



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE KÖK HÜCRE
NAKLİ YAPILAN PEDİYATRİK HASTALARDA HHV-6
ENFEKSİYONLARININ SIKLIĞININ VE KLİNİK
ÖNEMİNİN PROSPEKTİF OLARAK ARAŞTIRILMASI VE
VİRAL ENTEGRASYONUN TANISAL TESTLER
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Davut ERTEKİN

Antalya, 2013



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE KÖK HÜCRE NAKLİ
YAPILAN PEDİYATRİK HASTALARDA HHV-6
ENFEKSİYONLARININ SIKLIĞININ VE KLİNİK ÖNEMİNİN
PROSPEKTİF OLARAK ARAŞTIRILMASI VE
VİRAL ENTEGRASYONUN TANISAL TESTLER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Davut ERTEKİN

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Derya MUTLU

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2013

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2012.04.0103.004 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimimde ve tezimin her aşamasında büyük emeği olan, saygıdeğer tez danışmanı hocam Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Derya MUTLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince birçok konuda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. S.Tümer VURAL'a, Sayın Prof.Dr. Meral GÜLTEKİN'e, sayın Prof.Dr. Dilek ÇOLAK'a, Sayın Prof.Dr. M. Dilare ÖĞÜNÇ'e, Sayın Doç.Dr. Gözde ÖNGÜT'e, Sayın Doç.Dr. Betil ÖZHAK BAYSAN'a, Sayın Doç.Dr. Mete EYİGÖR'e ve Sayın Doç.Dr. Sadi KÖKSOY'a teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım süresince çalışma ortamımda sonsuz desteklerini gördüğüm Merkez Laboratuvarında görev yapan tüm çalışma arkadaşlarım ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan, yaşamım boyunca bana verdikleri her türlü destek ve duydukları güven ile her zaman yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere, tüm aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Şekiller Dizini	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Sınıflandırma	2
2.3. Genel Özellikleri	3
2.4. Replikasyon	5
2.5. Tropizm	6
2.6. Patogenez	7
2.7. Diğer Virüslerle İlişkisi	7
2.7.1. HHV-6 ve HIV-1	7
2.7.2. HHV-6 ve EBV	8
2.7.3. HHV-6 ve HPV	8
2.7.4. HHV-6 ve CMV	8
2.8. Epidemiyoloji	9
2.9. Latensi ve Persistans	9
2.10. HHV-6 ve Kromozomal Entegrasyon	10
2.11. Bulaşma Yolları	10
2.12. Klinik	11
2.12.1. HIV virüsü ile enfekte hastalarda klinik	12
2.12.2. Beyinde enfeksiyon	12
2.13. HHV-6'nın Diğer Hastalıklarla İlişkisi	12
2.13.1. HHV-6 ve multipl skleroz	12
2.13.2. HHV-6 ve kronik yorgunluk sendromu	13
2.13.3. HHV-6 ve kanser	14

2.14. Örneklerin Alınması, Taşınması Ve Saklanması	15
2.15. Mikrobiyolojik Tanı	15
2.15.1. Direkt tanı yöntemleri	15
2.15.2. İndirekt tanı yöntemleri	17
2.15.3. Primer enfeksiyonların tanısı	18
2.15.4. Aktif enfeksiyonların tanısı	19
2.16. Tedavi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Etik Kurul Onayı	20
3.2. Hasta Seçimi	20
3.3. İstatistiksel Yöntem	20
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	44
7. ÖZET	45
8. ABSTRACT	48
9. KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Anti-Thymocyte Globulin
CD	Cluster of Differentiation
CFS	Kronik Yorgunluk Sendromu
CMV	Sitomegalovirüs
CPE	Sitopatik etki
DR	‘Direct repeats’; tekrarlayan bölgeler
E	Early
EBV	Epstein-Barr Virüs
EIA	Enzimli İmmün Deney
FISH	Fluorescent in-situ hybridisation
GKK	Göbek kordon kanı
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
HBLV	Human B-lymphotropic virus
HHV-6	Human Herpes Virus 6
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papilloma Virus
HSB-2	Human T-lymphoblastoid cell line 2
HSCT	Hematopoietik Kök Hücre Nakli
HSV-1	Herpes Simpleks Virus tip 1
IE-A	İmmediate-early A
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay
IL	İnterlökin
JCV	John Cunningham virus
kDa	Kilodalton
L	Late
MS	Multiple Skleroz

MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ORF	Open Reading Frame (Açık okuma alanı)
Pac-1,2	Procasbase activating compound
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHA	Fitohemaglutinin
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücre
PML	Progresif Multifokal Lökoensefalopati
Ras	Rat sarkoma virusu
RT-PCR	Revers Transkriptaz – Polymerase Chain Reaction
TAT	Trans-Activator of Transcription
TNF	Tümör Nekroz Faktör
U	Unique
UL	Unique large

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Örnek sayısına göre reaktif hacimlerin belirlenmesi (32 reaksiyon için)	22
3.2. PCR’da kullanılan primer ve prob dizileri	24
4.1. HHV-6 IgG ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki	27
4.2. Hasta cinsiyeti ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki	28
4.3. Nakil sonrası, akut GVHD ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki	28
4.4. ATG tedavisi alan hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik oranları	29
4.5. Miyeloablatif tedavi alan hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik oranları	29
4.6. Nakil sonrası hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik durumu ile ateş ilişkisi	30
4.7. HHV-6 DNA pozitifliği ve nakil sonrası deri bulgusu arasındaki ilişki	30
4.8. HHV-6 DNA pozitifliği ve nakil sonrası karaciğer enzimlerindeki yükseklik arasındaki ilişki	31
4.9. HHV-6 DNA pozitif olan hastalarda nakil sonrası akut GVHD gelişme durumu	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. HHV-6 genomunun yapısı	4

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herpesviridae ailesinin üyelerinden olan Human Herpes virus 6 (HHV-6) ilk defa 1986 yılında, ABD’de, Salahuddin ve arkadaşları tarafından kazanılmış bağışıklık yetmezlik sendromu (AIDS) veya lenfoproliferatif hastalık belirtileri olan bir hastanın lenfosit kültüründen izole edilmiştir (1). Virusun sınıflandırılmasında, sitomegalovirus (CMV) ile gen yapısı organizasyonu, spesifik genler arasındaki homoloji ve fenotipik benzerlikler nedeni ile, Herpesviridae ailesinin beta herpesvirinae alt ailesinde roseolavirus cinsine yerleştirilmiştir. HHV 6 farklı genetik, immünolojik ve biyolojik özelliklerine göre, HHV-6A ve HHV-6B olarak iki gruba ayrılır (2).

HHV-6A daha çok nörovirulan olarak tanımlanmıştır (3). Çünkü Multipl skleroz (MS) gibi nöroinflamatuvar hastalığı olan kişilerde daha sıklıkla bulunmuştur (4). HHV-6B primer enfeksiyonu ise çocukluk çağıının yaygın bir hastalığı olan Eksantem Subitum’a (altıncı hastalık ya da rozeola infantum) neden olmaktadır. Ayrıca HHV-6B nakil alıcılarında yaygın olarak reaktivasyona neden olmaktadır. Bunun yanında nakil alıcılarında ensefalit, kemik iliği baskılanması, pnömoni gibi şiddetli klinik bulgulara neden olabilmektedir (5).

Virusun periferik kan mononükleer hücrelerinde latent olarak kalabilme yeteneği, aktif viral enfeksiyonların tanısını zorlaştırabilecek bir unsurdur. Luppi ve arkadaşları floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile üç kişide kromozoma entegre olmuş HHV-6 DNA’sını göstermişlerdir (6).

Bu çalışma ile amaçlanan, kök hücre alıcılarında aktif HHV6 enfeksiyonlarının sıklığını ortaya koymak, HHV-6 enfeksiyonlarını klinik bulgularla ilişkilendirmek, ülkemizde HHV6’nın kromozomal entegrasyon sıklığını ve bu durumun HHV-6’ya yönelik moleküler tanısal testlerdeki etkisini açığa çıkarmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

HHV- 6 ilk defa 1986 yılında, Dharam Ablashi, Syed Zaki Salahuddin ve Robert Gallo tarafından AIDS veya lenfoproliferatif hastalık belirtileri olan bir hastanın lenfosit kültüründen izole edilmiştir. HHV-6 ile enfekte hücrelerin sıklıkla intranükleer ve/ya da intrastoplazmik inklüzyon cisimcikleri içerdiği görülmüş. Elektron mikroskopunda yeni bir virüs olduğu ortaya çıkarılmış ve onlar tarafından insan B lenfotropik virüs (HBLV) olarak adlandırılmıştır (7,8). Ancak bir süre sonra yeni virüsün ve Dünya'nın değişik bölgelerinden elde edilen izolatların; Başta CD4 yüzey antijenini taşıyan T lenfositlerine ve birçok dokuya tropizm gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu sebeple tropizme dayalı adlandırmadan vazgeçilerek virüsün adı HHV-6 olarak değiştirilmiştir (6,9).

Yamanishi ve arkadaşları çocukluk çağıının yaygın hastalığı roseola infantum'un, febril fazlar süresince kültürünü yaparak HHV-6B'yi bulmuşlardır ve akut hastalığın haftalar içinde serokonversiyonunu ispat etmişlerdir.

Araştırmacılar, hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinden (PKMH) virüsü izole etmiş ve elektron mikroskopik inceleme ile herpesvirüs özellikleri gösterdiği bulunmuştur. Bu yeni izolat ile HHV-6, altıncı hastalığa yol açan etken olarak tanımlanmıştır (10).

2.2. Sınıflandırma

HHV-6A ve HHV-6B, HHV-7 ile birlikte roseola virüs cinsinde, beta herpesvirüs subfamilyasının bir üyesidir. Sınıflandırılmasının temelinde, genomik özellikleri iyi tanımlanmış insan sitomegalovirüsü ile göreceli olarak yüksek düzeydeki benzerlikleri yatmaktadır. HHV6, gama ya da alfa herpes virüslerle daha düşük düzeyde genetik benzerliğe sahiptir.

HHV-6'nın bulunmasından kısa bir süre sonra bazı laboratuvarlarda virüslerin izolasyonları tanımlanmıştır ve aynı virüslerin farklı suşları olduğu anlaşılmıştır (11, 12). HHV-6 farklı genetik, immünolojik ve biyolojik özelliklerine göre, HHV-6A ve HHV-6B olarak iki gruba ayrılır (2). Aynı alt ailede yer alan CMV ile %66 oranında genom benzerliği göstermektedir. HHV-6, herpesviridae ailesinin tüm karakteristik özelliklerini taşımaktadır (13,14).

2.3. Genel Özellikler

HHV-6A ve HHV-B'nin virionları bütün herpesvirüslerde olduğu gibi dört yapısal element içerir. Elektrondan yoğun bir çekirdek, ikosahedral simetrik kapsid, bir tegüment (zarf ve kapsid arasındaki boşluğu dolduran yapısal materyal), viral glikoproteinler ve membran proteinlerinin yer aldığı dış zarftan oluşur (15). Virionu ortaya çıkartacak olan bir araya gelme işlemi, nükleokapsidlerin olduğu nükleusta başlar. HHV-6 kapsid çapı 90 ile 110 nm arasındadır (16,17). Tegüment, kapsit oluştuktan sonra çekirdekte tam olarak açıklanamayan bazı aşamalardan sonra oluşur (18, 19). Tegüment, belki de membrana bağlı ve normalde sitoplazmik yerleşimli; ancak HHV-6 ile infekte hücrelerde nükleer lokalizasyonda, teguzom olarak adlandırılan yeni bir yapıdan kaynaklanmaktadır (19). Tamamen tegümentlenmiş kapsidler 165 nm çapa sahiptirler ve teguzomun nükleer membranla füzyonu sonucu sitoplazmaya salınıyor gibi görünmektedirler (17). Bu kapsidler zarflarını, sitoplazmik veziküller içerisine tomurcuklanarak kazanmaktadır. Olgun virion yaklaşık 200 nm çapındadır ve egzozitoz yolu ile salınır (16).

Genom

HHV-6 genomu doğrusal, çift-sarmallı 160 ila 162 kb büyüklüğünde, deoksiribonukleotid (DNA) molekülüdür. 8 ila 9 kb'lık uç tekrar (Direct repeats: DR) bölgeleriyle yandan desteklenmiş ve en erken A (immediate early A: IE-A) bölgesinde R1, R2 ve R3 olarak adlandırılan üç ara tekrar bölgesiyle kesintiye uğrayan 143 ile 145-kb büyüklüğündeki özgün (U) bölgeden oluşur. DR bölgeleri, kırılma – paketlenme motiflerini (pac-1, pac-2) ve omurgalı kromozomlarının telomerlerinin karakteristik bir dizisi olan (GGGTTA) hegzanükleotidinin tekrarlarını içerir (20). Bu dizilerin DNA'nın replikasyonunda ve viral genomun, latent olarak infekte hücrelerde sürekliliğini sağlamada kullanıldığı düşünülmektedir (21). Özgün bölgenin genomik düzenlenmesi HCMV'nin özgün uzun (UL) bölgesi ile benzerlikler göstermektedir.

HHV-6B genomu 119 açık okuma alanı (open reading frame; ORF) içermektedir. Bunlardan dokuzu HHV-6A'da bulunmamaktadır (22). Diğer yandan HHV-6A'daki 9 ORF bölgesinin kesme ya da çerçeve kayma mutasyonları, başlama kodonunun yokluğunun sonucu olarak HHV-6B genomunda karşılığının bulunmadığı Gombel ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (23). Özgün bölgede bulunan genler U1 'den U100'e kadar isimlendirilmektedirler. DR bölgesi içindeki ORF'ler DR1'den

DR7'ye kadar isimlendirilirken, HHV-6B'ye özgü ORF'ler ise B1'den B9'a kadar adlandırılmıştır.

Tüm herpesvirüsler içerisinde korunan, yapısal virion bileşenleri, DNA replikasyonu ve nükleotid metabolizması için gerekli enzimler yedi gen bloğu içerisinde toplanmıştır. Ayrıca küme yapan genler arasında US22 denilen gen familyası sadece β herpesvirüsler içerisinde bulunmaktadır. Bunların fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (24, 25). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. HHV-6 genomunun yapısı.

Suşlar arası farklılık

Genomların tamamı karşılaştırıldığında HHV-6A ve HHV-6B nükleotidleri arasındaki benzerlik %90'dır. Genomun sonlarına yakın alanlar korunmaktadır. IE1 bölgesinde farklılık nükleotid seviyesinde %31'e ulaşmaktadır (22,26). HHV-6A ve HHV6B karakteristik restriksiyon endonükleaz profillerine sahiptirler. Bu da kolayca sınıflandırılmalarını sağlamaktadır (27, 28).

En yüksek düzeyde farklılığın olduğu IE1 bölgesi, A ve B varyantları arasında, yapışma paterni ve geçici transkripsiyon düzenlenmesi açısından farklılık gösterir (22). Bu değişkenlik, iki varyant arasındaki biyolojik farklılıktan kesin olarak sorumlu tutulmaktadır. A ve B varyantları arasındaki farkı belirleyen diğer faktör U97-U100 bölgesidir. Bu bölge glikoprotein kompleks gp82 ve gp105'i kodlamaktadır. Bu gen

içerisindeki HN3 olarak isimlendirilen bir egzon, sadece HHV-6B’de bulunmaktadır (26).

80-kDa U100 geninin ürünü olan glikoprotein Q (gQ), CD46 reseptör bağlaması ve membran kaynaşmasına yol açmaktadır (29). Bu bölgedeki değişkenlik A ve B varyantlarının hücre tropizmindeki farklılıklara katkı sağlayabilmektedir. Diğer uyuşmazlığın olduğu bölgeler LT1, DR2, DR7, DR8, LJ1, RJ1, U1 ve U47’dir (26).

Suşlar içindeki farklılık

Aynı varyantlar arasındaki farkın düzeyi, A ve B varyantları arasında olduğu gibi, hangi gen ya da dizinin analiz edilmiş olmasına bağlıdır. HHV-6B suşları içindeki en yüksek farklılık, her iki DR bölgesinin sol tarafında konumlanmıştır (23,30).

Bununla birlikte IE-A bölgesi A ve B varyantları arasında yüksek seviyede farklılık gösterse de, bu bölge HHV-6B izolatları arasında yüksek düzeyde korunmuştur (31).

2.4. Replikasyon

HHV-6’nın her iki varyantı da bütün çekirdekli hücrelerin membranında bulunan CD46 reseptörüne tutunarak hücre içine girmektedir (32). Bu glikoprotein aynı zamanda kızamık aşısı virüsünün reseptörü olarak görev yapmaktadır (33,34).

HHV-6 ve kızamık virüsünün etkileşimi CD46’nın farklı alanlarında olmaktadır. HHV-6A’da CD46 için viral bağlanmaya yardımcı, glikoprotein H-L-Q, (gH-gL-gQ) kompleksleri gösterilmiştir (29). gH, CD46’nın SCR3 ve SCR2 alanlarına bağlanmasından sorumludur (32). HHV-6 gB, henüz tanımlanamayan bir mekanizma ile birleştirme süreciyle ilişkilendirilmiştir (35). Kendi reseptörüne bağlanmasından sonra gH-gL-gQ hücre membranı ve viral zarfın kaynaşmasına yardımcı olmaktadır.

