Hoek L. Human anelloviruses: diverse, omnipresent and commensal members of the virome. *FEMS Microbiol Rev*. 2020;44:305–313.
27. Arze CA, Springer S, Dudas G, et al. Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host Microbe*. 2021;29:1305–1315.e6.
28. Abbas AA, Young JC, Clarke EL, et al. Bidirectional transfer of Anelloviridae lineages between graft and host during lung transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19:1086–1097.
29. Mortazkar P, Karbalaie Niya MH, Javanmard D, et al. Molecular epidemiology of anellovirus infection in children's urine: a cross-sectional study. *Adv Biomed Res*. 2020;9:16.
30. Rani A, Ranjan R, McGee HS, et al. A diverse virome in kidney transplant patients contains multiple viral subtypes with distinct polymorphisms. *Sci Rep*. 2016;6:33327.
31. Herrmann A, Sandmann L, Adams O, et al. Role of BK polyomavirus (BKV) and torque teno virus (TTV) in liver transplant recipients with renal impairment. *J Med Microbiol*. 2018;67:1496–1508.
32. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, et al. Quantification of torque teno virus viremia as a prospective biomarker for infectious disease in kidney allograft recipients. *J Infect Dis*. 2018;218:1191–1199.
33. Handala L, Descamps V, Morel V, et al. No correlation between torque teno virus viral load and BK virus replication after kidney transplantation. *J Clin Virol*. 2019;116:4–6.
34. Focosi D, Macera L, Boggi U, et al. 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.

RESEARCH ARTICLE

Monitoring of plasma Torque teno virus, total *Anelloviridae* and Human Pegivirus 1 viral load for the prediction of infectious events and acute graft versus host disease in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting

Lorena Forqué¹ | Eliseo Albert¹ | José L. Piñana²  | Ariadna Pérez² | Rafael Hernani² | Carlos Solano^{2,3} | David Navarro^{1,4,5}  | Estela Giménez^{1,4}

¹Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

²Hematology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

³Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

⁴CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

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

Correspondence

David Navarro, Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Biomedical Research Institute, Av. Blasco Ibáñez 17, Valencia 46010, Spain.
Email: david.navarro@uv.es

Funding information

General Directorate of Science and Research from Government of Valencia

Abstract

Anelloviridae and Human Pegivirus 1 (HPgV-1) blood burden have been postulated to behave as surrogate markers for immunosuppression in transplant recipients. Here, we assessed the potential utility plasma Torque teno virus (TTV), total *Anelloviridae* (TAV), and HPgV-1 load monitoring for the identification of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients (allo-HSCT) at increased risk of infectious events or acute graft versus host disease (aGvHD). In this single-center, observational study, plasma TTV DNA, TAV DNA, and HPgV-1 RNA loads were monitored in 75 nonconsecutive allo-HSCT recipients (median age, 54 years). Monitoring was conducted before at baseline or by days +30, +60, +90, +120, and +180 after transplantation. Pneumonia due to different viruses or *Pneumocystis jirovecii*, BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis (BKPyV-HC), and Cytomegalovirus DNAemia were the infectious events considered in the current study. Kinetics of plasma TTV, TAV DNA, and HPgV-1 RNA load was comparable, with though and peak levels measured by days +30 and day +90 (+120 for HPgV-1). Forty patients (53%) developed one or more infectious events during the first 180 days after allo-HSCT, whereas 29 patients (39%) had aGvHD (grade II–IV in 18). Neither, TTV, TAV, nor HPgV-1 loads were predictive of overall infection or CMV DNAemia. A TTV DNA load cut-off $\geq 4.40 \log_{10}$ (pretransplant) and $\geq 4.58 \log_{10}$ (baseline) copies/mL predicted the occurrence of BKPyV-HC (sensitivity $\geq 89\%$, negative predictive value, $\geq 96\%$). TTV DNA loads $\geq 3.38 \log_{10}$ by day +30 anticipated the occurrence of aGvHD (sensitivity, 90%; negative predictive value, 97%). Pretransplant HPgV-1 loads were significantly lower ($p = 0.03$) in patients who had aGvHD than in those who did not. Monitoring of TTV DNA or HPgV-1 RNA plasma levels either before or early after transplantation may be ancillary to identify allo-HSCT recipients at increased risk of BKPyV-HC or aGvHD.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

KEYWORDS

aGvHD, BK-virus cystitis, Cytomegalovirus DNAemia, Human Pegivirus, infection, total *Anelloviridae*, TTV, viral load

1 | INTRODUCTION

The *Anelloviridae* family includes circular, negative sense, single-stranded DNA viruses, of which three genera, *Alphatorquevirus* (Torque teno virus [TTV]), *Betatorquevirus* (Torque teno minivirus [TTMV]) and *Gammatorquevirus* (Torque teno midi virus [TTMDV]) infect humans chronically.^{1,2} The *Anelloviridae* represent a major fraction (around 70%) of the human blood virome that remains relatively stable over years in the healthy host.³ The *Anelloviridae* are highly T-lymphotropic and T-cell dependent immune mechanisms are mainly responsible of virus replication control; in this context, the *Anelloviridae* burden in the blood compartment was postulated to behave as a surrogate marker of the net state of immunosuppression in transplant recipients.⁴ A large body of experimental evidence supports this assumption in the solid organ transplantation (SOT) setting^{5,6}; in fact, high TTV DNA levels associates with the occurrence of infectious events, whereas the opposite holds true for acute rejection. The kinetics of TTV DNA load and its association with immune-related clinical events in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) setting is more complex due to conditioning-driven lymphodepletion and the timing of lymphocyte reconstitution.⁶ In this context, the kinetics of TTV DNA load in plasma appear to mirror that of immunological reconstitution early after allo-HSCT, whereas it is more reflective of the degree of immunosuppression at late times (over day +100) after transplantation.⁶ Only a few studies have investigated the potential value of TTV DNAemia monitoring for the prediction of immune-related clinical events such as infection (i.e., Cytomegalovirus-CMV-DNAemia) or acute graft versus host disease (aGvHD) in the allo-HSCT setting, these yielding somewhat conflicting observations.^{7–13} Co-detection of TTV, TTMV, and TTMDV in pretransplant and postengraftment plasma specimens was documented by our group using next generation sequencing in a large fraction of allo-HSCT recipients (more than two-thirds).¹⁴ In view of this finding we developed a quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) assays targeting TTMV and TTMDV in addition to TTV (total *Anelloviridae*-TAV-) which we hypothesized might add value to TTV-specific PCR assays in the inference of the net state of immune competence in this clinical setting, although this assumption was not assessed.¹⁴

Human Pegivirus 1 (HPgV-1) is a 9.4 kb positive-sense single-strand RNA genome enveloped virus that belongs to the genus *Pegivirus* of the family *Flaviviridae*.¹⁵ HPgV-1 is a lymphotropic virus that may establish a subclinical persistent infection in healthy individuals.¹⁶ A number of studies have shown that HPgV-1 persistent infection may modulate host immune responses; in this sense, notably, HPgV-1 infection may downregulate immune activation in the HIV-1 infection setting.¹⁶ HPgV-1 RNAemia is frequently

detected in allo-HSCT recipients (ranging from 14% to 61%).^{17–23} In a previous study, HPgV-1 RNAemia was associated with an impaired NK cell, but not T cell, immune-reconstitution²⁴; yet, to date no impact of HPgV-1 RNAemia on clinical outcomes has been reported in the allo-HSCT setting.^{18–23}

Here, we further characterized the kinetics TTV, TAV, and HPgV-1 viral load in plasma following allo-HSCT and investigated whether quantification of TAV, TTV, and HPgV-1 viral load at different time points would allow anticipation of the occurrence of immune-related clinical complications such as certain infections, whose control is mainly dependent on T-cell-mediated immune mechanisms, and acute graft versus host disease (aGvHD).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and samples

In this observational retrospective study, a total of 75 nonconsecutive adult patients (median age, 54 years; range, 19–70) who underwent T-cell replete allo-HSCT at the University Clinical Hospital of Valencia between 2017 and 2021 were included. Relevant clinical and demographic characteristics of the patients are displayed in Table 1. The only criterium for patient inclusion was the availability of at least 3 stored plasma samples (–80°C) collected at different time points before (7–10 days) at baseline (Day 0) or after (+30, +60, +90, +120, and +180) transplantation. Medical records were retrospectively reviewed for extraction of demographic and clinical data of interest (occurrence of certain infectious events and aGvHD) developing within the first 180 days after transplantation. Exemption of informed consent was obtained from the University Clinical Hospital Ethics Committee (authorization number 2019/246).

2.2 | Quantification of Torque teno virus DNA, total *Anelloviridae* DNA and Human Pegivirus 1 in plasma

Nucleic acid extraction was performed from 200 µL of plasma using the QIAAsymphony platform (Qiagen). TTV DNA was quantified using a Taqman real-time PCR, as previously described.⁷ TAV DNA was quantified using a SYBR Green based real-time PCR using the universal primers NG779/NG781 that target a conserved segment of the UTR region, as previously described.^{14,25} Human Pegivirus (HPgV-1) RNA was quantified using a one-step RT-PCR as previously described.²⁶

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients included in the study.

Variable	No. (%)
Sex	
Male	46 (61)
Female	29 (39)
Underlying disease	
Acute myeloid leukemia	28 (37.3)
Acute lymphocytic leukemia	1 (1.3)
Chronic myeloid leukemia	3 (4)
Chronic lymphocytic leukemia	3 (4)
Hodgkin's lymphoma	13 (17.3)
Multiple myeloma	1 (1.3)
Myelodysplastic syndrome	4 (5.3)
Myelofibrosis	4 (5.3)
Non-Hodgkin's lymphoma	15 (20)
Other hematological diseases	3 (4)
Stem cell source	
PB	75 (100)
Donor type	
Related	46 (61)
Unrelated	29 (39)
HLA matching	
Matched	41 (55)
Mismatched	9 (12)
Haploidentical	25 (33)
CMV serostatus	
D+/R+	44 (59)
D-/R+	20 (27)
D+/R-	5 (6)
D-/R-	6 (8)
Conditioning regimen	
Myeloablative	14 (19)
Reduced intensity	61 (81)
aGvHD prophylaxis	
Sirolimus plus MMF plus cyclophosphamide	71 (94.6)
Tacrolimus plus sirolimus	2 (2.6)
Tacrolimus plus cyclophosphamide	2 (2.6)
Occurrence of aGvHD	
Grade I	11 (14.6)
Grades II-IV	18 (24)

Abbreviations: aGvHD, acute graft vs. host disease; CMV, cytomegalovirus; D, donor; HLA, human leukocyte antigen; MMF, mycophenolate mofetil; PB, peripheral blood R, recipient.

