

T.C.
GAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI KİŞİLERDE VE LENFOPROLİFERATİF BOZUKLUĞU OLAN
KANSERLİ HASTALARDA HHV-6 VİRUSUNUN İFA YÖNTEMİ İLE
ANTİKOR DAĞILIMI VE PCR - RFLP YÖNTEMİ İLE VARYANT
ANALİZİ

DOKTORA TEZİ
GÜLNUR TARHAN

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Semra KUŞTİMUR

90339

ANKARA - 2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

d ATP	: Deoksiadenozin trifosfat
d GTP	: Deoksiguanozin trifosfat
d CTP	: Deoksisitozin trifosfat
d TTP	: Deoksitimidin trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasid
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorikasit
KCl	: Potasyum klorür
MgCl₂	:Magnezyum klorür
dk	: Dakika
LTP	: Large tegüment protein
bç	: Baz çifti
mM	: Milimolar
pM	: Pikomolar
TAE	: Tris-asetikasit-EDTA
mg	: Miligram
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
RF	: Romatoid faktör
NHL	: Non-Hodgin lenfoma
HL	: Hodgkin lenfoma
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
MM	: Mültipl myeloma
ML	: Malign lenfoma
KML	: Kronik myeloblastik lösemi

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	Sayfa
	No
Tablo 1 : İnsan Herpesviruslarının sınıflaması	5
Tablo 2 : HHV-6' nın klinik hastalıklar ile etiyolojik ilişkisi	11
Tablo 3 : Restriksiyon endonükleaz enzimleri	25
Tablo 4 : Tüm çalışma grubunda HHV-6 IgG ve IgM pozitiflik oranları	40
Tablo 5 : HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranlarının çeşitli yaş gruplarına göre sayı ve yüzde dağılımı	41
Tablo 6 :Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 seropozitiflik ve seronegatiflik oranlarının sayı ve yüzde dağılımı	43
Tablo 7 : Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının cinsiyete göre sayı ve yüzde dağılımı	44
Tablo 8 :Kanserli hastalarda HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının sayı ve yüzde dağılımı	46
Tablo 9 :Sağlıklı bireyler ve kanserli hastalarda PCR sonuçları	47
Tablo 10 :Sağlıklı bireyler ve kanserli hastalarda HHV-6 varyant dağılımı	51
Şekil 1 : HHV-6 virion yapısı	6
Şekil 2 : İndirekt immünfloresan antikor tekniği	20
Şekil 3 : Polimeraz zincir reaksiyonu	23
Şekil 4 : HHV-6 spesifik primer bölgeleri	32
Şekil 5 : HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranlarının çeşitli yaş gruplarına göre dağılımı	42
Şekil 6 :Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının cinsiyete göre dağılımı	45
Şekil 7 : HHV-6 varyant A (SIE suşu) ve varyant B (HST suşu)' den amplifye edilen DNA' ların kısmi nükleotid sekansları	48

Şekil 8	:HHV-6 spesifik 830 bç' lik PCR ürününün Hind III enzimi ile kesilmesi	49
Resim 1	: HHV-6 antikorlarının IFA testi ile negatif görünümü	38
Resim 2	: HHV-6 antikorlarının IFA testi ile pozitif görünümü	38
Resim 3	: Klinik örneklerde HHV-6 DNA' nın amplifikasyonu	48
Resim 4	: PCR pozitif örneklerin Hind III enzimi ile kesimi	50



İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
BULGULAR	40
TARTIŞMA	52
SONUÇ	58
ÖZET	59
SUMMARY	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	81

GİRİŞ

Herpesvirus enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülen viral enfeksiyonlardır. HHV-6 ekzantem subitumun etiyolojik ajanı olmakla birlikte, çocuklarda ve yetişkinlerde çok değişken klinik tablolara yolaçabilmektedir.

Sağlıklı bireylerdeki HHV-6 enfeksiyonları genellikle asemptomatiktir. Yetişkin popülasyondaki seropozitiflik oranı, toplumların sosyoekonomik düzeyi, yaşam koşulları ve hijyenik alışkanlıklarına göre % 80 - 100 arasında değişmektedir. Özellikle ülkelerin sosyo-ekonomik durumları ile virusun dağılımı arasında yakın bir ilişki vardır. Avrupa, Avustralya ve Amerika' da bu oran, Afrika ve Asya gibi gelişmemiş bölgelerdekine göre daha düşüktür ¹⁻⁸.

Tüm Herpes grubu virüslerde olduğu gibi, HHV-6' da potansiyel onkojen bir virus olarak kabul edilmektedir. In vitro olarak hücrelerde transformasyona yol açtığı gösterilmiştir. Ancak in vivo olarak insanlardaki onkojenitesi hakkında deliller çok azdır ve risk faktörleri tam olarak tanımlanmamıştır ⁹. Lenfomalı hastalarda yapılan serolojik çalışmalarda, bu hastaların kanlarında ve lenfoid dokularında viral antijenler gösterilmiş, diğer hastalıklar ve kan donörlerine göre bu grupta daha yüksek titrede HHV-6 antikorları saptanmıştır. Bununla birlikte insan lenfomalarında HHV-6 virusunun önemi halen anlaşılamamıştır ¹⁰⁻¹⁴.

HHV-6 izolatları; biyolojik, immünolojik ve moleküler özellikleri bakımından varyant A ve varyant B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. HHV-6 B' nin ekzantem subitum etkeni ve immün sistemi baskılanmış bireylerde sıklıkla aktif olduğu bilinmesine rağmen, HHV-6 A' nın bugüne kadar herhangi bir hastalık ile kesin bir ilişkisi tanımlanmamıştır ¹⁵⁻²¹.

HHV-6, in vitro transforme edici özelliğe sahiptir. Virusun latent enfeksiyonun reaktivasyonu sonucu gelişen lenfomalar ve diğer hastalıklarda etiyolojik bir farklılık gösterdiği ileri sürülmektedir. Bu yüzden sağlıklı kişilerde ve lenfoproliferatif bozukluğu olan olgularda HHV-6 varyantlarının dağılımı ve varlığı hakkında daha fazla detaylı bilgiye gereksinim vardır.

Ülkemizde HHV-6 sıklığı, yaygınlığı ve varyant dağılımı konusunda henüz detaylı bir çalışma yapılmamıştır. HHV-6 virusunun daha çok tükrükle bulaştığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{22 - 24}. Kalabalık bir toplumda yaşamamız ve hijyenik koşulların yetersiz oluşu HHV-6 enfeksiyonlarının ülkemizde de fazla olacağını düşündürmektedir.

HHV-6 virusunun tanısı için bugüne kadar pek çok yöntem kullanılmıştır. Özellikle serolojik yöntemler virusun epidemiyolojik çalışmaları için oldukça yararlı olmuştur. Ancak bu yöntemler ile henüz güvenli bir varyant spesifik tanı yapılamamaktadır .

Son yıllarda biyomoleküler yöntemlerin devreye girmesi ile birlikte pratik önem kazanan PCR ile enfeksiyon hastalıklarının tanısında direkt olarak enfeksiyon ajanına ait nükleik asitler gösterilebilmektedir. Aynı zamanda PCR ile çoğaltılan DNA'nın, RFLP analizi ile etkene ait farklı türler belirlenebilmektedir^{25 - 27}.

HHV-6 için bu yöntemlerle yapılan değişik çalışmalarda, çeşitli klinik örneklerde PCR ile çoğaltılan HHV-6DNA'sı, restriksiyon enzimleri kullanılarak genotiplendirilmiş, bu çalışmalar sonucunda PCR yönteminin tanı aşamasında oldukça duyarlı olduğu ve RFLP yönteminin ise genotiplendirmede yararlı bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır^{28 - 30}.

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı bireylerde ve lenfoproliferatif bozukluğu olan kanserli hastalarda HHV-6 virusuna karşı antikor prevalansının IFA yöntemi ile saptanması ve

aynı populusyonlarda PCR-RFLP yöntemi ile HHV-6 varyant A ve B dağılımının belirlenmesi hedeflenmiştir.



GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

Human herpes virus - 6, ilk defa 1986 yılında Salahuddin ve ark. tarafından AIDS ve çeşitli lenfoproliferatif hastalığı olan olguların periferik kan mononükleer hücrelerinden izole ve karakterize edilmiştir ^{31 - 33}.

1989 yılında Yamanishi, Ueda, Asano ve ark., bu virüsü ekzantem subitumlu çocukların periferik kan lenfositlerinden izole etmişler ve insan hastalıklarında etiyolojik bir rol oynadığını bildirmişlerdir ^{34 - 36}.

Başlangıçta yapılan sınırlı genomik analiz ve morfolojik çalışmalar sonucunda virüsün B hücrelerine tropizm gösterdiği belirlenmiş ve **Human - B - lenfotropik virus (HBLV)** olarak adlandırılmıştır. Ancak daha sonraki detaylı çalışmalarda B hücrelerine ilaveten T hücreleri, epitelyal hücreler, lenfosit, monosit - makrofaj hücre dizinleri, düşük düzeyde de olsa megakaryositler ve beynin glia hücreleri gibi değişik hücre tiplerinide enfekte edebildiği görülmüş, diğer morfolojik - biyolojik özelliklerine göre **Human herpes virus - 6** olarak yeniden adlandırılmıştır ^{37 - 39}.

VİRUSUN GENEL ÖZELLİKLERİ

HHV-6, **Herpesviridae** familyasının yeni tanımlanmış bir üyesidir. Taksonomik sınıflandırması henüz kesinleşmemekle birlikte virüs, genetik özellikleri bakımından CMV ve HHV-7' nin de içinde bulunduğu Betaherpesvirinae alt familyasının Roseolavirus genusuna dahil edilmiştir. Ancak lenfotropizmi, biyolojik ve fiziksel özellikleri bakımından da Gamaherpesvirus grubundaki EBV ile de yakın benzerlik göstermektedir ^{33, 40, 41} (Tablo I).

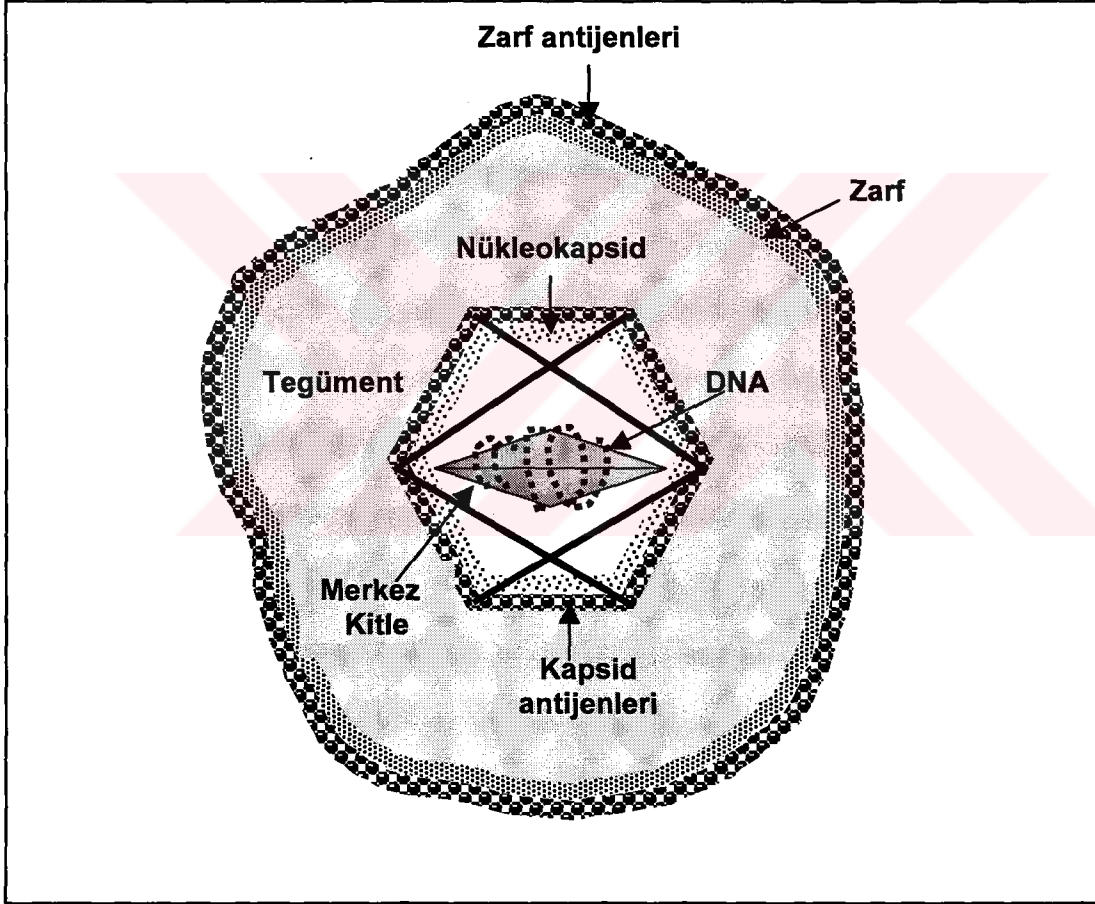
Tablo 1: İnsan Herpesviruslarının Sınıflaması ⁴².

İNSAN HERPESVİRUSLARI			
Alt aile / Cins	Resmi Ad	Sık Kullanılan Ad	Biyolojik Özellikler
Alphaherpesvirinae			
Simplexvirus	Human herpesvirus 1 Human herpesvirus 2 Cercopithecine Herpesvirus 1	Herpes simpleks virus 1 Herpes simpleks virus 2 Simian herpes B virusu	Hızlı üreme, sitolitik, Nöronlarda latentlik
Varicellovirus	Human herpesvirus 3	Varicella- zoster virusu	
Betaherpesvirinae			
Cytomegalovirus	Human herpesvirus 5	Sitomegalovirus	Yavaş üreme Sitomegalik tükürük bezleri ve böbrekte latentlik
Roseolavirus	Human herpesvirus 6 Human herpesvirus 7		Makrofaj ve lenfositlerde latentlik
Gammaherpesvirinae			
Lymphocryptovirus	Human herpesvirus 4	Epstein -Barr virusu	Lenfoproliferatif, B lenfositlerinde latentlik

YAPI

HHV-6, morfolojik olarak Herpes virus ailesinin genel yapısal özelliklerini taşır. Zarflı, ekstraselüler HHV-6 virionları 160-200 nm çapında ve sferik yapıda olup, 162 kapsomerden meydana gelen 90-110 nm çapında ikozahedral simetride bir nükleokapside sahiptir. Nükleokapsid ve dış membran arasında yaklaşık 20-40 nm kalınlığında **tegüment** adı verilen granüler bir zon vardır. Tegüment diğer herpes virüslerine oranla HHV-6' da daha belirgindir. En iç kısımda elektronca yoğun bir kor bulunmaktadır. Viral DNA; 160 -170 kb uzunluğunda, çift sarmallı lineer yapıda olup, guanin-sitozin içeriği % 43 tür ^{37,42, 43} (Şekil I).

HHV-6, genom yapısı bakımından herpes viruslar içinde en çok CMV ile yakın benzerlik göstermektedir. DNA sekanslama ve restriksiyon haritalama yöntemleri ile yapılan çalışmalar sonucunda korunmuş bir gen bölgesinde HHV-6 ve CMV arasında %66' dan daha fazla, diğer herpesviruslarla ise %50' den daha az oranda aminoasid benzerliği tesbit edilmiştir^{44 - 49}.



Şekil 1: HHV-6 virion yapısı³⁷.

REPLİKASYON

Bugün, HHV-6' nın replikasyonu ile ilgili pek çok önemli soru cevapsız kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda virusun CD+4 T hücrelerine tropizm gösterdiği belirtilmesine rağmen, virusun hedef hücre üzerinde bağlandığı reseptör henüz tam olarak belirlenememiştir. HHV-6 sadece insan hücrelerinde replike olmaktadır. İn vivo olarak geniş bir konakçı doku çeşidine tropizm göstermektedir. Lenf bezleri, lenfositler, makrofaj ve monositler, böbrek tübüler endotel hücreleri, tükürük bezleri, nöron ve oligodendrositlerin HHV-6 ile enfekte oldukları belirlenmiştir. İn vitro olarak, en iyi IL-2 ile aktive edilmiş taze lenfositlerde replike olmaktadır. Ancak bir çok izolat HSB-2, JHAN, Molt -3 gibi devamlı hücre kültürlerine adapte edilmiştir. Bu hücreler dışında virus sinir, epitel veya fibroblast orjinli hücre kültürlerinde üretilmişse de bu sistemler çok fazla tercih edilmemektedir ^{17, 21, 38, 50, 51}.

HHV-6 replikasyonu viral glikoproteinlerin konak hücre yüzey reseptörleri ile reaksiyona girmesi ile başlamaktadır. Virus zarfının, hücre membranı ile kaynaşmasından sonra viral nükleokapsit hücre sitoplazmasına girer. Daha sonra, hücre membranı ile nükleokapsitin kaynaşması sonucunda viral genom nükleus içine aktarılır. Genomun transkripsiyonu ve replikasyonu nükleusta olur. DNA sekanslama ve aminoasit analizleri ile HHV-6 genomunda DNA polimeraz, DNaz, urasil DNA glikozilaz, majör kapsid geni, glikoprotein H, glikoprotein L ve glikoprotein G gibi korunmuş herpes virus proteinlerini kodlayan çoklu bir gen bölgesi belirlenmiştir ^{41, 47, 52}.

Viral genomun replikasyonu, virus tarafından kodlanan DNA polimerazın etkisiyle gerçekleşir. Oluşan prokapsitler boş olarak nükleus içinde toplanırlar. İçleri DNA ile dolduktan sonra nükleer membrandan birer zarf edinirler. Daha sonra ya ekzositoz veya hücre lizisi yoluyla hücreyi terk ederler. Bu tarz replikasyon, tüm Herpes grubu viruslarda aynıdır ^{7, 17, 43}.

İmmün presipitasyon teknikleri ile yapılan çalışmalarda infekte hücrelerde HHV-6 spesifik 10 -30 glikoprotein tanımlanmıştır ^{17, 53, 54} .

HHV-6, CMV ile yakın genetik benzerlik göstermesine rağmen CMV' de tanımlanan timidin kinaz homologları bu virusta gösterilmemiştir ¹⁷ .

HHV-6 VARYANTLARI

HHV-6 izolatları genom yapısı, biyolojik ve immünolojik özellikleri bakımından **varyant A** ve **varyant B** olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu varyantların in vitro hücre tropizmi, T hücre markırlarının ekspresyonundaki etkileri, monoklonal antikorlar ile gösterdikleri reaksiyonlar, restriksiyon endonükleaz profilleri, nükleotid sekansları, seroepidemioloji ve hastalıklar ile olan birliktelikleri birbirinden farklıdır ^{55 - 57} .

Tüm farklılıklara rağmen bu varyantlar genetik özellikleri bakımından birbirleri ile yakın benzerlik göstermektedir. Genomik sekanslar arasında %95 oranında homoloji bulunmaktadır. Genel olarak varyantlar arasındaki bu sekans benzerliği antijenik çapraz reaksiyonun yüksek düzeyde olması ile kendini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda varyantlara ait diğer özellikler arasında da %25 oranında farklılık gözlenmiştir ^{58 - 61} .

HHV-6B, ekzantem subitumun majör etiyolojik ajanı olup, aynı zamanda immün sistemi baskılanmış bireylerde sıklıkla aktiftir. Bu varyant, tek gen lokusunda nükleotid sekanslarına göre grup içerisinde %1' den daha az, gruplar arasında ise % 2 - 4 oranında farklı en az iki guba ayrılmıştır. Bu gruplar arasında biyolojik veya genetik özellikler bakımından bir farklılık olup olmadığı ise henüz bilinmemektedir ^{16,17,19, 28, 30} .

HHV-6 A, HHV-6B' ye göre toplumda daha az sıklıkla gözlenmektedir ve insan hastalıkları ile olan etiyolojik ilişkisi tam olarak

aydınlanmamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda HHV-6 B' den bağımsız olarak ekzantem subitum veya diğer ateşli hastalıklarda hiçbir HHV-6 A izolatu tanımlanmamıştır ^{20, 62, 63}.

EPİDEMİYOLOJİ

HHV-6 geniş bir coğrafik dağılıma sahip olup, tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Doğal HHV-6 enfeksiyonu türe özgüdür ve bilinen bir vektörü yoktur. İnsan HHV-6 virusu için tek rezervuar insandır. Virusun insandan insana bulaşma yolları henüz tam olarak aydınlanmamakla birlikte, virus sağlıklı yetişkinlerin tükürüğünden %63-92 oranında izole edilmiş; HHV-6 spesifik viral antijenler ve DNA, tükürük bezi ve bronşiyal biopsi örneklerinde gösterilmiştir. Bu durum enfeksiyonun en yaygın şekilde yakın temas sonucu oral sekresyonlar aracılığı ile bulaştığını düşündürmüştür. Tükürük haricinde çok yaygın olmasada, intrauterin veya perinatal ve fekal-oral yollarla geçiş olabileceğide yapılan çalışmalarda bildirilmiştir ^{64 - 72}.