Ortaya çıkan nükleokapsit, sitoplazma içinde nükleer por kompleksine taşınmaktadır. Burada viral DNA genomu nükleoplazma içine serbest bırakılır. Sitosolik transport mekanizmalarının detayları HHV-6 için henüz aydınlanmamıştır. Fakat muhtemelen Herpes Simpleks Virüsü-1 (HSV-1) ve HCMV için tanımlanan mekanizmalara benzemektedir (36).

Virüs, üç sınıf viral proteini (immediately; en erken [IE], early; erken [E] ve late; geç [L]) hücresel transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarını kullanarak

sentezlemektedir. HHV-6 IE proteini enfeksiyondan sonra birkaç saat içinde sentezlenmekte ve diğer genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır. E geninin ekspresyonu IE proteinin sentezine ve protein ürünlerine bağlıdır. E geni başlıca DNA metabolizması ve replikasyonunda rol almaktadır.

E ve L proteinlerinin fark edilmesi bazı istisnalar hariç geçici olarak viral DNA polimeraz aktivitesine bağlıdır (37). Geç proteinler sıklıkla glikoziledir ve olgun virüs bileşenlerini oluşturmaktadır (38). Ancak aynı zamanda kemokin kodlayan U83 geni geç dönemde eksprese olmaktadır. Egzositoz yoluyla ekstrasellüler boşluğa, matür virüs partikülleri bırakılmadan önce transport veziküllerinde art arda glikozilasyon olmaktadır. HHV-6 virüsünün maturasyon yolu enfekte hücrelerin hücre membranında saptanan viral glikoprotein olmaması ile diğer herpes virüslerden farklıdır (39,40). Enfeksiyon oluşmasından yeni virionun serbest bırakılmasına kadar geçen toplam zaman yaklaşık olarak 72 saattir (41).

2.5. Tropizm

HHV-6 virüsü ilk olarak insan B lenfotropik virüs olarak tanımlanmasına rağmen (8) HHV-6A, HHV-6B in vitro olarak en iyi şekilde CD4⁺ T lenfositlerde replike olmaktadır (42). Bütün HHV-6 izolatları, aktive olmuş periferik ya da kord kanı mononükleer hücrelerinde enfeksiyon yapmaktadır.

T hücrelerini enfekte etme yetenekleri, farklı varyantlar içinde sınıflandırılmalarına neden olmaktadır (27). HHV-6A ve HHV-6B'nin CD4⁺ T lenfositleri enfekte ettiği, CD8⁺ T lenfositleri ise sadece HHV-6A'nın enfekte ettiği Griven ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (43). CD46 reseptörünün çok yaygın yerleşimi, HHV-6'nın çok farklı hücre tiplerini in vivo ve in vitro olarak enfekte etmesiyle sonuçlanmaktadır.

HHV-6, T lenfosit, fibroblast (44), doğal katil hücreleri (45), karaciğer hücreleri (46), epitelyal hücreler (47), endotel hücreleri (48), fetal astrositler (49), oligodentrositler ve mikrogliya hücrelerini (50) in vitro olarak enfekte etmektedir.

HHV-6'nın doku dağılımı in vivo olarak daha geniştir. Bu dağılım beyin dokusu, karaciğer dokusu, tonsiller dokusu, tükürük bezleri ve endotelyumu içermektedir. Farklı diferansiyasyon dönemlerindeki kan hücrelerine aktarılmış olabilen latent HHV-6'nın kemik iliği progenitör hücrelerinin enfeksiyonu sonucu olduğu gösterilmiştir. Bu HHV-6'nın monosit/makrofaj ve dentritik hücrelerde gösterilmesiyle kanıtlanmıştır

(51). HHV-6 enfeksiyonuna duyarlı türler oldukça azdır ve HHV-6 enfeksiyon modelini oluşturabilecek bir kemirici bulunmamaktadır. Bunun yanında HHV-6 antikorları, antijenik benzerlikleri olan simian virüslerle enfekte de olabilen maymunlarda gösterilmiştir (52). Simian HHV-6 homologları tanımlanmıştır (53). Farklı maymun türlerinde ve makak örneklerinde HHV-6 ile ilişkili deneysel enfeksiyonlarda başarılı olunmuştur (54).

2.6. Patogenez

HHV-6, solunum sekresyonları ile solunum yolundan bulaşmaktadır. Yenidoğanda genellikle doğum sırasında yakın temasla (aile bireyleri, doktor, hemşire) veya çocuklar arasında olmaktadır. Bulaşmanın virüs ile enfekte sağlıklı görünen kişilerden tükürük ile yayıldığı bilinmektedir. Virüsün kadınlarda genital bölgede gebelerde servikste bulunduğu doğum sırasında yeni doğana bulaşabileceği bildirilmektedir. HHV-6, in vitro T ve B lenfositleri ile lenfosit, makrofaj orjinli çeşitli hücre kültürlerini enfekte etmektedir.

İn vivo olarak ise karaciğer, merkezi sinir sistemi dokuları, tükürük bezleri ve endotelial hücreleri enfekte etmektedir. Enfekte ettiği hücrelerde önce primer enfeksiyon yapmakta primer enfeksiyon sonrası virüs monositlerde, makrofajlarda, olasılıkla tükürük bezlerinde, böbreklerde ve bronşial salgı bezlerinde hücre nükleusunda latent olarak kalmaktadır (2).

2.7. Diğer Virüslerle İlişkisi

2.7.1. HHV-6 ve HIV-1

HHV-6'nın AIDS'de bir kofaktör olarak işlev gördüğü düşünülmüştür (55). Bu iddiayı doğrulama üzerine yapılan çalışmalar klinik gözlemlerden daha çok in vitro veriler üzerinde yoğunlaşmıştır. HHV-6, CD4⁺ T hücre (9) tropizmi nedeniyle HIV-1'e (Human Immunodeficiency Virus 1, İnsan immün yetmezlik virüsü) benzemektedir. Latik HHV-6 enfeksiyonu HIV enfekte kişilerde bu hücre popülasyonunun azalmasına yol açar. HHV-6, HIV-1 ekspresyonunu uyararak HIV-1 LTR (long terminal repeat) promoter bölgesini aktive etme yeteneğine sahiptir (56,57). HHV-6 proteinleri ve HIV-1 TAT (trans-activator of transcription) proteini arasında sinerjistik etkileşimi gösterilmiştir (58,59).

HHV-6, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi immünolojik mediatörlerin ekspresyonunu etkiler (60). HHV-6 ve HIV-1'in koenfeksiyonları in vitro ve in vivo olarak raporlanmıştır (61,62,63). HHV-6'nın, HIV-1'in replikasyonu üzerine etkileriyle ilgili çelişkili raporlar vardır. Bazı çalışmalar ile aktive ettiği gösterilmiştir (64,56). Bazı çalışmalarla da replikasyonu baskıladığı gösterilmiştir. (65,66).

2.7.2. HHV-6 ve EBV

HHV-6 ve Epstein Barr virüsü'nün (EBV) özellikle lenfatik dokular gibi geniş bir doku dağılımı olması ve prevalanslarının yüksek olması nedeni ile aynı hastada birlikte izole edilebilirler.

İn vitro çalışmalarda, HHV-6'nın EBV genlerinin ekspresyonunu arttırarak EBV replikasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Klinik çalışmalarda ise lenfoproliferatif bozukluklarda HHV-6'nın önemli bir role sahip olmadığı görülmüştür (13,67).

2.7.3. HHV-6 ve HPV

HHV-6'nın latent insan papilloma virüsü (HPV; Human Papilloma Virus) olan hastaların servikal epitelinden yapılan kültürlerde enfeksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu enfeksiyonlarda HPV mRNA ekspresyonu artmaktadır. HHV-6 U16 geni tarafından kodlanmış proteinler ve Pzvh-14 genomik klonu, HPV transforme edici genlerini aktive etmektedir. Sonuç olarak klinik araştırmalar ile HHV-6 ve HPV arasındaki ilişkinin neoplaziyi indükleyip indüklemediği tartışılmaktadır (68,69).

2.7.4. HHV-6 ve CMV

Solid organ nakli yapılan hastalarda, HHV-6'nın, CMV enfeksiyonu ile birlikteliği bildirilmiştir. CMV ile HHV-6'nın beraberliğinde meydana gelen enfeksiyonlarda CMV'nin tek başına etken olduğu enfeksiyonlarda görülen ateş, nötropeni, ve diğer viral sendrom bulguları daha baskın olarak görülmektedir. Bu durum HHV-6'nın miyelosüpresif etkisi ve nörotropik bir virüs olmasından dolayı olabilir. Nakilden sonraki dönemde CMV ve HHV-6 enfeksiyonunun beraber görüldüğü hastalarda intravenöz gansiklovir tedavisi verilmesine rağmen CMV hastalığının geliştiği, diğer yandan CMV'nin tek başına etken olduğu durumlarda ise aynı tedavinin uygulanması ile iyileşmenin görüldüğü rapor edilmiştir.

HHV-6, T hücrelerini infekte ederek, interlökin-2 (IL-2), mRNA ve protein sentezini baskılayarak immünsüpresif etki göstermektedir. Bu durum immünsistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (13,70,71).

2.8. Epidemiyoloji

HHV-6 enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Çoğu toplumda seroprevalansı %90'ın üzerindedir. Primer enfeksiyon genellikle erken çocukluk döneminde oluşmakta, iki üç yaşlarında çoğunlukla enfeksiyon geçirilmiş olmaktadır. HHV-6B çoğunlukla erken çocukluk döneminde geçirilirken, HHV 6A %50 oranında erişkin dönemde geçirilmektedir. Kız ve erkek çocuklar arasında fark yoktur.

HHV-6 seropozitifliği ile sosyoekonomik durum arasında ilişki saptanmamıştır (2). HHV-6'nın seroprevelansı, serolojik yöntem duyarlılıkları, HHV-6 ve HHV-7'ye karşı oluşan belli antikorlar arasındaki çapraz reaksiyonlar, immünfloresan yöntemleri ve coğrafik farklılıklar gibi çeşitli farklılıklardan dolayı çok değişken olarak rapor edilmiştir. Fakat yine de yetişkin kişilerde farklı coğrafik bölgelerde, her iki varyantın seroprevelansının %95'in üstünde olduğu tahmin edilmektedir. Artan yaşla antikor titrelerinde azalma görülmektedir (72,73).

HHV-6 varyantları arasında ayırım yapan uygun bir serolojik test bulunmamaktadır. HHV-6B seroprevelansı HHV-6A'dan daha yüksektir. HHV-6 genellikle çocuklarda 6-15 aylık dönemde kazanılır ve inkübasyon periyodu 1-2 haftadır. 6-12 ay arasındaki çocuklarda akut ateş vakaların %20'sini oluşturmaktadır (74). Bunların sadece HHV-6B varyantının oluşturduğu vakalar olduğu düşünülmektedir. Sıklıkla yetişkin yaşta görülen HHV-6A'nın serokonversiyon yaşı bilinmemektedir. Fakat klinik semptomları olmadan ve B varyantının görülmesinden sonra ortaya çıktığı düşünülmektedir (75,76,77).

2.9. Latensi ve Persistans

Roseola'nın akut dönemi dışında, her ne kadar DNA'sı ve transkriptleri çoğu çocukta PCR ile ara ara (yaklaşık %1) saptanabilirse de HHV-6 kültürde nadiren saptanır (78). Bu, PKMNH'lerde gerçek latent enfeksiyonun oluştuğunu akla getirmektedir.

Latent HHV-6 monositlerde, bunların CD34⁺ progenitörlerinde ve PKMNH kökenli dentritik hücrelerde tespit edilmiştir. HHV-6 daha sık olarak tükürükten ziyade tükürük bezlerinde saptanırken HHV-7 sıklıkla hem bezlerde, hem de tükürükte görülmektedir.

HHV-6A'nın, medikal veya cerrahi endikasyonlarla veya travma nedeniyle yoğun bakımda ünitelerinde yatan hastaların %53'ünde reaktif olduğu bildirilmiştir

(79). Yoğun bakım ünitesinde yapılan bir başka çalışmada çoklu organ yetmezliği sendromu olan hastalarda da görülmüştür (80).

2.10. HHV-6 ve Kromozomal Entegrasyon

İnsan herpesvirüs-6 (HHV-6) diğer herpesvirüsler arasında kromozoma entegrasyon özelliğinden dolayı tektir (81,82). Her çekirdekli insan hücresinde viral genomun varlığının bir sonucu olarak kan ve dokuda, kromozoma entegre HHV-6'lı (CIHHV-6) hastalarda, HHV-6'nın çok yüksek seviyeleri tespit edilmiştir.

Kanda 4-10 milyon lökosit olduğu kabul edilirse tam kanda PCR'da HHV-6, kantitatif olarak kromozomal entegrasyondan dolayı çok yüksek olacaktır ($1-10 \times 10^6$ kopya/mL) (83). CIHHV-6 aileden çocuklara kalıtsal olarak geçer (81). HHV-6 virüsünün iki çeşidi de (HHV-6A, HHV-6B) kromozomal entegrasyon yeteneğine sahiptir (82,83). Entegrasyon sıklığının genel popülasyonun %0.8'inde olduğu tahmin edilmektedir.

Transplant popülasyonunda CIHHV-6'nın klinik etkileri ve prevalansı ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur. CIHHV-6'nın kanda yüksek kopyada bulunmasından dolayı aktif enfeksiyon olarak yanlış yorumlanabilir. Bu durum potansiyel toksik ilaçlarla, klinik hastalıkların altta yatan asıl sebebini değerlendirmeden gereksiz tedaviye neden olabilir (84).

2.11. Bulaşma Yolları

HHV-6'nın temel bulaş yolunun solunum sekresyonları olduğu düşünülmektedir. Virusun sağlıklı görünen kişilerden tükürük ile yayıldığı bilinmektedir. Tükürüğün oral, nazal veya konjuktival mukoza ile teması sonucu bulaşmaktadır. Ekzantem subitumlu çocukların virusu tükürük ve dışkı ile çıkardıkları, ayrıca hasta çocukların idrarında da virus bulunduğu bildirilmektedir (85). Hamilelik sırasında hamileliğin immünsüpresyon etkisinden dolayı HHV-6 reaktivasyonu olabilmektedir (86). İntrauterin, perinatal dönemde vertikal bulaşma olabilir; ancak bu yolla bulaşma düşük orandadır. Anne sütü, fekal oral yol ve kan ürünleri ile bulaşmaya genellikle rastlanmaz (87). Sağlıklı yenidoğanlarda serum IgM yokluğunda kord kanı örneklerinde HHV-6 DNA bulunması, intrauterin bulaşmanın olabileceğini desteklemiştir (88,89). Vertikal HHV-6'nın bulaşma insidansı bütün doğumlarda %1-2

oranındadır ve intrauterin HCMV bulaşmasıyla ilişkili değildir (90,87).

Bir hastada intrauterin HHV-6 enfeksiyonundan sonra şiddetli nörolojik komplikasyonlar tanımlanmıştır (91). HHV-6B DNA dizisinin hamile kadınların genital traktında %20 oranında bulunmasına rağmen perinatal bulaşma olası görülmemiştir (92,93). Küçük çocuklar arasında yaygın bir bulaş yolu olan dışkı ağız yolu HHV-6 için tespit edilememiştir. Yine de dışkı örneklerinde HHV-6 pozitif bulunmuştur (94,95).

Sonuç olarak, en sık ve bilinen bulaşma tükürük ile olmaktadır (96).

2.12. Klinik

HHV-6 çocuklarda roseola infantum (ekzantem subitum, altıncı hastalık) etkenidir. HHV-6 enfeksiyonu sıklıkla anneden geçen koruyucu antikorların azalması ile birlikte çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Hastalık yaklaşık 3-5 gün süren ateşin aniden düşmesi ve makülopapüler döküntülerin görülmesi ile karakterizedir. İnkübasyon süresi 9-10 gün, prodromal dönem 3-4 gün sürer (97,98). Döküntü önce boyunda, kulakların arkasında, sırtta başlamakta daha sonra yüz ve distal ekstremiteler hariç vücudun diğer kısımlarına yayılmaktadır. Diğer klinik belirtiler döküntü öncesinde görülebilen palpebral ödem ve suboksipital, postaurikuler ve servikal lenfadenopatiden ibarettir.

Primer HHV-6 enfeksiyonu döküntüsüz ateş veya ateşsiz döküntü şeklinde de kendini gösterebilmektedir. Primer HHV-6 enfeksiyonunun sık görülmeyen fakat daha ciddi formları 40°C üstünde ateş, solunum güçlüğü, timpanik yangı ve konvülziyonlardır. Diğer ciddi fakat nadir görülen komplikasyonlar; karaciğer, dalak büyümesi, Ginatti-Crosti sendromu fontanel şişmesi, aseptik menenjit ve ensefalittir (97).

Çocukların %9'u primer enfeksiyon sırasında asemptomatiktir (98). Primer HHV-6 enfeksiyonu, acil kliniğe başvuruyu gerektiren çocukların önemli bir kısmındaki ateşli nöbet krizlerinin nedenidir. Erişkinlerde ise primer HHV-6 enfeksiyonu nadir fakat ciddi olabilmektedir. Bu vakalarda klinik bulgular, mononükleoz benzeri hastalık, uzayan lenfadenopati, fulminan hepatit olabilir (97). Latent HHV-6 reaktivasyonuna immun sistemi baskılanmış bireylerde rastlanabilmektedir.