2.3 | Definitions and diagnostic criteria

Pneumonia caused by SARS-CoV-2 was defined as the presence of lower respiratory tract disease symptoms and pulmonary infiltrates by chest-X-ray or chest CT scan, along with the detection of SARS-CoV-2 RNA in respiratory samples by the TaqPath COVID-19 RT-PCR (ThermoFisher Scientific). Pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii* was defined as the presence of clinical symptoms with suggestive radiological findings and the presence of a positive PCR result (RealCycler PJIR kit®; Progenie Molecular) in bronchoalveolar lavage samples in the absence of an alternate diagnosis. Proven Cytomegalovirus (CMV) Pneumonia was diagnosed according to laboratory and clinical criteria previously reported by Ljungman et al.²⁷ CMV DNA was quantified in plasma samples by using the Abbott RealTime CMV Assay (Abbott molecular). BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis (BKPyV-HC) was diagnosed according to ECIL clinical guidelines.²⁸ BK virus DNA was quantified in plasma samples by using the Realquality RQ-BKV (AB Analytica) PCR.

2.4 | Statistical analysis

Frequencies of categorical variables were compared using the Fisher's exact test, whereas medians of continuous variables were compared by means of the Man-Whitney *U* test. Correlation between continuous variables was carried out by the Spearman correlation test. Two-sided exact *p* values are reported, considering $p < 0.05$ statistically significant. The selection of the best cut-off in terms of sensitivity and specificity for a given variable was carried out by the receiver-operating characteristic (ROC) analysis. All analyses were performed using GraphPad Prism versión 9.0.

3 | RESULTS

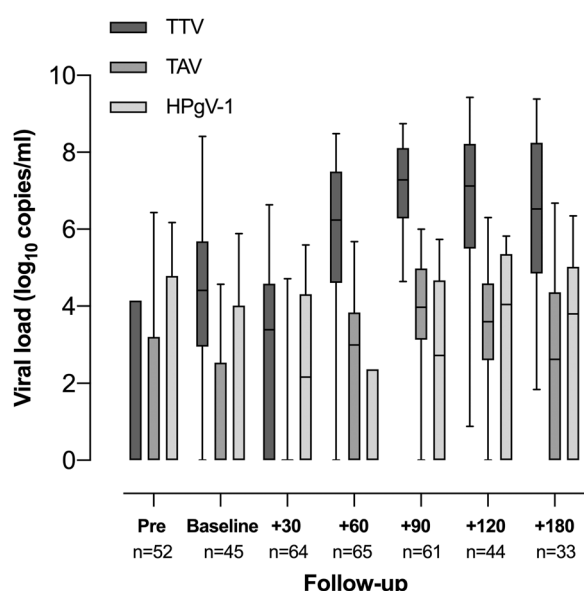
3.1 | kinetics of Torque teno virus, total Anelloviridae and Human Pegivirus-1 load in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

A total of 364 plasma samples from 75 patients were available for viral loads quantitation, of which 52 were obtained before transplantation (preconditioning), 45 the day of transplantation (baseline), 64 on day +30, 65 on day +60, 61 on day +90, 44 on day +120, and 33 on day +180, in all cases from unique patients. Qualitative PCR results for all viruses at different time points on an individual basis are shown in Supporting Information: Table 1. The full set of specimens ($n = 7$) was available from 15 patients. While some of these patients displayed persistently positive ($n = 6$ for TTV, and $n = 3$ for HPgV-1) or negative ($n = 4$ for HPgV-1), other tested negative before transplantation and positive in one or more specimens afterwards ($n = 4$ for TTV and $n = 7$ for HPgV-1), this suggesting the occurrence of virus infection following transplantation. Interestingly, a number of

TABLE 2 Detection rate and plasma viral loads of Torque teno virus DNA, total *Anelloviridae* DNA, and Human Pegivirus-1 RNA at different time points prior or after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Time of viral load monitoring (no. of patients tested)	TTV detection (%), median viral load [IQR range] in log ₁₀ copies/mL	TAV detection (%), median viral load [IQR range] in log ₁₀ copies/mL	HPgV-1 detection (%), median viral load [IQR range] in log ₁₀ copies/mL
Pretransplant (52)	77% 4.15 [2.16–5.36]	43% 0 [0–3.20]	48% 0 [0–4.78]
Baseline (45)	78% 4.41 [2.96–5.68]	36% 0 [0–2.54]	42% 0 [0–4.01]
+30 (64)	63% 3.40 [0–4.58]	21% 0 [0–0]	51% 2.16 [0–4.31]
+60 (65)	94% 6.24 [4.61–7.50]	65% 3.0 [0–3.83]	56% 2.36 [0–4.52]
+90 (61)	100% 7.29 [6.28–8.11]	82% 3.97 [3.14–4.98]	59% 2.72 [0–4.67]
+120 (44)	96% 7.12 [5.50–8.22]	80% 3.61 [2.61–4.59]	64% 4.04 [0–5.35]
+180 (33)	97% 6.53 [4.85–8.25]	65% 2.63 [0–4.36]	56% 3.79 [0–5.02]

Abbreviations: HPgV-1, Human Pegivirus-1; TAV, total anelloviridae; TTV, Torque teno virus.

**FIGURE 1** Plasma Torque teno virus, total *Anelloviridae* and Human Pegivirus 1 viral loads in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients over the study period. The number of available specimens at each monitoring time point is shown.

patients testing positive before conditioning turned out negative at baseline (4/30 for TTV, 5/13 for TAV and 1/14 HPgV-1) (Supporting Information: Table 1).

Most patients had TTV or TAV DNA detectable (in at least in one sample) over the study period (73/75; 97% and 64/75; 85%, respectively). As shown in Table 2, the rate of TTV and TAV detection throughout the study period followed a similar pattern; namely, it decreased by day +30 respect to that found at baseline (15% reduction), and subsequently increased reaching the maximum by day +90 (100% for TTV and 80% for TAV). Kinetic of plasma TTV and TAV DNA load, depicted in Figure 1, was comparable, with though and peak levels measured by days +30 and day +90, respectively (Figure 1 and Table 2). Although TTV and TAV viral

loads correlated fairly well (Rho, 0.71; 95% CI, 0.66–0.76; $p < 0.001$ -Supporting Information: Figure 1), the former were significantly higher than the latter (overall, median 5.96 log₁₀ copies/mL; range, 1.11–9.64 vs. overall median 3.90 log₁₀ copies/mL; range, 2.05–7.07; $p = 0.01$) at all time points (Table 2).

As shown in Table 2, HPgV-1 was detected in at least one specimen from 50/75 patients (66%). The rate of HPgV-1 detection remained relatively stable throughout the study period (minimum 42% at baseline and maximum, 64% by day +120); nevertheless, HPgV-1 RNA load increased steadily from baseline (median, 0; IQR 0–4.78 log₁₀ copies/mL) over the study period (peak level, 4.04 log₁₀ copies/mL; IQR, 0–5.35 reached by day +120) (Figure 1, Table 2). No demographic or clinical variables were associated with the rate of TTV, TAV, or HPgV-1 detection in our cohort (not shown).

3.2 | Monitoring of Torque teno virus, total *Anelloviridae* and Human Pegivirus-1 plasma load for the prediction of infection events

First, we aimed to investigate whether TTV, TAV, and HPgV-1 viral loads measured at different time points before or after allo-HSCT differed across patients who either did or did not develop certain infection events. Since *Anelloviridae* and HPgV-1 burden is presumed to be modulated by virus-specific T cells, only infection events occurring in the study population within the study period likely associated with impaired T-cell responses were considered in the analyses described below; namely, pneumonia (occurring a median of 44 days; range 4–144 after transplantation) due to SARS-CoV-2 ($n = 3$), *Pneumocystis jirovecii* ($n = 1$), or CMV ($n = 1$), CMV DNAemia (detected a median of 47 days after transplantation; range, –8 to 49) ($n = 36$), and BK virus-associated Hemorrhagic cystitis (BKPvV-HC) ($n = 18$), diagnosed a median 21 days after transplantation (range, 8–82). A total of 40 patients (53%) developed one or more infectious events during the first 180 days after allo-HSCT; specifically, 32 (43%) patients had an episode of infection during the first 30 days, 6 (8%) between days +31 and +60 and 6 (8%) between days +61 and +90.

Due to the above distribution of infectious events across time, we focused on assessing whether TTV, TAV, and HPgV-1 loads quantitated either before transplantation at baseline or by day +30 were associated with the occurrence of overall infection developing after these time points. As shown in Table 3, this was not the case. Likewise, a lack of association was observed when viral loads only from patients testing positive by the respective PCR assay were considered for analyses (Supporting Information: Table 2). Moreover, from a qualitative standpoint, testing positive by for any of the above viruses before transplantation at baseline and at day +30 was not associated with the occurrence of infectious events (p values ranging from 0.12 to 0.87).