HHV-6 enfeksiyonlarının insidansı yaş, coğrafik bölge ve sosyo-ekonomik düzeyle yakından ilişkili bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda düşük sosyo-ekonomik şartlar ve kalabalık ortamlarda enfeksiyonun insidans ve prevalansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Seropozitiflik oranı sosyoekonomik düzeye göre %80 - 100 olarak tesbit edilmiştir. Sosyal düzeyi düşük gruplarda enfeksiyonun erken yaşlarda kazanıldığı buna karşılık özellikle gelişmiş ülkelerde enfeksiyon yaşının daha ileri dönemlere rastladığı bildirilmiştir.

Kangro ve ark., İngiltere ve HongKong' da 593 serum örneğini değerlendirdikleri çalışmada, HongKong' daki çocukların % 90' dan fazlasının İngiltere' dekilere göre daha erken yaşlarda enfekte olduklarını ve özellikle kalabalık ortamların virusun yayılımında oldukça önemli olduğunu göstermişlerdir ⁷³.

Değişik yaş populasyonlarında ELISA, IFA ve nötralizasyon testleri ile yapılan çalışmalarda ise seroprevalans oranının %80' den daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda toplumda 2 yaşın üzerindeki insanların %95' inden fazlasının HHV-6A veya HHV-6B veya her ikisi ile seropozitif olduğu belirlenmiştir^{7,17}.

Yaş-spesifik olarak yapılan çalışmalarda, kord kanı ve yeni doğan bebeklerin serumlarında %90' dan daha fazla oranda HHV-6 antikor tesbit edilmiştir. Maternal antikorların kaybolması ile ilişkili olarak, yaşamın ilk 4 ayı içerisinde seroprevalans ve geometrik ortalama titrelerinde düşüş gözlenmiştir¹⁻³. Primer enfeksiyonla birlikte antikor titresi 4 ay - 1 yaş arasında pik düzeyine ulaşmıştır. Bu durum enfeksiyonun genel olarak erken dönemlerde kazanıldığını düşündürmüştür. En yüksek antikor titresi 4 yaşın altındaki çocuklarda gözlenmiştir. Bazı çalışmalarda yetişkin dönemde seropozitivite oranının düştüğü ifade edilirken, bazı çalışmalarda çocukluk, ergenlik ve 40 yaşına kadar olan dönemde stabil kaldığı, 40 yaşından sonra ise % 35 oranında azaldığı ifade edilmiştir^{74 - 79}.

KLİNİK ÖZELLİKLER

HHV-6' nın çok sayıda klinik hastalığın patojenezinde etiyolojik bir ajan olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür (Tablo 2). Virusun ilişkili olduğu klinik tablolar temel olarak primer ve sekonder enfeksiyon olmak üzere başlıca iki kategoride toplanmıştır^{37, 42, 79}.

Tablo 2: HHV-6' nın klinik hastalıklar ile etiyolojik ilişkisi ³⁷.

Hastalık	Etiyolojik İlişki
Ekzantem subitum	+++
Çeşitli döküntü ile seyreden ateşli hastalıklar	++
Hepatit	++
İmmün yetmezliği olan konakta görülen şiddetli hastalıklar (pnömoni, hepatit vb.)	++
Malignensi ve lenfoproliferatif lezyonlar	+
Kronik yorgunluk sendromu	+
Diğer hastalıklar (Kikuchi hastalığı vb.)	+

1. PRİMER ENFEKSİYON

Primer HHV-6 enfeksiyonu, virusun ekzojen olarak kazanılması sonucu seronegatif kişilerde görülen klinik tablodur ve genellikle asemptomatik seyirlidir. En yaygın şekilde doğumdan 3-6 ay sonra maternal antikörlerin kaybolması sonucu gelişir.

Çocuklarda primer HHV-6 enfeksiyonu ile birlikte görülen en yaygın klinik tablo ekzantem subitumdur. Bu hastalık roseola infantum veya 6. hastalık olarakta bilinmektedir. Ekzantem subitum, HHV-6' nın etkeni olduğu doğrulanmış tek hastalıktır. Ekzantem subitumlu çocuklarda yapılan çalışmalarda, bu hastaların periferik kanlarından sıklıkla HHV-6 B varyantı izole edilmiş ve serokonversiyonu gösterilmiştir ^{80 - 83}.

Hastalık; spesifik olmayan prodrom belirtilerini takiben 40 °C' yi aşan yüksek ateş, rubelliform döküntü, yumuşak damak ve uvulada eritemli papüller (Nagayama 's spotları), fontanel şişkinliği, konvülsiyon, ishal, öksürük, gözkapığı ödemi, servikal lenfadenopati, periferik kanda lenfositosis ve nötropeni ile karakterizedir.

Lenfositler, plazmositoid sitoplazmalı atipik lenfoblastlardır, nötropeni immünsüpresyonu düşündürecek düzeyde değildir. Hastalığın genel olarak prognozu iyidir ve spontan iyileşme gösterir^{84 - 86}. Bununla birlikte ekzantem subitum sırasında veya sonrasında görülen, febril konvülziyonlar ve nörolojik komplikasyonlardan (ensefalomiyelit, anormal EEG, anormal BOS analizi ve nörolojik sekellerden) HHV-6 sorumlu tutulmaktadır. Virusun primer enfeksiyon sonrasında BOS' na geçerek latent kalabileceği ve reaktivasyon ile konvülziyonlara yol açabileceğide ileri sürülen görüşler arasındadır^{87, 88}.

Sağlıklı yetişkinlerde primer enfeksiyon nadir görülür ve normal çocukluk dönemine göre daha ağır seyreder. Semptomlar genel olarak uzamış lenfoadenopati, EBV ve CMV ile ilişkisiz heterofil antijen negatif enfeksiyöz mononükleozis benzeri sendrom ve fulminan hepatit şeklindedir⁸⁹.

2 . SEKONDER ENFEKSİYON:

Sekonder enfeksiyon ya endojen olarak latent enfeksiyonun aktive olması yada daha önceden immünite kazanmış kişilerde virusun ekzojen olarak yeniden alınması sonucu gelişen tablodur.

Vücutta latent halde bulunan virus; fizyolojik, patolojik, iyatrojenik, gebelik, malignite, transplantasyon, immünsüpresif tedavi gibi çeşitli etkenlerle tekrar aktive olabilir. Sağlıklı kişilerde IgM antikorlarının sıklıkla saptanması, bağışık bireylerde sık görülen reaktivasyon veya virusun yeni bir suşu ile reinfeksiyonu düşündürmektedir.

Sekonder enfeksiyon latent hale gelmedikçe veya kazanılmış tam bir immünite varsa önemli bir tablo oluşturmaz. Klinik semptom ve bulgular primer enfeksiyona göre daha hafiftir ve genellikle asemptomatiktir. Ancak immün sistemi baskılanmış bireylerde, primer enfeksiyon gibi sekonder enfeksiyonda da semptomatik veya ağır patoloji ile seyreden klinik hastalıklar görülebilmektedir .

HHV-6' nın reaktivasyon veya reenfeksiyona bağlı olarak pek çok klinik tablo ile ilişkili olduğu ileri sũrũlmektedir. Kronik yorgunluk sendromu, kronik kemik iliği supresyonu, hemofagositik sendrom ⁹⁰, pnũmoni, bũbrek transplantasyonu yapılan hastalarda allograft reddi ^{91, 92}, kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda gũrũlen " graft versus host " reaksiyonuna ikincil pnũmoni ⁹³⁻⁹⁶, Sjũgren sendromu, Afrika tipi Burkitt lenfoma, Kawasaki hastalığı, tiroidit, romatoid artrit, Crohn hastalığı, Kaposi sarkomu, Gullain-Barre sendromu, multipl skleroz ve Parkinson hastalığı gibi. pek çok klinik tablo ile birliktelik gũsterdiđine dair olgu raporları bulunmaktadır. Ancak bu hastalıkların hişbirinde etiyolojik ilişki henũz kesin olarak doğrulanmamıştır. Bu birlikteliklerin bazılarının, hũcresel immũn yetmezliğin ikincil HHV-6 reaktivasyonuna bağlı olabileceği ileri sũrũlmũřtũr ^{97, 98}.

HHV-6' nın HIV enfeksiyonundaki rolũ henũz araştırma safhasındadır. Her iki virusunda CD+4 T hũcre lenfotropizm gũstermesi, HHV-6' nın HIV enfeksiyonlarının ilerlemesinde bir kofaktũr olabileceğini dũřũndũrmũřtũr. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise bu hastalığın ileri safhalarında yaygın HHV-6 enfeksiyonu gũsterilmiřtir ⁹⁹⁻¹⁰⁵. Tũm bunlara ilaveten, immũn yetmezliği olan hastalarda EBV ve CMV' e benzer şekilde primer HHV-6 enfeksiyonu, latent HHV-6 reaktivasyonu ve litik HHV-6 enfeksiyonu gũzlenmiřtir ^{106,107}.

HHV-6 İLE İLİŞKİLİ LENFOPROLİFERATİF HASTALIK VE LENFOMALAR

HHV-6, lenfotropik bir virus olduğu için lenfadenopati ile seyreden hastalıklarda serolojik olarak kanda ve hastalıklı dokularda varlığı araştırılmaktadır. HHV-6 antikorlarının yũksek prevalansı AIDS' le ilişkili veya ilişkisiz nodal Hodgkin lenfoma; AIDS ile ilişkili veya ilişkisiz nodal veya ektranodal B ve T hũcreli non-Hodgkin lenfoma; reaktif lenfadenit; sinũs histiyozis; histiyositik nekrotizan lenfadenit (Kikuchi hastalığı);

lenfoproliferatif hastalıklar; akut ve kronik lenfositik lösemi, Sjögren sendrom, Hodgkin ve non - Hodgkin lenfoma, Afrika tipi Burkitt lenfoma, akut ve kronik lösemi ve sarkodiyozlu hastaların serumlarında tesbit edilmiştir. Tüm bunlara rağmen, günümüzde HHV-6' nın herhangi bir kanser tablosu ile direkt ilişkili olduğunu gösteren kesin deliller mevcut değildir ^{108 -111}.

T hücreli lenfoproliferatif hastalık ve lenfomalardan, nodal ve ekstra nodal T hücreli non Hodgkin lenfoma ve anjiyoimmünoblastik lenfadenopati ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. T hücre hastalıklarında HHV-6 enfeksiyonu veya reaktivasyonunun, hastalığı modifiye edebileceği ve progresyonunu hızlandırabileceği düşünülmektedir. T hücreli lenfomalarda virusun patogenetik rolü belirsizdir ¹¹. HHV-6' nın normal T hücrelerini enfekte ederek, T hücre fonksiyonunu baskılayabileceği ve immünsüpresyona yol açabileceği, bu yolla malign klonun hızlı büyümesine ve yayılmasına neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bunun dışında yapılan çalışmalarda EBV ile enfekte hücrelerin HHV-6 ile enfeksiyonunun, EBV gen ekspresyonunu arttırdığı ve EBV replikasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. HHV-6' nın, EBV ile ilişkili lenfoproliferatif hastalık ve lenfomalarda progresyonu hızlandırarak patogenetik bir rol oynadığı düşünülmektedir ⁷.

PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

Yüksek seroprevalans nedeni ile yeni doğan bebeklerin çoğunda HHV-6' ya karşı maternal antikolar vardır ve bu dönemde primer enfeksiyon nadir olarak görülür. Maternal antikoların azalması ile birlikte 6-12 aydan itibaren primer enfeksiyon olasılığı artar ¹¹²⁻¹¹⁴.

CD +4 T lenfositleri virusun predominant olarak hedef aldığı hücreler olmasına rağmen, virusun bu hücrelere bağlandığı reseptörler henüz tanımlanmamıştır. Ekzantem subitum ve heterofil negatif mononükleozis gibi akut hastalıklarda direkt viral sitolizisin etkili olduğu

düşünülmektedir. Ancak virusun vücuda girdikten sonra bir viremi oluşturduğu ve bu yolla tüm vücuda yayıldığı bilinen gerçekler arasındadır.

CMV enfeksiyonlarında olduğu gibi, HHV-6 enfeksiyonlarında da patojenez yönünden 3 önemli nokta gözönünde bulundurulmaktadır :

- Dolaşan antikörlerin varlığında virus hücreden hücreye yayılabilir. Hücreden serbestleşen virus, β_2 mikroglobülini absorbe eder. β_2 mikroglobülin, virusun antijenik bölgelerini maskeleyerek onu antikor nötralizasyonundan korur.
- Virus, konakçıda latent olarak kalabilir. Özellikle mononükleer lökositlerde gizlenerek böbrek ve kemik iliği gibi organ ve dokularda latent olarak kalır.
- İmmünsüpresyon durumlarında reaktive olur.

HHV-6' nın kendisinde CD+4 T lenfositlerini azaltarak CD4 / CD8 oranında düşme ve lenfosit fonksiyonlarında bozulmaya yol açarak immünsüpresyona neden olabileceğide ileri sürülen görüşler arasındadır.

Primer HHV-6 enfeksiyonu sırasında, diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi hümmoral immün cevap görülmektedir. Vireminin kaybolması ile birlikte virus spesifik nötralizan antikörler oluşmaktadır. IgM türü nötralizan antikörler klinik belirtilerin görülmesinden sonraki 5-6 gün içinde kanda tesbit edilebilir düzeye gelmekte, 2-3 haftada en yüksek düzeyine ulaştıktan sonra, genel olarak 2 ay içinde kaybolmakta ve reaktivasyon sonucu yeniden ortaya çıkabilmektedirler. Yetişkinlerin yaklaşık olarak % 5' inin herhangi bir zamanda HHV-6 ile IgM pozitif olduğu tesbit edilmiştir. Fakat bunun tetikleyici faktörünün ne olduğu henüz tam olarak aydınlanmamıştır. IgG antikörleri hastalığın ateşli dönemini takiben 7-10 gün sonra oluşmaktadır ve yıllarca tesbit edilebilir düzeyde vücutta kalmaktadır. Reaktivasyon durumlarında ise bu antikörlerin düzeyleri daha

yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda HHV-6 enfeksiyonlarında spesifik IgA yanıtı gösterilmemiştir¹¹⁵.

HHV-6 enfeksiyonlarında oluşan hümmoral immün cevaba rağmen latent virusun reaktivasyonu ve tükrükten uzun süre salınımı yüksek antikor titreleri ile önlenememekte hatta birbiri ile ilişkili bulunmaktadır. Dolayısıyla HHV-6 enfeksiyonlarında hümmesen immünitenin daha büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Hümmesen immünitenin baskılandığı durumlarda örneğin kemoterapi alanlarda, immümsüpresif ve ya sitotoksik ilaç kullananlarda HHV-6 reaktivasyonu sıklıkla bildirilmektedir. Böbrek transplantasyonu sonrasında görülen antikor titresindeki artış, viremi, virusun başta kan olmak üzere kemik iliği, bronkoalveolar ve oral lavaj örneklerinden izole edilmesi, AIDS'li hastalarda HHV-6 'nın çeşitli dokulara yayılması, HHV-6' nın hümmesen bağışıklığın baskısından kurtularak aktif hale geçtiğine işaret etmektedir.

Akut ateşli faz sırasında IFN- α düzeyinde artış, ayrıca periferal kan mononükleer hümmre kültürlerinde IL-1 β ve TNF- α gibi çözünmür sitokinlerin varlığı gösterilmesine rağmen, HHV-6 enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında hümmesen immünitenin rolü hakkındaki pek çok soru henüz aydınlanmamıştır. IFN- α , TNF- α ve IL-1 β gibi çözünmür faktörlerin oluşturulması, IL-2 ekspresyonun inhibisyonu ve lenfosit, monosit, makrofajlar ve kemik iliği prekürsör hümmre populasyonlarının üremelerinin sümmesyonu gibi, HHV-6' nın in vitro etkileri ile in vivo enfeksiyonun biyolojik ilişkileri bugün tanımlanmayı bekleyen konuları arasında yer almaktadır^{116, 117}.

TANI

Primer HHV-6 enfeksiyonları genel olarak belirtisiz veya nonspesifik enfeksiyon bulguları ile seyrettiği için klinik tanı pratik önem taşımamaktadır. Ayrıca virus normal koşullarda seropozitif sağlıklı bireylerin tükrük, kan ve diğere bir çok bölgelerinde latent olarak

bulunduğu için, hastalardan etkenin izole edilmesi her zaman mevcut klinik belirti ve bulgular ile birlikte değerlendirilmemektedir. Ancak son yıllarda organ transplantasyonu, AIDS ve çeşitli malignitelerden dolayı immünsüpresif bireylerin sayısı gittikçe artmaktadır. HHV-6' nın bu hasta gruplarında ağır klinik tablolar oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle tedavi takibinin yapılması ve gerekli önlemlerin zamanında alınması bakımından, hızlı ve kesin tanı bu aşamada oldukça önem kazanmaktadır⁴².

Günümüzde ayırıcı tanı için kullanılan laboratuvar yöntemlerini:

- Virus izolasyonu ve kültürü
- Serolojik yöntemler
- Biyomoleküler yöntemler

olmak üzere üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

VİRUS İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ

Virus izolasyonunda kan, tükürük, BOS, idrar, serebrospinal sıvı başta olmak üzere çeşitli vücut sıvıları veya doku biyopsi örnekleri kullanılmaktadır¹¹⁸⁻¹²⁰.

Klinik örneklerden virusun izolasyonu için kullanılan en duyarlı hücreler, göbek kord kanı veya sağlıklı yetişkinlerden elde edilen mitojen (fitohemaglutinin, IL-2) ile uyarılmış mononükleer hücrelerdir. Hücre kültürlerinde virusun üremesi intranükleer veya intrasitoplazmik granüllerin varlığı ve hücrelerin büyük refraktil hale gelmesi ile karakterizedir^{121, 122}. Ayrıca hücre transformasyon aktivitesi ile ilişkili olarak, hücre kültürlerinde transforme olmuş odaklar gösterilmiştir.

Primer lenfosit kültürlerinde izolasyon referans yöntem olmasına rağmen, aktif HHV-6 enfeksiyonları için kullanım alanı sınırlıdır. Ekzantem subitumun akut fazında virus %90' dan daha fazla oranda izole edilirken, reaktivasyon durumlarında çok fazla başarılı olmadığı gözlenmiştir¹²³.

SEROLOJİK TESTLER

HHV-6 enfeksiyonlarının tanısında viral kültür kesin yöntem olmasına rağmen, sonuç için birkaç hafta beklenilmesi gerekmektedir ⁴². Enfekte edilmiş hücrelerde veya klinik örneklerde viral antijenlerin veya genomunun gösterilmesi ise erken tanı olanağı sağladığı gibi kültür yönteminide desteklemektedir.

Serolojik yöntemler hastalığın tanısından ziyade daha çok epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.

Primer HHV-6 enfeksiyonlarında HHV-6 spesifik IgM antikorları 5-7 gün içerisinde saptanabilir düzeydedir, fakat çoğu kültür pozitif çocuklarda saptanabilir IgM antikor yanıtı her zaman gözlenememektedir. Ayrıca sağlıklı yetişkinlerin % 5' inde IgM antikorlarının herhangi bir zamanda pozitif olması, bu antikorların klinik olguların tanısında tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. HHV-6 IgG antikorları vücutta uzun süre kaldıkları için daha çok seropozitifliğin gösterilmesi bakımından değer taşımaktadırlar. Ancak reaktivasyon veya reenfeksiyon durumlarında IgM antikorları yeniden ortaya çıkmakta ve IgG antikor düzeyinde önemli artışlar kaydedilmektedir. Bu nedenle, bu antikorlar HHV-6 reaktivasyon veya reenfeksiyonlarında önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadırlar ^{7,8,17,37,42,43,77}.

HHV-6 enfeksiyonlarının serolojik tanısında ;

- Enzim - linked immunosorbent assay
- Kompleman birleşmesi testi
- Nötralizasyon testi
- İndirekt hemaglütinasyon testi
- İmmun Floresan Antikor testi
- Radioimmunoassay
- Fotometrik partikül aglütinasyon testi
- Westernblotting

gibi teknikler geliştirilmişse de seroepidemiolojik çalışmalarda, daha çok IFA ve ELISA yöntemleri kullanılmaktadır.