Kemik iliği ve kök hücre alıcılarının yarısına yakınında, bazı çalışmalarda da

yarısından fazlasında aktif HHV-6 infeksiyonlarına rastlanmaktadır. Organ transplant alıcılarında HHV-6, HHV-7 ve CMV reaktivasyonu arasında zamansal bir bağ vardır gibidir; transplantasyon sonrası zaman olarak orta değer, sırası ile 20, 27 ve 36 gündür (13). Ateş, ensefalit ve ensefalopati, pnömoni, gecikmiş engraftment, deri döküntüleri, CMV benzeri hastalık, graft versus host hastalığı (GVHD), hepatit, kemik iliği süpresyonu bu hastalarda görülebilen klinik bulgulardır (6,13,99).

HHV-6 nakil sonrası, bazen şiddetli olabilen hastalıklarda düşük ve orta seviyede her zaman yer alır ve HHV-6 aktivitesi immün süpresyonun hem bir belirteci hem de katılımcısı olabilir (100).

2.12.1. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalar

HHV-6 her ne kadar CD 4⁺ T hücreleri enfekte eder ve onlarda çoğalırsa da, AIDS’de HHV-6’nın spesifik bir rolü gösterilememiştir; ancak bazı ilginç veriler olası patojenik etkileşmeyi akla getirmektedir (101,102).

2.12.2. Beyinde enfeksiyon

HHV-6 nöronal hücrelerde ürer ve nörolojik belirtiler açıkça primer enfeksiyonla ilişkilidir. Birçok çalışma HHV-6’nın beyinde her zaman bulunduğunu göstermiştir ve virüsün multiple skleroz ile olası bağlantısını ileri sürmüştür (103). Birçok çalışma hastaların bir kısmında virüs ve hastalık arasında bir bağlantı olduğunu gösterirken diğerleri vakalar ve kontroller arasında bir fark bulamamıştır.

Progresif multifokal lökoensefelopati’de (PML), JC (John cunningham) polyoma virüsün bilinen etyolojik rolüne ilaveten PML vakalarında beyin dokusu arşiv örnekleri insitu PCR ve immünsitokimya ile incelendiğinde, kontrollere göre PML vakalarında daha fazla sıklıkta HHV-6 saptanmıştır (104). Buna karşılık, progresif multifokal lökoensefelopatili AIDS hastalarında BOS örneklerinde HHV-6 PCR ile aktif HHV-6 enfeksiyonu gösterilememiştir (105).

2.13. HHV-6’nın Diğer Hastalıklarla İlişkisi

2.13.1. HHV-6 ve multiple skleroz

MS beyin ve omurilikte aksonların demiyelinizasyonu ile sonuçlanan sinir sisteminin, otoimmün ve inflamatuvar bir hastalığıdır. Challoner, 1995 yılında MS hastalarının beyinlerinde insanla ilişkili olmayan genetik diziler aramaya başladığında

HHV-6 ve MS ilişkisi başlamıştır. Oligodentrositlerin içerisinde HHV-6 DNA'yı yüksek miktarda bulmuştur. Aynı zamanda demiyelinizasyon olan bölgelerde enfekte hücrelerin konsantrasyonunun yüksek olduğunu bildirmiştir (106).

Oligodentrositler miyelin üreten hücrelerdir. Aynı zamanda MS patogeneğinde primer rol oynayan hücrelerdir. MS, nöronal aksonların etrafını kaplayan miyelininin immün sistem aracılı odaksal bozulmasıyla karakterize bir hastalıktır. Sinir impulslarının oluşmasında bozulma olmaktadır. İkincil olarak miyelin hasarı, T-hücre ve makrofaj infiltrasyonu, astrositlerde skar formasyonu ve daha sonraki aşamada aksonal hasara neden olma gibi karakteristik özelliklere sahiptir (107).

Challonerin bulguları önemli tartışmalara neden olmuştur. Literatürde çelişkili bilgi ve yorumların ortaya çıkmasıyla Moore ve Wolfson tarafından ciddi olarak eleştirilmiştir (108). Bu araştırma HHV-6 ile MS arasındaki ilişkiyi ortaya çıkaran ilk yayınlanmış araştırmadır. MS prevalansı, ekvatoral bölgeye göre daha uzak bölgelerdeki popülasyonda artış göstermektedir. Çocukluk çağını düşük insidanslı bölgelerde yaşayan kişilerde yetişkin çağında MS'in görülme ihtimali daha azdır. Bu epidemiyolojik bulgulardan dolayı MS hastalığına enfeksiyon ajanlarının neden olduğu değerlendirilebilir (109).

Araştırmacılar 2004 yılında, HHV-6'ya özgü aktif virüsle, MS'in ilk aşamaları sırasında yüksek seviyede bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir. Kısa süre sonra, araştırmacılar aktif HHV-6 düzeylerinde relaps sırasında yükselme olduğunu bulmuşlardır (4). Ayrıca araştırmacılar tarafından HHV-6 IgG1 ve IgM antikor düzeylerinin kontroller sırasında MS hastalarında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (110).

2.13.2. HHV-6 ve kronik yorgunluk sendromu

Kronik yorgunluk sendromu (CFS; chronic fatigue syndrome), yıpratıcı kronik bir hastalıktır. (111) Nedeni ya da nedenleri bilinmemektedir. CFS'li hastaların merkezi sinir sisteminde (MSS) ve otonom sinir sisteminde anormal bulgular, immün sisteminin çeşitli bölgelerinde kronik aktivasyon bulguları ve düzensiz enerji metabolizması vardır. CFS ölçütlerini karşılayan birçok hastada, hastalık enfeksiyon benzeri bir sendrom ile başlamaktadır.

Aktif replikasyonu olan hastalarda primer lenfosit kültürü kullanılarak HHV-6'nın bulunmasından kısa bir süre sonra CFS benzeri hastalığı olan 259 hastada

yapılan bir çalışma yayımlanmıştır. Hastaların %70'inde aktif replikasyon bulunmuştur. Kontrol grubunun ise %20'sinde bulunmuştur (112).

Hastalığın semptomlarına yol açan etkenin HHV-6'nın reaktivasyonunu ya da gizli immün yetmezliğe yol açan hastalığın, HHV-6 reaktivasyonunu neden olduğu bu çalışmada cevapsız kalmıştır. Sadece serolojik tekniklerle yapılan çalışmalarla aktif enfeksiyonla latent enfeksiyon birbirinden ayıramamıştır. Karışık sonuçlar ortaya atılmıştır. Fakat tamamında olmamakla beraber HHV-6 enfeksiyonu ve CFS arasında ilişki gösterilmiştir (113,114).

Diğer çalışmalar aktif enfeksiyonun saptanabileceği yöntemlerle çalışılmıştır. (primer hücre kültürü, serum ya da plazmada polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi, IgM ile antijen antikor arama) Bu çalışmaların büyük kısmında CFS ile aktif HHV-6 enfeksiyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir (115,116,117).

2.13.3. HHV-6 ve kanser

İnsan herpes virüsleri olan, EBV virüsü ve human herpes virus 8 (HHV-8) onkojenik ajanlar olarak tanımlanmıştır. İlk olarak HHV-6 suşu lenfoproliferatif düzensizliği olan hastalardan izole edilmiştir (8). Özellikle immünsüpresyon durumunda kansere neden olabileceği sürekli olarak ilgiyle araştırılmaktadır. Bu ilgi, transaktivasyon proteinlerini kodlayan HHV-6 genlerinin bulunmasıyla katlanarak artmıştır. pDR7'nin transformasyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

Diğer yandan pU94'ün tümör oluşumuna karşı olabileceği ve transformasyonu indükleyen Ras proteinini baskılayabileceği gösterilmiştir (118). Sonuç olarak, in vitro ortamda birçok regülatuar ve hücre ile etkileşime giren mekanizmanın rol oynadığı HHV-6 enfeksiyonu sırasında, hiçbir transformasyon olayı tespit edilememiştir. Ayrıca, in vivo olarak da HHV-6 birçok proliferatif durumla ilişkilendirilse de, onkojenik özellikleri için hiçbir kanıt elde edilememiştir. Temelde, çok yaygın olarak bulunması ve konak hücre kromozomuna entegre olup latent olarak kalabilmesi, tümör dokularında HHV-6'nın PCR analiz sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır (119,120).

Servikal epitelde HHV-6'nın saptanması (121,122) ve HPV'ye yakın transaktivasyon özellikleri nedeniyle servikal kanserde patogenezinin araştırılmasına yol açmıştır (123). Prospektif bir çalışmada 388 kadında PCR ile HHV-6 DNA bakılarak analiz edilmiş ve servikal lezyonun derecesinde fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, servikal kanserde rolünün olmadığı bulunmuştur (124). Oral karsinom patogeneğinde malign ve malign olmayan oral lezyonlarda HHV-6 antijeninin sıklıkla saptanması patogeneğinde rolü olduğunu düşündürse de, bu bulguları çalışmalarla desteklenmeyi beklemektedir (125).

2.14. Örneklerin alınması, taşınması ve saklanması

Virüs izolasyonu için, kan örnekleri antikoagülanlı (heparin gibi) tüpe alınmalı ve 24 saat içinde ficol gradient işlemine tabi tutulmalıdır; hücreler kesinlikle dondurulmamalıdır. İzolasyondan sonra, HHV-6 enfekte hücreler (hem primer hücre kültürü, hem hücre serileri) standart kriyoprezervasyon vasatında saklanabilirler. Moleküler yöntemlerle virüsün saptanması için (örneğin PCR ile) tükürük örnekleri; filtre kâğıdı stripleri, ağız sürüntüsü, boğaz sürüntüsü gibi yöntemlerle toplanabilir. PCR için serum, plazma ve hücreler dondurulmuş olarak gönderilebilir (126).

2.15. Mikrobiyolojik Tanı

Altıncı hastalığa klinik gözlemlerde genel olarak yanlış teşhis konulmaktadır. Sık olarak rubella ve kızamık enfeksiyonları ile karışmaktadır. Özellikleri tipik olmasına rağmen deri döküntüleri ilaç reaksiyonları ile karıştırılabilmektedir. Görülme yaşının kızamık, kabakulak ve rubella aşılarının uygulandığı zamana denk gelmesi nedeniyle HHV-6 enfeksiyonunun neden olduğu nörolojik komplikasyonlar, aşı komplikasyonları ile de karışabilmektedir. Bu sebeple HHV-6 enfeksiyonunun kliniğinin araştırılması ve laboratuvar testlerini kullanarak ayırıcı tanının yapılması gerekmektedir (13,14).

2.15.1 Direkt tanı

a) İzolasyon yöntemleri

HHV-6, her ne kadar hasta PKMNH'leri ve insan göbek kordon kanı (GKK) lenfositleri ile kültür yöntemini kullanılarak periferik mononükleer hücrelerden izole edilebilirse de (8,30) klinik örneklerden primer izolasyon tanı laboratuvarlarında rutin olarak yapılmamaktadır. Primer hücre kültür vasatı olarak %10 fetal kalf serumu, mililitrede 100 Ü penisilin, 100 µg streptomisin ve 0,29 mg L-glutamin ilave edilmiş RPMI-1640 kullanılır. Hücreler başlangıçta 10⁶/ml yoğunlukta kültüre edilir.

Fikol ile saflaştırılmış primer GKK lenfositleri, %5 CO₂'li ortamda önce 2-3 gün süre ile mililitresinde 0.01 hidrokortizon ve 2 µg fitohemaglutinin (PHA) içeren hücre

kültür vasatı ile uyarılır. Uyarılmış GKK lenfositleri daha sonra eşit hacimde hastanın fikal purified periferel kan mononükleer hücreleri ile birlikte tarif edilen vasatta (sadece fitohemaglutinin rekombinant IL-2 ile değıştirilir; IL-2 konsantrasyonu 0.1-5 Ü/ml arasında değışmektedir) kültüre edilir.

Kültürler sitopatik etki yönünden hergün kontrol edilir. Tipik HHV-6 sitopatik etkisi (CPE), GKK lenfosit kümelerinin kaybolması ve sinsisya adı verilen büyük balonlaşmış hücre görünümleridir. 7-10 gün sonra kültür, taze uyarılmış periferel mononükleer hücrelere pasajlanır. İlave 7-10 gün sonra kültürler hala sağlıklı görünümde ise negatif olarak kabul edilir.

HHV-6 enfeksiyonu, immünfloresan veya PCR ile doğrulanmalıdır. Primer GKK lenfosit kültürlerinde elde edilen izolatlar devamlı hücre serilerinde üremeye adapte edilebilirler; bunun için HHV-6 izolatları için HSB-2 veya J-JHAN hücreleri, HHV-6B izolatları için de molt-3 hücreleri kullanılır. Kültür şartları primer hücreler için tarif edilene benzerdir. HHV-6 üretimi önemli oranda tecrübe gerektirmektedir (41,127,128).

b) Antijen saptama yöntemleri

HHV-6 antijenleri özgün monoklonal antikorlar kullanılarak gösterilebilir. Antijen saptama yöntemi, hücre kültüründe HHV-6 enfeksiyonunu doğrulamada ve dokularda viral proteinlerin gösterilmesi amaçlarıyla da kullanılmaktadır. HHV-6 antijenemi testinde, HHV-6'ya özgü antijenler aktif enfeksiyon sırasında PKMH'lerde belirlenebilmektedir. İyi karakterize edilmiş, ticari olarak temin edilebilen antikorlar, p41'e (DNA polimeraz yardımcı faktör), gp 116/54/64'e (glikoprotein B) ve HHV-6B 101K/p100 tegüment proteinine spesifik monoklonal antikorlardır. Spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak HHV-6A ve HHV-6B varyant ayırımı da yapılabilir (13,14,129).

c) Nükleik asit saptama yöntemleri

HHV-6'nın direk tanısı in situ hibridizasyon, in situ PCR (130,131) ve immünohistokimya (132) ile konulabilir. Bu yöntemlerin bir yeri olmakla beraber, direk tanıda kullanılan en yaygın yöntem PCR'dır. Viral aktivitenin görüldüğü anlarda bile viral DNA'nın nispeten düşük düzeylerde olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, PCR duyarlılığı HHV-6 saptanmasında özel bir öneme sahiptir. HHV-6'nın muhtelif genomik bölgelerini hedefleyen birçok PCR stratejisi

yayınlanmıştır. Herhangi bir genomik hedef veya stratejinin bir diğerinden üstünlüğü gösterilememiş olup daha fazla yöntem standardizasyon ve karşılaştırılmasına gereksinim vardır.

Kullanılan yöntemler tek-hedef ve çok hedefli PCR (multipleks PCR) stratejileri, kalitatif ve kantitatif ölçümler, DNA (PCR) veya RNA'yı (revers transkriptaz, RT-PCR) hedefleyen yöntemleri içermektedir. HHV-6A ve HHV-6B tür spesifik PCR primerler, tür spesifik hibridizasyon problemleri, ürün büyüklük farklılıklarına göre, PCR ürünlerinin restriksiyon enzim analizi veya real-time PCR kullanarak erime eğrisi analizi ile kolayca ayırt edilebilirler.

Klinik laboratuvarlarda HHV-6 kantitatif PCR, çoğu insan herpesvirüslerin aynı anda analizini sağlayan herpesvirüs çok hedefli (multipleks) PCR'ın bir parçası olarak kurulabilir (133,134). Çok hedefli test kullanıldığında, ayırıcı tanı için normalde düşünülmeyen virüslerle ilgili pozitif sonuçların klinik önemini veya bu anlamda geçersizliğini klinik olarak değerlendirmede göz önünde bulundurmak gerekir. HHV-6A, HHV-6B ve HHV-7'yi kantitatif olarak saptayan ve ayırt eden bir LightCycler tabanlı yöntem tarif edilmiştir (135).

Kontaminasyon riski nedeniyle nested-PCR kullanımından kaçınılmalıdır. Ekstrakt hazırlamak için lize edilen örnek materyalin miktarı (örneğin hücre sayısı ve sıvı hacmi) ve daha sonra bundan her bir reaksiyona ilave edilecek miktar, dikkatlice standardize edilmeli ve sonra da duyarlılık hesaplama sırasında göz önünde bulundurulmalıdır (136).

2.15.2. İndirekt tanı

Serolojik testler

HHV-6 antikor tayini için birçok ELİZA (Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi tarif edilmiştir. Çoğu HHV-6 antikor testi enfekte hücre kültür lizatı kullanma esasına dayanır; saflaştırılmış viral antijenler de kullanılabilir. İmmunoblot yönteminde (IgG, IgM) en duyarlı HHV-6 antijeni p100 veya 101K diye tanımlanan yaklaşık 100 kDa'lık bir viriyon proteinidir. İndirekt immünofloresan yöntem (IFA), HHV-6 spesifik IgM ve IgG antikorlarının saptanması ve kantitasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır.

Geçmişteki veya yakın zamandaki enfeksiyon IFA tabanlı avidite antikor testleri yapılarak ayırt edilebilmektedir. HHV-6 enfeksiyonundan sonra düşük düzey

avidetinin yüksek değerlere çıkması yaklaşık 5 ay sürmektedir. Antikor avidite testi HHV-6 ve HHV-7 primer enfeksiyonunu ayırmada da kullanılabilir (129).

Duyarlılık ve özgüllük

Genel olarak, ELİZA tabanlı testlerin IFA'dan daha duyarlı olduğu düşünülmektedir, fakat pratikte her zaman böyle değildir ve duyarlılık tanımının sadece enfeksiyonun saptanması veya end-point titre üzerine dayandırılıp dayandırılmadığına göre değişebilir.

HHV-6 serolojisi ile ilgili özel sorunlar HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 ve CMV arasındaki çapraz reaksiyonlardır (12,88). Antijen olarak enfekte hücreleri kullanan şu anki serolojik yöntemler HHV-6 ve HHV-7 antikor yanıtını ayırt edememektedir (129).