A sufficient number of early BKPyV-HC ($n = 11$) and CMV DNAemia episodes ($n = 36$), that is developing within the first 30 days after transplantation, were registered to independently assess the potential association between TTV, TAV, and HPgV-1 loads measured either before transplantation or at baseline and occurrence of these clinical events within this time frame. While no significant differences between TTV, TAV, and HPgV-1 loads were observed across patients either developing CMV DNAemia or not (Supporting Information: Table 3), both pretransplant and baseline TTV DNA levels were significantly higher in patients who subsequently developed BKPyV-HC compared to that in whom the disease was not diagnosed (median 5.26 $\log_{10}$ copies/mL [IQR, 4.60–7.08] vs. 3.85 $\log_{10}$ copies/mL [IQR, 0–5.19]; $p < 0.01$ for pretransplant and median 5.89 $\log_{10}$ copies/mL [IQR, 4.92–6.86] vs. 3.45 $\log_{10}$ copies/mL [IQR, 0–5.29]

$p < 0.01$ for baseline) (Figure 2A). ROC analysis showed that both preconditioning and baseline TTV viral loads had similar predictive ability for early BKPyV-HC; in effect, preconditioning TTV viral loads greater than 4.40 $\log_{10}$ copies/mL had a sensitivity of 89% (95% CI, 54%–99%), specificity of 63% (95% CI, 48%–76%), positive predictive value (PPV) of 33% and negative predictive value (NPV) of 96% (AUC 0.78; $p < 0.001$). Likewise, baseline TTV viral load greater than 4.58 $\log_{10}$ had a sensitivity of 100% (95% CI, 62%–100%), specificity of 65% (95% CI, 49%–78%), PPV of 38% and NPV of 100% (AUC 0.84; $p < 0.001$). When only patients testing positive for TTV were considered for analyses, a trend towards higher pretransplant viral loads in patients developing BKPyV-HC was observed (median, 5.26 $\log_{10}$ copies/mL; IQR, 4.68–6.88, vs. median, 4.44 $\log_{10}$ copies/mL; IQR, 3.71–5.39; $p = 0.08$). In turn, patients developing BKPyV-HC had significantly higher ($p = 0.02$) TTV DNA loads at baseline than those who did not (median, 5.89 $\log_{10}$ copies/mL; IQR, 5.07–6.65 vs. median, 4.58 $\log_{10}$ copies/mL; IQR, 3.39–5.59). In these patients, baseline TTV viral loads greater than 5.37 $\log_{10}$ copies/mL displayed a sensitivity of 75% (95% CI, 44.9%–100%), specificity of 78.4% (95% CI, 63.4%–93.3%), PPV of 42% (95% CI, 21.4–67.4) and NPV of 93.5% (95% CI, 79.3–98.2) (AUC, 0.78; $p = 0.018$). In turn, testing positive or negative for TTV before transplantation, at baseline or at day +30 was not associated with the subsequent occurrence of BKPyV-HC (p values, 1.0, 0.24, 0.14, respectively).

Importantly, frequency analyses revealed that receipt of an haploidentical or HLA-mismatched allograft was more common

TABLE 3 Plasma Torque teno virus DNA, total *Anelloviridae* DNA, and Human Pegivirus 1 RNA loads measured before, at the time of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation or by day +30 in patients with or without infections (one or more) and acute graft vs. host disease (all grades) occurring within the first 180 days after transplantation.

Virological parameter TTV (median $\log_{10}$ copies/mL [IQR])	Infectious events ^a			Acute graft vs. host disease ^b		
	Yes	No	p Value	Yes	No	p Value
Pretransplant	4.41 [2.95–5.52]	3.98 [0–5.19]	0.41	4.00 [0–5.45]	4.29 [3.24–5.30]	0.72
Baseline	4.52 [0.77–5.79]	4.05 [3.02–5.55]	0.93	4.31 [3.18–6.45]	4.41 [0–5.60]	0.58
+30	3.80 [2.53–4.51]	3.14 [0–4.58]	0.46	4.53 [3.63–6.04]	2.66 [0–4.37]	0.02
TAV (median $\log_{10}$ copies/mL [IQR])	Yes	No	p Value	Yes	No	p Value
	Yes	No	p Value	Yes	No	p Value
Pretransplant	0 [0–4.08]	0 [0–3.08]	0.80	0 [0–3.37]	0 [0–3.33]	0.65
Baseline	0 [0–2.57]	0 [0–2.69]	0.64	0 [0–3.31]	0 [0–2.32]	0.21
+30	0 [0–4.32]	0 [0–0]	0.21	0 [0–0]	0 [0–0]	0.47
HPgV-1 (median $\log_{10}$ copies/mL [IQR])	Yes	No	p Value	Yes	No	p Value
	Yes	No	p Value	Yes	No	p Value
Pretransplant	2.08 [0–4.33]	0 [0–5.49]	0.71	0 [0–3.26]	3.48 [0–5.48]	0.03
Baseline	0 [0–4.21]	0 [0–3.54]	0.61	0 [0–3.61]	0 [0–4.25]	0.49
+30	2.29 [0–4.50]	2.17 [0–4.30]	0.92	2.72 [0–4.59]	0 [0–4.32]	0.69

Abbreviations: HPgV-1, Human Pegivirus-1; TAV, total *anelloviridae*; TTV, Torque teno virus.

^aA total of 39 patients had one or more infectious events, including pneumonia due to SARS-CoV-2 ($n = 3$), *Pneumocystis jirovecii* ($n = 1$), or cytomegalovirus ($n = 1$), cytomegalovirus DNAemia ($n = 36$), and BK virus-associated hemorrhagic cystitis ($n = 18$).

^bA total of 29 patients developed acute graft vs. host disease (any grade).

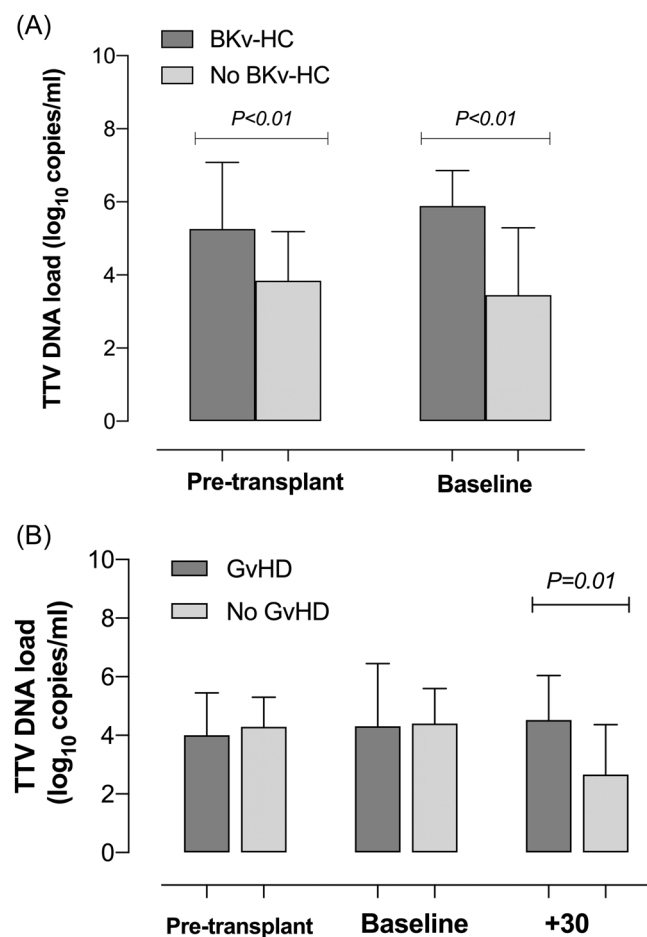


FIGURE 2 Association of plasma Torque teno virus DNA loads and subsequent occurrence of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis (A) or acute graft versus host disease of any grade (B). Significant *p* values are shown.

among patients who developed early BKPyV-HC (82% vs. 39%; *p* = 0.03). In contrast, both preconditioning and baseline TAV or and HPgV-1 loads were comparable in both comparison groups.

3.3 | Monitoring of Torque teno virus, total Anelloviridae and Human Pegivirus-1 plasma load for the prediction of acute graft versus host disease

A total of 29 patients (39%) developed aGvHD at a median of 29 days after transplantation (range, 6–133), of whom 18 had grades II–IV disease and received corticosteroids at high doses (>1 mg/kg/day). Plasma TTV, TAV, and HPgV-1 loads measured before transplantation, at baseline or by day +30 in patients with or without aGvHD (any grade) are shown in Table 2. Overall, median TTV DNA load determined by day +30 was significantly higher (median 4.53 log₁₀ copies/mL vs. 2.66 log₁₀ copies/mL; *p* = 0.02) in patients who went on to develop aGvHD than in those who did not (Figure 2B). A similar observation was made when only grade II–IV aGvHD were considered (median 5.81 log₁₀ copies/mL vs. median 2.79 log₁₀

copies/mL; *p* < 0.001). ROC analysis (AUC = 0.73; *p* = 0.02) showed that TTV viral loads above 3.38 log₁₀ copies/mL by day +30 could predict the occurrence of subsequent aGvHD with 90% sensitivity (95% CI, 59.6–98.2), 57% specificity (95% CI, 43.3–69.0), 28% PPV (95% CI, 15.6–45.4), and 97% NPV (95% CI, 83.8–99.4). Likewise, TTV viral loads above 5.07 log₁₀ predicted the occurrence of aGvHD grades II–IV with 83% sensitivity (95% CI, 43.6–97.0), 91% specificity (95% CI, 81.1–96.2), 50% PPV (95% CI, 23.7–76.3), and 98% NPV (95% CI, 90.1–99.7); (AUC = 0.88; *p* = 0.002).

Among patients testing positive for TTV DNA by day +30, TTV DNA loads were significantly higher (*p* = 0.017) in those developing aGvHD grades II–IV (median, 5.81 log₁₀ copies/mL; IQR, 5.16–6.34 vs. median, 4.11 log₁₀ copies/mL; IQR, 3.41–4.71), while viral loads were comparable (*p* = 0.28) across patients with or without all grade aGvHD. In this sense, TTV viral loads above 5.11 log₁₀ copies/mL predicted the occurrence of aGvHD grades II–IV with 83% sensitivity (95% CI, 43.6–97.0), 85.0 specificity (95% CI, 69.9–93.6), 50% PPV (95% CI, 23.7–76.3), and 96.6% NPV (95% CI, 83.3–99.4); (AUC, 0.80; *p* = 0.019).