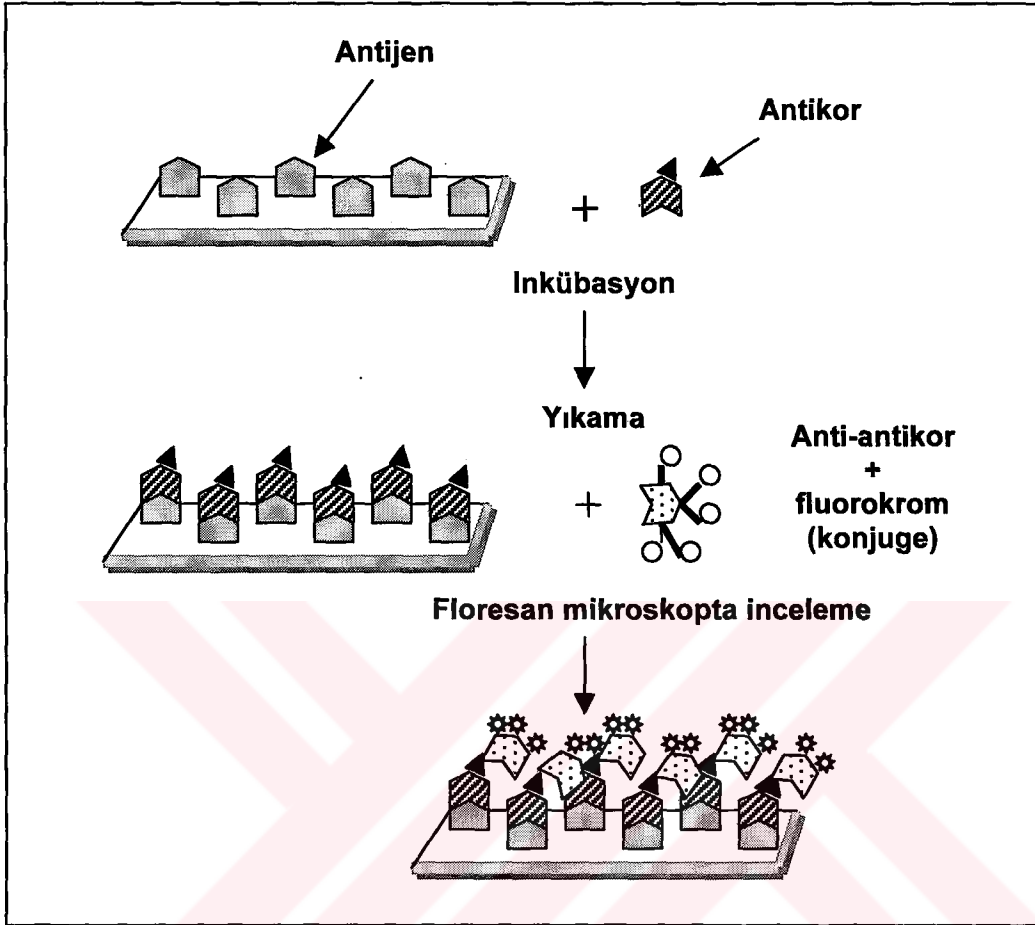
IFA yöntemin duyarlılığı ELISA testine göre daha zayıf olmakla birlikte özgüllüğü daha yüksek bulunmuştur¹²⁴⁻¹²⁹.

İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR TEKNİĞİ

İmmünfloresan teknikleri, mikroorganizmaların çabuk identifikasyonu, kanda antikorların saptanması, kanda T ve B lenfositlerinin identifikasyonu gibi pratik önem taşıyan birçok alanda başarı ile kullanılan antijen-antikor tanısına dayalı yöntemlerdir. Sadece floresan mikroskoba ihtiyaç gösteren bu teknikler yüksek spesifiteye sahiptir. Bu test, ilk izolasyonundan günümüze kadar HHV-6 enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılmıştır^{127,128}.

Testin temel prensibi, özel lamlarda fikse edilmiş enfekte hücreler veya etkene özgül saflaştırılmış antijenlerin, hasta serumunda bulunan antikorlarla birleştikten sonra ortama ilave edilen floresanlı anti-insan globulin ile bağlanarak floresan vermesi esasına dayanmaktadır (Şekil 2).

Bu yöntemin başarısı alınan örneğin kalitesine, hazırlanan preparatın temizliğine, kullanılan antiserumun özgüllüğüne ve değerlendiren kişinin tecrübesine bağlıdır¹³⁰⁻¹³³. Sonuçların kısa sürede alınması nedeni ile tercih edilmektedir. Dezavantajları kültür tekniklerine göre daha az duyarlı olması, enfekte hücre tabakalarının kullanılması ve spesifik nükleer floresanın nonspesifik sitoplazmik floresandan kolay ayrılmamasıdır.



Şekil 2 : İndirekt immünfloresan antikor tekniği.

HHV-6 ile enfekte hücrelerde IgG moleküllerine karşı Fc reseptörü taşıyan sitoplazmik inklüzyonlar olduğu için, IgG antikorlarının saptanması sırasında, yalnızca çekirdek içi inklüzyonların floresanının değerlendirilmesi gerekir. Bu reseptörler, IgG'ye non spesifik olarak bağlanırlar ve HHV-6 antikorunu içermeyen serum ile yalancı pozitif floresans verirler. Ayrıca IgM antikorlarının saptanması sırasında romatoid antikor komplekslerine bağlı olarak özgül olmayan yalancı pozitif sonuçlar alınabilmektedir .

IFA yönteminin, HHV-6 enfeksiyonlarında özellikle pediatrik popülasyonun epidemiyolojik çalışmalarında önemli bir yeri olmuştur ^{34-38,73,74,97}. Test sırasında yapılan işlemlerin pratikliği, az

miktarda hasta serumunun kullanılması ve kısa sürede sonuç alınması IFA testinin yaygın olarak kullanılabilirliğini sağlamıştır.

Antikor tarama testleri epidemiyolojik çalışmalarda kesin değerlere sahip olmakla birlikte, klinik kullanımları sınırlıdır. Ayrıca duyarlılık ve özgüllükleri test sırasında kullanılan reagenlere bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntemler ile HHV-6A ve HHV-6B varyantları arasındaki ayırım çapraz reaksiyonlar nedeni ile güvenli bir şekilde yapılamamaktadır. Günümüzde varyant spesifik tanı için geliştirilmiş herhangi bir serolojik yöntem bulunmamaktadır.

Son yıllarda teknolojik gelişmelere paralel olarak HHV-6 enfeksiyonlarının tanısında çok daha duyarlı yöntemler kullanıma girmiştir. Bu amaçla DNA hibridizasyonu ve PCR gibi, biyomoleküler yöntemler pek çok laboratuvarında rutin amaçlı testler olarak kullanılmaktadır^{26,28,56, 66,72}.

PCR

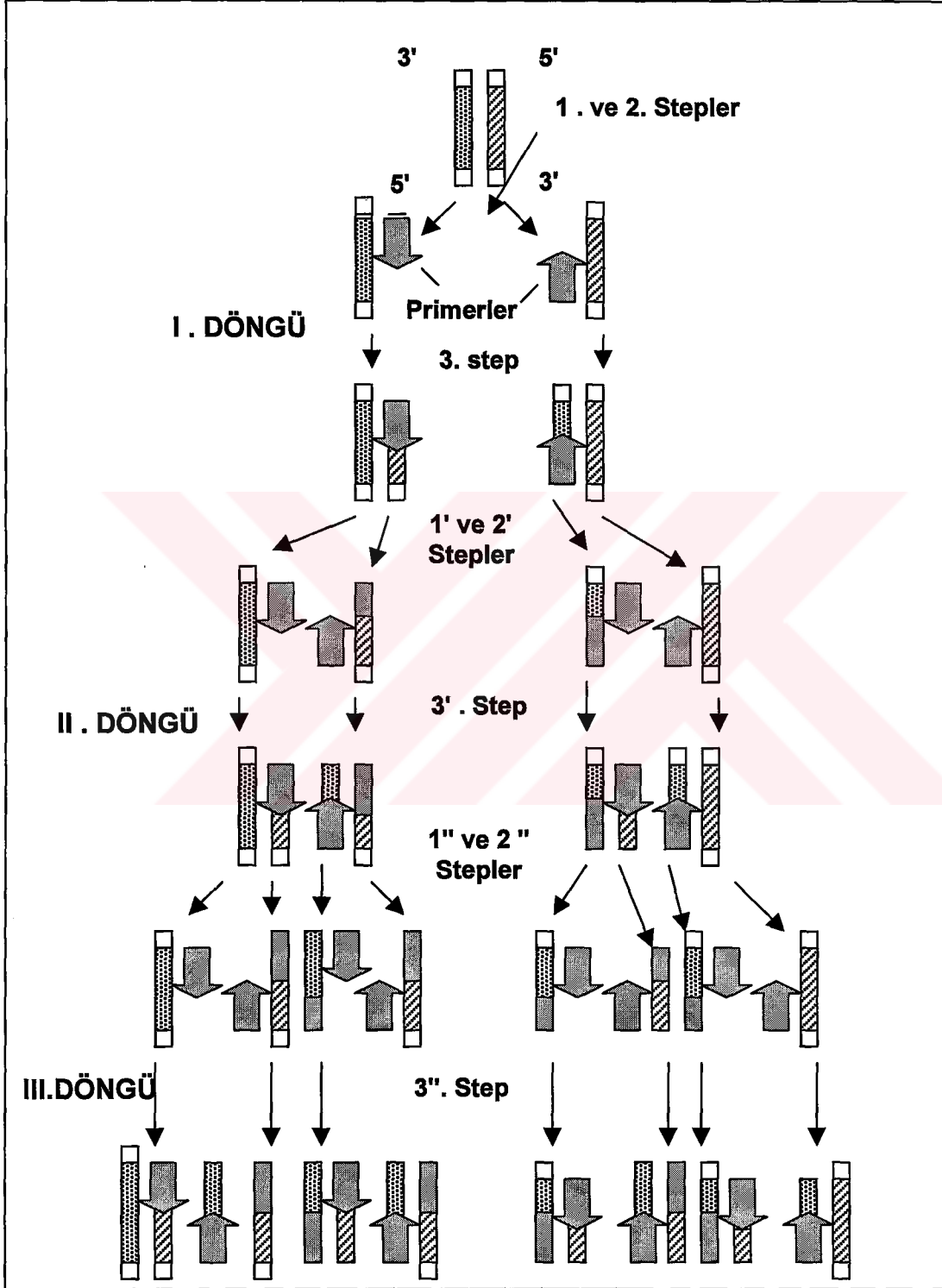
PCR ,1987 yılında Kary Mullis tarafından tanımlanmış, in vitro DNA çoğaltma yöntemidir. Bu yöntem hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonunun bir tüp içinde taklit edilmesi esasına dayanmaktadır. PCR ile DNA' nın çoğaltılabilmesi için reaksiyon karışımında çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA' da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp, ona bağlanacak olan DNA primerleri; primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz; sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar; polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle tris ve KCl) ve enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg⁺⁺ iyonları gerekmektedir.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. İlk basamak denatürasyondur. 94 ° C' ye ısıtılan DNA' nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir

(annealing) . Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50 ile 70 °C arasında değişmektedir. Üçüncü basamak polimerizasyon veya sentez aşamasıdır. Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72 °C' ye getirildiğinde, primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri 3' ucuna kalıp DNA' ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılmış olur (Şekil 3). Çoğaltılan DNA parçalarının gösterilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezidir. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışığı altında izlenir.

PCR yöntemi ile ortamda birkaç DNA kopyası bile olsa, hedef gen birkaç saat içinde 10^6 kat arttırılabilmektedir. Bu nedenle kısa sürede sonuç vermesi bakımından diğer tanı yöntemlerine göre daha üstündür. PCR protokolleri arasındaki farklılık, değişik primerlerin seçilmesinden kaynaklanmaktadır. Doğru primerler seçildiğinde duyarlılık %100 dür. PCR yöntemi için etkenin mutlaka canlı olması gerekmemektedir ^{134,135,136,137}.

PCR' ın en önemli kullanım alanlarından birisi enfeksiyon hastalıklarının tanısıdır. Bu yöntem özellikle mikroskobik inceleme ile saptanması ve kültürde üretilmesi zor ya da imkansız mikroorganizmaların (viruslar, geç üreyen mikobakteri gibi bazı bakteri türleri, çeşitli mantar ve parazitlerin) erken, duyarlı ve özgül tanısında son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.



Şekil 3 : Polimeraz zincir reaksiyonu.

Günümüzde PCR reaksiyonu ile çoğaltılan DNA dizileri spesifik enzimler aracılığı ile kesilerek bu etkene ait genotiplendirmeler yapmak mümkündür. Bu amaçla kullanılan RFLP testi, yüksek yinelenebilirlik özelliği ve kesin sonuçları ile genotiplendirmede sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP)

Rekombinat DNA araştırmaları için temel bir araç olan restriksiyon endonükleazlar, özgül baz dizilerini tanıyarak çift sarmallı DNA' yı spesifik bölgelerinden kesen enzimlerdir. DNA' dan genin ve ya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin ve spesifik fonksiyon gösterirler. Bu enzimlerin moleküler biyolojide RFLP analizi , southern blot analizi ve prob hazırlanması gibi bir çok kullanım alanları vardır. Restriksiyon endonükleaz enzimler Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere başlıca üç gruba ayrılmıştır.

Tip I ve Tip III endonükleazlar, DNA' da spesifik baz dizilerini tanımalarına rağmen, kesme işlemini başka baz sıralarından yaparlar. Bu nedenle bu enzimler gen manüplasyonlarında hatalara neden oldukları için tercih edilmemektedirler.

Tip II endonükleazları ise tanıma ve kesme yönünden daha spesifiktirler ve moleküler biyolojik çalışmalarda amaca yönelik seçilerek kullanılırlar. Bunlar DNA' da kısa nükleotid dizilerini tanıyarak çift iplikli DNA' yı özgül bölgelerinden keserler. Tanıma bölgeleri genellikle 4 - 7 nükleotidlik ikili simetri gösteren diziler olup, kesme işlemi sonrasında iki yapışkan uç meydana getirirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 600' den fazla Tip II restriksiyon enzimi tanımlanmıştır^{138,139,140}.

HHV-6 enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan restriksiyon enzimleri elde edildikleri mikroorganizma ve tanıdıkları baz dizilerine göre Tablo3' de gösterilmiştir.

Tablo 3 : Restriksiyon endonükleaz enzimleri ¹³⁸.

Mikroorganizma	Simge	Dizi
Haemophilus influenzae	Hind III	5'....A♦AGCTT 3' 3'...TTCGA♦ A.....5'
Haemophilus influenzae	Hinf I	5'G ♦ ANTC3' 3'...CTNA ♦G 5'
Thermus aquaticus	Taq I	5'T♦CGA3' 3'...AGC♦T 5'
Esherichia coli	Eco R I	5'G♦AATTC3' 3'...CTTAA♦G5'

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. MATERYAL

1.1. Kullanılan Cihaz Listesi

1. DNA Thermal Cycler (PTC- 100; MJ Research, USA)
2. Elektroforez tankı ve güç kaynağı (E714; Consort, Belgium)
3. UV transillüminatörlü bilgisayarlı jel dökümentasyon sistemi
(UVP- Grabit 2.0, USA)
4. Mikrosantrifüj (DT 024; Nüve, Türkiye)
5. Soğutmalı santrifüj (Universal 16R, USA)
6. pH metre (F12; Horiba, Japan)
7. Vortex (G560E; Scientific Industries, USA)
8. Derin dondurucu (-20 ve -70 ° C)(MDF-U5410; Sanyo, Japan)
9. Buzdolabı (+4 ° C)(T 4042; Arçelik, Türkiye)
10. Manyetik karıştırıcı (MK 103; Nüvemix, Türkiye)
11. Etüv (EN 500; Nüve ,Türkiye)
12. Otoklav (MLS 3020U; Sanyo, Japan)
13. Hassas terazi (PB 153; Mettler Toledo, Switzerland)
14. Floresan mikroskop (BH2-RFCA; Olympus, Japan)
15. Polaroid fotoğraf makinesi (C-35AD-Ç; Olympus, Japan)
16. Steril laminar akımlı güvenlik kabini (Laminar hood; Biological Safety
Cabinets, Class II Type A / B 3, Nuair, USA)
17. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201, Japan) .
18. Otomatik pipet (Transferpipet) 2 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl
(Eppendorf Reference, Germany)

1.2. Kullanılan Gereç Listesi

1. Steril pipet ucu 2 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl
(Eppendorf Reference, Germany)
2. Eppendorf tüp (1,5 ml)
(Eppendorf Reference, Germany)
3. Steril PCR tüpü (0.2 ml) ince duvarlı, Rnase-Dnase free (Biozym)
4. Vacutainer jelli serum ayırma tüpü (16 x 100 mm)
(Beckton Dickinson, UK)
5. Vacutainer EDTA' lı tüp (16 x 100 mm)
(Beckton Dickinson, UK)
6. 5 ml' lik plastik enjektör (Tıbset A.Ş, Türkiye)
7. Latex muayene eldiveni (Altop A.Ş, Türkiye)

1.3. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

1. HHV-6 IgG IFA Kit (V3 HHV6; Biotrin, Ireland)
2. HHV-6 Ig M IFA Kit (V17 HHV6 ; Biotrin, Ireland)
3. DNA Pürifikasyon Kiti (MC 85200 ; Epicentre Technologies, USA)
4. RF Kiti (Lateks Aglutinasyon; Shield, England)
5. Hind III (ER0501; Fermentas, Lithuania)
6. Hae III QX 174 DNA (D0672; Sigma, USA)
7. Taq DNA Polymerase (Q82250N; Epicentre Technologies, USA)
8. 10X PCR Buffer (Q7260B ; Epicentre Technologies, USA)
9. 25 mM MgCl₂ (FB4250; Epicentre Technologies, USA)
10. Primer 5 - 10 OD (43 baz) (Operon Technologies, USA)
11. 25 mM d NTP set (D59104; Epicentre Technologies, USA)
12. Agarose (High resolution, Ultrapure grade) (A8455; Sigma, USA)
13. Ethidium bromide (E7637; Sigma, USA)
14. Asetik asit (A6283; Sigma, USA)
15. Etil alkol (Sigma ; USA)

16. İsopropil alkol (I9516; Sigma, USA)
17. Etyhlenediaminetetraasetic acid disodium dihydrate(EDTA),Titriplex III (E4884; Sigma,USA)
18. Orange G (O3756; Sigma, USA)
19. Sodyum hidroksit (S8045; Sigma,USA)
20. Trisma-base (T 1503; Sigma, USA)
21. PCR reaksiyonu için pozitif kontrol Dr. Toshiomi Okuno (Osaka Üniversitesi, Japonya) tarafından sağlandı.

1.4. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

1. 0.5 M EDTA çözeltisi (pH : 8)

186.1 gr EDTA

20 gr NaOH

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

2. 50 x TAE (Tris - Asetik asit- EDTA çözeltisi)

242 gr Tris-baz

57,1 ml Asetik asit

100 ml 0.5 M EDTA, pH= 8

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3. 1x TAE

10 ml 50 x TAE

Distile su ile 500 ml ' ye tamamlanır.

4. Yükleme tamponu

3ml gliserol

25 mg Orange G

7 ml distile suda çözülür.

5. Etidyum bromür stok çözeltisi

10 mg Etidyum Bromür
1 ml distile suda çözülür.

6. Etidyum bromür jel boyama çözeltisi

Etidyum bromür stok çözeltisi (10 mg / ml)	50µl
Distile su	300ml

(Çözelti, kapaklı plastik kutuda hazırlanarak oda ısısında saklandı.
En çok 10 jel boyamasında kullanıldıktan sonra yenilendi.)

1.5. Kullanılan Klinik Örnekler

Çalışma kapsamında, 57 sağlıklı yetişkin (15-50 yaş) , 66 sağlıklı çocuk (0-14 yaş) ve lenfoproliferatif bozukluğu olan (lösemi, lenfoma vb.) 50 kanserli hasta olmak üzere toplam 173 örnek incelendi. Çalışma grubunda yer alan 0-50 yaş grubu tüm sağlıklı populasyon hematolojik tablosu laboratuvar bulguları ile normal sınırlarda olduğu doğrulanmış gönüllü kişiler arasından seçildi. Kanserli hastalar, Sağlık Bakanlığı Demetevler Onkoloji Hastanesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji servislerinde onkolojik tanısı hematolojik, radyolojik ve patolojik bulgular ile doğrulanmış, hasta gruplarından seçildi.

YÖNTEMLER

KAN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Periferik venden 2 ml antikoagülanlı (EDTA' lı) ve 5 ml antikoagülanlı (EDTA' sız) kan örneği alındı. PCR testi için kullanılacak olan antikoagülanlı kanlardan DNA saflaştırıldıktan sonra, saflık kontrolü yapılarak örnekler çalışma gününe kadar -20 ° C' de saklandı.