2.15.3. Primer enfeksiyonların tanısı

HHV-6 primer enfeksiyonu tanısı için aşağıdaki tanımlar kullanılmıştır:

- a) Akut ve konvelasan dönemde (2 ile 4 hafta aralıklarla toplanmış) serum veya plazma örnekleri arasındaki serokonversiyon
- b) Serum veya plazmada spesifik düşük aviditeli antikorların saptanması (129)
- c) 3 aydan büyük çocuklarda (maternal antikorların yarattığı sorunlar nedeniyle bazıları 6 ayı önermektedir) hastalığın ortaya çıkışından sonraki 5 gün içinde tam kan ve IgG negatif plazmada pozitif PCR sonucu (137)
- d) Hastalığın akut dönemi süresince alınan PCR-pozitif kan ve PCR-negatif tükürük (138)
- e) Pozitif serum IgM ve/veya serum PCR birlikte (her birinin tek başına düşük duyarlılığı nedeniyle) değerlendirildiğinde (139)
- f) IgG antikor yokluğunda IgM antikor saptanması.

Bireylerin %5'inin herhangi bir anda HHV-6 IgM yönünden pozitif olması ve pencere dönemi iyi tanımlanmadığından sadece IgM antikorlarının bakılması çok az bir değere sahiptir.

Primer HHV-6 enfeksiyonu hemen her zaman 2-3 yaş öncesi çocuklarda olur. Bu nedenle, klinik belirtilerin roseola uyumlu olduğu durumlarda, IgM ve IgG'nin her ikisinin de pozitif olduğu serum örneği, eğer kan IgG yanıtı geliştikten sonra alınmışsa primer enfeksiyona işaret edebilir; bu durumda avidite testi tanıyı açıklığa kavuşturacaktır. Kantitatif PCR testleri tercih nedenidir; zira tanısal açıdan kuşkulu

serum veya plazma pozitifliğine yol açan germline hücrelerine entegre viral DNA'ya bağlı çok yüksek miktarlarda virüs yüküne sahip bireylerin saptanmasına neden olmaktadır (129).

2.15.4. Aktif enfeksiyonların tanısı

Hem primer enfeksiyonlar hem de reaktivasyonları içerecek şekilde, aktif enfeksiyonların tanısı için aşağıdaki ölçütler düşünülmektedir:

- a) Periferik mononükleer hücrelerden virüs izolasyonu (altın standart)
- b) Akut ve konvelasan dönem serum veya plazma örnekleri arasında 4 kattan fazla antikor artışı
- c) Serum veya plazmada HHV-6 DNA PCR pozitifliği (düşük duyarlılığı nedeniyle tek başına güvenilir değildir)
- d) Tam kan veya periferik mononükleer hücrelerde kantitatif PCR ile tanımlanmış bir eşik değeri üzerinde sonuç (örneğin bazal HHV-6 viral yük belirlenen düzenli takip altındaki transplant hastaları; viral yükte anlamlı bir artış reaktivasyonu işaret eder)
- e) RT-PCR ile spliced HHV-6 mRNA saptanması (140).

2.16. Tedavi

Özet olarak, HHV-6 enfeksiyonu bağışıklık sistemi normal çocuklarda kendi kendini sınırlar ve tedavi almasına gerek yoktur. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde latent virüsün reaktivasyonu sonucu hayatı tehdit eden komplikasyonlara neden olabilir. Etkili bir aşı mevcut değildir. HHV-6 enfeksiyonunun tedavisi için tehlikesiz, güvenli ilaçlara ihtiyaç vardır. HHV-6'ya karşı antiviral tedavide hiçbir kontrollü çalışma yapılmamıştır ve HHV-6 enfeksiyonlarının tedavisi için hiçbir bileşik resmi olarak onaylanmamıştır.

Bu yüzden HHV-6'ya karşı klinikte kullanılan ilaçlar HCMV tedavisi ve profilaksisinde kullanılanlarla aynıdır. Bunlar gansiklovir ve valgansiklovir daha az önemli olan asiklovir, nükleozid analogu cidofovir, pirofosfat analogu foscarnet'dir. Bu antiherpesvirüs bileşenlerinden birçoğu önemli eksikliklere sahip; bu nedenle, HHV-6 enfeksiyonunun tedavisi için günümüzde yeni stratejiler bulunması gereklidir (141).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Etik Kurulu tarafından, 10.04.2012 tarihinde verilen onay sonucu, Helsinki Deklarasyonu kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde pediatrik kök hücre nakli bölümünde kök hücre nakli yapılan 37 allojenik, 2 otolog toplam 39 hasta dahil edilmiştir.

3.2. Hasta Seçimi

Ekim 2011 - Haziran 2012 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Çocuk Hematoloji Polikliniğine başvuran yaşları 1 ile 17 arasında değişen çocuk hastalardan, kök hücre nakli olacak hastaların nakil öncesi alıcı ve vericiden birer tane plazma ve tam kan örneği nakil sonrası da alıcıdan, nakil tarihini takip eden on haftalık dönemde haftada bir plazma örneği alınması planlandı. Nakil sonrası en az dört örneği olan hastalar çalışmaya dahil edildi.

3.3. İstatistiksel yöntem

Bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi SPSS programı ile yapılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanılmıştır ve $p>0.05$ anlamlılık düzeyine göre değerlendirilmiştir.

PCR

Ekstraksiyon (nükleik asit izolasyonu veya saflaştırılması)

Mikroorganizmanın saf nükleik asidinin elde edildiği aşamadır. DNA'nın silika membran yapısındaki filtrelerde tutulması sonucu elde edilmektedir.

MagNa Pure cihazı

MagNa Pure LC tam otomatize bir ekstraksiyon cihazıdır. Cihaz bir bilgisayara bağlıdır ve bu bilgisayara yüklenen programlar doğrultusunda ekstraksiyon işlemi kapalı devre olarak gerçekleştirmektedir. Cihaz bünyesinde farklı işlemlerin gerçekleştirildiği bölümlere ayrılmıştır.

Cihazın içindeki farklı bölümlerde pipetleme, yıkama, magnetik alan oluşturulması ve kaldırılması, elde edilen DNA'nın elüsyon buffer içinde saklanması gibi işlemler gerçekleştirilebilmektedir.

EDTA'lı tüp içine alınan kan ve plazma örnekleri; MagNa Pure LC cihazında, MagNa Pure LC total nükleik asit İzolation Kit (roche diagnostics) prosedürüne uygun olarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

MagNa Pure LC cihazındaki işlemlerden önce dışarıda yapılması gerekli çalışmalar

Kit içinde bulunan malzemeler:

1. Yıkama Solüsyonu 1 (siyah şişe): PCR inhibitörlerini uzaklaştırmak için.
2. Yıkama Solüsyonu 2 (mavi şişe): Tuz, protein, vs. uzaklaştırmak için.
3. Yıkama Solüsyonu 3 (kırmızı şişe): Tuz vs. uzaklaştırmak için.
4. Lizis buffer (yeşil şişe): Hücre lizisi ve DNA'nın bağlanması için
5. Proteinaz K (pembe şişe): Proteinlerin sindirimi için.
6. Manyetik cam partikül süspansiyonu: DNA'yı bağlamak için.
7. Elüsyon buffer: DNA'yı yeniden serbest hale getirmek için.

Manyetik cam partikülleri süspansiyonu (MGPs) kullanılmadan önce, stoklama sırasında çökmeye eğilimli olduğu için, homojenize hale getirmek amacıyla karıştırıldı (vortekslendi).

Proteinaz K: Her proteinaz K vialine (küçük şişe) 3.0 ml elüsyon buffer eklendi. Erittikten sonra 2.0 ml daha elüsyon buffer eklendi (toplam 5.0 ml) ve karıştırıldı.

Burada kullanılan izolasyon metodu magnetik partikül (boncuk) tekniğidir.

MagNa Pure LC 2.0 cihazının software'inden Total NA serum-plazma-kan protokolü seçildi. Sonra her bir örnek için örnek ve elüsyon hacmi programa tanımlandı (Örnek volümü: 200 µl, elüsyon volümü: 100 µl). Ne kadar sayıda plazma ve kan örneği çalışılacağı seçildi ve örnek sayısına göre reaktifler hesaplanarak cihaza yüklendi.

Tablo 3.1. Örnek sayısına göre reaktif hacimlerin belirlenmesi (32 reaksiyon için).

Kit numaraları	Kullanılan solüsyonlar	Kullanılan miktar (µL)
1	Wash Buffer I	31.2
2	Wash Buffer II	15.9
3	Wash Buffer III	32.6
4	Lysis/Binding Buffer	10.6
5	Proteinase K	4.2
6	Magnetic Glass Particles	5.8
7	Elution Buffer	6.8

MagNa Pure cihazının çalışması: Cihaz çalışma kitine uygun olarak bilgisayara yüklenen program doğrultusunda, reagenlerin ve saf malzemelerin miktarını ve cihaz içi lokalizasyonunu bağlı bulunduğu bilgisayarın ekranında göstermektedir. Cihazın cam dış kapağı açılarak reagenler ve saf malzemeler cihaz üzerinde kendilerine ayrılan uygun bölümlere yerleştirildikten sonra hasta örneklerini içeren örnek kartuşu bilgisayar ekranında gösterilen uygun bölgeye yerleştirilir. Cihazın dış cam kapağı kapatılır ve bilgisayar üzerinden çalıştırılır.

Cihaz önce sarf malzemelerin yerini ve miktarını robotik kolda yer alan optik okuyucu ile kontrol eder ve eksikse uyarı verir, değilse robotik kol aracılığıyla önce pipet uçlarını alır ve reagenleri uygun birimlere dağıtarak çalışmaya başlar. Bu sırada bilgisayar ekranından çalışmanın aşamaları ve testin ne zaman sonlanacağı görülebilmektedir.

DNA izolasyonu MagNa Pure LC Total nükleik asit izolasyon Kiti (Roche Diagnostics, Germany) ile MagNa Pure LC otomatize izolasyon sisteminde yapıldı. Kit içinde bulunan ve sistemin gereksinimlerini içeren reaktifler cihazda ilgili pozisyonlara yerleştirildi. Özel kartuşlar üzerine kan ve plazma örneklerinden 200 µl örnek otomatik pipetle konuldu. İşlemden önce lizis tamponu içinde bulunan proteinaz K'nın etkisiyle açığa çıkarılan nükleik asitler yine lizis tamponu içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonunun etkisiyle karışıma eklenen manyetik boncuklara bağlanması sağlandı. Birkaç yıkama işlemiyle, manyetik boncuklara bağlanmamış olan maddeler ortamdan uzaklaştırıldı.

Daha sonra yüksek ısı etkisi ve tuz konsantrasyonunun düşürülmesiyle birlikte nükleik asitler manyetik boncuklardan ayrılarak saf olarak elde edildi. Tüm bu işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi. Cihazın içerisinde, örneklerden otomatik olarak nükleik asit izolasyonu yapan bir bölüm ile işlemler sonunda örneklerin bekletildiği bir soğutma bloğu mevcuttu. Yaklaşık 1-1.5 saat süren izolasyon işlemi sona erdiğinde kartuşlar alındı ve elde edilmiş olan nükleik asitler PCR testleri için kullanıldı veya -80°C’de saklandı.

HHV6 DNA kantitasyonu

HHV6-DNA’sı real-time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Karlsson T. ve arkadaşları tarafından tanımlanan primer dizileri kullanılarak 63 baz çiftlik alan amplifiye edilmiştir (142). Hedef bölgeye ait sinyal deteksiyonu 5’ ve 3’ uçları sırasıyla FAM ve TAMRA işaretli Taq-man probu kullanılarak yapılmıştır. PCR inhibitörü varlığı Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) geni içerisinde yer alan bölgenin amplifikasyonu ve amplifiye edilen bölgenin 5’ ve 3’ uçları, sırasıyla BHQ3 ve Cy5 işaretli Taq-man probuyla deteksiyonu ile test edilmiştir. Beş mikrolitre ekstrakt örneği, 2.5 pmol hedef forward primeri, 15 pmol hedef reverse primeri, 7.5’arpmol internal kontrol primerleri (GAPD forward ve GAPD reverse), sırasıyla 10 ve 5 pmol hedef ve internal kontrol probları, 1.5 mM MgCl₂, her bir dNTP’ den 200 µM ve 1.25 U Hotstart Taq DNA polymerase içeren 20 µL’lik mastermiks karışımına eklendi.

Kullanılan primer ve prob dizileri Tablo 3.2’de gösterilmiştir. 95°C’de 10 dakikalık süre sonrasında 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de bir dakikadan oluşan 45 döngülük real-time amplifikasyon işlemi, Rotor-Gene (Corbett-Research, Australia) cihazı kullanılarak, yapılmıştır. Amplifikasyonun kantitatif olarak yapılabilmesi için gerekli standartlar, pozitif bir hastanın amplikon örneğinin, onar katlık beş farklı konsantrasyonunun UV spektrofotometre ile hazırlanması ve analizler sırasında kullanılması ile sağlandı.

Hedef dizilerin, internal kontrol dizileri ile birlikte amplifiye olmadığı örneklerin PCR inhibitörü içerdiği sonucuna varıldı ve bu örnekler analiz dışında bırakıldı.

Tablo 3.2. PCR’da kullanılan primer ve prob dizileri.

PRİMER	POLARİTE	DİZİ
TargetForw.	Sense	5’-CCCGAGCGCTAGGTTGAG-3’
TargetRev.	Anti-sense	5’-AACGCTCGTCACAAACATAAAATTC-3’
GAPD Forw.	Sense	5’-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3’
GAPD Rev.	Anti-sense	5’-GAAGTTGAAGTTCGGAGT-3’
TargetProbe		5’-FAM-ATGATCGAAACGCCTACAC –TAMRA
GAPD Probe		5’-Cy5-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-BHQ3-3’

ELİZA

Testin yöntemi

HHV-6 IgG ELİZA yöntemi güvenilir immunoanalitik bir yöntemdir. Stripler HHV-6 antijenleriyle kaplanmıştır. Anti HHV-6 antikorları test edilen serumda varsa hareketsiz antijenlere bağlanır ve antijenlerle birleşen antikorlar daha sonra horseradish peroksidazla etiketli hayvan anti-insan IgG antikorları tarafından tanınır. Bağlanmış etiketli antikorlar, kromojenik substratla enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkar. Negatif serum reaksiyon vermez.

Örneklerin hazırlanması

Serum örnekleri dilüsyon bufferla 1:100 oranında dilüe edildi. Kalibratör ve kontrol serumu dilüe edilmedi. Yıkama solüsyonu distile ya da iyonize suyla uygun hacimlerde 10 defa dilüe edilerek hazırlandı. Konsantre edilmiş yıkama solüsyonunda tuz kristalleri varsa yıkama banyosunda 32 - 37°C arasında ısıtıldı. Px-konjugat dilüsyon bufferla 50 defa dilüe edildi. TMB substrat ve Stop solüsyonu kullanıma hazır oldukları için dilüe edilmedi.

Yöntem prosedürü

İlk olarak birinci kuyucuğa dilüsyon bufferi pipetleyerek başlandı. Daha sonra gelen iki kuyucuğa kalibratör, sonraki iki kuyucuğa sırasıyla negatif kontrol ve pozitif kontrol serum pipetlendi. Kalan kuyucuklara dilüe edilmiş serum örnekleri, pipetleme planına uygun olarak örnek sıraları karışmayacak şekilde pipetlendi. Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

Daha sonra kuyucuklardan sıvılar aspire edilip dezenfektan içeren şişelere uygun şekilde konuldu. Kuyucuklar 250 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

Kuyucukalarda sıvı kaldıysa plate ters çevrilerek sert bir zemine vuruldu daha sonra son kalan damlalar absorban kâğıt ile uzaklaştırıldı. Dilüe edilmiş Px-konjugattan her kuyucuğa 100 µl eklendi. Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklar 250 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez aspire edilip yıkandı.

Her bir kuyucuğa 100'er µl TMB substratından ilave edildi. Oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara TMB dağıtılmaya başladığında zaman ölçülmesine başlandı.

Stripler alüminyum folyo ile örtüldü veya karanlık bir ortama konuldu. Daha sonra stop solüsyonundan 100 µl ilave edilerek reaksiyon durduruldu. TMB de olduğu gibi aynı pipetleme ritmi kullanılarak bütün kuyucuklarda reaksiyon zamanının aynı olması sağlandı. Mikroplate birkaç kez vurularak reaktiflerin tamamen karışması sağlandı. Mikroplateler 20 dakika içerisinde mikroplate okuyucularıyla 450 nm absorbansta okutuldu.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatrik Kök Hücre Transplantasyonu Biriminde 06.10.2011 - 04.06.2012 tarihleri arasında kök hücre transplantasyonu olan 40 hastanın nakil öncesi ve sonrası kan örnekleri ve bu kan örnekleri santrifüj edilerek plazma örnekleri alındı. Fakat çocuk kök hücre nakli bölümünde nakil olan alıcılardan bir tanesi, yaşının 23 olması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Geriye kalan 39 hastanın yaşları bir ile 17 arasında değişmekteydi (ortalama: 8.92 ± 4.906). Hastaların yaşlarının ortanca değeri dokuz bulundu.

Hastalardan nakil öncesi bir defa kan ve bu kanın santrifüjü sonucu elde edilen plazması, nakil sonrası ise her hastadan haftada bir defa olacak şekilde 10 hafta kan örneği alınması planlandı, alınan kanlar santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Toplam 295 kan+plazma örneği toplandı. Toplanan kan ve plazmalar -80°C 'de muhafaza edildi.