Finally, the detection rate (any level) of TTV DNA by day +30 was not different across patients with or without all grade aGvHD (17/25 vs. 23/39; *p* = 0.46) or aGvHD grades II–IV (11/15 vs. 29/49; *p* = 0.38). Interestingly, as shown in Table 3, overall, pretransplant but not baseline HPgV-1 loads were significantly higher (*p* = 0.03) in patients who had not aGvHD than in those who did so (median, 3.48 log₁₀ copies/mL vs. undetectable); this observation stand when only grade II–IV episodes were considered for analyses (median, 2.98 log₁₀ copies/mL vs. undetectable; *p* = 0.03) or when only patients testing positive for HPgV-1 by PCR at this time point were included in the analysis (median, 5.45 log₁₀ copies/mL; IQR, 4.19–5.84 vs. median, 3–71; IQR, 2.87–4.20; *p* = 0.003). In this context, notably, detectability of HPgV-1 before transplantation was associated with a lower incidence of grades II–IV aGvHD (detectable in 24 out of 44 patients without the disease and in 1 out of 8 patients with the disease; *p* = 0.05).

4 | DISCUSSION

Here, we further characterized the kinetics of TTV, TAV, and HPgV-1 plasma load in allo-HSCT and investigated whether viral burdens estimated at different time points after transplant could predict the occurrence of certain infectious events that developed in our patients and are likely associated with deficient T-cell responses, including pneumonia due to SARS-CoV-2, *P. jirovecii*, or CMV, BKPyV-HC and CMV DNAemia and severe aGvHD (or its treatment with corticosteroids). To quantify TAV DNA we used an “in house” RT-PCR that returned lower viral loads than that provided by our TTV RT-PCR and was less sensitive,¹⁴ despite being able to target *Anelloviridae* other than TTV. This extent was previously shown by our group in a cohort of SOT recipients.²⁹

The kinetics of TTV DNA load followed a previously characterized pattern,^{8,9} with lowest levels measured around the time of

engraftment and peak levels quantified by day +90. Since TTV and TAV DNA levels correlated well (Rho , 0.71), not surprisingly the kinetics of TAV DNAemia mirrored that of TTV DNAemia. HPgV 1 RNA was detected (at least in once) in around 66% of patients, a figure slightly higher than previously reported (range, 14%–61%).^{17–23} Although speculative, differences between analytical performances of RT-PCR used in these studies or history of blood components replacement across patients in the cohorts, among other factors may account for this finding. Notably, although the rate of HPgV-1 detection remained relatively stable throughout the study period, de novo acquisition HPgV-1 following transplantation may have taken place in some patients, those testing negative in the pre-conditioning sample and positive in one or more posttransplant specimens. Nevertheless, we cannot rule out that these patients were already infected before transplantation and displayed HPgV-1 RNA loads below the limit of the detection of the assay. Likewise, our data suggested that a number of patients might have acquired *Anelloviridae* infection in the posttransplant period. Interestingly, the dynamics of HPgV-1 RNA load was found to follow a similar trend compared to TTV DNA or TAV DNA loads, although peak levels were measured later (by day +120). This finding can be interpreted as further indicating the lymphotropic nature of HPgV-1 and the potential relevance of T-cell dependent mechanisms in the ultimate control of virus replication.

In our view, the most relevant observations of the current study are as follows. First, while neither TTV, TAV, nor HPgV 1 levels measured at different time points appeared to anticipate the occurrence of subsequent infectious events considered collectively, we found that, pretransplant and baseline TTV DNA loads predicted the risk of BKPyV-HC developing early after transplantation (within the first 30 days), irrespective of whether all patients or only those testing positive by PCR at these time points were considered for analyses. Specifically, overall, a TTV viral load cut-off $\geq 4.40 \log_{10}$ (pretransplant) and $\geq 4.58 \log_{10}$ (baseline) copies/mL displayed a high sensitivity (89%) and NPV (96%) for predicting BKPyV-HC. This suggested that TTV DNA load may behave as a surrogate marker for immunosuppression driven by either the underlying hematological disease, its treatment before transplantation the conditioning regimen used or all together. Strikingly, a quite similar cut-off ($\geq 5.01 \log_{10}$ copies/mL) measured by day +30 was predictive of the occurrence of BKPyV-HC after kidney SOT.³⁰ Other studies conducted in the kidney SOT setting also found an association between high TTV DNA loads and high BKV DNAemia.³¹ On the other hand, no significant differences between TTV, TAV, and HPgV-1 loads were observed across patients either developing CMV DNAemia (at any level) or not, which concurred with previous findings from our group (relative to TTV DNA load).⁹

Second, in our setting, high TTV DNA viral loads measured by day +30 (after engraftment) were associated with the subsequent occurrence of aGvHD (all grades or grade II–IV), regardless either all tested patients or only those testing positive by PCR were considered for analyses. Noticeably, TTV viral loads above $5.07 \log_{10}$ predicted the occurrence of aGvHD grades II–IV with high sensitivity

(83%) and very high NPV (98%). This observation could be explained on the basis of the immune-mediated pathogenetic nature of aGvHD and the fact that TTV DNA load at around the time of engraftment seems to be more reflective of immune reconstitution, rather than immunosuppression.^{8–10} In line with our finding, Gilles et al.¹¹ reported high TTV DNA by day +30 in patients who developed aGvHD during the first 100 days after transplantation. A direct link between TTV DNA levels and aGvHD has also been noticed in other studies.^{13,23} In contrast, Schmitz and colleagues were unable to predict the occurrence of immune-related clinical complications on the basis of TTV DNA monitoring.¹² Differences in clinical and demographic characteristics of patients in these cohorts may account for the observed discrepancies.

Third, HPgV-1 infection has been associated with immunomodulatory effects and beneficial clinical outcomes in HIV and Ebola infected individuals.¹⁶ In the allo-HSCT setting, HPgV-1-viremic recipients were found to display an impaired NK cell, but not T cell, immune-reconstitution compared with HPgV-1-non-viremic patients in a previous study,²⁴ thus suggesting an immunomodulatory role for HPgV-1; yet, to our knowledge, a few studies conducted in the allo-HSCT setting have investigated whether an association exists between HPgV-1 and any clinical outcome including infection, aGvHD or survival.^{19–21} Here, we found pre-transplant HPgV-1 RNA loads to be significantly lower in patients who had aGvHD (all grades or grade II–IV) compared to those who did not. A similar observation was made when only patients testing positive at this time point were included. Furthermore, patients testing positive for HPgV-1 RNA before conditioning had a lower rate of aGvHD (all grades or grades II–IV) compared to patients testing negative. In line with this latter observation, Vu et al.²¹ reported a trend ($p = 0.19$) towards a lower incidence of grades II–IV aGvHD in patients testing positive for HPgV-1 at the time of transplantation compared to that in patients who did not. Nevertheless, since virus loads measured at baseline or at any time after transplantation were not associated with the subsequent risk of developing aGvHD the interpretation of our finding is not straightforward; although it could be argued that preconditioning HPgV-1 RNA load may be somehow reflective of the impact of the underlying disease and its treatment on the state of immunocompetence, which may also influence the risk of aGvHD, at this point, and given the small sample size of our study, we cannot rule out the possibility that this is merely artefactual.

The main limitation of the current study is undoubtedly its limited sample size that prevented us from analyzing the impact of factors that may associate with clinical outcomes and blood viral burden, including the nature of the underlying disease, type of allo-HSCT, or the immunosuppressive regimen used or a potential “dose-dependent” effect of TTV DNA load on the risk of BKPyV-HC. In addition, a few patients ($n = 15$) had all set of plasma specimens, which impeded a more precise characterization of the kinetics of viral loads for these viruses. This could have resulted in a miscategorization of some patients, specially those with a single positive PCR specimen during follow-up, which were considered as infected by the corresponding virus (i.e., patient 23 for HPgV-1). Moreover, due to its

monocentric nature, it is uncertain whether our findings might be generalizable to other centers. In conclusion, pretransplant or baseline TTV DNA and HPgV-1 RNA plasma levels may be ancillary to identify allo-HSCT recipients at increased risk of BKPyV-HC or aGvHD. Further studies are warranted to prove or refute this assumption.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Lorena Forqué and Eliseo Albert performed the experiments and analyzed the data. José Luis Piñana, Ariadna Pérez, Rafael Hernani, and Carlos Solano contributed to data curation and analysis. David Navarro and Estela Giménez designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Eliseo Albert (Juan Rodés Contract; JR20/00011) holds a contract funded by the Carlos III Health Institute (co-financed by the European Regional Development Fund, ERDF/FEDER). This work was funded by grant GV/2020/188 for R + D + I projects developed by emerging research groups. General Directorate of Science and Research from Government of Valencia.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the statements in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