IFA yöntemi ile serolojik inceleme için alınan antikoagülansız kan örnekleri ise oda sıcaklığında 1-2 saat bekletildikten sonra 3000 x g ' de 10 dk santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Her kişi için çift serum örneği alınıp, serumlar çalışma gününe kadar -70 ° C' de saklandı.

DNA 'NIN SAFLAŞTIRILMASI

DNA' nın saflaştırılması için Epicentre Technologies' nin DNA pürifikasyon kiti kullanıldı. Bu aşamada kan örneklerine, üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak tam kan örneklerinin lizis protokolü uygulandı. Buna göre :

1. EDTA' lı tüpe alınan kan örneğinden, 200µl alınarak mikrosantrifüj (ependorf tüp) tüpe transfer edildi.
2. Bunun üzerine 600 µl eritrosit eritme çözeltisi (Red Cell Lysis Solution) ilave edildi. Tüp 2-3 defa alt -üst edilerek karıştırıldı. Materyalin tam süspansiyonu için tüpün alt kısmına parmakla hafifçe birkaç defa fiske vuruldu.
3. Tüp oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra, vortekslendi. Aynı işlem bir defa daha tekrarlandı.
4. Tüp 25 sn 10000 x g' de santrifüj edildi.
5. Tüpün içinde 25 µl sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı, vortekslendi.
6. Beyaz kan hücreleri 300µl doku ve hücre eritme çözeltisi(Tissue and Cell Lysis Solutionu)' inde süspanse edildi
7. Tüpe 1µl RNase A (5 µg / µl) ilave edildi ve vortekslendi.
8. 37 ° C' de 30 dk inkübe edildi.
9. Bu süre sonunda tüp 3-5 dk buz içinde bekletildi.
10. Doku ve hücreleri eritilmiş 300µl örneğin üzerine, 150µl protein presipitasyon çözeltisi (MPC Protein Precipitation Solution) ilave edildi. 10 sn hızlı bir şekilde vortekslendi.
11. Tüp 10 dk $\geq 10,000$ x g' de santrifüjlendi.

12. Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi ve çökelti atıldı.
13. Süpernatanta 500 µl isopropanol ilave edildikten sonra, tüp en az 30-40 defa alt -üst edilerek materyalin karışması sağlandı.
14. 4 ° C' de $\geq 10,000 \times g$ de 10 dk santrifüj edildi.
15. Çökelti DNA kaldırılmadan isopropanol dikkatli bir şekilde döküldü.
16. Tüp %75 etanolle çökelti kaldırılmadan pipet vasıtası ile iki defa çalkalandı ve bu işlem sonrasında etanolün tamamı alındı.
17. Tüpün dip kısmında bulunan çökelti DNA, 35 µl TE (Tris -EDTA) tamponu ile süspanse edildikten sonra, çalışma gününe kadar -20 ° C 'de saklandı.

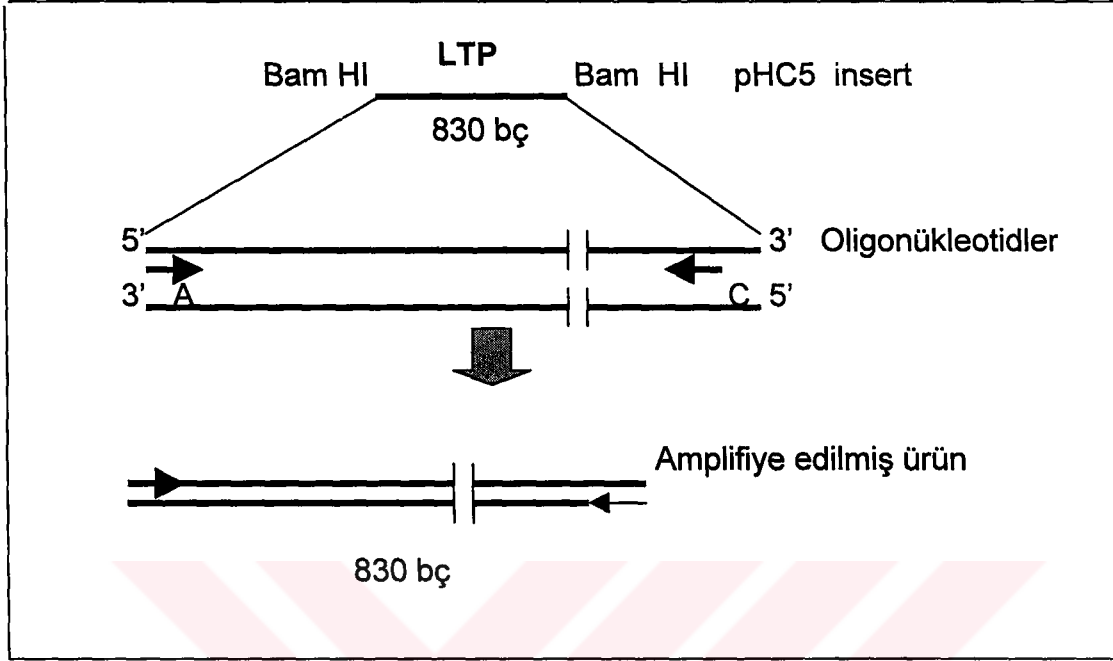
DNA MİKTARININ SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE ÖLÇÜLMESİ

Yukarıda anlatılan yöntemle ekstrakte edilen 35 µl DNA örneği 20 kat seyreltilerek spektrofotometrede miktarı ölçüldü. DNA derişimini belirlemek için 260 nm dalga boyundaki optik dansitite, DNA' nın saflığını belirlemek için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik dansititelerin oranları (260 / 280) kullanıldı. Bu oranın 1.8 olması DNA' nın saflığını, 1.8' den düşük olması protein kontaminasyonunu, 1.8 den yüksek olması ise RNA kontaminasyonunu düşündürdü.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

PCR KARIŞIMININ HAZIRLANMASI

PCR ile HHV-6 DNA' nın amplifikasyonu için viral genom üzerinde, diğer herpes viruslar ile reaksiyon vermeyen ve HHV-6 ' nın genetik olarak değişkenlik gösteren türleri arasında korunmuş LTP (Large tegument protein bölgesi) bölgesinin 830 bç' lik bir sekansı hedef bölge olarak seçildi ^{21, 26,28, 61}.



Şekil 4 : HHV-6 spesifik primer bölgeleri²⁸.

Bunun için,

A : 5' - GAT CCG ACG CCT ACA AAC AC - 3'

C : 5' - CGG TGT CAC ACA GCA TGA ACT CTC -3'

primer dizileri kullanıldı^{21, 28}.

PCR karışımı, her bir örnek için;

- Distile su 25 µl
 - 10 x PCR tamponu 5.1 µl
 - 10 x PCR enhancer 5 µl
 - Mg Cl₂ (25 m M) 4 µl
 - d NTP mix (10 mM) 5µl
 - Her bir primer (20 p mol) 0.5 µl
 - Taq DNA polimeraz (5 U/µl) 0.25 µl
- olacak şekilde hazırlandı.

Bu ana karışımdan tüplere 45' er μ l dağıtıldı ve her tüpe 5 μ l örnek DNA' sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 50 μ l' ye tamamlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanmış ısı döngü (thermo cyler) cihazına yerleştirildi.

PCR uygulamasının her aşamasında kontaminasyonun önlenmesi ve toksik maddelerden korunmak amacıyla eldiven kullanıldı. Tepkime tüplerinin DNA kontaminasyonundan korunması amacıyla; tepkime karışımlarının hazırlanması,örneklerin PCR için hazırlanması, amplifikasyon ve elektroforez aşamaları ayrı odalarda yapıldı. Odalar arasında araç gereç ve kimyasal çözelti alış veriş yapılmadı. Deney sırasında tek kullanımlık pipet uçları ve tüpler kullanıldı. Tepkime karışımlarının hazırlanması ve örneklerin PCR için hazırlanması aşamaları laminar air flow class II kabinlerde gerçekleştirildi. Çalışmadan önce kabinlerin içi ve kullanılan aletler en az yarım saat ultraviyole ile ışınlandı, % 10' luk sodyum hipoklorit ve %70'lik etil alkolle silindi.

Tepkime karışımlarının hazırlanması sırasındaki kontaminasyonları belirlemek için, her bir amplifikasyon setinde HHV-6 DNA pozitif ve ayrıca hiç DNA içermeyen negatif kontroller (tepkime karışımında kalıp DNA ' nın bulunmaması) kullanıldı.

DNA AMPLİFİKASYONU

Amplifikasyon işlemi sırasında , hedef DNA başlangıçta 94 ° C' de 3 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra ;

94 ° C' de 45 sn denatürasyon

62 ° C' de 45 sn primerlerin bağlanması

72 ° C ' de 1.15 sn primerlerden yeni DNA zincirinin sentezlenmesi

olmak üzere toplam 40 döngü yapıldı ²¹. En son aşamada 72 ° C' de 4dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar +4 ° C' de bekletildi.

Birinci amplifikasyondaki değerlendirme sonrasında, negatif sonuç alınan örnekler için aynı amplifikasyon işlemi yeniden tekrarlandı.

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

AGARUZ JELİN HAZIRLANMASI

Amplifikasyondan sonra amplifiye ürünlerin değerlendirilmesi için % 1.5' luk agaroz jel hazırlandı ²⁶. Agaroz jel elektroforezi sırasında yürütme tamponu olarak TAE tamponu kullanıldı. Agaroz bu tampon içerisinde eritildikten sonra, 60 ° C' ye soğutularak hazırlanan yatay jel tablasına döküldü. 5 mm kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektroforez tarağı takılarak, jelin tamamen katılaşması için 30 dk beklendi. Bu süre sonunda tarağın jele zarar vermeden çıkartılması sağlandı.

ELEKTROFOREZ İŞLEMİ

Jel, elektroforez tankına, delikli kısmı katoda gelecek biçimde yerleştirildi. Ve tampon solüsyonu jelin en az 1 mm üstünde olacak şekilde tankın içine eklendi. Elde edilen DNA' ların yoğunluklarını arttırmak, boyamak ve jeldeki ilerleme hızını görmek amacı ile 10µl çoğaltılmış DNA örneği, 5µl yükleme tamponu (orange G + gliserol) ile karıştırılıp, 15µl alınarak jele yüklendi. Tankın kapağı kapatılarak, elektrodla doğru akım veren güç kaynağı bağlandı ve hareketin anota doğru olup olmadığı kontrol edildi. Amplifiye edilen DNA örnekleri 110 voltta 40 dk elektroforez işlemine tabii tutuldu.

BOYAMA VE GÖRÜNTÜLEME İŞLEMİ

Boyama işleminde floresan boya olan etidyum bromür kullanıldı. Jel, 20 dk 0.5 mg / ml etidyum bromürlü boyama çözeltisi içinde bekletildi. Boyama işleminden sonra jel, bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu üzerine yerleştirildi. Ve jel içinde bulunan boyanmış DNA' lar bilgisayarlı jel dökümantasyon sistemi aracılığı ile görüntülendi.

ÇOĞALTILMIŞ DNA' LARIN RESTRIKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMLERİ İLE ANALİZİ

PCR reaksiyonu sonucu pozitif örneklerin agaroz jelde görünür bandlarında tiplendirme yapmak için, restriksiyon endonükleaz enzim analizi uygulandı. Her hastaya ait amplifikasyon ürünü, Hind III enzimi ile kesildi ^{16, 21, 28, 27, 98}. Kesim işlemi için:

- | | |
|-------------------------|-------|
| • Enzim (Hind III) | 2 µl |
| • EnzimTamponu (10 x) | 5 µl |
| • Amplifiye ürün | 20 µl |
| • Distile su | 23µl |

50 µl olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı, 37 ° C' de bir gece inkübe edildi.

Kesim ürünleri için %2' lik agaroz jel hazırlandı. 10 µl kesilmiş örnekler ve aynı hastaların kesilmemiş örnekleri 5 µl yükleme tamponu ile beraber jeldeki kuyucuklara yüklendi. 110 voltta 40 dk yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV - transillüminatör ile incelendi.

İNDİREKT İMMÜNİFLORESAN ANTİKOR TESTİ

HHV-6 spesifik Ig G ve Ig M yapısındaki antikorlar, Biotrin firmasından temin edilen HHV-6 IgG (V3 HHV6) ve HHV-6 IgM (V17 HHV6) IFA kitleri kullanılarak araştırıldı. Testin tüm çalışma aşamalarında kit prosedüründe tanımlanan ilke ve standartlara uyuldu. IFA testi üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak aşağıda tanımlandığı gibi yapıldı.

IFA KİT İÇERİĞİ VE HAZIRLANMASI

- 1. HHV-6 antijen substrat lamaları:** 4 x 10 godelidir. HHV-6 GS suşu ile infekte HSB -2 hücreleri ile tesbit edilmiştir.
- 2. Pozitif kontrol:** HHV-6 antikorları içeren pozitif kontrol liyofilize halde olup, 1/ 10 dilüsyonda 1 ml PBS ile sulandırıldı.
- 3. Negatif kontrol:** HHV-6 antikorları içermeyen negatif kontrol liyofilize halde olup, 1/ 10 dilüsyonda 1 ml PBS ile sulandırıldı.
- 4. FITC Konjugat :** Liyofilize halde olup, FITC kaplı anti-goat Ig G ve IgM 2 ml PBS ile sulandırıldı.
- 5. PBS :** Tablet halde olan çözelti bileşimi, 1 litre distile su ile sulandırıldı (pH : 7.5).
- 6. Kaplama çözeltisi (Mounting medium):** 3 ml Tris ile tamponlanmış gliserol (pH : 8.0).
- 7. İnaktivasyon reagent**

TESTİN YAPILIŞI:

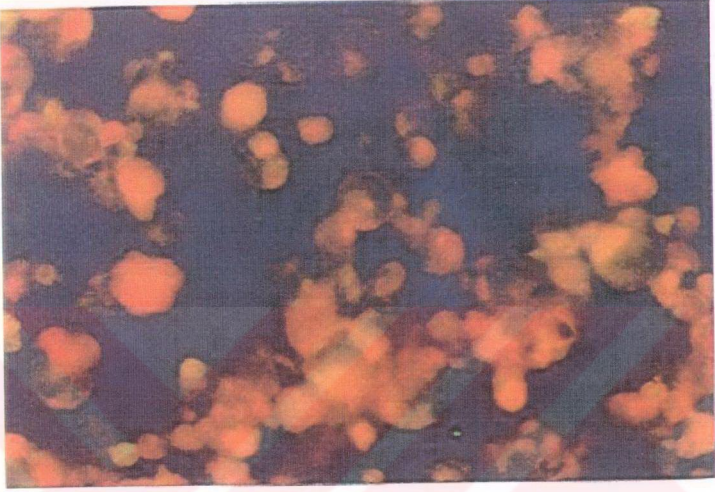
1. Her bir hasta serumu, pozitif ve negatif kontroller, PBS ile IgG antikorları için 1 / 20 ve IgM antikorları için 1 / 40 dilüsyonda olacak şekilde sulandırıldı. Her bir godeye 20 µl dilüe hasta serumu konuldu.
2. IgM antikorları için hazırlanan lamalar nemli ortam oluşturulmuş ağız kapaklı petri kutuları içinde 37 ° C 'de 3 saat, IgG antikorları için hazırlanan lamalar 37 ° C 'de 30 dk inkübe edildi.

3. Daha sonra lamalar özel yıkama kaplarında 10' ar ve 5' er dk olmak üzere PBS ile iki defa yıkandı.
4. Lamlar üzeri godelere değmeyecek şekilde kurutma kağıdı kapatılarak kurutuldu.
5. Her bir godeye 40 µl konjugat konuldu .
6. Lamlar tekrar 37 ° C 'de 30 dk nemli ortamda inkübe edildi.
7. Daha sonra lamalar özel yıkama kaplarında 10' ar ve 5' er dk olmak üzere PBS ile iki defa yıkandı.
8. Lamların üzerine birkaç damla kaplama çözeltisi (mounting medium) konuldu ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatılıp, floresans mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi.

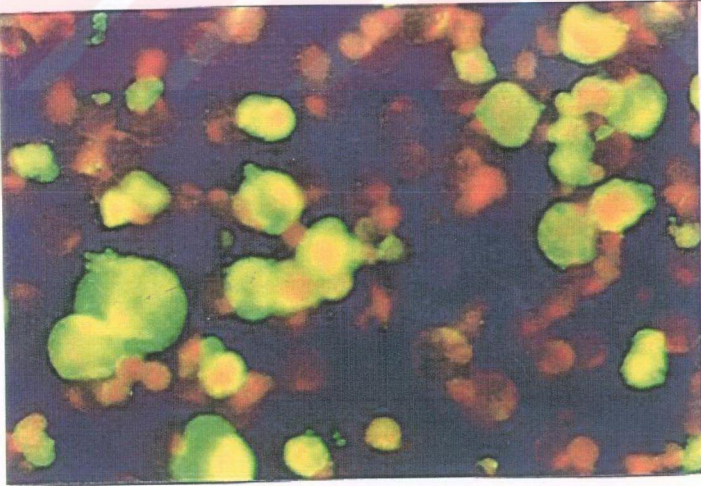
TESTİN OKUMA VE DEĞERLENDİRİLMESİ:

Karanlık odada floresan mikroskopta 200-500Xbüyütmede görüntülerin değerlendirilmesinde, floresan reaksiyonun yoğunluk derecesi temel alındı. Siyah zemin üzerinde yeşil-sarı floresan renk veren hücreler (+) , vermeyen hücreler negatif olarak kabul edildi. Floresan reaksiyonun derecesine göre (+) hücreler :

Çok parlak	++++	
Parlak	+++	
Orta derecede parlak	++	
Zayıf	+	
Floresan renk göstermeyen	-	olarak derecelendirildi.



Resim 1 : HHV-6 antikorlarının IFA testi ile negatif görünümü.



Resim 2 : HHV-6 antikorlarının IFA testi ile pozitif (++++) görünümü.

RF TESTİ:

HHV-6 Ig M pozitif olgularda, yalancı pozitif reaksiyonların olup, olmadığının belirlenmesi amacı ile sıklıkla IgM yalancı pozitifliğine neden olduğu belirtilen romatoid faktör testi yapıldı. Bunun için:

1. Lam üzerine 1 damla hasta serumu ve 1 damla antijen (tavşandan elde edilen koyun eritrositlerine karşı oluşmuş IgM ile kaplı koyun eritrositleri) damlatılarak , bagetle karıştırıldı.
2. 2 dakika bekletildi.
3. Lam 30 derece eğilip,aglutinasyon reaksiyonu olup olmadığına bakıldı.

Reaksiyon görünür aglutinasyon yoksa negatif (8 IU / ml' nin altı), görünür aglutinasyon varsa pozitif (8 IU / ml' nin üstü) olarak kabul edildi.

Negatifliğin doğrulanması amacı ile test süresi sonunda 1 dakika daha beklenildi. Pozitif sonuç veren örnekler tekrar değerlendirildi.

İSTATİSTİK

Tüm istatistiksel değerlendirmeler “ **SPSS (statistical packages for social sciences) for MS Windows Release 5.0**” programı ile bilgisayarda yapıldı. Sağlıklı gruplar arasındaki IgG ve IgM antikörlerinin yaşa ve cinsiyete göre ortalamalarının, sağlıklı ve hasta gruplar arasındaki IgG ve IgM antikor dağılımlarının ve tüm gruplar arasındaki PCR-RFLP sonuçlarının değerlendirilmesinde Students T, Fisher kesin ki-kare testi ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada sağlıklı kişilerde ve lenfoproliferatif bozukluğu olan kanserli hastalarda HHV-6 virusunun seroperevalansını belirlemek için, yaşları 6 ay -50 yaş arasında değişen 123 sağlıklı birey (64 kadın, 59 erkek) ve 50 lenfoproliferatif bozukluğu olan kanserli hasta değerlendirildi.

Bu gruplarda serum örneklerinde HHV-6 spesifik IgG ve IgM antikorlarının varlığı IFA yöntemi ile araştırıldı. Tüm çalışma grubunda HHV-6 IgG ve HHV-6 IgM antikor pozitiflik oranları Tablo 4' te gösterildiği gibi, sırası ile % 87.28 ve % 24.27 olarak bulundu.

Tablo 4 : Tüm çalışma grubunda HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranları.

ÇALIŞMA GRUPLARI	HHV-6 ANTİKORLARI			
	IgG		IgM	
	Pozitif	(%)	Pozitif	(%)
Sağlıklı bireyler	93 / 123	75.60	28 / 123	22.7
Kanserli hastalar	48 / 50	96	14 / 50	28
Toplam	151 / 173	87.28	42 / 173	24.27

Sağlıklı kişilerde HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının yaş gruplarına göre dağılımını belirlemek için, sağlıklı bireyler 6-11 ay, 1-2 yaş, 3-8 yaş, 9-14 yaş, 15-26 yaş, 27-38 yaş ve 39 yaşın üzerindeki olmak üzere 7 gruba ayrıldı.