Örneklerin 256'sı plazma ve 39'u kan örneğinden oluşmaktaydı. Bir hastadan nakil sonrası alınan örnek sayısı dört ile 10 arasında değişmekteydi (ortalama: 6.25 ± 1.6). Toplam plazma sayısının ortanca değeri altı bulundu.

Örneklerin nakil sonrası toplama zamanı 25 ile 70 gün arasında değişmekteydi. Nakilden sonra örnek toplama zamanının ortanca değeri 52 ve örnek toplama son günü ortalama 51.6 bulundu.

Toplam sayısı 295 olan örneklerden, real-time PCR yöntemi ile HHV-6 DNA pozitifliğine bakıldı. Aynı zamanda 38 hastanın nakil öncesi plazma örneklerinden HHV-6'ya yönelik serolojik durumuna bakıldı. Hastaların nakil öncesi serolojik durumu ve nakil sonrası HHV-6 DNA pozitifliği ile birlikte klinik bulguların ilişkisi incelendi. Toplam 39 hastadan 12'sinde (%30.8) HHV-6 DNA en az bir örnekte pozitif, kalan 27 (%69.2) hastada negatif bulundu. Nakilden sonra HHV-6 DNA ilk pozitiflik günü iki ile 42 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 23.5 ± 10.78). Ortanca değeri ise 22.5 bulundu.

Pozitif bulduğumuz 12 hastanın mililitrede ki kopya sayıları 113 ile 11214931 kopya arasında değişmekteydi. Pozitifliklerin kopya sayılarının ortanca değeri 1774 kopya/ml bulundu.

Otuzdokuz hastanın 23'ü (%59) HLA uyumlu, 16'sı (%41) HLA uyumsuz hastalardı. HLA uyumsuz hastaların 10'unda (%62.5) HHV-6 DNA pozitif bulundu.

HLA uyumlu hastaların ise ikisinde (%8.7) HHV-6 DNA pozitif bulundu. HLA uyumsuz hastalarda HHV-6 pozitifliğinin daha fazla oranda saptandığı görüldü. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p= 0.001$).

Nakil öncesi HHV-6 IgG durumu ile nakil sonrası HHV-6 DNA durumu arasındaki ilişki; Toplam 39 hastanın 38'inde nakil öncesi plazma örneklerinden HHV-6 IgG bakıldı. Hastaların 34'ünde (%89.5) pozitiflik saptandı. Üç (%7.9) hastada grey zone, bir (%2.6) hastada negatif bulundu. Serolojisini pozitif bulduğumuz hastaların 10'unda (%29.4) aynı zamanda HHV-6 DNA da pozitif bulundu. Grey zone çıkan üç hastanın ikisinde (%66.7) HHV-6 DNA pozitif, bir (%33.3) hastada negatif bulundu. Hastaların serolojik durumları ve HHV-6 DNA pozitiflikleri Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1. HHV-6 IgG ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki.

			HHV-6 DNA		Toplam
			Negatif	Pozitif	
HHV-6 IgG	Negatif	Sayı	1	0	1
		Yüzdesi (%)	100.0%	.0%	100.0%
	Pozitif	Sayı	24	10	34
		Yüzdesi (%)	70.6%	29.4%	100.0%
	Greyzone	Sayı	1	2	3
		Yüzdesi (%)	33.3%	66.7%	100.0%
Toplam		Sayı	26	12	38
		Yüzdesi (%)	68.4%	31.6%	100.0%

Cinsiyet ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde; hastaların 26'sı (%66.7) erkek çocuk, 13 (%33.3) tanesi kız çocuktur. Toplam 26 erkek çocuğun dokuzunda (%34.6) HHV-6 DNA pozitif bulundu. Toplam 13 kız çocuğun üçünde (%23.1) HHV-6 DNA pozitif bulundu. Cinsiyet ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Cinsiyet ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki Tablo 4.2'de görülmektedir.

Tablo 4.2. Hasta cinsiyeti ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki.

			HHV-6 DNA		Toplam
			Negatif	Pozitif	
Hasta cinsiyeti	Kadın	Sayı	10	3	13
		Yüzdesi (%)	76.9%	23.1%	100.0%
	Erkek	Sayı	17	9	26
		Yüzdesi (%)	65.4%	34.6%	100.0%
Toplam		Sayı	27	12	39
		Yüzdesi (%)	69.2%	30.8%	100.0%

Klinik bulgulardan akut GVHD ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki incelendiğinde; toplam 39 hastanın 10'unda aGVHD (akut graft versus host hastalığı) gelişti, 29 hastada gelişmedi. Bu aGVHD gelişen 10 hastanın dördünde (%40) aynı zamanda HHV-6 DNA'da pozitif bulundu. Diğer altı hastada ise HHV-6 DNA (%60) negatif bulundu. Akut GVHD gelişmeyen 29 hastanın sekizinde (%27.6) HHV-6 DNA pozitif, kalan 21 (%72.4) hastada ise negatif bulundu. Akut GVHD ile HHV-6 DNA pozitifliği arasında ki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Nakil sonrası akut GVHD ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki Tablo 4.3'de görülmektedir.

Tablo 4.3. Nakil sonrası akut GVHD ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki.

			HHV-6 DNA		Toplam
			Negatif	Pozitif	
Akut GVHD	Yok	Sayı	21	8	29
		Yüzdesi (%)	72.4%	27.6%	100.0%
	Var	Sayı	6	4	10
		Yüzdesi (%)	60.0%	40.0%	100.0%
Toplam		Sayı	27	12	39
		Yüzdesi (%)	69.2%	30.8%	100.0%

Bir başka parametre Antitimosit globulin (ATG) verilen hastalardaki HHV-6 DNA pozitifliği; toplam 27 hastaya ATG verilmiş, ATG verilen 27 hastanın altısında (%22.2) HHV-6 DNA pozitif bulunmuş, kalan 21 (%77.8) hastada ise negatif bulunmuştur. ATG verilmeyen 12 hastanın ise altısında (%50) HHV-6 DNA pozitif, kalan altı hastada negatif bulunmuştur. ATG verilen hastalarla HHV-6 DNA pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$). ATG verilen hastalarla HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki Tablo 4.4'de görülmektedir.

Tablo 4.4. ATG tedavisi alan hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik oranları.

			HHV-6 DNA		Toplam
			Negatif	Pozitif	
ATG verildi mi ?	Hayır	Sayı	6	6	12
		Yüzdesi (%)	50.0%	50.0%	100.0%
	Evet	Sayı	21	6	27
		Yüzdesi (%)	77.8%	22.2%	100.0%
Toplam		Sayı	27	12	39
		Yüzdesi (%)	69.2%	30.8%	100.0%

Miyeloablatif tedavi ve HHV-6 DNA pozitif hastalar arasındaki ilişki; toplam 39 hastanın 34'üne miyeloablatif tedavi verilmiş olup, miyeloablatif tedavi alan 34 hastanın 12'sinde (%35.3) HHV-6 DNA pozitif, 22'sinde (%64.7) negatif bulunmuştur. Tedavi almayan beş hastanın hiçbirisinde HHV-6 DNA pozitifliği saptanmamıştır. HHV-6 DNA'sını pozitif olarak bulduğumuz 12 hastanın tamamının miyeloablatif tedavi alan hastalar olduğu belirlenmiştir. Fakat miyeloablatif tedavi ve HHV-6 DNA pozitifliği arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. ($p>0.05$). Miyeloablatif tedavi alan hastalardaki HHV-6 DNA pozitiflik oranları Tablo 4.5'de görülmektedir.

Tablo 4.5. Miyeloablatif tedavi alan hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik oranları.

			HHV-6 DNA		Toplam
			Negatif	Pozitif	
Miyeloablatif tedavi	Yok	Sayısı	5	0	5
		Yüzdesi (%)	100.0%	.0%	100.0%
	Var	Sayısı	22	12	34
		Yüzdesi (%)	64.7%	35.3%	100,0%
Toplam		Sayısı	27	12	39
		Yüzdesi (%)	69.2%	30.8%	100.0%

HHV-6 DNA pozitifliği ile nakil sonrası ateş görülen hastalar arasındaki ilişki; toplam 39 hastanın nakil sonrası dönemde 37'sinde (%94.9) ateş yüksekliğinin görüldüğü dönemler oldu, kalan iki (%5.1) hastada ise ateşli dönem olmadı. HHV-6 DNA'sı pozitif bulunan toplam 12 hastanın 11'inde (%91.7) ateş görüldü kalan bir (%8.3) hastada ise hiç ateş görülmedi. HHV-6 DNA'sı negatif bulunan 27 hastanın 26'sında (%96.3) ateşin olduğu dönemler görüldü, bir (%3.7) hastada ise hiç ateşli

dönem olmadı. HHV-6 DNA pozitifliği ile nakil sonrası ateş yüksekliği olan hastalar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). HHV-6 DNA pozitifliği ile nakil sonrası ateş görülen hastalar arasındaki ilişki Tablo 4.6’da görülmektedir.

Tablo 4.6. Nakil sonrası hastalarda HHV-6 DNA pozitiflik durumu ile ateş ilişkisi.

			Ateş bulgusu		Toplam
			Yok	Var	
HHV-6 DNA	Negatif	Sayı	1	26	27
		Yüzdesi (%)	3.7%	96.3%	100.0%
	Pozitif	Sayı	1	11	12
		Yüzdesi (%)	8.3%	91.7%	100.0%
Toplam		Sayı	2	37	39
		Yüzdesi (%)	5.1%	94.9%	100.0%

Nakil sonrası HHV-6 DNA pozitifliği ile deri bulgusu olan hastalar arasındaki ilişki; genel olarak 39 hastanın dokuzunda (%23.1) deri bulgusu var, 30 (%76.9) hastada ise yoktu. Toplam 12 HHV-6 DNA pozitif olan alıcının dördünde (%33.3) deri bulgusu vardı, kalan sekiz (%66.7) alıcıda ise deri bulgusu yoktu. HHV-6 DNA’sı negatif olan 27 alıcının beşinde (%18.5) deri bulgusu vardı, 22’sinde (%81.5) ise deri bulgusu yoktu. HHV-6 DNA pozitif hastalarla deri bulgusu görülen hastalar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

Nakil sonrası HHV-6 DNA pozitifliği ile deri bulgusu olan hastalar arasındaki ilişki Tablo 4.7’de görülmektedir.

Tablo 4.7. HHV-6 DNA pozitifliği ve nakil sonrası deri bulgusu arasındaki ilişki.

			Deri bulguları		Toplam
			Yok	Var	
HHV-6 DNA	Negatif	Sayı	22	5	27
		Yüzdesi (%)	81.5%	18.5%	100.0%
	Pozitif	Sayı	8	4	12
		Yüzdesi (%)	66.7%	33.3%	100.0%
Toplam		Sayı	30	9	39
		Yüzdesi (%)	76.9%	23.1%	100.0%

HHV-6 DNA pozitifliği ve nakil sonrası karaciğer enzimleri aspartat transaminaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) arasındaki ilişki; 39 hastanın 16’sında (%41) KC enzimlerinde yükselme görüldü, 23 (%59) hastada ise görülmedi. HHV-6 DNA

pozitif olan 12 hastanın altısında (%50) karaciğer enzimlerinde yükselme görüldü, kalan altı (%50) hastada görülmeydi. HHV-6 DNA'sı negatif olan 27 hastanın ise 10'unda (%37) karaciğer enzimlerinde yükselme vardı, kalan 17 (%63) hastada ise yoktu. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nakil sonrası karaciğer enzimlerindeki yükseklik arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). HHV-6 DNA pozitifliği ve nakil sonrası karaciğer enzimleri (AST, ALT) arasındaki ilişki Tablo 4.8'de görülmektedir.

Tablo 4.8. HHV-6 pozitifliği ve nakil sonrası karaciğer enzimlerindeki yükseklik arasındaki ilişki.

			AST, ALT yüksekliği		Toplam
			Yok	Var	
HHV-6 DNA	Negatif	Sayı	17	10	27
		Yüzdesi (%)	63.0%	37.0%	100.0%
	Pozitif	Sayı	6	6	12
		Yüzdesi (%)	50.0%	50.0%	100.0%
Toplam		Sayı	23	16	39
		Yüzdesi (%)	59.0%	41.0%	100.0%

HHV-6 DNA pozitif olan hastalarla nakil sonrası akut GVHD gelişmesi arasındaki ilişki; toplam 39 hastanın 10'unda (%25.6) aGVHD görüldü, 29 (%74.4) hastada görülmeydi. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz 12 hastanın dördünde (%33.3) aGVHD gelişti, diğer sekiz (%66.7) hastada gelişmedi. HHV-6 DNA'sı negatif olan 27 hastanın ise altısında (%22.2) aGVHD görüldü, 21 (%77.8) hastada görülmeydi. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz hastalarla aGVHD arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$). HHV-6 DNA pozitif olan hastalarla nakil sonrası akut GVHD arasındaki ilişki Tablo 4.9'da görülmektedir.

Tablo 4.9. HHV-6 DNA pozitif olan hastalarda nakil sonrası akut GVHD gelişme durumu.

			Akut GVHD		Toplam
			Yok	Var	
HHV-6 DNA	Negatif	Sayı	21	6	27
		Yüzdesi (%)	77.8%	22.2%	100.0%
	Pozitif	Sayı	8	4	12
		Yüzdesi (%)	66.7%	33.3%	100.0%
Toplam		Sayı	29	10	39
		Yüzdesi (%)	74.4%	25.6%	100.0%

Nakilden sonra nötrofil ve platelet engraftmenti ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki; nötrofil engraftment zamanı 10 ile 89 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 20.60 ± 16.50). Transplantasyondan sonra nötrofil engraftmenti görülme zamanının ortanca değeri 16'ydı. Platelet engraftmenti ise 10 ile 150 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 26.90 ± 26.81) ve nakilden sonra görülme zamanının ortanca değeri 17'ydi.

Nötrofil engraftmenti dört hastada, platelet engraftmenti de dokuz hastada görülmüdü. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz 11 hastada nötrofil engraftmenti ortalama 16.55 günde görüldü. Negatif olan 24 hastada ortalama 18.67 günde görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan sekiz hastada platelet engraftmenti ortalama 9.19 gün bulundu, negatif olan 22 hastada ise 17.8 bulundu. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nötrofil ve platelet engraftmenti arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$).

Çalışmamızda beş hastada HHV-6 pozitiflik zamanı ile klinik bulgular arasında zaman açısından uyum görüldü. İki hastada HHV-6 pozitifliğini saptadığımız günle eş zamanlı olarak aynı gün deri bulguları ortaya çıktı. Bu iki hastadan birinde ve bir başka hastada pozitiflik günü ile karaciğer enzimlerinde yükselme aynı gün başladı. Diğer iki hastada ise HHV-6 DNA saptadığımız gün ateş bulgusu ortaya çıktı.

5. TARTIŞMA

HHV-6 enfeksiyonu erken çocukluk çağında Ekzantema Subitum ve ateşli bir hastalık sebebi olarak bilinen bir enfeksiyondur. Nüfusun %90'ından fazlası hayatın ilk 18 ayında HHV-6 ile enfekte olmaktadır (98,143). Etken, primer enfeksiyondan sonra birçok dokuda latent olarak kalmaktadır. Bu yönden diğer herpesvirüslere benzemektedir (144). HHV-6 sağlıklı çocuklarda nadir olarak şiddetli hastalıklara neden olmaktadır. Fakat bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde viral reaktivasyon sonucu şiddetli klinik belirtilere ve artmış ölüm riskine sahiptir (145).

Allojenik hematopoetik kök hücre nakli; kanser hastaları, hematolojik ve immunolojik hastalar, doğuştan metabolik hastalığı olan hastaların tedavisinde yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Kemik iliği ve periferel kan kök hücreleri sıklıkla hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) için hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda kord kanı kök hücreleri de kullanılmaktadır. HSCT'yi takiben hastalara greft rejeksiyonu ve GVHD gelişimini önlemek için immüsupresif tedavi uygulanmaktadır. Kök hücre alıcıları ciddi derecede immüsupresif hastalardır. Bu durumda fırsatçı enfeksiyonlara duyarlılığı büyük oranda arttırmaktadır. Viral reaktivasyonun allojenik kök hücre naklinden sonra major komplikasyonu Akut Greft Versus Host Hastalığı, allograft rejeksiyonu ve artmış non relaps mortalitedir (146, 147).

Moleküler ve immün teşhis yöntemlerinin gelişmesi; HHV-6 reaktivasyonunu, morbidite ve klinik sonuçlarını daha iyi takip etmemize neden olmuştur. HSCT'den sonra HHV-6'nın rolü tam olarak incelenmemiştir. Prospektif olarak yetişkin hastalarda HHV-6 reaktivasyonu ile grade 3-4 GVHD, santral sinir sistemi (CNS) fonksiyon bozukluğu ve mortalitedeki artış kuvvetli bir şekilde tanımlanmıştır (145). Fakat çocuklarda raporlarda HHV-6 reaktivasyonu ve klinik sonuçları arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir (148,149).