José L. Piñana  <https://orcid.org/0000-0001-8533-2562>

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

REFERENCES

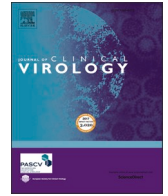
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(1):92-97.
- Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(7):589-593.
- De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013;155(5):1178-1187.
- 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(1):115-117.
- van Rijn A, Roos R, Dekker F, Rotmans J, Feltkamp M. Torque teno virus load as marker of rejection and infection in solid organ transplantation—a systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2023;33(1):e2393.
- Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: the case of Torque teno virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis*. 2022;24(2):e13778.
- 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(3):440-442.
- 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, 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*. 2018;53(2):180-187.
- Albert E, Solano C, Giménez E, et al. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(2):253-258.
- 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(5):355-362.
- Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The value of Torque teno virus (TTV) as a marker for the degree of immunosuppression in adult patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(4):643-650.
- Pradier A, Masouridi-Levrat S, Bosshard C, et al. Torque teno virus as a potential biomarker for complications and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:998.
- Giménez E, Monzó C, Albert E, et al. Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2021;93(8):5167-5172.
- Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus pegivirus within the family flaviviridae. *J Gen Virol*. 2011;92:233-246.
- Stapleton JT. Human Pegivirus type 1: a common human virus that is beneficial in immune-mediated disease? *Front Immunol*. 2022;13:887760.
- Skidmore SJ, Collingham KE, Harrison P, Neilson JR, Pillay D, Milligan DW. High prevalence of hepatitis G virus in bone marrow transplant recipients and patients treated for acute leukemia. *Blood*. 1997;89(10):3853-3856.
- Rodríguez-Iñigo E, Tomás F, Gómez-García de soria V, et al. Hepatitis C and G virus infection and liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: results from a prospective study. *Blood*. 1997;90(3):1326-1331.
- Corbi C, Traineau R, Esperou H, et al. Prevalence and clinical features of hepatitis G virus infection in bone marrow allograft recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20(11):965-968.
- Ljungman P, Halasz R, Hägglund H, Sönnernborg A, Ringdén O. Detection of hepatitis G virus/GB virus C after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(5):499-501.
- Vu DL, Cordey S, Simonetta F, et al. Human pegivirus persistence in human blood virome after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(2):225-232.
- Li Z, Li Y, Liang Y, Hu L, Chen S. Prevalence and risk factors of human pegivirus type 1 infection in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Int J Infect Dis*. 2019;85:111-113.
- Zanella MC, Vu DL, Hosszu-Fellous K, et al. Longitudinal detection of twenty DNA and RNA viruses in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients plasma. *Viruses*. 2023;15(4):928.
- Pradier A, Cordey S, Zanella MC, et al. Human pegivirus-1 replication influences NK cell reconstitution after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2023;13:1060886.

25. Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T, Okamoto H. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J Clin Microbiol*. 2008;46:507-514.
26. Fernández-Ruiz M, Forque L, Albert E, et al. Human pegivirus type 1 infection in kidney transplant recipients: replication kinetics and clinical correlates. *Transplant Infect Dis*. 2022;24:e13771.
27. 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*. 2016;64(1):87-91.
28. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2017;73(1):12-21.
29. Forqué L, Fernández-Ruiz M, Albert E, et al. Dynamics of human anelloviruses in plasma and clinical outcomes following kidney transplantation. *Transplantation*. 2023;107(2):511-520.
30. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, et al. Early kinetics of Torque teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2020;22(2):e13240.
31. Solis M, Velay A, Gantner P, et al. Torquetenovirus viremia for early prediction of graft rejection after kidney transplantation. *J Infect*. 2019;79(1):56-60.

SUPPORTING INFORMATION

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

How to cite this article: Forqué L, Albert E, Piñana JL, et al. Monitoring of plasma Torque teno virus, total *Anelloviridae* and Human Pegivirus 1 viral load for the prediction of infectious events and acute graft versus host disease in the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation setting. *J Med Virol*. 2023;95:e29107. doi:10.1002/jmv.29107



Monitoring of Torque Teno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: May it help to predict clinical outcomes?

Lorena Forqué^a, Eliseo Albert^a, Estela Giménez^a, Ignacio Torres^a, Nieves Carbonell^b, José Ferreres^b, María Luisa Blasco^b, David Navarro^{a,c,*}

^a Microbiology Service, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

^b Medical Intensive Care Unit, Clinic University Hospital, INCLIVA Health Research Institute, Valencia, Spain

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Torque teno virus (TTV)
TTV DNAemia
COVID-19
Intensive care unit
Mortality

ABSTRACT

Background: Torque teno virus (TTV) DNA load in plasma directly associates with the net state of immunosuppression and inflammation in different clinical settings, including transplantation and chronic inflammatory diseases.

Objectives: We investigated whether plasma TTV DNA load may predict the occurrence of certain infectious events and overall mortality in critically ill COVID-19 patients.

Patients and Methods: 50 patients (median age, 65.5 years) were recruited. TTV DNA load was quantitated in serial plasma specimens by real-time PCR. Serum levels of interleukin-6, C-reactive protein, ferritin, lactate dehydrogenase, Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) and absolute lymphocyte counts (ALC) in paired specimens were available. Nosocomial bloodstream infections and ventilator-associated pneumonia and overall mortality were the clinical outcomes.

Results: TTV DNA was detected in 38 patients (76%). A weak inverse correlation ($Rho = -0.28$; $P = 0.004$) was observed between TTV DNA loads and ALC. No direct correlation was found between TTV DNA load and serum levels of any of the above biomarkers. Patients with detectable TTV DNA had an increased risk of subsequently developing infectious events (HR 9.28; 95% CI, 1.29–69.5; $P = 0.03$). A trend ($P = 0.05$) towards higher TTV DNA area under a curve between days 7 and 17 after ICU admission (AUC_{7-17}) was observed in patients who died, as compared to survivors.

Conclusion: Our findings suggested that plasma TTV DNA load monitoring may be helpful for predicting the occurrence of severe nosocomial infections and mortality in critically ill COVID-19 patients.

JCV-D-21-00,857. R3

1. Background

Anelloviridae are small (30–50 nm) non-enveloped single-stranded DNA (2.2–3.9 Kb) of negative sense (ss-) viruses that comprise three genera, Alphatorquevirus, which includes torque teno virus (TTV), a prototypic member of the anelloviruses, Betatorquevirus and Gammatorquevirus [1]. TTV, which has not been consistently linked to any human disease, establishes a chronic-persistent infection presumably in multiple body sites [2], representing a major component of the human virome [3]. TTV DNAemia is commonly documented in healthy infected individuals and remains relatively stable in magnitude over years [4]; in

contrast, the level of TTV DNAemia fluctuates widely in transplant recipients with a clear linkage to the net state of immunosuppression; in fact, peripheral blood TTV DNA load consistently correlates directly with the intensity of host immunosuppression, and as such it may predict the occurrence of allograft rejection (low viral loads) or infectious events (high viral loads), notably in the solid organ transplantation setting-SOT-[5–10]. Outside the immunosuppressed population, high plasma and respiratory tract TTV DNA loads have been reported in individuals with chronic lung disorders of inflammatory nature, such as asthma, chronic bronchiectasis or chronic obstructive lung disease, as compared to healthy individuals [11–13]; while the ability of TTV to stimulate inflammatory responses, as shown in vitro models [14], may account for this latter observations, it may also be that pro-inflammatory

* Corresponding author.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105082>

Received 6 September 2021; Received in revised form 20 January 2022; Accepted 21 January 2022

Available online 23 January 2022

1386-6532/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Clinical characteristics of the study population.

Variables	no. (%)
Sex	
Male	34 (68)
Female	16 (32)
Type of comorbidity	
Diabetes mellitus	11 (22)
Asthma/ Chronic lung disease	8 (16)
Hypertension	22 (44)
Dyslipidemia/ Obesity	26 (52)
Cancer	2 (1)
Immunosuppression	2 (1)
Number of comorbidities	
One	17 (34)
Two or more	21 (42)
None	12 (24)
On mechanical ventilation	50 (100)
Acute renal failure	15 (30)
Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II	
<10	9 (18)
10–15	17 (34)
>15	24 (48)
Antiviral or anti-inflammatory treatment	
Remdesivir	11 (22)
Corticosteroids	50 (100)
Tocilizumab	19 (38)
Adrenalin	24 (48)

environments trigger TTV replication. In this context, lymphopenia and excessive generation of proinflammatory cytokines are hallmarks of severe COVID-19, the latter being pathogenetically involved in the development and aggravation of acute respiratory distress syndrome (ARDS), and tissue damage, which eventually result in multi-organ failure and death [15–17]. Since a certain degree of immunosuppression and an hyperinflammatory state co-exist in severe COVID-19 patients, and both conditions may impact on TTV replication, in this exploratory study we aimed at characterizing the kinetics of plasma TTV DNA load in critically ill COVID-19 patients, how does it compare to that

of absolute lymphocyte counts (ALC) and serum levels of inflammatory and tissue damage parameters and assessing whether it may behave as a surrogate biomarker of poor clinical outcomes.

TTV is hepatotropic and has been associated historically with acute and chronic liver disease, although formal proof lending support to that assumption is lacking [18]. In turn, acute liver injury develops frequently in COVID-19 and it is associated with poor outcome [19]. On the basis of the above, we also sought to determine whether TTV DNA loads were associated with serum levels of transaminases.

2. Study design

2.1. Patients and specimens

In this prospective single-center observational study, 50 critically ill COVID-19 patients (34 males and 16 females; median age, 65.5 years; range, 21–79) were recruited between 16 October 2020 and 20 February

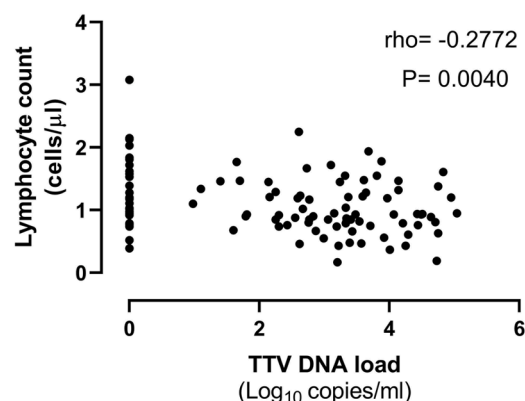


Fig. 2. Correlation between plasma TTV DNA load and absolute lymphocyte counts in critically ill COVID-19 patients. Rho and P values are shown.