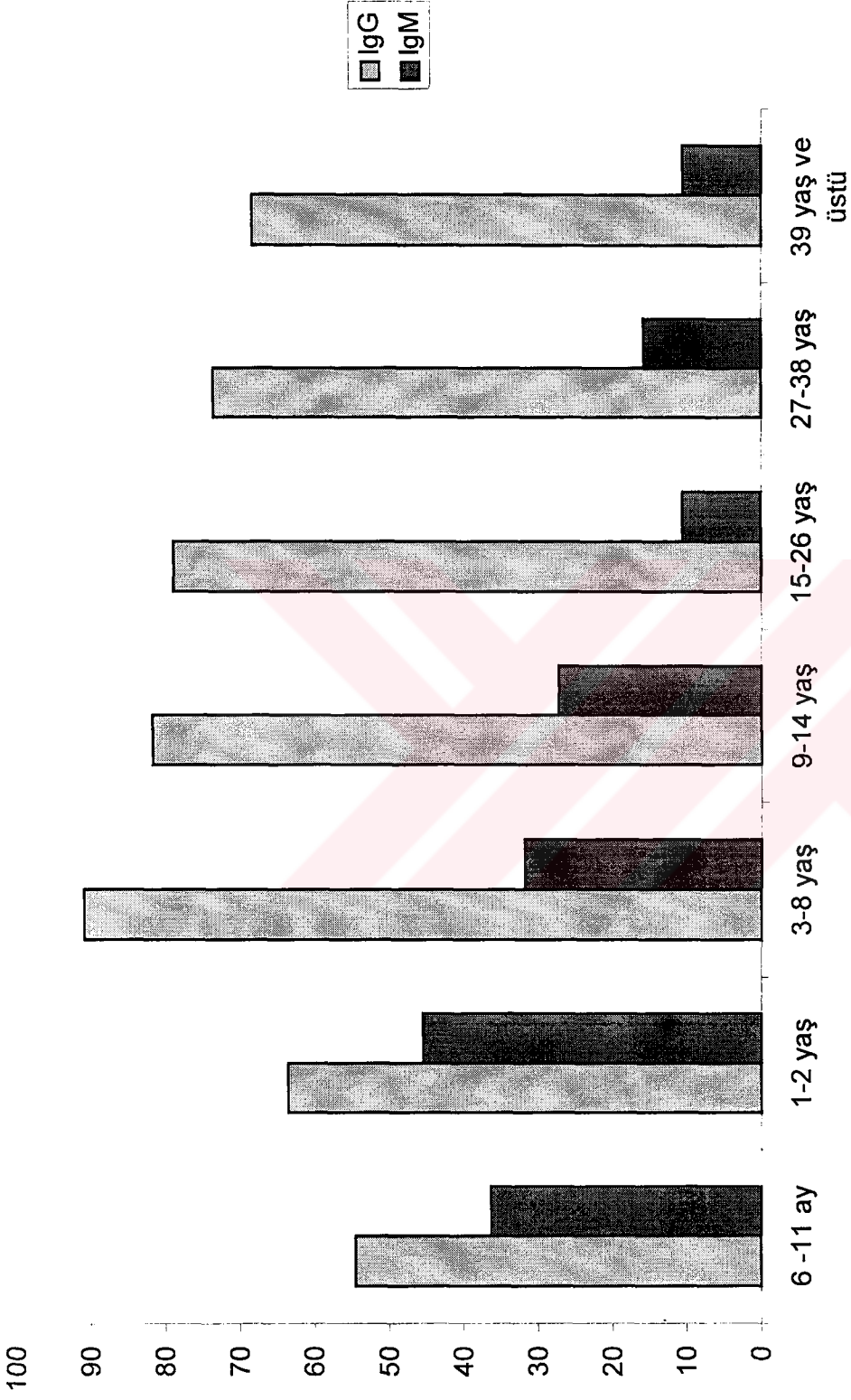
Test edilen 123 serum örneğinin 93' ünde (% 75.60), HHV-6 IgG antikoru pozitif bulundu. Pozitiflik oranının 1-2 yaş grubunda yükselmeye başladığı (% 63.63), 3 - 8 yaş grubunda en yüksek düzeye ulaştığı, yaş ilerledikçe bu oranının kademeli olarak azaldığı tesbit edildi (Tablo 5). Bu antikorların yaş gruplarına göre dağılımı istatistiksel olarak incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

Akut enfeksiyonun göstergesi olan IgM antikorları için, 123 olgunun 28' inden pozitif sonuç alındı. HHV-6 IgM antikor pozitif olan tüm serumlar, RF testi ile yalancı pozitiflik yönünden değerlendirildi. HHV-6 IgM antikor pozitif olan hiç bir örnekte RF pozitif sonuç alınmadı.

6-11 ay ve 1-2 yaş grubunda, HHV-6 IgM pozitiflik oranı sırası ile % 36.36 ve %45.45 olarak bulundu. Bu oranların diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. 9-14 ve 15-26 yaş grubunda IgM pozitiflik oranı bakımından sırası ile % 27.27 ve % 10.52 oranında kademeli bir düşüş gözlenirken, 27-38 yaş grubunda %15.78 ile hafif bir yükselme kaydedildi 39 yaş ve üzeri olan grupta ise bu oran %10.52 olarak tesbit edildi. Tüm yaş grupları arasında IgM antikorlarının dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$), (Tablo 5),(Şekil 5).

Tablo 5 : HHV-6 Ig G ve IgM antikor pozitiflik oranlarının çeşitli yaş gruplarına göre sayı ve yüzde dağılımı

YAŞ GRUPLARI	HHV-6 ANTİKORLARI			
	IgG		IgM	
	Pozitif	(%)	Pozitif	(%)
6 -11 ay	6 / 11	54.54	4 / 11	36.36
1-2 yaş	7 / 11	63.63	5 / 11	45.45
3-8 yaş	20 / 22	90.90	7 / 22	31.81
9-14 yaş	18 / 22	81.81	5 / 22	27.27
15-26 yaş	15 / 19	78.94	2 / 19	10.52
27-38 yaş	14 / 19	73.68	3 / 19	15.78
39 yaş ve üstü	13 / 19	68.42	2 / 19	10.52
Toplam	93 / 123	75.60	28 / 123	22.76



ŞEKİL 5: HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranlarının çeşitli yaş gruplarına göre dağılımı.

Seropozitiflik oranı, tüm yaş gruplarında genel olarak değerlendirildiğinde % 79.67 bulundu. En yüksek oran % 90.90 ile 3-8 yaş grubunda gözlemlendi. Genel antikor prevalansının 15-38 yaş grubundan itibaren 39 yaş dönemine kadar stabil kalıp, bu dönemde düşme eğilimi gösterdiği tesbit edildi (Tablo 6).

Tablo 6: Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 seropozitiflik ve seronegatiflik oranlarının toplam sayı ve yüzde dağılımı.

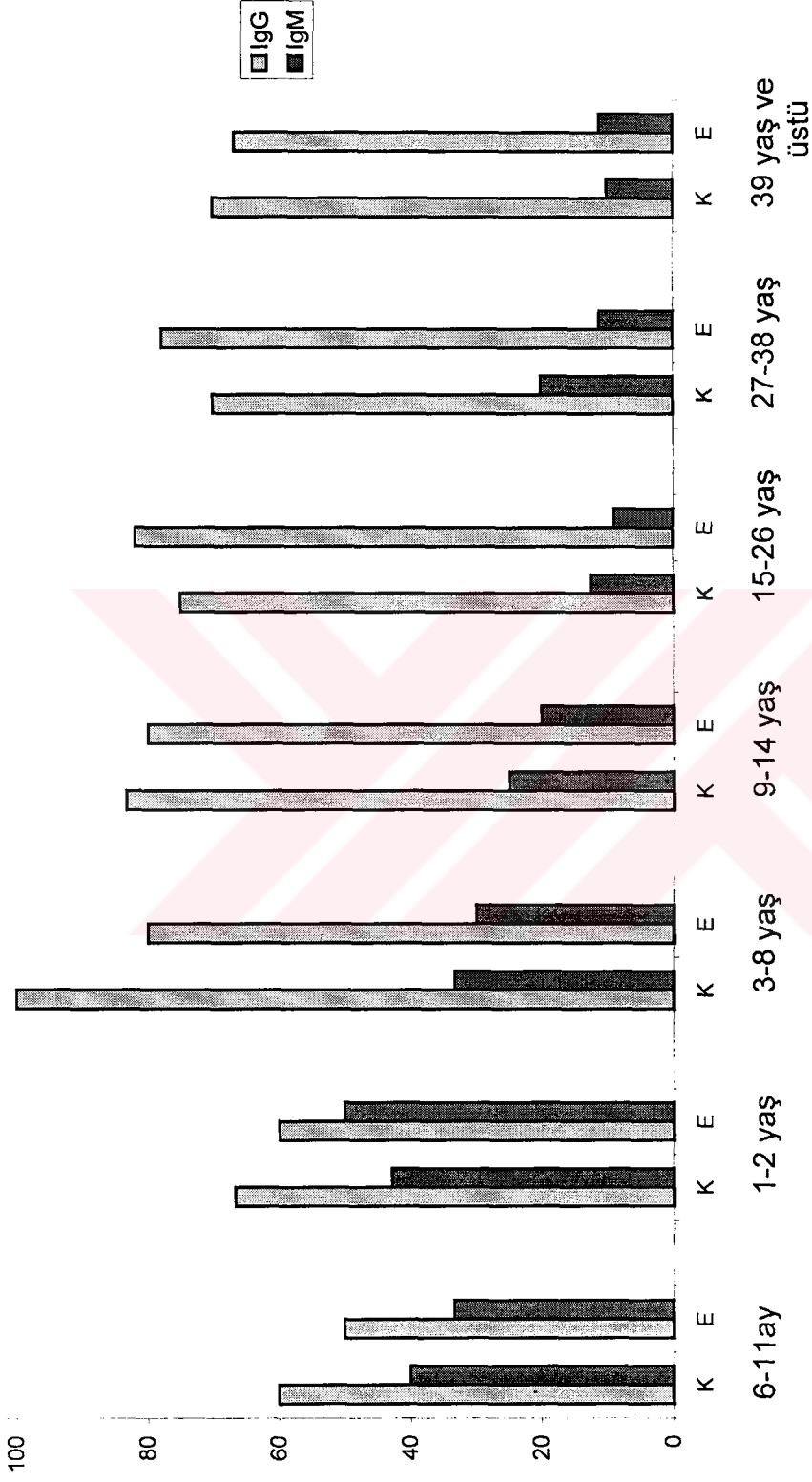
YAŞ GRUPLARI	HHV-6 ANTİKOR PREVALANSI			
	Seropozitif ^a		Seronegatif ^b	
	n	(%)	n	(%)
6 -11 ay	8 / 11	72.72	3 / 11	27.27
1-2 yaş	9 / 11	81.81	2 / 11	18.18
3-8 yaş	20 / 22	90.90	2 / 22	9.09
9-14 yaş	18 / 22	81.81	4 / 22	18.18
15-26 yaş	15 / 19	78.94	4 / 19	21.05
27-38 yaş	15 / 19	78.94	4 / 19	21.05
39 yaş ve üstü	13 / 19	68.42	6 / 19	31.57
Toplam	98 / 123	79.67	25 / 123	20.32

a: IgG veya IgM pozitif serumlar, **b:** IgG veya IgM negatif serumlar

Çalışmaya alınan bireylerin HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranları, aynı zamanda cinsiyet ayrımına göre değerlendirildi. Her iki cinsten HHV-6 IgG ve IgM antikorları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$), (Tablo 7, Şekil 6).

Tablo 7 : Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının cinsiyete göre sayı ve yüzde dağılımı.

YAŞ GRUPLARI	CİNS	HHV-6 ANTİKORLARI	
		IgG	IgM
		Pozitif %	Pozitif %
6-11ay	K	60	40
	E	50	33.33
1-2yaş	K	66.66	42.85
	E	60	50
3-8 yaş	K	100	33.33
	E	80	30
9-14yaş	K	83.33	25
	E	80	20
15-26 yaş	K	75	12.5
	E	81.81	9.09
27-38 yaş	K	70	20
	E	77.77	11.11
39 yaş ve üstü	K	70	10
	E	66.66	11.11
Toplam		75.60	22.76



ŞEKİL 6: Çeşitli yaş gruplarında HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının cinsiyete göre dağılımı.

KANSERLİ HASTALARDA HHV-6 AKTİVASYONUN SEROLOJİK BULGULARI

Kanserli hastalarda HHV-6 aktivasyonunu ve buna bağlı olarak HHV-6' ya karşı özgül antikorların artışını saptamak amacı ile yaşları 18 - 61 yaş arasında değişen 11 NHL, 12 HL, 12 ALL, 7 MM, 6 ML, 2 KML olmak üzere toplam 50 lenfoproliferatif bozukluğu olan kanser hasta değerlendirildi.

Değerlendirme aşamasında, yaş ve cinsiyetleri çalışma grubuna uyan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak kullanıldı. IgM pozitif olan tüm serumlar, RF testi ile yalancı pozitiflik yönünden test edildi. Bu test ile pozitif sonuç alınan 3 hastanın HHV-6 IgM antikoru negatif kabul edildi (Tablo 8).

Tablo 8: Kanserli hastalarda HHV-6 IgG ve IgM antikorlarının sayı ve yüzde dağılımı.

OLGU	HHV-6 ANTİKORLARI			
	IgG		IgM	
	Pozitif	%	Pozitif	%
Sağlıklı Yetişkin				
15-26 yaş	15 / 19	78.94	2 / 19	10.52
27-38 yaş	14 / 19	73.68	3 / 19	15.78
39 yaş ve üstü	13 / 19	68.42	2 / 19	10.52
Toplam	42 / 57	73.68	7 / 57	12.28
Kanserli Hastalar				
HL	12 / 12	100	4 / 12	33.33
NHL	11 / 11	100	3 / 11	27.27
ALL	11 / 12	91.66	4 / 12	33.33
ML	5 / 6	83.33	1 / 6	16.66
MM	7 / 7	100	2 / 7	28.57
KML	2 / 2	100	- / 2	0
Toplam	48 / 50	96	14 / 50	28

İstatistiksel olarak kontrol grubu ve hasta grubu birbiri ile karşılaştırıldığında, IgM antikor pozitifliği bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bununla birlikte IgG pozitifliği bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.0001$).

IgG pozitifliği yönünden hasta grupları ve sağlıklı kişiler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

SAĞLIKLI BİREYLERDE VE KANSERLİ HASTALARDA PCR - RFLP SONUÇLARI İLE İLGİLİ BULGULAR

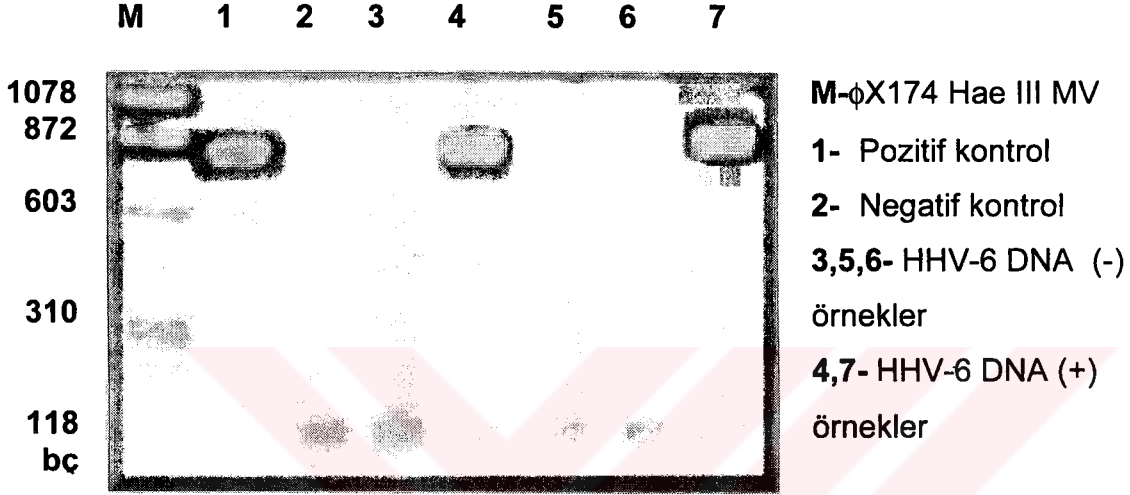
Bu çalışmada, sağlıklı bireyler ve kanserli hastalara ait 173 kan örneğinde, HHV-6 DNA' nın tanısı, PCR ile yapıldı. HHV-6 DNA, incelenen 173 örneğin 67' sinde (+), 106' sında (-) olarak bulundu. Pozitiflik oranı, çalışma gruplarına göre değerlendirildiğinde; Sağlıklı bireylerde 123 örneğin 44' ünün, hasta grubunda 50 örneğin 23' ünün PCR (+) olduğu gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 9 : Sağlıklı bireylerde ve kanserli hastalarda PCR sonuçları.

OLGU	PCR			
	Pozitif	%	Negatif	%
Sağlıklı Çocuk	25 / 66	37.87	41 / 66	62.13
Sağlıklı Yetişkin	19 / 57	33.33	38 / 57	66.67
Onkoloji	23 / 50	46	27 / 50	54
Toplam	67 / 173	38.72	106 / 173	61.28

PCR yöntemi ile amplifiye edilen örneklerin, HHV-6 DNA bakımında (+) veya (-) olarak değerlendirmesi, agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

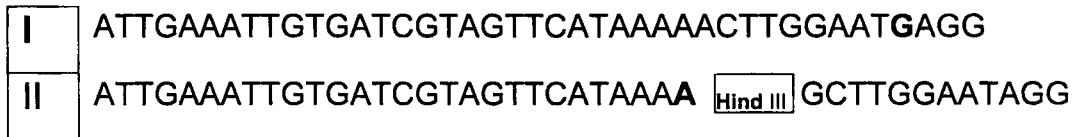
Agaroz jel elektroforezinde, 830 bç' lik bir bölgede bir bantın gözlenmesi PCR (+), 830 bç' lik bir bölgede bir bantın gözlenmemesi ise PCR (-) olarak değerlendirildi (Resim 3).



Resim 3 : Klinik örneklerde HHV-6 DNA 'nın amplifikasyonu.