Bu nedenle çalışmamızda nakil olacak çocuk hastaların nakilden önce seropozitifliğine, nakilden sonra ise real-time PCR yöntemi ile HHV-6 DNA pozitifliğine bakarak nakil sonrası HHV-6 enfeksiyon sıklığını belirlemek ve pozitif bulduğumuz hastaların klinik ile ilişkisini belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda toplam 39 hasta mevcuttu. Hastaların 26'sı (%66.7) erkek çocuk, 13'ü (%33.3) kız çocuktu. Yaşları bir ile 17 arasında değişmekteydi (ortalama:

8.92±4.906). Hastaların yaşlarının ortanca değeri dokuzdu. Alıcıların 37'si allojenik, iki tanesi otolog alıcıydı. Otuz dokuz hastanın 12'sinin (%30.8) en az bir örneğinde HHV-6 DNA pozitif bulundu. Yirmialtı erkek çocuğun dokuzunda (%34.6), 13 kız çocuğunun da üçünde (%23.1) pozitif bulundu. Erkek çocuklarda daha fazla pozitiflik görülse de istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Toplam 295 örneğin 14'ünde (%4.74) pozitiflik saptandı. Pozitif bulduğumuz örneklerin hepsi allojenik alıcıların örnekleriydi.

Zerr ve ark. 2005 yılında yaşları 15 ile 67 arasında değişen, yaşlarının ortanca değeri 42 olan, %60'ı erkek, %40'ı kadın olan 110 allojenik kök hücre nakil hastasının 52'sinde (%47) HHV-6 reaktivasyonu belirlemişler. Plazma örneklerinin tamamının %10'unda pozitiflik saptanmış. Erkeklerde %67, kızlarda %33 pozitiflik saptanmış. Fakat erkek cinsiyeti, HHV-6 reaktivasyonunda risk faktörü olarak görülmemiştir (145).

Radonic ve ark. tarafından 2005 yılında Almanya'da toplam 82 hastada yaptıkları çalışmada hastaların 34'ü (%41,5) erkek, 48'i (%58,5) kadınmış. Hastaların ortanca yaş değeri 39'muş (aralık: 17-64). Seksen iki allojenik kök hücre transplant hastasının plazma örneği kantitatif real-time PCR yöntemi ile HHV-6A ve HHV-6B için analiz edilmiş. Yirmi dört (%29) hastada HHV-6A ve 35 (%43) hastada ise HHV-6B saptanmış (150).

Miyoshi ve ark. 2001 yılında Japonya'da 43 hasta ile yaptıkları çalışmada hasta yaşları bir ile 19 arasında değişmekteymiş. Yaş ortalamaları 9.6'yıymış. Yirmibeş allojenik ve 18 otolog hastada HHV-6 DNA'yı semikantitatif PCR ve serolojik testlerle periferik mononükleer hücrelerde saptamışlar. HHV-6 DNA pozitifliği PCR yöntemi ile allojenik kök hücre alıcılarında %68, otolog kök hücre alıcılarında ise %61 bulunmuş. Allojenik alıcıların örneklerinin %29.6'sında, otolog alıcıların örneklerinin ise %27.9'unda pozitiflik saptanmış (151).

Betts C. ve ark. 2011 yılında Amerika'da yaptıkları çalışmada ortanca yaşı 26 (aralık:1-66) olan hastalarda, allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra kantitatif PCR yöntemi ile HHV-6 viremisini 82 hastanın 46'sında (%56) saptamışlar. HHV-6 viremisi erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmüş ($p<0.05$). Alıcı- verici cinsiyeti, cinsiyet uyumu, yaş gibi faktörlerin HHV-6 DNA viremi insidansını etkilemediği belirlenmiş (152).

Impert-Marcille ve ark. 2000 yılında Fransa’da yaptıkları bir çalışmada allojenik ve otolog kök hücre alıcılarında periferel kan mononükleer hücrelerde, nested PCR yöntemi ile yapılan çalışmada 92 hastanın 39’unda (%42.5) aktif HHV-6 enfeksiyonu saptanmış. Tüm örneklerin %18.3’ünde tespit edilmiş. Nakil öncesi hastaların hiç birinde PBMH’de HHV-6 DNA tespit edilememiş. Nakil öncesi hastaların HHV-6 serolojik durumu ve kök hücre kaynağının HHV-6 viremisinde önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiş (153).

Anne de Pagter ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada 58 çocuk hastada allojenik HSCT’den sonra HHV-6 reaktivasyonunun insidansı ve klinik sonuçları araştırılmış. Çocuklarda ortalama yaş 7.6’yı (aralık: 0,1-18,1). Elli sekiz hastanın 39’unda (%67) kantitatif PCR yöntemi ile plazmada HHV-6 DNA saptanmış (154).

Sashihara ve ark. tarafından 2009 yılında Japonya’da yapılan çalışmada, kord kanı kök hücre nakli hastalarında HHV-6 virüsünün insidansı araştırılmış. Yirmi yedi hasta analiz edilmiş ve nakil sonrası 16 (%59.2) alıcıda aktif enfeksiyon saptanmış. 10 kord kanı kök hücre alıcısından yedisinde (%70), 17 kemik iliği kök hücre ve periferel kan kök hücre alıcısının da dokuzunda (%52.9) pozitif bulunmuş. Kord kanından kök hücre nakli olan hastalarda pozitiflik kemik iliği ve periferel kandan kök hücre nakli olan hastalardan önemli derecede yüksek bulunmuş (155).

Hentrich ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada hasta yaşları 14 ile 63 arasında değişmekteymiş. Yüz yirmi yedi erkek ve 101’i kadın olmak üzere 228 hasta ile yapılan bu çalışmada 96 (%42.1) hastanın periferel kan ve diğer örneklerinde HHV-6 enfeksiyonunun reaktivasyonu nested-PCR ile gösterilmiş. Hastaların 129 (%56.5) örneğinde pozitiflik saptanmış (156).

Ogata ve ark. 2006 yılında allojenik kök hücre naklinden sonra 50 hastada HHV-6 virüs sıklığını incelemişler. Hastaların yaşları 12 ile 59 arasında değişmekteymiş. Hasta yaşlarının ortalama değeri 40.5 olarak hesaplanmış. Hastaların 30’u erkek, 20’si kadın hastaymış. Real-time PCR yöntemi ile plazmada 50 hastanın 24’ünde (%48) HHV-6 DNA pozitif bulunmuş (157).

Çalışmamızda HHV-6 DNA ilk pozitiflik günü iki ile 42 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 23.5±10.78). Ortanca değeri ise 22.5 gün bulundu.

Radonic ve ark. tarafından nakilden sonra HHV-6A için ilk pozitiflik zamanının ortalama değerini 38 gün (aralık: 6-632), HHV-6B için 41 gün (aralık: 5-212) olarak

saptanmış (150).

Zerr M. ve ark. tarafından yapılan çalışmada nakil sonrası HHV-6 DNA için ilk pozitiflik günü 19 ile 28 gün arasında değişmekteymiş ve ortanca değeri 23 gün olarak hesaplanmış (145).

Impert-Marcille M ve ark. tarafından yapılan çalışmada nakilden sonra HHV-6 enfeksiyonunu saptanma zamanı altı ile 117 gün arasında değişmekteymiş. Saptanma zamanının ortanca değeri 17 gün bulunmuş. İlk pozitiflik zamanı otolog alıcılar arasında allojenik alıcılara göre daha erken görülmüş. Biz böyle bir değerlendirme yapamadık. Çünkü bizim pozitiflik bulduğumuz hastaların tamamı allojenik hastalardı ve otolog hasta sayısı sadece ikiydi (153).

Brian C. Betts ve ark. tarafından yapılan çalışmada HHV-6 viremi zamanının nakil sonrası ortanca değeri 23 (aralık: 10-168) gün bulunmuş.

Anne de Pagter ve ark. tarafından nakilden sonra HHV-6 DNA pozitifliğinin saptanma zamanının ortanca değeri 16 gün (aralık: 0-120 gün) olarak hesaplanmış (154).

Hentrich ve ark tarafından yapılan çalışmada kök hücre naklinden sonra HHV-6 DNA saptanma zamanı dört ile 441 gün arasında değişiyormuş, ortanca değer 26 gün olarak hesaplanmış (156).

Ogata ve ark. tarafından yapılan çalışmada allojenik kök hücre naklinden sonra HHV-6 DNA pozitiflik başlama zamanının ortanca değeri 18 gün bulunmuş (aralık: 31-70) (157).

Toplam 39 hastanın 38'inde nakil öncesi plazma örneklerinden HHV-6 IgG bakıldı. Hastaların 34'ünde (%89.5) pozitiflik saptandı. Üç (%7.9) hastada grey zone, bir (%2.6) hastada negatif bulundu. Serolojisini pozitif bulduğumuz hastaların 10'unda (%29.4) aynı zamanda HHV-6 DNA da pozitif bulundu. Grey zone çıkan üç hastanın ikisinde (%66.7) HHV-6 DNA pozitif, bir (%33.3) hastada negatif bulundu.

Savolainen ve ark. tarafından nakilden önce beş çocuk hastanın HHV-6 serolojisi negatif bulunmuş (4 otolog, 1 allojenik) ve nakilden sonra iki hastada primer enfeksiyon tanısı konulmuş. Hastalardan birisinin otolog diğerinin allojenik hasta grubundan olduğu belirtilmiş (149).

İmpert M ve ark. nakil öncesi 92 yetişkin hastanın serolojik durumuna bakmışlar. Yirmi sekiz allojenik alıcının 22'sinde (%78.5), 64 otolog alıcının 45'inde (%70) HHV IgG pozitif bulunmuş. Yaş artışıyla seroprevalansın azaldığını belirtmişler. Bu

durumun özgül HHV-6 antikorlarının azaldığının göstergesi olabileceğini vurgulamışlar. Sonuç olarak, alıcının serolojik durumuna bakılarak özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda primer enfeksiyonla reaktivasyonun ayırt edilemeyeceğini belirtmişler (153).

Yoshikawa ve ark. nakil öncesi alıcıların serolojik durumuna bakmışlar. Bütün alıcılarda pozitif bulmuşlar. Nakil öncesi hastaların HHV-6 antikor titrelerine, nakil sonrası ise HHV-6 viremlerine bakmışlar. Viremi gelişmeyenlerin antikor titreleri, önemli derecede viremi gelişenlere göre yüksekmiş. Viremi gelişmeyen hastalarda antikor titrelerinin yüksek olmasından dolayı nötralizan antikorların HHV-6 enfeksiyonunun gelişmesini önlemiş olabileceğini düşünmüşler (158).

Çalışmamızda HLA uyumsuz hastaların %62.5'inde HHV-6 DNA pozitif bulundu. Uyumlu hastaların ise %8.7'sinde HHV-6 DNA pozitif bulundu. HLA uyumsuz hastalarda HHV-6 pozitifliğinin daha fazla oranda saptandığı görüldü. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.001$).

Hentrich ve ark. tarafından yapılan çalışmada akraba dışı uyumlu ve uyumsuz alıcılarda, otolog alıcılara göre HHV-6 reaktivasyonu daha fazla bulunmuş (156).

Sashihara ve ark. çalışmalarında kord kanından kök hücre nakli yapılan hastalarda, periferik kan ve kemik iliğinden kök hücre nakli olan hastalara göre HHV-6 reaktivasyon riskinin daha fazla olduğunu bildirmişler. Neden olarak da kord kanı kök hücre nakli olan hastaların HLA uyumsuz hastalardan oluşuyor olması düşünülmüş (155).

Anne de Pagter ve ark. çalışmalarında HLA uyumsuz nakiller ve HHV-6 reaktivasyonu arasında önemli bir ilişki saptayamamışlar (154).

Ogata ve ark. çalışmalarında allojenik HLA uyumsuz nakillerin alıcılarda HHV-6 reaktivasyonu görülmesinde önemli bir risk faktörü olduğunu belirtmişler ($p=0.01$) (157).

Toplam 39 hastanın 34'üne miyeloablatif tedavi verilmiş olup, miyeloablatif tedavi alan 34 hastanın 12'sinde (%35.3) HHV-6 DNA pozitif, 22'sinde (%64.7) negatif bulunmuştur. Tedavi almayan beş hastanın hiçbirinde HHV-6 DNA pozitifliği bulunmamıştır. Toplam 39 hastadan HHV-6 DNA'sını pozitif olarak bulduğumuz 12 hastanın tamamının miyeloablatif tedavi alan hastalar olduğu belirlenmiştir. Bu durum miyeloablatif tedavinin HHV-6 DNA pozitifliği açısından önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır.

Anne de Pagter F ve ark. tarafından yapılan çalışmada nakilden önce bütün hastalara miyeloablatif tedavi uygulanmış ve 58 hastanın 39'unda (%67) plazmada HHV-6 virüsü saptanmıştır. Non-miyeloablative tedavinin yetişkinlerde çocuklara göre daha sık uygulandığını, bu durumun klinik gidişatı etkileyebileceği belirtilmiştir (154).

Myoshi ve ark allojenik ve otolog hastalarda HHV-6 DNA sıklığını her iki grup arasında benzer bulmuşlar. Fakat 25 allojenik nakil hastasının beşinde nakilden sonra HHV-6 DNA yükünde azalma olmamış. Allojenik ve otolog hastalar arasındaki bu farkın tedavi rejiminin yoğunluğundan kaynaklanabileceğini düşünmüşler (151).

Hentrich ve ark. tüm akraba dışı vericilerden kök hücre nakli olan alıcılara HSCT'den önce uygulanan artmış immün baskılanmanın HHV-6 reaktivasyonuna yol açabileceğini önemle vurgulamışlardır (156).

Ogata ve ark. tarafından yapılan çalışmada 50 nakil hastasının nakil öncesi 46'sına (%92) miyeloablatif tedavi uygulanmış. Miyeloablatif tedavi alan 46 hastanın 23'ünde (%50) HHV6 DNA pozitif, kalan 23 (%50) hastada ise negatif bulunmuş ve GVHD gelişmesini önlemek için uygulanan yoğun immunsupresif tedavinin HHV-6 enfeksiyonuna neden olabileceğini bildirmişler (157).

Çalışmamızda toplam 27 hastaya ATG verilmiş olup, ATG verilen 27 hastadan altısında (%22,2) HHV-6 DNA pozitif bulundu. ATG verilmeyen 12 hastanın da altısında (%50) HHV-6 DNA pozitif bulunmuştur. ATG verilen hastalarla HHV-6 DNA pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Radonic ve ark. tarafından yapılan çalışmada 82 hastanın 45'ine (%55) miyeloablatif tedavi, 37'sine (%45) antitimosit globülin verilmiş. HHV-6 sıklığı, 82 hastanın 59'unda (%72) yüksek oranda pozitif bulunmuş (150).

Yoshikawa ve ark. tarafından yapılan çalışmada 82 kemik iliği kök hücre nakli olan alıcıların 21'ine ATG verilmiş. ATG verilen 21 hastanın üçünde (%14.3) HHV-6 DNA pozitif, 18'inde (%85.7) negatif bulunmuş. ATG verilmeyen 60 hastanın 27'sinde (%45) HHV-6 DNA pozitif, 33'ünde (%65) negatif bulunmuş. ATG verilen hastalarla HHV-6 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış ($p>0.05$). Allojenik nakillerin HHV-6 reaktivasyonu için uygun bir ortam oluşturduğu düşünülmüş. Aynı zamanda viral enfeksiyonun oluşması için TBI (Total Body Irradiation; tüm vücut ışınlaması) ve ATG tedavisi gibi iki risk faktörü belirlenmiş. Bu hipotezi onaylamak için daha çok sayıda otolog alıcının yer aldığı çok değişkenli analiz yapılması gerektiği vurgulanmış (158).

Çalışmamızda nakil sonrası 39 hastanın 37'sinde (%96.3) ateş yüksekliğinin görüldüğü dönemler oldu. HHV-6 DNA'sı pozitif bulunan toplam 12 hastanın 11'inde (%91.7) ateş görüldü. HHV-6 DNA'sı negatif bulunan 27 hastanın 26'sında (%96.3) ateşin olduğu dönemler görüldü. Ateş ile HHV-6 enfeksiyonu arasında ilişki anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Fakat iki hastada HHV-6 pozitifliğini saptadığımız gün eş zamanlı olarak ateş bulgusu ortaya çıktı.

Savolainen ve ark. tarafından 60 hasta ile yapılan çalışmada hastaların nakil sonrası 22'sinde (%36) ateş görülmüş. Pozitif buldukları 16 allojenik hastanın dokuzunda (%56.3), altı otolog hastasının da dördünde (%66.7), HHV-6 enfeksiyonu ile birlikte ateş de görülmüş. Bu bulgular sonucu nakil sonrası HHV-6 reaktivasyonu ile ateş semptomu arasında ilişki olduğu düşünülmüş (149).

İmbert-Marcille M ve ark. 92 hasta üzerinde yaptıkları çalışma sonucu nakil sonrası HHV-6 enfekte 39 hastanın 29'unda, 53 negatif hastanın 12'sinde ateş saptamışlar ($p<0.05$). Çalışmalarında önemli bulgulardan birisi de sıklıkla ateş ile HHV-6 aktif enfeksiyonunun birlikte görülmesi olarak belirtilmiş (153).

Betts C ve ark. tarafından yapılan çalışmada hematopoietik kök hücre naklinden sonra HHV-6 viremisi görülen hastaların %24'ünde, görülmeyen hastaların ise %3'ünde ateş semptomu görülmüş. HHV-6 viremisi olan hastalarda daha çok ateş görülmesinden dolayı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$) (152).

Myoshi ve ark. allojenik ve otolog kök hücre nakli hastalarında nakil sonrası, HHV-6 DNA'sı pozitif ve negatif olan hastalar arasında ateş sıklığı açısından fark bulamamışlar (151).