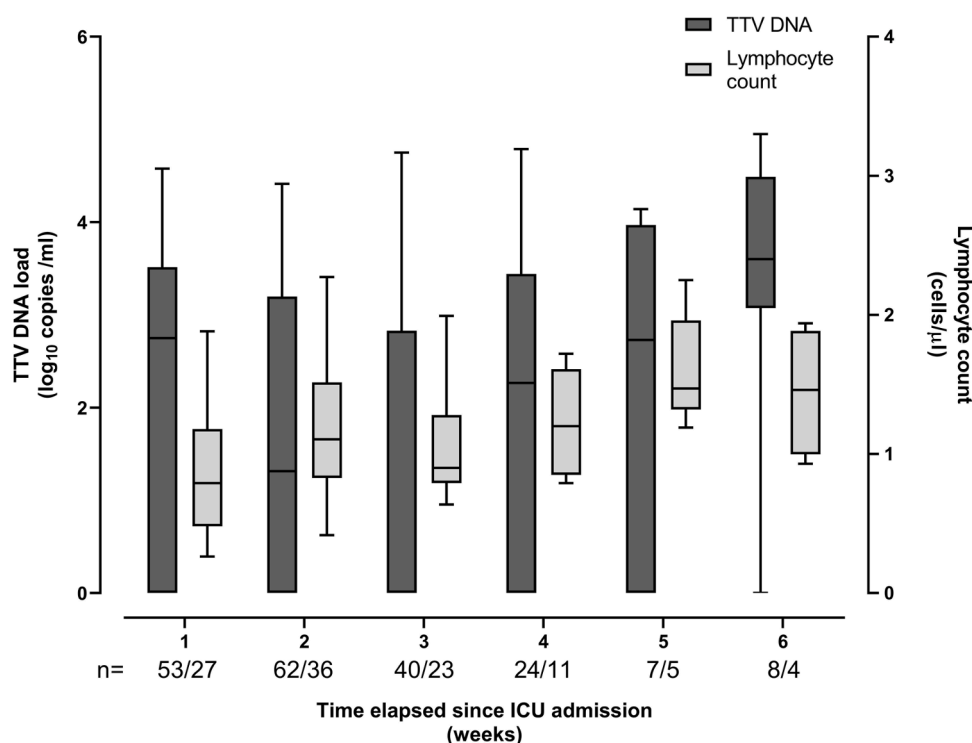


Fig. 1. Whisker plots depicting plasma TTV DNA loads and absolute lymphocyte counts in critically ill COVID-19 patients. The number of specimens available for analyses at different timepoints following intensive care unit admission is shown.

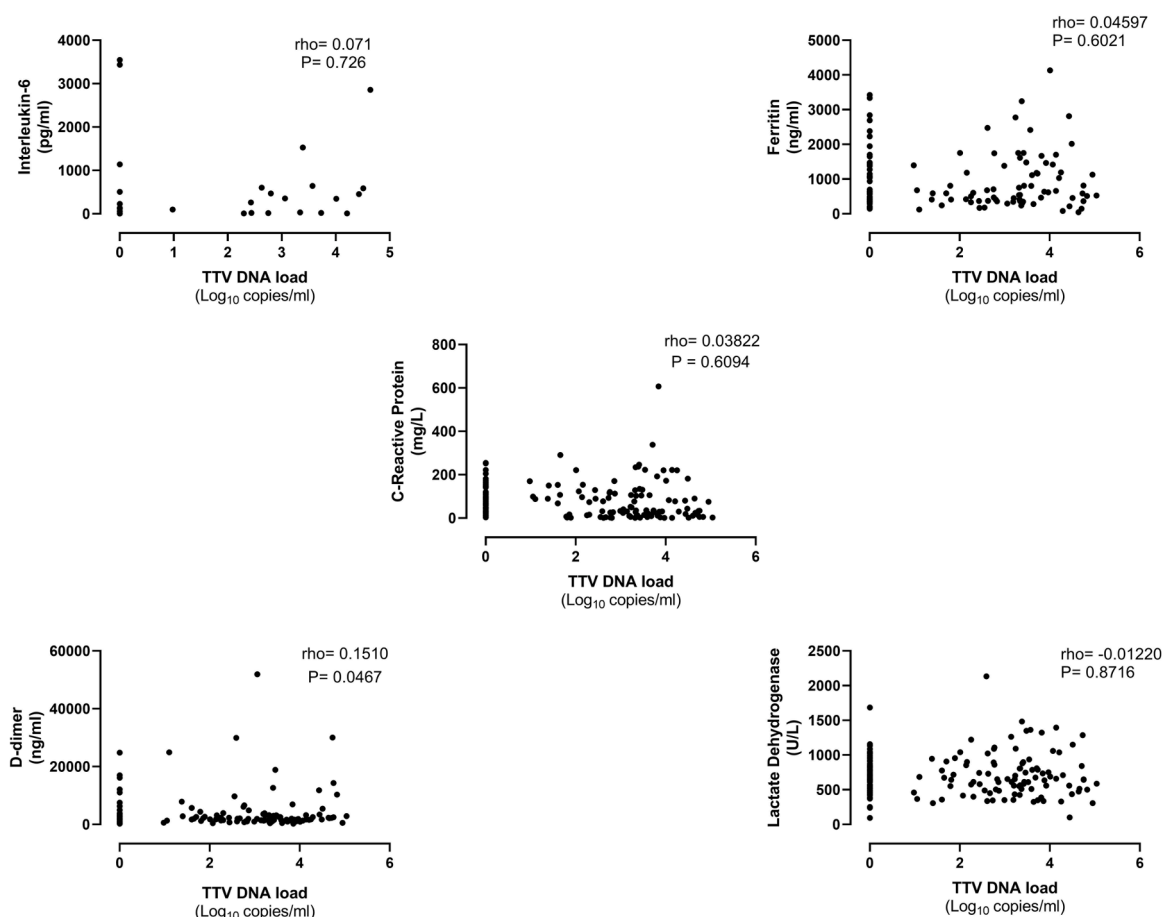


Fig. 3. Correlation between plasma TTV DNA load and levels of interleukin-6, ferritin, Dimer-D and lactate dehydrogenase in paired sera in critically ill COVID-19 patients. Rho and P values are shown.

2021 (Table 1). All cases were due to the Wuhan-Hu-1 D614G variant, as determined by whole-genome sequencing (not shown). Sequential plasma specimens were scheduled to be collected at least once a week since ICU admission until release or death. The only patient inclusion criterion was the availability of at least two specimens for the analyses detailed below. Plasma were obtained by centrifugation of whole blood EDTA tubes, cryopreserved at -80°C and retrieved for TTV DNAemia analyses. Medical history and laboratory data were prospectively recorded. The current study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario INCLIVA (May 2020).

2.2. TTV DNA quantitation

TTV DNA load in plasma was quantified with a TaqMan real-time PCR assay ~~kit~~ which amplifies a highly conserved segment of the untranslated region of the viral genome, as previously reported [20, 21]. 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.

2.3. Diagnosis of SARS-CoV-2 infection

Real-time PCR assays were used for detection of SARS-CoV-2 RNA in upper or lower respiratory tract specimens, as previously described [22].

2.4. Laboratory measurements

Clinical laboratory tests included serum levels of ferritin, D-Dimer (D-D), C reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), lactate dehydrogenase

(LDH), Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and ALC in blood specimens paired to plasma samples used for TTV DNA quantitation.

2.5. Definitions

Bacteremia, fungemia and ventilation associated pneumonia (VAP) were defined as previously reported [23, 24, respectively]. According to the CDC (Centers for Disease Control and prevention) [25], critical illness was defined by the presence of respiratory failure, septic shock, and/or multiple organ dysfunction.

2.6. Statistical methods

Frequency comparisons for categorical variables were carried out using Fisher's exact test. Differences between medians were compared using the Mann-Whitney U test. Correlations between variables of interest were assessed using the Spearman's rank test. The TTV DNA load area under a curve (AUC) was calculated with the STATGRAPHIC Centurion XVII statistics package (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) and required 2 or more specimens/patient. Two-sided P -values < 0.05 were considered significant. Univariate Cox regression models were built to identify risk factors for defined clinical events. Statistical analyses were performed using SPSS version 25.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

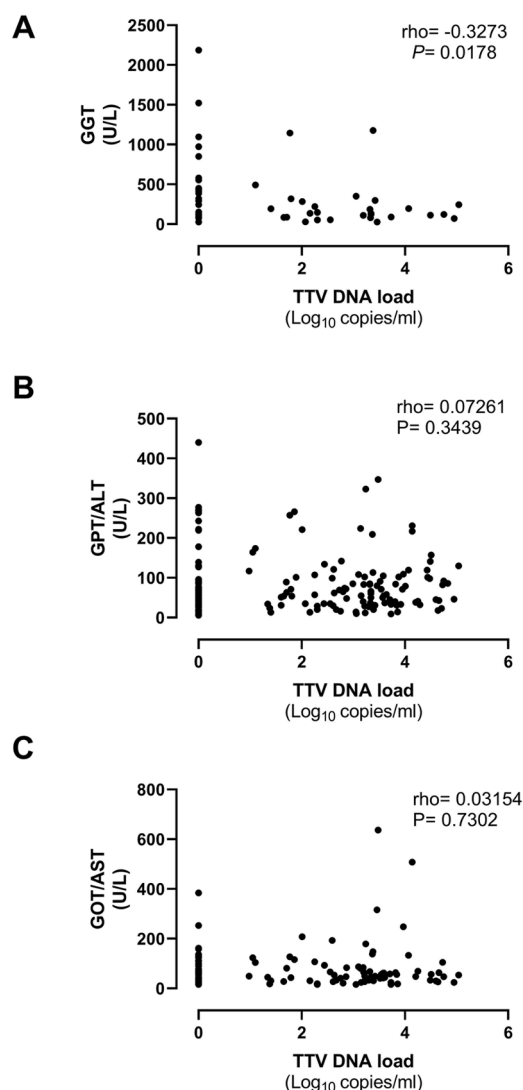


Fig. 4. Correlation between plasma TTV DNA load and levels of Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in paired sera in critically ill COVID-19 patients. Rho and P values are shown.

Table 2

Causative agents of bacteremia/fungemia and ventilator-associated pneumonia in critically ill COVID-19 patients.