PCR POZİTİF ÖRNEKLERDE RFLP ANALİZİ İLE VARYANT DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

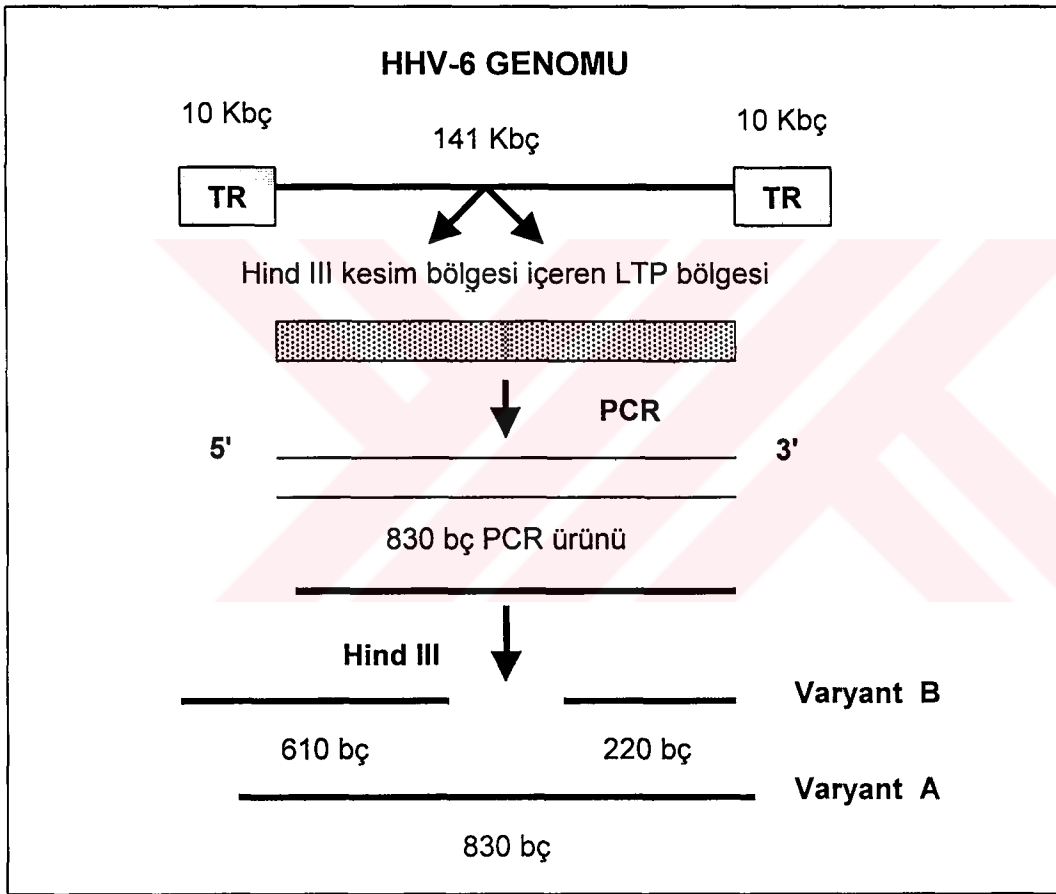
PCR yöntemiyle HHV-6 (+) olan örneklerde HHV-6 varyantlarını belirlemek için : HHV-6 LTP kodlayan genin 830 bç' lik bölgesinde spesifik kesim yeri olan, Hind III restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimin kesim yerine ait palindromik bölgedeki nükleotid dizileri ve kesim yerleri şöyledir:



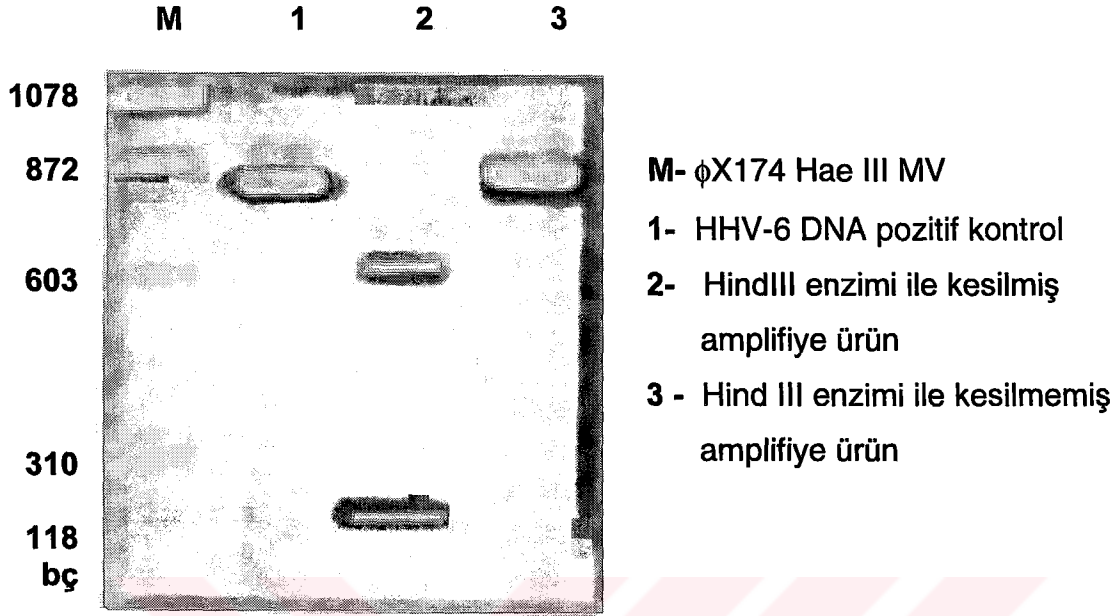
Şekil 7 : Varyant A (SIE suşu) ve varyant B (HST suşu)' dan amplifiye edilen HHV-6 DNA' ların kısmi nükleotid sekansları.

I: SIE suşu' na ait sekanslar II: HST suşu' na ait sekanslar

PCR (+) olan toplam 67 örnek Hind III, enzimi ile kesildi. 830 bç'lik bölge, izolatların bir kısmında ile 610 bç ve 220 bç olmak üzere 2 fragmente ayrıldı. Diğer bir grup izolatta ise Hind III ile herhangi bir kesim bölgesi ayırt edilmedi. Literatüre göre, Hind III ile kesilen izolatlar varyant B, kesilmeyen izolatlar varyant A olarak kabul edildi ²⁸ (Resim 4), (Şekil 7).



Şekil 8 : HHV-6 spesifik 830 bç'lik PCR ürününün Hind III enzimi ile kesilmesi.



Resim 4 : PCR pozitif örneklerin Hind III enzimi ile kesimi.

Sağlıklı bireylerde ve lenfoproliferatif hastalığı olan kanserli hastalarda PCR pozitif örneklerin HindIII enzimi ile kesim sonrasındaki varyant dağılımı Tablo 10' da gösterilmiştir.

RFLP analizi sonucunda tüm çalışma gruplarında varyant B % 74.62 oranla varyant A (% 25.37)' ya göre daha fazla sıklıkla tesbit edildi. Çalışmada sağlıklı çocuk ve yetişkinler arasında varyant türü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Sağlıklı yetişkin popülasyon ve kanserli hastalar birbiri ile karşılaştırıldığında, her iki grupta varyant B türünün daha yaygın olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. ($p > 0.05$).

Çalışmamızda örnek sayısı az olduğu için, kanserli hasta grupları arasında istatistiksel karşılaştırma yapılamadı.

Tablo 10 : Sağlıklı bireylerde ve kanserli hastalarda HHV-6 varyant dağılımı.

OLGU	HHV-6 DNA		HHV-6 VARYANLARI			
			A		B	
			Pozitif	%	Pozitif	%
Sağlıklı Çocuk	25 / 66	37.8	6 / 25	24	19 / 25	76
Sağlıklı Yetişkin	19 / 57	33.3	4 / 19	21.05	15 / 19	78.94
Toplam	44 / 123	35.77	10 / 44	22.72	34 / 44	77.27
Kanserli Hastalar						
HL	6 / 12	50	2 / 6	33	4 / 6	66.66
NHL	7 / 11	63.6	2 / 7	28.57	5 / 7	71.42
ALL	5 / 12	41.6	2 / 5	40	3 / 5	60
ML	1 / 6	16.6	- / 1	-	1 / 1	100
MM	4 / 7	57.2	1 / 4	25	3 / 4	75
KML	- / 2	0	-	-	-	-
Toplam	23 / 50	46	7 / 23	30.43	16 / 23	69.56
Genel Toplam	67 / 173	38.72	17 / 67	25.37	50 / 67	74.62

TARTIŞMA

Tüm dünyada yaygın olarak bulunan HHV-6; coğrafi, etnik ve hijyenik koşullara, bireyin immün durumuna ve yaşına bağlı olarak prevalansı gittikçe artan enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Sağlıklı bireylerdeki seropozitiflik oranı, popülasyondan popülasyona değişmekle beraber %80-100 arasındadır. Ülkelerin sosyoekonomik durumları ile virusun dağılımı arasında yakın bir ilişki vardır. Ekonomik ve hijyenik koşulları yetersiz olan toplumlarda enfeksiyonun daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Avustralya, Avrupa ve Kuzey Amerika' da bu oran, Afrika ve Güneydoğu Asya gibi gelişmemiş bölgelerdekine göre daha düşük düzeydedir ^{73, 75, 76, 125}.

Ranger ve ark. 1991 yılında Afrika, Amerika ve Avrupa kıtalarını içine alacak şekilde 11 farklı ülkede, sağlıklı yetişkin popülasyon ve hamile kadınlardan topladıkları 550 serum örneğinde HHV-6 IgG antikor prevalansını IFA testi ile değerlendirmişler; seropozitiflik oranını Morokko' da % 20, Sub - Saharan Afrika' da %60-90, Ekvator' da %92, Martinique' de %50, Fransa' da %76 olarak bulmuşlardır ⁶.

Japonyada sağlıklı çocuk ve yetişkinlerde yapılan benzer bir çalışmada ise 325 serum örneğinde IgG antikor prevalansı IFA testi ile bütün yaş gruplarında % 85 -100 olarak bulunmuştur. Bu oran Amerika' da %72.5 - 80, İngiltere' de %44 - 90, Almanya' da % 52 - 80 olarak bildirilmiştir ⁵.

Yurdumuzda HHV-6 enfeksiyonlarının seroprevalansı ile ilişkili henüz detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle toplumumuzda HHV-6 antikor bulunma sıklığını ve yaşlara göre dağılımını araştırmak için sunulan çalışma planlanmıştır. 123 sağlıklı bireyden toplanan serum örneklerinde yapılan bu çalışmada IgG ve IgM antikorları IFA testiyle değerlendirilmiş, HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranı sırası ile

% 75.60 ve %22.76, genel seropozitivite oranı % 79.67 olarak bulunmuştur.

HHV-6 enfeksiyonları ile ilgili, bir çok ülkeden çeşitli araştırmacılar gerek seroepidemiolojik olarak gerekse immünsüpresyonu olan riskli gruplarda HHV-6 antikor düzeylerini araştıran çalışmalar yapmışlardır. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, doğumdan sonra maternal antikorların kaybolmasını takiben primer enfeksiyonun 6.aydan itibaren kazanıldığı, 1 - 3 yaşına kadar olan dönemde çocukların büyük bir çoğunluğunun enfekte olduğu ve enfeksiyonun genel olarak erken çocukluk döneminde kazanıldığı gerçeği ortaya çıkarılmıştır. Yetişkin popülasyonlarda antikor prevalansı ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda yaşa bağlı olarak antikor seropozitifliğinde düşüş kaydedilirken, bazılarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranı yaş gruplarına göre değerlendirilmiş, 0-6 ay yaş grubu anneden geçen maternal antikorlar nedeni ile çalışma kapsamına alınmamıştır. 6 - 11 ay yaş grubunda, HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranları %54.54 ve % 36.36 olarak bulunmuştur. IgG antikorları için saptanan bu değer yaş grupları içerisindeki en düşük orandır. Literatürlere göre bu dönem, maternal antikorların azalması veya kaybolmasını takiben primer enfeksiyonunun yeni kazanıldığı dönemdir ^{1, 2, 4, 75}. 1-2 yaş grubunda, HHV-6 IgG ve IgM antikor pozitiflik oranları sırası ile % 63.63 ve %45.45 olarak bulunmuştur. IgM antikor oranlarının, diğer yaş gruplarına göre bu yaş gruplarında yüksek düzeyde olması, primer enfeksiyonun bu dönemde kazanılmaya başladığı olasılığını güçlendirmektedir.

3-8 yaş grubu genel olarak çocukların kalabalık ortamlarla temaslarının arttığı dönem olup, çalışmamızda HHV-6 IgG oranı %90.90 ile yaş grupları içinde saptanan en yüksek orandır. Bununla birlikte bu yaş grubunda HHV-6 IgM (% 31.81) antikor düzeyinde hafif bir düşüş kaydedilmiştir. Bu değerler primer HHV-6 enfeksiyonunun, 3 - 8 yaş grubuna kadar olan dönemde yoğun bir şekilde kazanıldığını

göstermektedir. HHV-6 IgG antikor pozitiflik oranı, 9-14 yaş grubundan (% 81.81) itibaren sonraki yaş gruplarında kademeli olarak azalmıştır. Benzer şekilde HHV-6 IgM antikorlarında da kademeli düşüş gözlenirken, 27-38 yaş grubunda % 15.78 ile hafif bir yükselme kaydedilmiştir. Bu durum bu yaş grubunda reenfeksiyon veya reaktivasyon olasılığını düşündürmüştür.

Çeşitli yaş gruplarından elde edilen tüm bulgular, diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de HHV-6 enfeksiyonlarının oldukça yaygın olduğunu ve enfeksiyonun çoğunlukla erken çocukluk döneminde kazanıldığını açıkça göstermektedir.

Bulgularımız , HHV-6 enfeksiyonlarının yaş gruplarına göre bağımlı bir dağılım gösterdiğini vurgulayan Levy ^{1.}, Okuno ^{2.}, Asano ^{4.}, Yanagi ^{5.}, Brown ⁷⁵ ve ark. nin yaptıkları çalışmalar ile de uyumlu bulunmuştur .

Çalışmamızda kadınlar ve erkekler arasında HHV-6 seropozitivitesi yönünden tüm yaş gruplarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum HHV-6 enfeksiyonlarının yayılımında cinsiyetin önemli olmadığını düşündürmektedir. Briggs ve arkadaşlarının 93 serum örneğini IFA tesiti ile değerlendirdikleri çalışmalarında seropozitivite oranını, erkeklerde 24 / 52 (%46), kadınlarda 25 / 41(% 61) olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada cinsiyetler arasında seropozitivite yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark kaydedilmemiştir ⁷⁶. Bizim çalışmamızda da kadınlar ve erkekler arasında seropozitivite yönünden benzer sonuçlar alınmıştır.

Tüm herpes grubu virüslerde olduğu gibi, HHV-6' da genellikle asemptomatik olarak konağa girdikten sonra, özellikle CD+4 T lenfositlerine afinitesi nedeniyle bu hücrelerde çoğalmakta ve büyük bir olasılıkla yine aynı hücrelerde latent olarak kalmaktadır. HHV-6, in vitro olarak hücrelerde transformasyona yol açtığı için diğer herpesviruslar gibi, potensiyel bir onkojen virus olduğu kabul edilmektedir. Ancak in vivo olarak insanlardaki onkojenitesi hakkındaki deliller oldukça

azdır ve risk faktörleri tam olarak tanımlanmamıştır. Buna karşılık, kanserli hastalar pek çok yoldan HHV-6 ile infekte olabilirler. Kan ve organ nakli, HHV-6 için bir enfeksiyon nedeni olabileceği gibi, gerek doğal gerekse kullanılan kemoterapötiklerin ve radyoterapinin yol açtığı immüsupresyon sonucunda oluşan HHV-6 reaktivasyonlarında ikinci bir enfeksiyon kaynağını oluşturabileceği düşünülmektedir ^{96, 97}.

Kanserli hastalarda kemoterapi uygulaması ile birlikte ortaya çıkan immüsupresyon, genellikle vücutta latent halde bulunan etkenlerin aktive olmasına neden olmaktadır. Bu şekilde gelişen enfeksiyonlarda asıl antikor cevabı olan IgG natüründeki antikorlar ani olarak yükselmektedir. Buna karşılık her bir reenfeksiyon ve reaktivasyonda gelişen IgM cevabı, ilk karşılaşmalardaki düzeylerde olup, lineer bir artış göstermemektedir ^{7, 8, 89, 91, 125}.

Malignitelerin etiolojisinde HHV-6'nın rolü ile ilgili olarak, en çok HL üzerinde çalışılmıştır. HL'li hastalarda diğer hastalıklar ve kan donörlerine göre daha yüksek seroprevalans ve antikor titresi gösterilmiştir. Viral antijenler ve DNA nekrotize lenfoadenopati ve diğer lenfatik hastalığı olan hastaların lenf nodlarında ve kanlarında tesbit edilmiştir ^{11, 14, 21, 31, 33, 97, 102, 109 -111}.

Bu bilgilerin ışığı altında, biz de çalışmamızda kemoterapi alan veya kemoterapisi tamamlanmış olan 50 kanserli hastadan (11 NHL, 12 HL, 12 ALL, 7 MM, 6 ML, 2 KML) alınan serum örneklerinde HHV-6 enfeksiyonunu, IFA testi ile araştırmayı planladık. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubunda % 73.68 IgG ve % 12.28 IgM pozitifliği saptandı. Hasta grubunda ise bu oranlar sırası ile % 96 ve %28 olarak bulundu. HHV-6 IgG pozitiflik oranının tüm hasta gruplarında yüksek sıklıkta olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu gruplarda HHV-6 IgM antikorlarında kontrol grubuna göre daha fazla olduğu belirlendi. Hasta grupları arasında hastalık türüne göre HHV-6 IgG ve IgM pozitifliği yönünden anlamlı bir fark saptanmadı.

Epidemiyolojik çalışmalarda, serolojik testlerin önemli bir yeri olmasına rağmen bu yöntemler ile henüz tür ayrımını sağlayacak güvenli bir test geliştirilmemiştir. Son yıllarda kullanıma giren PCR yöntemi ile HHV-6 DNA; sağlıklı populasyon, ekzantem subitumlu çocuklar ve çeşitli immünsüprese bireylerin biopsi, tükürük ve periferal kan lenfositlerinde sıklıkla tesbit edilmiş ve RFLP yöntemi ile etkenin türü (HHV-6 A ve ya HHV-6 B) duyarlı bir şekilde belirlenmiştir ^{25, 67} .

Cone ve ark. 20 sağlıklı bireyin tükürük ve periferal kan mononükleer hücrelerinde nested PCR ile HHV-6 DNA' sını araştırmışlar her iki materyalde % 95 oranında PCR pozitif sonuç almışlardır ²⁴ . Aberle ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise 44 sağlıklı yetişkinin tükürük ve periferal kan mononükleer hücrelerinde aynı yöntem ile HHV-6 DNA sırası ile % 95.45 ve % 63.63 oranında pozitif bulunmuştur. Varyant analizi sonucunda ise tüm örneklerde % 99 oranında varyant B türü yaygın olarak gözlenmiştir ²⁰ .

Çalışmamızda sağlıklı bireylerde PCR sonuçları gözönüne alındığında, periferal kan mononükleer hücrelerinde HHV-6 DNA pozitiflik oranı % 35.77 olarak bulunmuştur. Saptadığımız bu oran,diğer literatürlere göre düşük düzeydedir.Bunun nedeni nested PCR yönteminin bizim yöntemimize göre daha duyarlı olmasıdır. PCR ile HHV-6 DNA pozitif örneklerde, RFLP yöntemi ile yapılan varyant analizi sonucunda ise varyant B (% 74.62)' nin, varyant A (% 25.37)' ya göre daha yaygın olduğu gözlenmiştir.

Kanserli hastalarda HHV-6 reaktivasyonu, serolojik yöntemlerin yanısıra hastaların klinik örneklerinde virusa ait nükleik asitlerin saptanması ile de gösterilebilmektedir.

In situ hibridizasyon yöntemi ile yapılan bir çalışmada, HHV-6 sekansları HL ve NHL' li bir kaç olguda %5 -%18 sıklıkla gösterilmiştir. Ancak yine de HL ve NHL gelişiminde HHV-6 , tek başına yeterli bir neden olarak gösterilmemiştir.

Çalışmamızda incelenen 50 kanserli hastanın 23'ünde (% 46) HHV-6 DNA pozitif bulunmuştur. En yüksek pozitivite %63.6 ile NHL olgularında saptanmıştır. Diğer hasta gruplarında bu oran; HL % 50, ALL %41.6, ML % 16.6 ve MM %57.2 olarak tespit edilmiştir. 2 KML hastasından ise negatif sonuç alınmıştır. Çalışmamızda hasta gruplarının sayısı az olduğu için aralarında istatistiksel karşılaştırma yapılamamıştır. Bu nedenle hastaların ve hastalığın türüne göre HHV-6 enfeksiyonlarının durumu hakkında kesin bir kanıya varılamamıştır. Ancak, çalıştığımız hasta sayısı az olmasına rağmen, özellikle NHL, HL ve ALL olgularında saptanan değerler, seroloji sonuçları ile birlikte yorumlandığında, HHV-6 IgG (NHL %100, HL %100, ALL % 91.66) ve HHV-6 IgM (NHL %27.27, HL %33.33, ALL % 33.33) düzeylerinin yüksek olması, kontrol grubu ile hasta grubu arasında genel seropozitiflik ve PCR pozitiflik oranı bakımından anlamlı bir fark bulunması, hastalarda HHV-6 reaktivasyonu olduğunu açıkça göstermektedir.

Tüm çalışma gruplarımızda, RFLP sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, HHV-6 varyant B % 74.62, varyant A türü % 25.37 sıklıkta bulunmuştur. Bu sonuçlara göre diğer çalışmalar ile uyumlu olarak, toplumumuzda varyant B türünün varyant A' ya göre daha yaygın olarak bulunduğunu söylemek mümkündür.

SONUÇ

Toplumlarda yaygın olarak bulunan ve onkojenik potansiyeli olduğu düşünölen HHV-6 virusu oldukça geniş bir araştırma konusu oluşturmaktadır. Sunulan çalışmamız bu konu ile ilgili ilk ve öncü bir çalışmadır. Çalıştığımız populasyon sayı olarak küçük bir grubu kapsamasına rağmen ve IFA tekniğı kullanılarak elde edilen seroloji sonuçları, her ne kadar kalitatif olarak değerlendirilmiş olsa da sağlıklı bireyler ve kanserli hastalarda serum HHV-6 IgG ve IgM antikor prevalansı ile ilgili genel fikir edinilmiştir. Saptadığımız genel antikor pozitiflik oranı (% 79.67), bu virusun toplumumuzda da yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Ancak, Türkiye'de' ki sağlıklı populasyonun gerçek seropozitiflik oranını öğrenebilmek için, tüm coğrafi bölgeleri içeren geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır. PCR sonuçlarının seroloji sonuçları ile uyumlu bulunması PCR' ın HHV-6 enfeksiyonlarını belirlemede güvenilir bir test olacağını göstermektedir. PCR ile koordineli olarak tüm çalışma populasyonda RFLP testi ile saptanan HHV-6 varyant A (% 25.37) ve HHV-6 varyant B (%74.62) türlele, bu testin HHV-6 varyantlarını belirlemede oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir.