Çalışmamızda nakil sonrası deri bulgusu 39 hastanın dokuzunda (%23,1) görüldü, 30 (%76.9) hastada ise görülmedi. Toplam 12 HHV-6 enfeksiyonu olan alıcının dördünde (%33.3) deri bulgusu vardı, kalan sekiz (%66.7) alıcıda ise deri bulgusu yoktu. HHV-6 enfeksiyonu olmayan 27 alıcının beşinde (%18,5) deri bulgusu vardı, 22 (%81.5) alıcıda ise deri bulgusu yoktu. HHV-6 enfeksiyonu olan hastalarla deri bulgusu görülen hastalar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). Fakat iki hastada HHV-6 DNA pozitifliğini saptadığımız gün eş zamanlı olarak deri bulguları ortaya çıktı.

Betts C ve ark. tarafından HSCT'den sonra HHV-6 viremisi olan 46 hastanın 11'inde (%24) deri bulgusu görülmüş. HHV-6 negatif bulunan 36 hastaların sadece birinde (%3) deri bulgusu görülmüş. HHV-6 enfeksiyonu olan hastalarda deri bulgusu

daha fazla oranda görülmüş ($p<0.05$) (152).

Ogata ve ark. tarafından yapılan çalışmada allojenik kök hücre naklinden sonra 50 alıcının 35'inde (%70) deri döküntü görülmüş. 24 HHV-6 DNA pozitif hastanın 19'unda (%54.3) döküntü görülmüş. Fakat deri bulguları kutanöz GVHD olarak düşünülmüş ve HHV6 ile ilişkilendirilmemiş (157).

Savolainen ve ark. 60 hastanın 12'sinde (%20) deri döküntüsü tespit etmişler. On iki hastanın dokuzu allojenik, üçü otolog alıcıymış. Döküntüler daha çok hastaların gövde kısmında görülmüş ve büyük çoğunluğu kaşıntısızmış (149).

İmpert M ve ark. 39 HHV-6 enfeksiyonu tespit edilen hastanın 10'unda (%25.6) ve 53 HHV-6 negatif hastanın da 10'unda (%18.8) deri bulgusu bulmuşlar. Deri bulgusu ile HHV-6 enfekte hastalar arasında önemli bir ilişki bulunmadığını belirtmişler (153).

Sashihara ve ark. tarafından yapılan çalışmada sayı olarak belirtilmemiş fakat aktif HHV-6 enfeksiyonu bulunan hastaların çoğunda deri döküntüleri saptanmış (155).

Bizim bulgularımızda nötrofil engraftment zamanı 10 ile 89 gün arasında değişmekteydi (ortalama:20.60±16.50). Transplantasyondan sonra nötrofil engraftmenti görülme zamanının ortanca değeri 16 gündü. Platelet engraftmenti ise 10 ile 150 gün arasında değişmekteydi (ortalama:26.90±26.811) ve nakilden sonra görülme zamanının ortanca değeri 17 gündü. Nötrofil engraftmenti dört hastada gelişmedi. Platelet engraftmenti de dokuz hastada gelişmedi. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz 11 hastada nötrofil engraftmenti ortalama 16.55 günde görüldü. Negatif olan 24 hastada ortalama 18.67 günde görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan sekiz hastada platelet engraftmenti zamanı ortalama 9.19 gün bulundu, negatif olan 22 hastada ise 17.8 gün bulundu. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nötrofil ve platelet engraftment zamanları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

İmpert M ve ark. tarafından yapılan çalışmada 39 HHV-6 enfeksiyonu tespit edilen hastaların nötrofil engraftment zamanları altı ile 34 gün arasında değişmekteymiş. Ortalaması 15 gün olarak hesaplanmış. HHV-6 enfekte olmayan 53 hastanın ise nötrofil engraftment zamanları ise yedi ile 25 gün arasında değişmekteymiş. Ortalamasını 13 gün bulmuşlar. Platelet engraftment zamanı HHV-6 enfekte 39 hastada yedi ile 90 gün arasında değişmekteymiş. Ortalaması 21 gün bulunmuş. HHV-6 negatif 53 hastanın ise beş ile 50 gün arasında değişmekteymiş

ortalama zamanı 13 gün bulunmuş. Kök hücre kaynağı ya da nakilin tipi ile engraftment zamanları arasında fark bulunmamış. Engraftmentten önce aktif enfeksiyon gelişen hastalarda, engraftmentten sonra aktif enfeksiyon gelişen hastalara göre platelet ve nötrofil engraftment zamanı önemli derecede fazla bulunmuş ($p<0.05$) (153).

Anne de Pagter F ve ark. tarafından HHV-6 DNA'sı pozitif bulunan hastalar; reaktivasyon olmayan, viral yük 1000 kopya/ml küçük olanlar ve viral yük 1000 kopya/ml'den büyük olanlar olmak üzere üç gruba ayrılmış. Bu üç grup arasında nötrofil ve platelet engraftment zamanları açısından bir fark bulunmamış. Nakil sonrası nötrofil engraftment zamanlarının ortanca değeri 20 gün olarak bulunmuş (aralık: 7-60). Platelet engraftment zamanlarının ortanca değeri ise 31 gün bulunmuş (aralık :11-147) (154).

Ogata ve ark. nakil sonrası HHV-6 DNA'sını pozitif buldukları 24 hastanın nötrofil engraftment zamanlarının ortanca değerini 14 (aralık: 11-27), negatif olan 26 hastada ise ortanca değeri 14.5 gün bulmuşlar (aralık: 11-25). Hastaların %71,1'inde platelet engraftment zamanının ortanca değerini 30 günden fazla bulmuşlar. HHV-6' DNA'sı pozitif olan hastalar ile platelet ve nötrofil engraftment zamanı açısından bir ilişki saptamamışlar. Fakat HHV-6 DNA yükü çok fazla olan hastalarda platelet engraftment zamanında gecikme saptamışlar (157).

Betts C ve arkadaşları nakil sonrası HHV-6 pozitif buldukları hastalardan sadece birinde engraftmentten önce düşük seviyede HHV-6 viremi gelişmiş, diğer hastalarda ise nakil sonrası 21 günden itibaren engraftmentten sonra viremi gelişmiş (152).

Radonic ve ark. tarafından nakilden sonra HHV-6A enfeksiyonu tespit edilen hastalar ile platelet ve nötrofil engraftment zamanı, HHV-6B enfeksiyonu olan hastalar ile de nötrofil engraftment zamanı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış. Fakat HHV-6B DNA'sı 28 günden daha önce pozitifleşen hastalarda platelet engraftmentinde gecikme saptanmış ($p=0.031$). Aynı zamanda Miyeloablatif tedavi alan hastalarda platelet engraftmentinde gecikme saptanmış ($p=0.026$) (150).

Klinik bulgulardan akut GVHD ve HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki ilişki incelendiğinde, toplam 39 hastanın 10'unda aGVHD gelişti, 29 hastada ise gelişmedi. Akut GVHD gelişen 10 hastanın dördünde (%40) aynı zamanda HHV-6 DNA da pozitif bulundu. Akut GVHD gelişmeyen 29 hastanın sekizinde (%27.6) HHV-6 DNA pozitifliği. Çalışmamızda iki hastada enfeksiyondan önce aGVHD gelişmiş olup, bir

hastada eş zamanlı, bir hastada ise enfeksiyondan sonra aGVHD gelişti. Akut GVHD ile HHV-6 DNA pozitifliği arasındaki anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

İmpert M ve ark. yaptıkları çalışmada allojenik kök hücre nakli olan hastalarda akut GVHD sıklığı ile aktif HHV-6 enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamadıklarını bildirmişlerdir. Akut GVHD (Grade ≥ 1) gelişen 15 hastanın yedisinde, aGVHD gelişmeyen 13 hastanında beşinde, aktif HHV-6 enfeksiyonu bulunmuş ($p>0.05$). Bununla birlikte şiddetli aGVHD (grade ≥ 3) gelişen hastalarda HHV-6 enfeksiyon sıklığı daha fazla görülmüş.

Şiddetli aGVHD gelişen altı hastanın beşinde PCR sonucu HHV-6 DNA pozitif olarak tespit edilmiş. Şiddetli aGVHD gelişmeyen dokuz hastanın ise ikisinde aktif enfeksiyon bulunmuş ($p = 0.04$). Üç hastada GVHD'den önce, üç hastada sonra, bir hastada ise GVHD ile eşzamanlı olarak HHV-6 enfeksiyonu tespit edilmiş (153).

Betts C ve ark. tarafından yapılan çalışmada HHV-6 pozitif ve negatif olan hastalar arasında aGVHD gelişmesi açısından fark bulunmamış (155).

Hentrich ve ark. tarafından yapılan çalışmada HSCT'den sonra 129 HHV-6 enfekte hastanın 98'inde (%75) akut GVHD gelişmiş. Doksan dokuz negatif hastanın ise 40'ında (%40.4) akut GVHD gelişmiş. HHV-6 enfekte iki hastada ise kronik GVHD gelişmiş. Nakilden sonra görülme zamanının ortanca değeri 19 gün bulunmuş (aralık: 7-74). Bu iki hastada sırasıyla nakilden sonra 109 ve 181 gün sonra kronik GVHD gelişmiş. Yüz hastanın 57'sinde (%57) GVHD'nin başlangıcından sonra HHV-6 enfeksiyonu, 22 (%22) hastada GVHD gelişiminden önce HHV-6 enfeksiyonu, 21 (%21) hastada ise GVHD ile eş zamanlı olarak HHV-6 enfeksiyonu saptanmış. Hastaların büyük kısmında GVHD'nin başlangıcından sonra HHV-6 enfeksiyonu gelişmiş. Sebeb olarak, akut GVHD'nin neden olduğu ya da HHV-6 enfeksiyonu tedavisinin neden olduğu immün yetmezlik sonucu GVHD'den sonra enfeksiyonun geliştiği düşünülmüş (156).

Radonic ve ark. tarafından yapılan çalışmada 27 HHV-6B pozitifliği saptanan hastaların 23'ünde ilk pozitiflik saptanmadan önce akut GVHD gelişmiş, dört hastada ise pozitiflikten sonra gelişmiş. HHV-6 pozitifliğinden önce gelişen aGVHD'nin neden olduğu şiddetli immün baskılanma neticesinde virüsün reaktif olduğu öne sürülmüş (150).

Anne de Pagter F ve ark. tarafından yapılan çalışmada HSCT'den sonra 58 hastanın 16'sında (%28) aGVHD tespit edilmiş. Akut GVHD ile yaş, cinsiyet, HLA

uyumu, verici tipi ve kaynağı arasında bir bağlantı saptanmamış. GVHD patogenezinde doku hasarı, altta yatan hastalık, tedavi rejimi tetikleyici etkenler olarak düşünülmüş (154).

Çalışmamızda 39 hastanın 16'sında (%41) KC enzimlerinde yükselme görüldü. HHV-6 DNA pozitif olan 12 hastanın altısında (%50) karaciğer enzimlerinde yükselme görüldü, kalan altı (%50) hastada görülmedi. HHV-6 DNA'sı negatif olan 27 hastanın ise 10'unda (%37) enzimlerde yükselme vardı, kalan 17 (%63) hastada ise yoktu. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nakil sonrası KC enzimlerindeki yükseklik arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Hentrich ve ark. tarafından yapılan çalışmada nakilden sonra hastaların hepsinde serum bilirubininde artış saptanmış fakat karaciğer enzimlerinde bir artış saptanmamıştır (156).

Sashihara ve ark. kök hücre naklinden sonra aktif HHV-6 enfeksiyonu saptanan hastaların çoğunluğunda karaciğer fonksiyon bozukluğu gözlemişler (alanin amino transferaz >100 IU/mL) (155).

Sonuç olarak, çocuklarda, kök hücre naklinden sonra aktif HHV-6 enfeksiyonu yüksek oranda görülmektedir. Alıcı ve verici arasındaki HLA uyumu ve miyeloablative tedavi uygulanması, HHV-6 pozitifliği için önemli risk faktörleri olarak ortaya çıkmaktadır. Aktif HHV-6 enfeksiyonlarının, alıcılarda deri döküntülerine, ateşe ve karaciğer hasarına neden olabileceği düşünülmektedir. Kromozoma entegre HHV-6'nın tanı testleri üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Çocuklarda kök hücre naklinden sonra, aktif HHV-6 enfeksiyonu yüksek oranda görüldü.
2. Nakil sonrası özellikle ilk bir ayda aktif enfeksiyon oranı daha sık bulundu. İlk bir ayda HHV-6 enfeksiyonu açısından dikkatli olunması gerektiği düşünüldü.
3. Alıcı ve verici arasındaki HLA uyumunun HHV-6 aktif enfeksiyon sıklığını önemli oranda etkilediği düşünüldü. HLA uyumsuz hastalarda HHV-6 aktif enfeksiyonu daha sık oranda belirlendi.
4. Nakil öncesi miyeloablative tedavi uygulanan hastalarda tedavi sonucu ortaya çıkan immün baskılanmanın aktif HHV-6 enfeksiyonunu artırdığı düşünüldü ve enfeksiyonun görülmesi açısından risk faktörü olarak belirlendi.
5. Bazı hastalarda HHV-6 pozitiflik günü ile eş zamanlı olarak deri bulgusu, ateş görüldü ve karaciğer enzimlerinde yükselme tespit edildi. Bu tür klinik bulgularda ayırıcı tanıda HHV-6 enfeksiyonunun akla getirilmesi gerektiği düşünüldü.
6. Yapılan diğer çalışmalarda kromozoma entegre HHV6 sıklığı %0.5 ile %1 arasında değişen oranlarda bulunmuştu. Otuz dokuz hastanın dahil edildiği çalışmamızda hastaların hiç birinde kromozoma entegre HHV-6 tespit edilmedi. Daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmalar ülkemizde kromozoma entegre HHV-6 sıklığını doğru olarak yansıtabilir.

7. ÖZET

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE KÖK HÜCRE NAKLİ YAPILAN PEDİYATRİK HASTALARDA HHV-6 ENFEKSİYONLARININ SIKLIĞININ VE KLİNİK ÖNEMİNİN PROSPEKTİF OLARAK ARAŞTIRILMASI VE VİRAL ENTEGRASYONUN TANISAL TESTLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kök hücre alıcılarına uygulanan immün sistemi baskılayıcı ilaçlardan dolayı, alıcılar aktif enfeksiyon için duyarlı hale gelmektedir. Kök hücre naklinden sonra major komplikasyon aktif enfeksiyondur. Aktif enfeksiyonun, aGVHD, allograft rejeksiyonu ve nonrelaps mortalitede artışa neden olduğu bilinmektedir.

Nakil sonrasında görülen aktif HHV-6 enfeksiyonları; viral hepatit, ateş, deri döküntüsü, nötrofil ve platelet engraftment zamanında gecikme, akut GVHD, allograft rejeksiyonu ile ilişkilendirilmektedir. Nakilden sonraki aktif HHV-6 enfeksiyonunun rolünü daha iyi anlama, HHV-6 reaktivasyonu ile ilişkili komplikasyonların sıklığında azalmayı sağlayacak, koruyucu ve tedavi edici seçenekler için yol gösterici olabilecektir. Nakil sonrası HHV-6 aktif enfeksiyonu ve klinik ilişkisi daha önce bazı çalışmalarda erişkinlerde bildirilmesine rağmen çocuklarda büyük ölçüde klinik sonuçları bilinmemektedir.

Bu çalışmada, kök hücre nakli olan çocuk hastalarda nakil öncesi hastaların HHV-6 enfeksiyonu açısından serolojik durumu, nakil sonrası ise HHV-6 enfeksiyon sıklığı belirlenerek, aktif HHV-6 enfeksiyonu için risk faktörlerini belirlemeyi ve aktif enfeksiyonlarla klinik bulguların ilişkisini araştırmayı amaçladık. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi çocuk kök hücre nakli biriminde 06.10.2011-04.06.2012 tarihleri arasında kök hücre nakli olan, yaşları bir ile 17 arasında değişen 39 hasta çalışmaya dahil edildi. Otuzdokuz hastanın 38'inde nakil öncesi plazma örneklerinden HHV-6 IgG'sine bakıldı. Hastaların %89.5'inde pozitif, %7.9'unda grey zone, %2.6'sında negatif bulundu. Toplam 39 hastanın 12'sinin (%30,8) en az bir örneğinde HHV-6 DNA pozitif bulundu. Nakil sonrası, HHV-6 DNA ilk pozitiflik günü, iki ile 42 gün arasında değişmekteydi.

Toplam 26 erkek çocuğun %34.6'sında, 13 kız çocuğun %23.1'inde HHV-6 DNA pozitif bulundu. Serolojisi pozitif bulunan hastaların %29.4'ünün, aynı zamanda

HHV-6 DNA'sı da pozitif bulundu. Grey zone çıkan üç hastanın ise ikisinde (%66.7) HHV-6 DNA pozitif saptandı, serolojisi negatif olan bir hastada ise enfeksiyon saptanmadı.

Çalışmamızda HLA uyumsuz hastaların %62.5'inde, uyumlu hastaların ise %8.7'sinde HHV-6 DNA pozitif bulundu. HLA uyumsuz hastalarda HHV-6 pozitifliği daha fazla oranda saptandı. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.001$).