Parameter	no. (%)
Clinical condition	
Ventilator-associated pneumonia	14 (28)
Bacteremia/fungemia	9 (18)
Ventilator-associated pneumonia and bacteremia/fungemia	5 (10)
Causative agent	
Ventilator-associated pneumonia	
<i>Klebsiella</i> spp.	9 (18)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (4)
<i>Enterobacter</i> spp. + <i>Aspergillus</i> spp.	1 (2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (2)
No identification of the causative agent	1 (2)
Bacteremia/Fungemia	
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (10)
<i>Candida</i> spp.	4 (8)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1 (2)

3. Results

3.1. Patient clinical features

Patients were admitted to ICU at a median of 9 days (range, 2–21) after the onset of COVID-19 symptoms. All patients presented with pneumonia and were treated with ceftaroline-fosamil plus azithromycin or ceftriaxone plus azithromycin either prior to or at the time of ICU admission. No patient received prophylactic treatment with antifungals. All patients eventually needed mechanical ventilation. Of interest, all patients received corticosteroid treatment while at ICU and no patient had a canonical immunosuppressive condition. Median time of ICU stay was 20 days (range, 5–67).

3.2. Plasma TTV DNA kinetics

A total of 194 plasma specimens from 50 patients were processed for TTV DNA quantitation by real-time PCR. A median of 4 specimens/patient (range, 2–8) were available for the analyses. TTV DNA could be detected in one or more specimens ($n = 111$; 57.2%) from 38 patients (76%). A total of 30 patients had detectable TTV DNA at baseline, a median of 4 days (range, 1–7 days) after ICU admission. TTV DNAemia was documented in the remaining 8 patients during ICU stay. Fig. 1 depicts the kinetics TTV DNAemia since ICU admission. Overall, median TTV DNA load at baseline in the 38 patients who had one or more positive PCR result during ICU stay was 2.8 log₁₀ copies/ml (range, 0–4.7). Plasma TTV DNA load tended to decrease over time reaching though level by week 3, to increase later on to slightly higher level than that measured at baseline by week ≥6. TTV DNA peak load was achieved beyond week 4 with a maximum value of 4.75 log₁₀ copies/ml. The dynamics of ALC is also shown in Fig. 1. A significant drop ($P = 0.01$) of ALC was noticed by week 2 after ICU admission. Afterwards, ALC steadily increased to reach higher levels than those present at baseline (by weeks 5/≥6). We observed no consistent relationship between the kinetics of TTV DNA load and that of peripheral blood lymphocytes; yet, a significant ($P = 0.004$), but week inverse correlation ($Rho = -0.28$) was observed between these two parameters (Fig. 2).

3.3. Plasma TTV DNA load and serum levels of COVID-19 severity biomarkers

We next investigated whether plasma TTV DNA loads did correlate with levels of biomarkers of inflammation (IL-6, ferritin, and CRP), pro-coagulative activity (Dimer-D) and tissue damage (LDH) in paired sera. The data are shown in Fig. 3. We also assessed the potential association between TTV DNA loads and surrogate biomarkers of liver function (GGT, ALT, and AST) (Fig. 4). We found no direct correlation between TTV DNA load and serum levels of any of these biomarkers.

3.4. TTV DNA load and clinical events

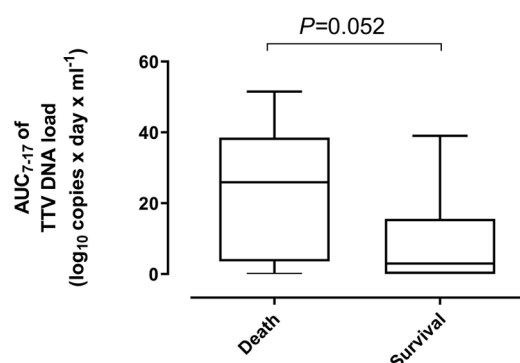
We next sought to investigate whether plasma TTV DNA load monitoring may allow prediction of the occurrence of certain nosocomial infectious events (bloodstream infections and VAP) and overall mortality. Twenty-eight patients had one or more infectious events during ICU stay (Table 2). Bloodstream infections and VAP were diagnosed at a median 19 days (range, 4–62) and 10 days (range, 3–48), respectively, following ICU admission. As shown in Table 3, overall, patients with detectable TTV DNA in plasma (in one or more specimens) during ICU stay ($n = 38$) had a higher rate of infectious events as compared to those who systematically tested negative for TTV DNA over the study period ($P = 0.013$). Moreover, a trend ($P = 0.16$) towards higher TTV DNA loads at baseline (<7 days since ICU admission) was noticed among patients who subsequently developed infectious events as compared to those who did not (median, 2.5 log₁₀ copies/ml; range, 0–4.75, vs. median, 0 log₁₀ copies/ml; range, 0–4.25). Cox models

Table 3

TTV DNA detection and load in plasma from critically ill COVID-19 patients stratified by occurrence of clinical events and death.

Clinical outcome	TTV DNA-based parameter			
	Detection of TTV DNA in plasma during ICU stay. No. of patients (%)	Non-detection of TTV DNA in plasma during ICU stay. No. of patients (%)	TTV DNA load ≥ 3.3 log ₁₀ copies/ml within week 1 after ICU admission. No. of samples (%) ^a	TTV DNA load < 3.3 log ₁₀ copies/ml within week 1 after ICU admission. No. of samples (%) ^a
Infectious events ^b	25 (89.2)	3 (10.7)	10 (45.4)	12 (54.5)
No infectious events ^b	13 (59.0)	9 (40.9)	4 (22.2)	14 (77.7)
Death	15	6	7 (43.7)	9 (56.2)
Survival	23	6	7 (29.1)	17 (70.8)

ICU, intensive care unit; TTV, Torque teno virus.

^a A total of 13 patients had 2 plasma specimens drawn within the first week after ICU admission).^b Bloodstream infections (bacteremia/fungemia), ventilator-associated pneumonia or both.**Fig. 5.** Whisker plots depicting plasma TTV DNA load area under a curve (AUC) between day 7 to day 17 (medians) after ICU admission (AUC7–17), reported as copies $\times$ day $\times$ mL⁻¹ in critically ill COVID-19 patients who either died or survived. The P value is shown.

adjusted to age, sex, and APACHE II indicated that qualitative detection of TTV DNA within the first week of ICU stay and TTV DNA loads ≥ 3.3 log₁₀ copies/ml were associated with an increased risk of subsequent infectious events (HR 9.28; 95% CI, 1.29–69.5; $P = 0.03$ and HR, 2.8; CI 95%, 0.9–5.2; $P = 0.08$, respectively).

A total of 21 out of 50 patients died. Death occurred at a median of 32 days (range, 19–59) after ICU admission. Mortality was comparable ($P = 0.52$) across patients with or without detectable plasma TTV DNA (Table 3). Moreover, TTV DNA load within 1 week after ICU admission was also similar ($P = 0.33$) among patients who died or survived (median, 1.74 log₁₀ copies/ml; range, 0–4.75 vs. median, 2.33 log₁₀ copies/ml; range, 0–4.14). Since deaths occurred after day 19 after ICU admission, we were able to calculate the TTV DNA load AUCs prior to that timepoint in patients with 2 or more consecutive PCR positive results and investigate whether this parameter was associated with subsequent overall mortality. Specifically, in order to avoid any bias due to different sampling times, we calculated AUC_s from a median of day 7 (range, days 4–10) until a median of day 17 (range, 14 to 19) since ICU admission (AUC_{7–17}) in 27 patients, of whom 11 died and 16 survived. As shown in Fig. 5, a clear trend ($P = 0.05$) towards higher TTV DNA AUC_{0–14} was observed in patients who died (median, log₁₀ 25.8 copies $\times$ days $\times$ mL⁻¹; range 0–51.5) compared with survivors (median, log₁₀ 2.95 copies $\times$ days $\times$ mL⁻¹; range 0–39.9).

4. Discussion

In this exploratory, proof-of-principle study we hypothesized that TTV DNA monitoring in plasma may serve the purpose of identifying critically ill COVID-19 patients at highest risk of developing infectious events leading to poor prognosis, such as bloodstream infections and

VAP [26,27], and overall mortality, both conditions pathogenetically linked to either a deficient, or dysbalanced SARS-CoV-2-driven immune responses, or both. TTV DNA load in plasma inversely correlate with peripheral ALC by 1 to 3 months after kidney transplantation [9] and at late times ($\geq$ day 100) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-allo-HSCT- [28]. We investigated whether this was the case in critically ill COVID-19 patients. ALC described a trajectory typically reported for this population group [29]; plasma TTV DNA load trajectory showed no apparent relationship with that of ALC; yet, a significant, but rather week inverse correlation between these two parameters was noticed.

Both, the in vitro pro-inflammatory nature of TTV [14] and the fact that TTV DNA load in the blood compartment is increased in patients with chronic inflammatory diseases as compared to healthy controls [11–13] led us to investigate whether a correlation between serum levels of surrogate biomarkers of inflammation or tissue damage, such as IL-6, CRP, D-D and LDH and plasma TTV DNA load could be documented in critically ill COVID-19 patients. Nevertheless, we observed no direct correlation at all between plasma TTV DNA loads and serum levels of the above biomarkers in paired specimens. In this respect, it is of relevance to mention that data on IL-6 levels were only available for 27 specimens from 23 patients and that 9 of these patients were under tocilizumab treatment at the time of sampling. Despite this, the lack of correlation between TTV DNA loads and serum levels of CRP and ferritin, both reliable markers of an hyperinflammatory state in patients with COVID-19 [15] argues against TTV DNA load being a good surrogate marker of inflammation in clinical setting.

Although controversial, TTV has been linked to acute and chronic liver disease in both immunocompetent and immunosuppressed individuals [18]. Since acute liver injury commonly presents severe COVID-19 [19], we investigated whether TTV DNA loads were associated with serum levels of transaminases. No direct correlation between these parameters was found, this arguing against a potential role of TTV in producing liver damage in critically ill COVID-19 patients.