ÖZET

Human herpes virus-6 (HHV-6) insanlarda exantem subitumun etiyolojik ajanı olmakla birlikte, immün sistemi etkileyen bir kofaktör olması nedeni ile son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Sağlıklı yetişkinlerde seroprevalansı %80-100 arasında olup, enfeksiyon yaşamın ilk yıllarında kazanılmaktadır. HHV-6 izolatları; biyolojik, immünolojik ve moleküler özellikleri bakımından varyant A ve varyant B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu varyantların farklı populasyon ve hasta gruplarında dağılımının farklı olması, virusun toplumdaki varlığına ilaveten varyant türünde belirlenmesini gerekli kılmaktadır. Ülkemizde HHV-6 sıklığı ve varyant dağılımı konusunda çalışma bulunmamaktadır. HHV-6 virusunun daha çok tükrükle bulaştığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kalabalık bir toplumda yaşamamız ve hijyenik koşulların yetersiz oluşu HHV-6 enfeksiyonlarının ülkemizde de fazla olacağını düşündürmektedir. Bu amaçla toplumumuzda, çeşitli yaş gruplarında sağlıklı bireylerde ve lenfoproliferatif bozukluğu olan olgularda HHV-6 virusuna karşı antikor prevalansının IFA yöntemi ile saptanması ve aynı populasyonlarda PCR-RFLP yöntemi ile HHV-6 varyant A ve B dağılımının belirlenmesi hedeflendi. Çalışmada yaşları 6ay - 50 yaş arasında değişen 123 sağlıklı birey ve 50 lenfoproliferatif bozukluğu olan kanserli hasta değerlendirmeye alındı. Tüm çalışma populasyonlarında, genel seropozitivite oranı % 79.67 olarak bulundu. Sağlıklı populasyonda çeşitli yaş gruplarına göre yapılan incelemede, HHV-6 IgG % 75.60 ve HHV-6 IgM % 22.76 olarak bulundu. Kanserli hastalarda ise HHV-6 IgG ve HHV-6 IgM oranları sırası ile % 96 ve % 28 olarak tesbit edildi. Her iki gruptaki PCR sonuçları gözönüne alındığında sağlıklı bireylerde HHV-6 pozitiflik oranı %35.77 iken kanserli hastalarda %46 idi. RFLP ile yapılan varyant dağılımı gözönüne alındığında ise sağlıklı bireylerde ve lenfoproliferatif bozukluğu olan hastalarda varyant B' nin varyant A' ya göre daha yaygın olduğu gözlemlendi.

SUMMARY

Human herpes virus-6 (HHV-6) is an etiological agent of exanthem subitum at human, however as it is a co factor effecting the immune system,it has recently gained quite importance. At healthy adults, the seroprevalance is 80-100 % and infection is taken during the early period of life. The isolates of HHV-6 were seperated into two groups; variant A and variant B with respect to their biological, immunological and molecular properties.

It is necessary to determine the variant type of the virus in addition to its presence in the community as the distrubution of these variants are different in various populations and patient groups. There is no study on HHV-6 frequency and variant distrubution in our country at all. HHV-6 virus was shown in investigations to be transmitted more often by spittle. As we live in a crowded populations and hygienic conditions are insufficient in our country, it is considered that HHV-6 infectious would be very frequent. For this reason, it was aimed to determine the antibody prevalence against HHV-6 virus in different age groups of healthy populations and in lymphoproliferative disorders patients by IFA and HHV-6 variant A and B distrubution in the same population by PCR-RFLP method.

In this study 123 healthy people and 50 patients with cancer who have lymphoproliferative defect at ages varying between 6 months- 50 years were evaluated. General seropositivity ratio in all studied populations was found as 79.67% .In an research at healthy population according to age groups,HHV-6 IgG was determined as 75.60% and 22.76% .

HHV-6 IgG and HHV-6 IgM ratios at patients with cancer were designated as 96 % and 28 % respectively. When PCR results of both groups were considered,it was found out that HHV-6 positivity ratio was 35.77% at healthy individuals and 46 % at patients with cancer. When variant distrubution determined by RFLP was considered, variant B was examined to be more common than variant A at both healthy individuals and patients with lymphoprolifeferative disorders.

KAYNAKLAR

1. LEVY, J.A., FERRO, F., GREENSPAN, D., LENNETTE, E.T. : Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet.*, 335,1047-1050,(1990).
2. OKUNO,T., TAKAHASHI, K., BALACHANDRA, N., SHIRAKI K., YAMANASHI, K., TAKASHI, M., BABA, K. : Seroepidemiology of Human Herpesvirus - 6 infection in normal children and adults. *J.Clin. Microbiol.*, 27, 651-655, (1989).
3. HUANG, L.M., LEE, C.H., CHEN, J.Y., WANG, J.D., CHANG, M.H., HSU, C.Y., KUO, P.F. : Primary Human Herpesvirus 6 infections in children : A prospective serologic study. *J. Infectious Dis.*,165, 1163-1164, (1995).
4. ASANO, Y., YOSHIKAWA, T., SUGA, S., YAZAKI, T., OZAKI, T., SAITO,Y., HATANO, Y., TAKAHASHI, M. : Enzyme - linked immunosorbent assay for detection of IgG antibody to Human Herpesvirus 6. *J.Med.Virol.*, 32,119-123, (1990).
5. YANAGI, Y., HARADA ,S., BAN, F., OYA, A., OKABE, N.,TOBINA . J. : High prevalence of antibody to Human Herpesvirus 6 and decrease in titer with increase in age in Japan. *J. Infect Dis.*,161, 153-154, (1990).
6. RANGER, S., PATILLAUD, S., DENIS, F., HIMMICH, A., SANGARE, S., M' BOUP, A., ITOUNA-N'GAPORO, A., PRINCE-DAVID, M., CHOUT, R., CEVALLOS, R., AGUT, H. : Seroepidemiology of Human Herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J.Med.Virol.*, 34,194-198,(1991).

7. BRAUN, D.K., DOMINGUEZ, G., PELLET P. E. : Human Herpesvirus-6. Clin. Mic. Rev .,10 (3), 521-567,(1997).
8. CASERTA, M.T., HALL, C.B. : Human Herpesvirus-6 in " Infections of the central nervous system" , 2nd ed., (Scheld, W.M., Whitley , R.J., Durack D.T., ed) 129-138, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA , (1997) .
9. TORELLI, G., BAROZZI, P., MARASCA, R., COCCONCELLI, P., MERELLI, E., NELLI L.C., FERRARI, S., LUPPI M. : Targeted integration of Human Herpesvirus 6 in the p Arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. J.Med.Virol., 46,178-188 , (1995).
10. ABLASHI, D.V., BALACHADRAN, N., JOSEPHS, S.F., HUNG, C.L., KRUEGER, G.R., KRAMARSKY, S.Z., SALAHUDDIN, S.Z., GALLO R. C. : Genomic polymorphism, growth properties and immunologic variations in Human Herpesvirus-6 isolates. Virology., 184,542-552, (1991).
11. LUKA, J., PIRRUCCELLO, J.S., KERSEY, J.H. : HHV-6 genome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Lancet ., 338,1277-1278,(1991).
12. LUPPI, M., MARASCA, R., BAROZZI, P., FERRARI, S., CECCHERINI NELLI, L., BATONI, G., MERELLI, E., TORELLI, G. : Three cases of Human Herpesvirus-6 latent infection : Integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. J.Med.Virol., 40,44-52, (1993).

13. BALACHANDRAN, N., TIRAWATNAPONG, S., PFEIFFER, B., ABLASHI, D.V., SALAHUDDIN, S.Z. : Electrophoretic analysis of Human Herpesvirus 6 polypeptides immunoprecipitated from infected cells with human sera. *J. Infect. Dis.*, 163, 29-34, (1991).
14. BOVENZI, P., MIRANDOLA, P., SECCHIERO, P., STRUMIA, R., CASSAI, E., LUCA, D.D. : Human Herpesvirus 6 (variany A) in Kaposi ' s sarcoma. *Lancet* ., 341, 1288-1289, (1993).
15. JOSEPS, S.F., ABLASHI, D.V., SALAHUDDIN, S.Z., KRAMARSKY, B., FRANZA, B.R., PELLET, P., BUCHBINDER, A., MEMON, S., WONG-STAAAL, F., GALLOR, C. : Molecular studies of HHV-6 . *J. Virol Meth.*, 21, 179-190, (1988).
16. MARTIN, M.E.D., THOMSON, B.J., HONESS, R.W., CRAXTON, M.A., GOMPELS, U.A., LIU, M.Y., LITTER, E., ARRAND, J.R., TEO, I., JONES M.D. : The genome of Human Herpesvirus 6 : Maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J. Gen Virol.* 72, 157-168, (1991).
17. PELLET, P.E., BLACK, B.J. : Human Herpesvirus 6 in " *Fields Virology* ", 3rd ed., (Fields, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., eds.) 2587-2608, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA ,(1996).
18. KONEMAN, E.W., ALLEN, D.S., JANDA, W.M. : Herpesviruses in " *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* ", 5th ed ., 1209-1259, Washington C.Winn, Jr , USA , (1997).

19. LINDQUESTER, G.J., INOUE, N., ALLEN, R.D., CASTELLI, J.W., STAMEY, F.R., DAMBAUGH, T.R., BRIAN, J.J., DANOVICH, R.M., FRENKEL, N., PELLETT, P.E. : Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the Human Herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome. *Arch. Virol.*, 141, 367-379, (1996).
20. ABERLE, S.W., MANDL, C.W., KUNZ, C., KRAUPP, T.H. : Presence of Human Herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J. Clin. Mic.*, 34, 3223-3225, (1996).
21. LUCA, D.D., MIRANDOLA, P., De Re, V., R., SECCHIERO, P., CARBONE, A., BOIOCCHI, M., CASSAI, E. : Human Herpesvirus 6: A survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J. Infect. Dis.*, 170, 211-215, (1994).
22. FOX, D.J., BRIGGS, M., WARD, P.A., TEDDER, R. S. : Human Herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet.*, 336, 590-593, (1990).
23. SADA, E., YASUKAWA, M., ITO, C., TAKEDA, A., SHIOSAKA, T., TANIOKA, H., FUJITA, S. : Detection of Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7 in the submandibular gland, parotid gland and lip salivary gland by PCR. *J. Clin. Mic.*, 34, 2320-2321, (1996).
24. CONE, R.W., HUANG, M.W., ASHLEY, R., HACKMAN, C., COREY, L. : Human Herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J. Clin. Mic.*, 31 (5), 1262-1267, (1993).

25. CUENDE, J.I, RUIZ, J.,CIVERIA, M.P., PRIETO, J. : High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested – PCR. *J. Med Virol.*, 43, 115-118, (1994).
26. COLLANDRE, H., AUBIN, J.T., AGUT, H., BECHET, J.M., MONTAGNIER, L. : Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. *J. Virol Meth*,31,171-180,(1991).
27. CHOUSTERMAN, S., LACASA, M., SHELDRIK, P. : Physical map of the channel catfish virus genome: Location of sites for restriction endonucleases EcoRI, Hind III, Hpa I and XbaI. *J.Virol.*, 65,73-85, (1979).
28. AUBIN, J.T., COLLANDRE, H., CANDOTTI, D., INGRAND, C., ROUZIUX, M., BURGARD, M., RICHARD, J.M., HURAU, J.M., AGU, H. : Several groups among Human Herpesvirus 6 strains can be distinguished by southernblotting and polymerase chain reaction. *J.Clin .Microbiol.*, 29, 367-372, (1991).
29. KONDO, K., HAYAKAMA, Y., MORO, H., SATO, S., KONDO, T., TAKAHASHI, K., MINAMISHIMA, Y., TAKAHASHI, M., YAMANISHI, K.: Detection by polymerase chain reaction amplification of Human Herpesvirus 6 DNA in peripheral blood of patients with exantem subitum. *J. Clin Mic.*,28 (5), 970-972 ,(1990).
30. JARRETT, R.F., GALLAGHER, A., GLEDHILL, S., JONES, M.D., TEO, I., GRIFFIN B.E. : Variation in restriction map of HHV-6 genome. *Lancet.*, i,448-449,(1989).

31. SALAHUDDIN S, Z., ABLASHI, D.V., MARKHAM, P.D., JOSEPHS, S.F., STURZENEGGER, S., KAPLAN, M., HALLIGAN, G., BIBERFELD, P., WONG-STAAAL, F., KRAMARSKY, B., GALLO, R.C. : Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science.*, 234, 596-601,(1986).
32. JOSEPHS, S.F., SALAHUDDIN, S.Z., ABLASHI, D.V., SCHACHTER, F., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C. : Genomic analysis of the Human B lymphotropic virus (HBLV). *Science.*, 234, 601-603, (1986).
33. BIBERFIELD, A., KRAMARSKY, B., SALAHUDDIN, S., GALLO, R.C. : Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (Human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferatif disease. *J. Natl Cancer Inst .*, 79, 933-941,(1987).
34. YAMANASHI, K., OKUNO, T., SHIRAKI, K., TAKAHASHI, M., KONDO, T., ASANO, Y., KURATA, T. : Identification of Human Herpes virus-6 as a casual agent for exantem subitum. *Lancet .*, ii, 1065-1067, (1989).
35. UEDA, K., KUSUHARA, K., HIROSE, M., OKADA, K., MIYAZAKI, C., TOKUGAWA, K., NAKAYAMA, M., YAMANISHI K. : Exantem subitum and antibody to Human Herpesvirus-6 . *J. Infect Dis.*, 159, 750-752, (1989).
36. ASANO, Y., YOSHIKAWA, T., SUGA, S., YAZAKI, T., HATA, D ., NAGAI, T., KAJITA, Y., OZAKI, T., YOSHIDA, S. : Viremia and neutralizing antibody response in infants with exanthem subitum. *J. Pediatrics.*, 114, 535-539 ,(1989).
37. LEACH, C.T., SUMAYA C.V., BROWN N. A. : Human Herpesvirus-6 : Clinical implications of a recently discovered, ubiquitous agent. *J. Pediatrics.*, 121, 173-181,(1992).

38. LOPEZ, C., PELLETT, P., STEWART, J., GOLDSMITH, C., SANDERLIN, K., BLACK, J., WARFIELD, D., FEORINA, P. : Characteristics of Human Herpes virus - 6. J. Infect. Dis., 157 (6), 1271-1273, (1988).
39. WYATT, L.S., BALACHANDRAN, N., FRENKEL, N. : Variations in the replication and antigenic properties of Human Herpesvirus 6 strains. J. Infect. Dis., 162, 852-857, (1990).
40. TEO, I.A., GRIFFIN, B.E., JONES, M.D. : Characterization of the DNA polymerase gene of Human Herpesviruses 6. J. Virol., 65, 4670-4680, (1991).
41. AGUT, H., DUPIN, N., AUBIN, J.T., CALVEZ V. : Novel Human Herpesviruses (Human Herpesviruses 6, 7 and 8). Clin Mic and Infection. 2, 159-167,(1996).
42. DOYMAZ, M.Z.: Herpesviridae, " Medikal Viroloji ", 317-348, Nobel Tıp Kitabevleri, Çağ Ofset Matbaacılık, İstanbul, Türkiye, (1994).
43. STOECKLE, M.Y. : Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7 in " Principles and Practice of Infectious Diseases", 4th ed., (MANDELL, G.L., BENNET, T., J.E, DOLIN, R ., ed.) 1377-1379, USA , (1995) .
44. LAWRENCE, G.L., CHEE, M., CRAXTON, M.A., GOMPELS, U.A., HONESS, R.W., BARRELL , B.G. : Human Herpesvirus 6 is closely related to Human Cytomegalovirus. J.Virol., 64, 287-299,(1990).
45. BUCHBINDER, A., ABLASHI, D.V., SAXINGER, C., JOSEPHS, S.F., SALAHUDDIN, S.Z., GALLO R.C. : Human Herpesvirus 6 and cross reactivity with other herpesviruses. Lancet ., ii, 217, (1989).

46. CHOU, S., MAROUSEK, G.I. : Homology of the envelope glycoprotein B of Human Herpesvirus - 6 and Cytomegalovirus. *Virology.*, 191,523-528, (1992).
47. CHANG, C.K., BALACHANDRAN , N. : Identification, characterization and sequence analysis of a cDNA encoding a phosphoprotein of Human Herpesvirus 6. *J.Virol.*, 65, 2884-2894, (1991) .
48. MARTIN, M.D., NICHOLAS, J., THOMSON, B.J., NEWMAN, C., HONESS, R. W. : Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate -early locus of Human Herpesvirus 6. *J.Virol.*, 65, 5381-5390, (1991).
49. MORRIS, D.J., LITTLER, E., JORDAN, D., ARRAND, J.R. : Antibody responses to Human Herpesvirus 6 and other herpesviruses. *Lancet.*, ii,1425-1426, (1988).
50. ERTÜRK, M. : Human Herpesvirus 6 - 7 - 8, " Temel ve Klinik Mikrobiyoloji ", (USTAÇELEBİ, Ş., ed.) 849-855, Güneş Kitabevi, Öncü Basımevi, Ankara, Türkiye, (1999).
51. LUCA, D.D., KATSAFANAS, G., SCHIRMER, E.C., FRENKEL, N. : The replication of viral and cellular DNA in Human Herpesvirus 6 infected cells. *Virology.*, 175, 199-210, (1990).
52. BAPAT, A.R., BODNER, A.J., TING, R.C.Y., CHENG, Y.C. : Identification and some properties of a unique DNA polymerase from cells infected with Human B Lymphotropic Virus. *J.Virol.*, 63, 1400-1403, (1989).

53. BALACHANDRAN, N., AMELSE, R.E., ZHOU, W. W., CHANG, C.K. : Identification of proteins specific for Human Herpesviruses 6 infected human T cells. *J.Virol.*, 63, 2835-2840, (1989).
54. ADLERS, P., MCVOY, M., CHOU S., HEMPFLING, S., YAMANISHI K., BRITT, W. : Antibodies induced by a primary Cytomegalovirus infection react with Human Herpesvirus 6 proteins. *J.Infect.Dis.*, 168, 1119-1126, (1993).
55. YAMAMATO, T., MUKAI, T., KONDO, K., YAMANISHI, K. : Variation of DNA sequence in immediate early gene of Human Herpesvirus 6 and variant identification by PCR. *J.Clin. Mic.*, 32, 473-476, (1994).
56. ISEGAWA, Y., MUKAI, T., NAKANO, K., KAGAWA, M., CHEN, J., MORI, Y., SUNAGAWA, T., KAWANISHI, K., SASHIHARA, J., HATA, A., ZOU, P., KOSUGE, H., YAMANISHI, K. : Comparison of the complete DNA sequences of Human Herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.*, 73, 8053-8063, (1999).
57. PELLETT, P.E., MARTINEZ, D.S., DOMINGUEZ, G., BLACK, J.B., ANTON, E., GEENAMOYER, C., DAMBUGH, T.R. : A strongly immunoreactive virion protein of Human Herpesvirus 6 variant B strain Z 29: Identification and characterization of the gene and mapping of a variant specific monoclonal antibody reactive epitope. *Virology.*, 195, 521-523,(1993).
58. DEWHURST, S., KRENITSY, D.M., DYKES, C. : Human Herpesvirus 6B origin: Sequence diversity, requirement for two binding sites for origin -binding protein and enhanced replication from origin multimers. *J.Virol.*, 68, 6799-6803, (1994).

59. DEWHURST, S., DOLLARD, S.C., PELLETT, P.E., DAMBAUGH T.R. : Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in Human Herpesvirus 6B strain Z 29. *J.Virol.*, 67, 7680-7683, (1993).
60. CHOU, S., MAROUSEK, G.I. : Analysis of interstrain variation in a putative immediate-early region of Human Herpesviruses 6 DNA and definition of variant specific sequences. *Virology.*, 198, 370-376, (1994).
61. AUBIN, J.T., AGUT H., COLLANDRE, H., YAMANISHI, K., CHANDRAN, B., MONTAGNIER, L., HUARUX, J.M. : Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of Human Herpes virus 6. *J.Med.Virol.*, 41, 223-234, (1993).
62. DEWHURST, S., MCINTRYEK., SCHNABEL, K., HALL, C.B. : Human Herpesvirus 6 (HHV-6) variants B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J.Clin.Mic.*, 31(2), 416-418, (1993).
63. DEWHURST, S., CHANDRAN, B., MCINTYRE, K., SCHNABEL, K., HALL, C.B. : Phenotypic and genetic polymorphism among Human Herpesvirus -6 isolates from North American infants. *Virology.*, 190, 490-493, (1992).
64. DUNNE, M.V., JEVON, M. : Examination of human breast milk for evidence of Human Herpesvirus 6 by polymerase chain reaction. *J. Infect.Dis.* , 168, 250, (1993).
65. KOSITANONT, U., WASI, C., WANPRAPAR, N., CHEARSKUL, S., CHIMABUTRA, K., SUTTHENT, R., FOONGLADDA, S., INAGI, R., KURATA, T., YAMANISHI, K. : Primary infection of Human Herpesvirus 6 in children with infection of Human Immunodeficiency Virus type 1. *J.Infect. Dis.*, 180, 50-55, (1990).