Superinfection events occur frequently in critically ill COVID-19 patients and notably worsen their prognosis [26,27]. Monitoring of TTV DNAemia has been shown to be a useful tool to anticipate the occurrence of a variety of infectious events in SOT and allo-HSCT settings [8–10, 30–33]. Our data suggested that this might also be the case in critically ill COVID-19 patients regarding nosocomial bloodstream infections and VAP. The potential relevance of this finding stems on two assumptions that are debatable: (i) most if not all adults are chronically infected by one or more TTV species that may access the blood compartment with no apparent clinical consequences [2]; (ii) the lack of TTV DNAemia detection, even in healthy individuals, may be due to analytical drawbacks (namely, insufficient sensitivity of current PCR assays), the existence of sanctuaries of viral persistence in organ and tissues other than peripheral blood [2,4,34], or both; natural or iatrogenic immunosuppression may decrease immune surveillance of TTV in

virus-persistence sites allowing TTV DNAemia to become detectable [2]. Moreover, an increased risk of subsequent infections was observed for patients displaying detectable TTV DNA in plasma or exhibiting TTV DNA load ≥ 3.3 log₁₀ copies/ml within the first week since ICU admission. If our observations were confirmed in more robust studies, monitoring of TTV DNA load in plasma early after ICU admission may trigger the administration of antimicrobial prophylaxis targeting opportunistic bacterial and fungal agents involved in severe infections.

High TTV DNAemia levels have been associated with increased mortality risk in different settings, including the elderly population [35, 36], septic patients at ICU recruited prior to the SARS-CoV-2 pandemic [37] and allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients [33]. Here, a trend towards an association with increased mortality rate was observed for TTV DNA AUC_{7–17}. This observation, however, must be interpreted with caution due to the scarce number of death events in the cohort.

The current study is merely exploratory and does not allow to draw robust conclusions; even so, our findings suggested that the magnitude of plasma TTV DNA load in critically ill COVID-19 patients may reflect their state of immunocompetence, as in other clinical settings, and point to a use of viral load monitoring as an ancillary tool for predicting the occurrence of severe nosocomial infections in critically ill COVID-19 patients and perhaps mortality. Whether it may anticipate the development of reactivation of persistent viruses such as Cytomegalovirus or Herpes simplex viruses, which may impact on patient survival, could not be addressed in the current study. The potential clinical relevance of our observations warrants further studies involving larger and if possible multicenter cohorts.

Funding

This work received no private or public funds.

Author contributions

LF, EA, EG, and IT: Methodology and validation of data. NC, JF and MLB: Medical care of ICU patients. DN: Conceptualization, supervision, writing the original draft. All authors reviewed the original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We are grateful to all personnel who work at Clinic University Hospital, in particular to those at Microbiology laboratory and the Intensive Care Unit for their commitment in the fight against COVID-19. Eliseo Albert and Estela Giménez hold a Juan Rodés Contract from the Health Institute Carlos III (JR20/00011 and JR18/00053, respectively). Ignacio Torres holds a Rfo Horteiga Contract (CM20/00090) the Health Institute Carlos III.

References

- [1] Family—Anelloviridae, in: AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy*, Elsevier, San Diego, 2012, pp. 331–3411.
- [2] D. Focosi, G. Antonelli, M. Pistello, F. Maggi, Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 589–593.
- [3] G. Liang, F.D. Bushman, The human virome: assembly, composition and host interactions, *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (2021) 514–527.
- [4] D. Focosi, P.G. Spezia, L. Macera, S. Salvadori, D. Navarro, M. Lanza, et al., Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors, *Clin. Microbiol. Infect.* 26 (2020) 1406–1410.

- [5] I. De Vlaminck, 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.
- [6] 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* 101 (2017) 360–367.
- [7] D. Focosi, L. Macera, M. Pistello, F. Maggi, Torque teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant, *J. Infect. Dis.* 210 (2014) 667–668.
- [8] R. Strassl, M. Schiemann, K. Doberer, I. Görzer, E. Puchhammer-Stöckl, F. Eskandary, et al., Quantification of torque teno virus viremia as a prospective biomarker for infectious disease in kidney allograft recipients, *J. Infect. Dis.* 218 (2018) 1191–1199.
- [9] M. Fernandez-Ruiz, E. Albert, E. Giménez, T. Ruiz-Merlo, P. Parra, F. López-Medrano, et al., Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation, *Am. J. Transplant* 19 (2019) 1139–1149.
- [10] I. Gorzer, M. Haloschan, P. Jaksch, W. Klepetko, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 33 (2014) 320–323.
- [11] M. Pifferi, F. Maggi, E. Andreoli, L. Lanini, E.D. Marco, C. Fornai, et al., Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma, *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 1141–1148.
- [12] G. Freer, F. Maggi, M. Pifferi, M.E. Di Cicco, D.G. Peroni, M. Pistello, 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, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 686.
- [13] Y. Xie, Q. Xue, W. Jiao, J. Wu, Y. Yu, L. Zhao, et al., Associations between sputum torque teno virus load and lung function and disease severity in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Front. Med. (Lausanne)* 8 (2021), 618757.
- [14] J. Rocchi, V. Ricci, M. Albani, L. Lanini, E. Andreoli, L. Macera, et al., Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9, *Virology* 394 (2009) 235–242.
- [15] D.A. Berlin, R.M. Gulick, F.J. Martinez, Severe Covid-19, *N. Engl. J. Med.* 383 (2020) 2451–2460.
- [16] D. Ragab, H. Salah Eldin, M. Taeimah, R. Khattab, R. Salem, The COVID-19 cytokine storm; what we know so far, *Front. Immunol.* 11 (2020) 1446.
- [17] D.E. Leisman, L. Ronner, R. Pinotti, M.D. aylor, P. Sinha, C.S. Calfee, et al., Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes, *Lancet Respir. Med.* 8 (2020) 1233–1244.
- [18] V.I. Reshetnyak, I.V. Maev, A.I. Burmistrov, I.A. Chekmazov, T.I. Karlovich, Torque teno virus in liver diseases: on the way towards unity of view, *World J. Gastroenterol* 26 (2020) 1691–1707.
- [19] A. Sharma, P. Jaiswal, Y. Kerakhan, L. Saravanan, Z. Murtaza, A. Zergham, et al., Liver disease and outcomes among COVID-19 hospitalized patients - A systematic review and meta-analysis, *Ann. Hepatol.* 21 (2021), 100273. Mar-Apr.
- [20] E. Albert, C. Solano, T. Pascual, I. Torres, L. Macera, D. Focosi, et al., Dynamics of torque teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients, *J. Clin. Virol.* 94 (2017) 22–28.
- [21] E. Albert, C. Solano, E. Giménez, D. Focosi, A. Pérez, L. Macera, 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* 53 (2018) 180–187.
- [22] B. Olea, E. Albert, I. Torres, R. Gozalbo-Rovira, N. Carbonell, J. Ferreres, et al., Lower respiratory tract and plasma SARS-CoV-2 RNA load in critically ill adult COVID-19 patients: relationship with biomarkers of disease severity, *J. Infect.* (2021). S0163-445300279-6.
- [23] IDSA guidelines. <https://www.idsociety.org/practice-guideline/practice-guideline-2010>.
- [24] I. Martin-Loeches, A.H. Rodriguez, A. Torres, New guidelines for hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia: USA vs. Eur. *Curr. Opin. Crit. Care* 24 (2018) 347–352.
- [25] COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed [06/2021].
- [26] J.S. Musuza, L. Watson, V. Parmasad, N. Putman-Buehler, L. Christensen, N. Safdar, Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: a systematic review and meta-analysis, *PLoS ONE* 16 (2021) e0251170.
- [27] P. Povoa, I. Martin-Loeches, S. Nseir, Secondary pneumonias in critically ill patients with COVID-19: risk factors and outcomes, *Curr. Opin. Crit. Care* (2021 Jul 27), <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000860>.
- [28] E. Albert, C. Solano, E. Giménez, D. Focosi, A. Pérez, L. Macera, et al., Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Med. Microbiol. Immunol.* 208 (2019) 253–258.
- [29] Y. Liu, W. Tan, H. Chen, Y. Zhu, L. Wan, K. Jiang, et al., Dynamic changes in lymphocyte subsets and parallel cytokine levels in patients with severe and critical COVID-19, *BMC Infect. Dis.* 21 (2021) 79.
- [30] F. Maggi, D. Focosi, M. Statzu, G. Bianco, C. Costa, L. Macera, et al., Early post-transplant torquetenovirus viremia predicts cytomegalovirus reactivations in solid, *Organ Transplant Recipients Sci. Rep.* 8 (2018) 15490.
- [31] E. Albert, C. Solano, E. Giménez, D. Focosi, A. Pérez, L. Macera, 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* 53 (2018) 180–188.
- [32] M. Fernández-Ruiz, E. Albert, E. Giménez, I. Rodríguez-Goncer, A. Andrés, D. Navarro, et al., Early kinetics of torque teno virus DNA load and BK polyomavirus viremia after kidney transplantation, *Transpl Infect. Dis.* 22 (2020) e13240.
- [33] A. Pradier, S. Masouridi-Levrat, C. Bosshard, C. Dantin, D.L. Vu, M.C. Zanella, et al., Torque teno virus as a potential biomarker for complications and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Front. Immunol.* 11 (2020) 998.
- [34] F. Bueno, E. Albert, J.L. Piñana, A. Pérez, C. Úbeda, M.D. Gómez, et al., Kinetics of Torque Teno virus DNA in stools may predict occurrence of acute intestinal graft versus host disease early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Transpl. Infect. Dis.* 23 (2021) e13507.
- [35] R. Giacconi, F. Maggi, L. Macera, M. Pistello, M. Provinciali, S. Gianecchini, et al., Torquetenovirus (TTV) load is associated with mortality in Italian elderly subjects, *Exp. Gerontol.* 112 (2018) 103–111.
- [36] R. Giacconi, F. Maggi, L. Macera, P.G. Spezia, M. Pistello, M. Provinciali, et al., Prevalence and loads of torquetenovirus in the European MARK-AGE study population, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 75 (2020) 1838–1845.
- [37] A.H. Walton, J.T. Muenzer, D. Rasche, J.S. Boomer, B. Sato, B.H. Brownstein, et al., Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis, *PLoS ONE* 9 (2014) e98819.