66. JARETT, R.F., CLARK, D.A., JOSEPHS, S.F., ONIONS, D.E. :
Detection of Human Herpesvirus- 6 DNA in peripheral blood and
saliva. *J. Med. Virol.*, 32, 73-76, (1990).
67. MUKAI, T., YAMAMATO, T., KONDO, T., KONDO, K., OKUNO ,T.,
KASUGE, H., YAMANASHI, K. : Molecular epidemiological studies of
Human Herpesvirus 6 in families. *J. Med .Virol.*, 42, 224-227. (1994).
68. KRUEGER, G.R.F., WASSERMANN, K., DECLERCK, L.S.D.,
STEVENS, W.J., BOURGEOIS,N., ABLASHI D.V., JOSEPHS S.F. :
Latent Herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet.*, 335,
1255-1256, (1990).
69. LUCA, D.D., MIRANDOLA, P., RAVAIOLI, T., DOLCETTI, R.,
FRIGATTI, A., BOVENZI, P., SIGHINOLFI, L., MONINI, P.,
CASSAI, E. : Human Herpesvirus 6 and 7 in salivary glands and
shedding in saliva of healthy and Human Immunodeficiency Virus
positive individuals. *J. Med .Virol.*, 45, 462-468, (1995).
70. PITALIA, A.K., LIU-YIN, J.A., FREEMONT, A.J., MORRIS, D.J.,
FITZMAURICE, R.J. : Immunohistological detection of Human
Herpesvirus 6 in formalin – fixed, parafin-embedded lung tissues.
J. Med. Virol., 41,103-107, (1993).
71. PIETROBONI, G.R., HARNETT, G.B., BUCENO, M.R. : Antibody to
Human Herpesvirus - 6 in saliva. *Lancet .*, ii, 1059, (1988).
72. KIDO, S., KONDO, K., MORISHIMA, T., TAKAHASHI, M.,
YAMANISHI, K. : Detection of Human Herpesvirus 6 DNA in throat
swabs by polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 32, 139 -142,
(1990).

73. KANGRO, H.O., OSMAN, H.K., LAU, Y.L., HEATH, R.B., YEUNG, C.Y., NIEG M.H. : Seroprevalence of antibodies to Human Herpesviruses in England and Hong Kong. *J. Med. Virol.*, 43, 91-96, (1994).
74. YOSHIKAWA, T., SUGA, S., ASANO, Y., YAZAKI, T., KODAMA, H., OZAKI, T. : Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (Human herpesvirus-6) in healthy individuals. *Pediatrics.*, 84, 675-677, (1989).
75. BROWN, N.A., SUMAYA, C.V., LIU, C.R., ENCH, Y., KOVACS, A., CORONESI, M., KAPLAN, M. : Fall in Human Herpesvirus - 6 seropositivity with age. *Lancet* ., ii , 396, (1988).
76. BRIGGS, M., FOX, J., TEDDER, R.S. : Age prevalence of antibody to Human Herpesvirus 6. *Lancet* ., ii , 1058, (1988).
77. BELHORN, T.H. : Human Herpesvirus 6 " in *Textbook of Internal Medicine* ", 3rd ed., (KELLEY, R.W., ed.) 1790-1791, Lippincott -Raven Publishers., Philadelphia, USA , (1992).
78. PETER, J.B. : Human Herpesvirus-6 in " *Use and Interpretation of Tests in Medical Microbiology* " , 3rd ed., 119-12 , USA , (1992).
79. YAMANISHI , K . : Human Herpesvirus 6 in " *Clinical Virology* " , 1st ed., (RICHMAN, D.D., WHITLET R.J., HAYDEN F.G., eds.) 471-483, Churchill Livingstone Inc, Livingstone, England, (1997).
80. LUCA, D.D., MIRANDOLA, P., SECCHIERO, P., CERMELLI, C., ALEOTTI, A., BOVENZI, P., PORTOLANI, M., CASSAI, E. : Characterization of Human Herpesvirus 6 strains from patients with exanthem subitum with or without cutaneous rash. *J. Infect. Dis.*, 166, 689, (1992).

81. KIKUTA, H., LU, H., MATSUMATO, S., JOSEPHS, S.F., GALLO, R.C. : Polymorphism of Human Herpesvirus 6 DNA from five Japanese patients with exantem. *Lancet*, ii, 550-551, (1989).
82. SUGA, S., YAZAKI, T., KAJITA, Y., OZAKI, T., ASANO, Y. : Detection of Human Herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exantem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J. Med. Virol.*, 46, 52-55, (1995).
83. YOSHIDA, T., YOSHIYAMA, H., SUZUKI, E., HARADA, S., YANAGI, K., YAMAMOTO, N. : Immun response of patients with exanthema subitum to Human Herpesvirus type 6 (HHV-6) polypeptides. *J. Infect. Dis.*, 160, 901-902, (1989).
84. ASANO, Y., YOSHIKAWA, T., SUGA, S., KOBAYASHI, I., NAKASHIMA, T., YAZAKI, T., KAJITA, Y., OZAKI, T. : Clinical features of infants with primary Human Herpesvirus 6 infection (Exantem subitum, roseola infantum). *Pediatrics*, 93, 105-108, (1994).
85. ASANO, Y., NAKASHIMA, T., YOSHIKAWA, T., SUGA, S., YAZAKI, T. : Severity of Human Herpesvirus-6 viremia and clinical findings in infants with exantem subitum. *J. Pediatrics*, 118 (6), 891-895, (1991).
86. WARD, K.N., GRAY, J.J. : Primary Human Herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J. Med. Virol.*, 42, 119-123, (1995).
87. CASERTA, M.T., HALL, C.B., SCHANABEL, K., MCINTYRE, K., LONG, C., COSTANZO, M., DEWHURST, S., INSEL, R., EPSTEIN, L.G. : Neuroinvasion and persistence of Human Herpesvirus 6 in children. *J. Infect. Dis.*, 170, 1586-1589, (1994).

88. ZANG, W.Z., LINDE, A., HAGGLUND, H., TESTA, M., LOCASCIULLI, A., LJUNGMAN, P. : Human herpesvirus 6 DNA in cerebrospinal fluid specimens from allogenic bone marrow transplant patients : Does it have clinical significance? . Clin. Infect. Dis., 28, 562-568, (1999).
89. NIEDERMAN, J.C., LIU, C.R., KAPLAN, M.H., BROWN, N.A. : Clinical and serological features of Human Herpesvirus-6 infection in three adults. Lancet., i, 817-819, (1988).
90. KIKUTA, H., HUA, L., TOMIZAWA, K., MATSUMOTO, S. : Enhancement of Human Herpesvirus 6 replication in adult human lymphocytes by monoclonal antibody to CD3. J. Infect. Dis., 161, 1085-1087, (1990).
91. DESJARDIN, J.A., GIBBONS, L., CHO, E., SUPRAN, S.E., FALAGAS, M.E., WERNER, B.G., SNYDMAN, D.R. : Human Herpesvirus 6 reactivation is associated with Cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary Cytomegalovirus infection. J. Infect. Dis., 178, 1783-1786, (1998).
92. LAUTENNCHLAGER, I., HÖCKERSTEDT, K., LINNOVUARI, K., TASKINEN, E. : Human Herpesvirus-6 infection after liver transplantation. Clin. Infect. Dis., 26, 702-707, (1998).
93. CONE, R.W., HUANG, M.W., HACKMAN, R.C., COREY L. : Coinfection with Human Herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. J. Clin. Mic., 34, 877-881, (1996).
94. CHOU, S., SCOTT, K.M. : Rises in antibody to Human Herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary Cytomegalovirus infection. J Clin Mic., 28, 851-854, (1990).

95. DROBYSKI, W.R., EBERLE, M., MAJEWSKI, D., BAXTER-LOWE, L.A. : Prevalence of Human Herpes virus 6 variant A and B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridization. *J.Clin.Mic.*, 31, 1515-1520, (1993).
96. WARD, K.N., GRAY, J.J., JOSLIN, M.E., SHELDON, M.J. : Avidity of IgG antibodies to Human Herpesvirus -6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. *J. Med.Virol.*, 39, 44-49, (1993).
97. LYALL, E.G.H. : Serological response of paediatric oncology patients to Human Herpesvirus-6. *J. Med.Virol.*, 43, 373-379, (1994).
98. DROBYSKI, W.R., DUNNE, M.W., BURD, E.M., KNOX, K.K., ASH R.C., HOROWITZ, M.M., FLOMENBERG, N., CARRIGAN, D.R. : Human Herpesvirus -6 (HHV-6) infection in allogenic bone marrow transplant recipients : Evidence of a marrow -suppressive role for HHV-6 in vivo. *J.Infect .Dis.*, 167, 735-739, (1992).
99. LEVY J.A., LANDAYA., LENNETTE E. : Human Herpesvirus 6 inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 replication in cell culture. *J.Clin.Mic.*, 28, 2362-2364, (1990).
100. LUSSO, P., MARKHAM, P.D., DEROCCO, S.E., GALLO, R.C. : In vitro susceptibility of T lymphocytes from chimpanzees (Pantroglodytes) to Human Herpesvirus 6 (HHV-6): A potential animal model to study the interaction between HHV-6 and Human Immunodeficiency Virus type 1 in vivo. *J.Virol.*, 64, 275--2758, (1990).

101. ASADA, H., KLAUS-KOVTUN, V., GOLDING, H., KATZ, S.I., BLAUVELT, A. : Human Herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses Human Immunodeficiency Virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol.*, 73, 4019-4028, (1999).
102. DOLCETTI, R., LUCA, D.D., MIRANDOLA P., VITA, S.D., DE RE, V., CARBONE A., TIRELLI U., CASSAI E., BOIOCCHI M. : Frequent detection of Human Herpesvirus 6 DNA in HIV - associated lymphadenopathy. *Lancet.*, 344,543, (1994).
103. HORVAT, R.T., WOOD, C., JOSEPHS, S.F., BALACHANDRAN, N. : Transactivation of Human Immunodeficiency Virus promoter by Human Herpesvirus 6 (HHV-6) strains GS and Z-29 in primary human T lymphocytes and identification of transactivating HHV-6 (GS) gene fragments. *J.Virol.*,65, 2895-2902, (1991).
104. FOX, J., BRIGGS, M., TEDDER, R.S. : Antibody to Human Herpesvirus 6 in HIV -1 positive and negative homosexual men. *Lancet.*,ii, 396-397, (1988).
105. SPIRA, T.J., BOZEMAN, L.H., SANDERLIN, K.C., WARFIELD, D.T., FEORINOP, M., HOLMAN, R.C., KAPLAN, J.E., FISHBEIN, D.B., LOPEZ, C. : Lack of correlation between Human Herpesvirus-6 infection and the course of Human Immunodeficiency Virus infection. *J.Infect.Dis.*,161, 567-570, (1989).
106. GOPAL, M.R., THOMSON B, J., FOX, J., TEDDER, R.S., HONESS, R.W. : Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV seropositives. *Lancet.*, 335,1598-1599, (1990).

107. CORBELLINO, M., LUSSO, P., GALLO, R.C. : Disseminated Human Herpesvirus 6 infection in AIDS. *Lancet* ., 342, 1242, (1993).
108. WARD, K.N., GRAY, J.J., EFSTATHIOU, S. : Brief report : Primary Human Herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor: *J.Med.Virol.*, 28, 69-72, (1989).
109. LYALL, E.G.H., CUBIE, H.A. : Human herpesvirus-6 DNA in the saliva of pediatric oncology patients and controls. *J Med Virol.* 47, 317-322, (1995).
110. LEVINE, P.H., JAHAN, N., MURARI, P., MANAK, M., JAFFE, E.S. : Detection of Human Herpesvirus 6 in tissues involved by sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman Disease). *J.Infect.Dis.*,166, 291-295,(1992).
111. SECCIHERO, P., CARRIGAN, D.R., ASANO, Y., BENEDETTI, L., CROWLEY, R.W., KOMAROFF, A.L., GALLO, R.C., LUSSO P. : Detection of Human Herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J. Infect .Dis.*, 171, 273-280, (1995).
112. DAIBATA, M., MIYOSHI, I. : Presence of Human Herpesvirus 6 DNA in cord blood cells. *J Infect Dis.*, 179,1046, (1999).
113. ADAMS, O., KREMPE, C., KOGLER, G., WERNET, P., SCHEID, A.: Congenital infections with Human Herpes virus 6. *J .Inf. Dis.*, 178, 544-546, (1998).
114. KNOWLESS, W.A., GARDNER, S.D. : High prevalence of antibody to Human Herpesvirus 6 and seroconversion associated with rash in two infants. *Lancet* .,ii, 912-913,(1988).

115. GROSE, C. : Human Herpesvirus type 6 in " Textbook of Pediatric Infectious Diseases", 3rd ed.,(CHERRY, F., ed.) 1583-1586, Boston, USA, (1992).
116. HORVAT, R.T., PARMELY, M.J., CHANDRAN, B. : Human Herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J.Infect.Dis.*,167, 1274-1280, (1993).
117. FLAMAND, L., GOSSELIN, J., ADDARIO, M.D., HISCOTT, J., ABLASHI, D.V., GALLO, R.C., MENEZES, J. : Human Herpesvirus 6 induces interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha but not interleukin-6 in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J.Virol.*, 65, 5105-5110,(1991).
118. SECCIHERO, P., ZELLA, D., CROWLEY, R.W., GALLO, R.C., LUSSO, P. : Quantitative PCR for Human Herpesviruses 6 and 7. *J.Clin .Mic.*, 33,2124-2130, (1995).
119. OSIOWY, C., HOME, I.P., MONETTE, M., ZOU, S. : Detection of Human Herpesvirus 6 in serum by a microplate PCR - hybridization assay. *J.Clin .Mic.*, 36, 68-72, (1992).
120. MINJOLLE, S., MICHELET, C., JUSSELIN, I., JOANNES, M., CARTIER, F., COLIMON, R. : Amplification of the six major Human Herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J.Clin.Mic.*, 37, 950-953, (1990).
121. ABLASHI, D.V., SALAHUDDIN, S.Z., JOSEPHS, S.F., IMAM, F., LUSSO, P., GALLO, R.C. : HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature.*, 329, 207, (1987).

122. CERPELLI, C., CONCARI, M., CARUBBI, F., FABIO, G., SABBATINI, A.M.T., PECORARI, M., PIETROSEMOLI, P., MEACCI, M., GUICCIARDI, E., CARULLI, N., PORTOLANI, M. : Growth of Human Herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Vir. Res. Dis.*, 45, 75-85, (1996).
123. CHIU, S.S., CHEUNG, C.Y., TSE, Y.C., PEIRIS M. : Early diagnosis of primary Human Herpesvirus 6 infection in childhood: Serology, polymerase chain reaction and virus load. *J. Infect. Dis.*, 178, 1250-1256, (1988).
124. SUGA, S., YOSHIKAWA, T., ASANO, Y., YAZAKI, T., OZAKI, T. : Neutralizing antibody assay for Human Herpesvirus-6. *J. Med. Virol.*, 30, 14-19, (1990).
125. DAHL, H., LINDE, A., SUNDQVIST, V.A., WAHREN, B. : An enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to Human Herpes Virus 6. *J. Virol. Meth.*, 29, 313-324, (1990).
126. SAXINGER, C., POLESKY, H., EBY, N., GRUFFERMAN, S., MURPHY, R., TEGTMERR, G., PAREKH, V., MEMON, S., HUNG, C. : Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in US populations. *J. Virol. Meth.*, 21, 199-208, (1988).
127. COYLE, P.V., BRIGGS, M., TEDDER, R.S., FOX J.D. : Comparison of three immunoassays for the detection of anti-HHV-6. *J. Virol. Meth.*, 38, 283-295, (1992).
128. COUILLARD, M., JOLY J.R., DESCHENES, L., RICHER, G. : Evaluation of variables in immunofluorescence procedures for the detection of antibodies against Human Herpesvirus-6 (HHV-6). *Virol.*, 15, 313-320, (1992).

- 129.PARKER, C.A., WEBER, J.M. : An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG and IgM antibodies to Human Herpesvirus type 6. J.Virol.Meth., 41,265-276, (1993).
- 130.KONEMAN, E.W., ALLEN, D.S., JANDA, W.M. : Herpesviruses in " Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology ", 5th ed ., 1247-1250, Washington C.Winn, Jr, USA, (1997).
- 131.İZGÜR, M. : Immunofluoresans, "İmmünoloji ", 1. baskı., (ARDA, M., MİNBAŞ, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, K.S., ed.) 368-370, Medisan Yayımevi, Ankara, Türkiye, (1994).
132. BİLGEHAN, H. : Fluoresanlı Antikor Deneyi, " Temel Mikrobiyoloji ve Bağıışıklık Bilimi " ,8.Baskı., 445-446, Barış Yayınevleri Fakülteler Kitabevi, İzmir,Türkiye, (1996) .
- 133.USTAÇELEBİ, Ş. : Immunofloresan Tekniği, " Genel Viroloji ", 1.Baskı.,141-143, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara,Türkiye, (1992).
- 134.KOCAGÖZ T. : Polimeraz zincirleme tepkimesi. Medical Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi 1 (3) : 112-118, (1996) .
135. ARDA M. : Polimeraz Zincir Reaksiyonu, " Biyoteknoloji ", 115-120, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:1, (1990).
- 136.SAMBROOK, J.,FRITSCH ,E.F., MANIATIS ,T. : In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction in " Molecular Cloning. A Laboratory Manual ", 2nd ed., 14.2-14.35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

- 137.SAIKI R.K.: Amplification of Genomic DNA in " PCR Protocols ",
(INNIS M.A.,GELFAND D.H.,SNINSKY J.J., WHITE T.J., ed.) 13-20,
Academic Press, Inc, San Diago, USA, (1990).
- 138.GLICK R. B., PASTERMAC J.J : Fundamentals of Molecular
Biotechnology in " Molecular Biotechnology ", 71-76, American
Soc.Microb,Washington D.C, USA, (1994).
- 139.ARDA M. : Rekombinant DNA Teknolojisi ve Genetik
Manipülasyonlar, " Biyoteknoloji ", 31-36, Kükem Derneği Bilimsel
Yayınları No:1,(1990).
- 140.SAMBROOK, J.,FRITSCH ,E.F., MANIATIS ,T.:Enzymes Used in
Molecular Cloning in " Molecular Cloning. A Laboratory Manual ". 2nd
ed., 5.2-5.95 , Cold Spring Harbor Laboratory Press,,(1989).

ÖZGEÇMİŞ

1.8.1967 yılında Gemerek' te doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Ankara' da tamamladım. 1989 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 1989-1991 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D' ında Yüksek Lisans Programına devam ettim. 1990- 1991 yılında Kayseri Sultansazlığı Koruma ve Düzenleme Projesi kapsamında Türkiye Tabiatını Koruma Derneği - Çevre Bakanlığı Özel Ödülünü aldım. Aynı yıllarda adı geçen dernekte yönetim kurulu üyesi olarak görev yaptım.1990-1992 yıllarında SSK Meslek Hastalıkları Hastanesinde Biyolog olarak görev yaptım. Aynı dönemde Gazi Üniversitesi Kazaları Araştırma ve Önleme Enstitüsün'de " İşçi Sağlığı ve İş Güvenliği " konusunda Yüksek Lisans Programına devam ettim. 1992-1997 yıllarında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Müdürlüğü, Boğmaca Aşısı Üretim ve Araştırma Laboratuvarında çalıştım. 1994 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programını bitirdim.1995 yılında aynı bölümün Doktora Programına başladım.1999 yılında Sağlık Bakanlığı - JICA (Japon International Cooperation Agency) teknik işbirliği çerçevesinde " Tüberküloz Tanısında Biyomoleküler Yöntemlerin Uygulaması " konusunda konturpart eğitimi almak üzere görevlendirildim. Bu konuda Japonya " Biomedical Science Association, Research Institute of Tuberculosis, Faculty of Medicine , Nagasaki University, National Institute of Infectious Diseases " da teorik ve uygulamalı eğitim aldım.

Halen Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora Programına devam etmekte ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarında görev yapmaktayım.