39 hastanın 10'unda (%25.6) aGVHD görüldü. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz hastaların %33,3'ünde aGVHD gelişti. HHV-6 DNA'sı negatif olan 27 hastanın ise altısında (%22.2) aGVHD görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla aGVHD arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

Tüm hastaların %23.1'inde deri bulgusu görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan 12 alıcının, dördünde (%33.3) deri bulgusu saptandı. HHV-6 DNA pozitifliği ile deri bulgusu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

HHV-6 DNA'sı pozitif bulunan hastaların %91.7'sinde ateş görüldü. HHV-6 DNA'sı negatif olan hastaların %96.3'ünde ateşin olduğu dönemler görüldü, bir (%3.7) hastada ise hiç ateşli dönem olmadı. HHV-6 DNA pozitifliği ile nakil sonrası ateş yüksekliği olan hastalar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

39 hastanın 16'sında (%41) KC enzimlerinde yükselme görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan 12 hastanın altısında (%50) karaciğer enzimlerinde yükselme görüldü. HHV-6 DNA'sı negatif olan 27 hastanın ise 10'unda (%37) enzimlerde yükselme vardı. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nakil sonrası KC enzimlerindeki yükseklik arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Nötrofil engraftment zamanı 10 ile 89 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 20.60 ± 16.50). Transplantasyondan sonra nötrofil engraftmenti görülme zamanının ortanca değeri 16'ydı. Platelet engraftmenti ise 10 ile 150 gün arasında değişmekteydi (ortalama: 26.90 ± 26.811) ve nakilden sonra görülme zamanının ortanca değeri 17'ydi.

Nötrofil engraftmenti dört hastada, platelet engraftmenti de dokuz hastada görülmeydi. HHV-6 DNA'sını pozitif bulduğumuz 11 hastada nötrofil engraftmenti ortalama 16,55 günde görüldü. Negatif olan 24 hastada ortalama 18,67 günde görüldü. HHV-6 DNA'sı pozitif olan sekiz hastada platelet engraftmenti ortalama 9.19 gün olarak bulunurken, negatif olan 22 hastada ise 17.8 gün bulundu. HHV-6 DNA'sı pozitif olan hastalarla nötrofil ve platelet engraftmenti arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Otuz dokuz hastanın dahil edildiği çalışmamızda hastaların hiç birinde kromozoma entegre HHV-6 tespit edilmedi.

Sonuç olarak, çocuklarda, kök hücre naklinden sonra, aktif HHV-6 enfeksiyonu yüksek oranda görülmektedir. Alıcı ve verici arasındaki HLA uyumu ve miyeloablatif tedavi uygulanması, HHV-6 pozitifliği için önemli risk faktörleri olarak ortaya çıkmaktadır. Aktif HHV-6 enfeksiyonlarının, alıcılarda deri döküntülerine, ateşe ve karaciğer hasarına neden olabileceği düşünülmektedir. Kromozoma entegre HHV-6'nın tanı testleri üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: İnsan herpesvirs-6, seroloji, real-time PCR.

8. ABSTRACT

INVESTIGATION OF INCIDENCE AND CLINICAL IMPORTANCE OF HHV-6 INFECTIONS IN PEDIATRIC STEM CELL TRANSPLANT RECIPIENTS AND THE EFFECT OF VIRAL INTEGRATION ON DIAGNOSTIC TESTS IN AKDENİZ UNIVERSITY HOSPITAL PROSPECTIVELY

The compromised immune system in stem cell transplant recipients (SCT), because of the administration of immunosuppressive drugs after SCT, make patients more susceptible and vulnerable for active infection. Active infection is a major complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and are suggested to be associated with acute graft-versus-host disease (aGVHD), allograft rejections, and increased nonrelapse mortality.

The active HHV-6 infections after transplantation, can cause viral hepatitis, fever, skin rash, delayed platelet and neutrophil engraftment, acute GVHD, allograft rejection. A better understanding of active HHV-6 infection after transplantation can reduce the incidence of complications that is associated with HHV-6 reactivation and paves the way for preventive and therapeutic options for HHV-6 infection. Although some studies have already been reported the HHV-6 active infection and clinical relation in adults, clinical results in children aren't known exactly.

In this study, we aimed to investigate the relationship between clinical findings and identify the risk factors for active HHV-6 infections by determining the pre-transplant serologic status and the frequency of the HHV-6 infection after transplantation.

Thirty nine patients who had stem cell transplantation at Akdeniz University Faculty of Medicine pediatric stem cell transplant unit, between 06.10.2011 and 04.06.2012 with age ranging from 1 to 17 were included in this study.

Pre-transplant HHV-6 IgG of 38 patients were studied from plasma samples. It was positive for 89.5 %, gray zone for 7.9% and negative for 2.6% of the patients.

For 12 (30.8%) patients, at least one sample were positive for HHV-6 DNA. After transplantation, the first positive samples for HHV-6 DNA were between two to 42 days. HHV-6 DNA has found positive in 34.6% of 26 boys and 23.1 %13 girls.

The serological positivity rate among HHV-6 DNA positive patients was 29.4%. Two of three patient with gray zone results for HHV-6 serology (66.7%) were positive for HHV-6 DNA. No infection was found in one patient with negative serology.

In our study, the positivity for HHV-6 in mismatched and matched HLA recipients were 62.5 and 8.7% respectively. The patients who were incompatible with HLA, were more frequently positive for HHV-6. This finding was statistically significant ($p=0.001$).

Ten of 39 (25.6%) patients had aGVHD. 33.3 % of the patients who had positive HHV-6 DNA, developed aGVHD. 6 of the 27 patients who had negative HHV-6 DNA had aGVHD. There was no significant correlation between the patients who had positive HHV-6 DNA and aGVHD ($p>0.05$).

23.1% of all patients had cutaneous manifestations. Four of the 12 patients who had positive HHV-6 DNA had evidence of cutaneous manifestations. There was no significant relationship between cutaneous manifestations and HHV-6 DNA positivity.

Fever was seen in 91.7% of patients who had positive HHV-6 DNA. 96.3% of the patients who had negative HHV-6 DNA, had fever in some periods. Only 1 patient (3.7%) didn't have fever. There was no significant correlation between HHV-6 positivity and fever after transplantation ($p>0.05$).

There was an increase of liver enzymes in 16 of 39 patients (41%). Liver enzymes were increased at 6 of 12 patients (50%) who had positive HHV-6 DNA and again liver enzymes were increased at 10 of 27 (37%) patients who had negative HHV-6 DNA. There was no significant relation between the patients who had positive HHV-6 DNA and post-transplant increased liver enzymes.

Neutrophil engraftment was ranged from 10 to 89 days (mean, 20.60 ± 16.50). The median time for neutrophil engraftment was 16 days. Platelet engraftment was ranged between 10 to 150 days (mean, 26.90 ± 26.811) and the median time after transplantation was 17 days. Neutrophil and platelet engraftment wasn't seen for 4 and 9 patients respectively. The mean engraftment time for neutrophils among 11 patients who had positive HHV-6 DNA, was 16.55 days. The mean time for neutrophils engraftment was 18.67 days among patients who had negative HHV-6 DNA.

The mean engraftment time for platelet among 8 patients who had positive HHV-6 DNA, was 9.19 days. The mean time for platelet engraftment was 17.8 days among 22 patients who had negative HHV-6 DNA. There was no significant relation between

the patients who had positive HHV-6 DNA and neutrophil and platelet engraftment.

In our study, which included 39 patients, chromosomal integrated HHV-6 was not detected.

As a result, in children, after stem cell transplantation, active HHV-6 infection is very common. For HHV-6 positivity after transplantation, HLA match between donor and recipient, and myeloablative therapy appears to be important risk factors. Skin rash, liver damage and fever can be caused by active HHV-6 infections after transplantation. More extensive studies are needed in order to understand the impact of chromosomal integrated HHV-6 on diagnostic tests.

Key words: Human herpesvirus-6, serology, real-time PCR.

9. KAYNAKLAR

1. Braun DK. Human Herpesvirus 6 Clinical Microbiology Reviews 1997; 10: 521-49.
2. Willke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2008; Cilt 2, 3.Baskı: 1689-91.
3. De Bolle L, Van Loon J, De Clercq E, Naesens L. Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. J Med Virol 2005; 75(1): 76-85.
4. Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, De Las Heras V, Bartolomé M, Arroyo R. Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing—remitting multiple sclerosis patients. Journal of Clinical Virology 2006; 37: 24–6.
5. Yoshikawa T. Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients. British Journal of Haematology 2004; 124(4): 421–32.
6. Braun DK, Dominquez G, Pellet PE. Human Herpesvirus. 6. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 521-67.
7. Anderson L. Human Retrovirus Family: Cancer, Central Nervous System Disease, and AIDS. JNCI Journal of the National Cancer Institute 1988; 80(13): 987–9.
8. Salahuddin S, Ablashi D, Markham P, Josephs S, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders". Science 1986; 234(4776): 596–601.
9. Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, Ablashi DV, et al. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus. J Exp Med 1988; 167: 1659-70.
10. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. Lancet 1988; 1(8594): 1065-7.
11. Becker WB, Engelbrecht S, Becker MLB, Piek C, Robson BA, Wood L, Jacobs P. New T-lymphotropic Human Herpesviruses. Lancet 1989; i: 41.
12. Jarrett RF, Gallagher A, Gledhill S, Jones MD, Teo I, Griffin BE. Variation in restriction map of HHV-6 genome. Lancet 1989; i: 448-9.
13. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. Clin Microbiol Rev 2005; 18(1): 217-45.
14. Yamanishi K, Mori Y, Pellett PE. Human Herpesviruses 6 and 7. Fields Virology, 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins 2006; 2823- 45.
15. Roizman B, Sears AE. Herpes simplex viruses and their replication, p. 2231-2295. In B. N. Fields, D.M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 3rd ed., vol.

2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa. 1996.
16. Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B-lymphotropic DNA virus (HBLV) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 933–41.
 17. Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, Kurata T, Yamanishi K, Takahashi M. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol* 1989; 33: 147–54.
 18. Nii S, Yoshida M, Uno F, Kurata T, Ikuta K, Yamanishi K. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol* 1990; 278: 19–28.
 19. Roffman E, Albert JP, Goff JP, Frenkel N. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol* 1990; 64: 6308–13.
 20. Thomson BJ, Dewhurst S, Gray D. Structure and heterogeneity of the sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol* 1994; 68: 3007–14.
 21. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7049–53.
 22. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999; 73: 8040–52.
 23. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995; 209: 29–51.
 24. Kashanchi F, Thompson J, Sadaie MR, Doniger J, Duvall J, Brady JN, Rosenthal LJ. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the Sall-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology* 1994; 201: 95–106.
 25. Nicholas J, Martin ME. Nucleotide sequence analysis of a 38.5-kilobase-pair region of the genome of human herpesvirus 6 encoding human cytomegalovirus immediate-early gene homologs and transactivating functions. *J Virol* 1994; 68: 597–610.
 26. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999; 73: 8053–63.
 27. Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 1991; 184: 545–52.
 28. Aubin JT, Collandre H, Candotti D, Ingrand D, Rouzioux C, Burgard M, et al. Several

- groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29:367–3726 isolates. *Virology* 1991; 184: 545–52.
29. Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J Virol* 2003; 77: 4992–9.
 30. French C, Menegazzi P, Nicholson L, Macaulay H, DiLuca D, Gompels UA. Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology* 1999; 262: 139–51.
 31. Stanton R, Wilkinson GW, Fox JD. Analysis of human herpesvirus-6 IE1 sequence variation in clinical samples. *J Med Virol* 2003; 71: 578–84.
 32. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99: 817–27.
 33. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993; 75: 295–305.
 34. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 1993; 67: 6025–32.
 35. Takeda K, Okuno T, Isegawa Y, Yamanishi K. Identification of a variant A-specific neutralizing epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology* 1996; 222: 176–83.
 36. Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, et al. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* 2003; 77: 8541–7.
 37. Oster B, Hollsberg P. Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *J Virol* 2002; 76: 7578–86.
 38. Singh N, Carrigan DR, Gayowski T, Singh J, Marino IR. Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1995; 60: 1355–7.
 39. Cirone M, Campadelli-Fiume G, Foa-Tomasi L, Torrisi MR, Faggioni A. Human herpesvirus 6 envelope glycoproteins B and H-L complex are undetectable on the plasma membrane of infected lymphocytes. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; 10: 175–9.
 40. Torrisi MR, Gentile M, Cardinali G, Cirone M, Zompetta C, Lotti LV, Frati L, Faggioni A. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology*

- 1999; 257: 460–71.
41. Black JB, Sanderlin KC, Goldsmith CS, Gary HE, Lopez C, Pellett PE. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J Virol Methods* 1989; 26: 133–45.
 42. Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, Takahashi M, Yamanishi K. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 1989; 63: 3161–3.
 43. Grivel JC, Santoro F, Chen S, Faga G, Malnati MS, Ito Y, Margolis L, Lusso P. Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol* 2003; 77: 8280–9.
 44. Luka J, Okano M, Thiele G. Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *J Clin Lab Anal* 1990; 4: 483–6.
 45. Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, Gallo RC. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 1993; 362: 458–62.
 46. Cermelli C, Concari M, Carubbi F, Fabio G, Sabbatini AM, Pecorari M, et al. Growth of human herpesvirus 6 in HepG2 cells. *Virus Res* 1996; 45: 75–85.
 47. Chen M, Popescu N, Woodworth C, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, et al. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol* 1994; 68: 1173–8.
 48. Caruso A, Rotola A, Comar M, Favilli F, Galvan M, Tosetti M, et al. HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol* 2002; 67: 528–33.
 49. He J, Mc Carthy M, Zhou Y, Chandran B, Wood C. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 1996; 70: 1296–300.
 50. Albright AV, Lavi E, Black JB, Goldberg S, O'Connor MJ, Gonzalez-Scarano F. The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neurovirol* 1988; 4: 486–94.
 51. Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S, Yasukawa M. Phenotypic and functional alterations of dendritic cells induced by human herpesvirus 6 infection. *J Virol* 2002; 76: 10338–45.
 52. Higashi K, Asada H, Kurata T, Ishikawa K, Hayami M, Spriatna Y, et al. Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. *J Gen Virol* 1989; 70: 3171–6.
 53. Lacoste V, Mauclere P, Dubreuil G, Lewis J, Georges-Courbot MC, Rigoulet J, et al. Simian homologues of human gamma-2 and betaherpesviruses in mandrill and drill monkeys. *J Virol* 2000; 74: 11993–9.
 54. Yalcin S, Mukai T, Kondo K, Ami Y, Okawa T, Kojima A, et al. Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 1992;

73: 1673–7.

55. Lusso P, Gallo RC. Human herpesvirus 6 in AIDS. *Immunol Today* 1995; 16: 67–71.
56. Ensoli B, Lusso P, Schachter F, Josephs SF, Rappaport J, Negro F, et al. Human herpes virus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *EMBO J* 1989; 8: 3019–27.
57. McCarthy M, Auger D, He J, Wood C. Cytomegalovirus and human herpesvirus-6 trans-activate the HIV-1 long terminal repeat via multiple response regions in human fetal astrocytes. *J Neurovirol* 1998; 4: 495–511.
58. Di Luca D, Secchiero P, Bovenzi P, Rotola A, Caputo A, Monini P, Cassai E. Reciprocal in vitro interactions between human herpesvirus- 6 and HIV-1 Tat. *AIDS* 1991; 5: 1095–8.
59. Garzino-Demo A, Chen M, Lusso P, Berneman Z, DiPaolo JA. Enhancement of TAT-induced transactivation of the HIV-1 LTR by two genomic fragments of HHV-6. *J Med Virol* 1996; 50: 20–4.
60. Flamand L, Gosselin J, D’Addario M, Hiscott J, Ablashi DV, Gallo RC, Menezes J. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 1991; 65: 5105–10.
61. Asada H, Klaus-Kovtun V, Golding H, Katz SI, Blauvelt A. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 1999; 73: 4019–28.
62. Fillet AM, Reux I, Joberty C, Fournier JG, Hauw JJ, Le Hoang P, et al. Detection of human herpes virus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridization, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 1996; 49: 289–95.
63. Gobbi A, Stoddart CA, Locatelli G, Santoro F, Bare C, Linquist-Stepps V, et al. Coinfection of SCID-hu Thy/Liv mice with human herpesvirus 6 and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000; 74: 8726–31.
64. Csoma E, Bacsi A, Liu X, Szabo J, Ebbesen P, Beck Z, Konya J, et al. Human herpesvirus 6 variant A infects human term syncytiotrophoblasts in vitro and induces replication of human immunodeficiency virus type 1 in dually infected cells. *J Med Virol* 2002; 67: 67–87.
65. Bonura F, Perna AM, Vitale F, Villafrate MR, Viviano E, Guttadauro R, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) by variant B of human herpesvirus 6 (HHV-6). *New Microbiol* 1999; 22: 161–71.
66. Levy JA, Landay A, Lennette ET. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *J Clin Microbiol* 1990; 28:

2362–64.

67. Valente G, Secchiero P, Lusso P, Abete MC, Jemma C, Reato G, Kerim S, Gallo RC, and Palestro G. Human herpesvirus 6 and Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: a controlled study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1996; 149: 1501- 10.
68. Romano N, Romano FM, Viviano E, Vitale F, Villafrate MR, Perna AM, et al. Rare association of human herpesvirus-6 DNA with human papillomavirus DNA in cervical smears of women with normal and abnormal cytologies. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1589–91.
69. Tran-Thanh D, Koushik A, Provencher D, Drouin P, Dubuc-Lissoir J, Gauthier P, et al. Detection of human herpes virus type 6 DNA in precancerous lesions of the uterine cervix. *J Med Virol* 2002; 68: 606–10.
70. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ. Human beta herpesvirus interaction in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2001; 183: 179-84.
71. Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazulli T. Human herpes virus 6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis* 2000; 181: 1450-3.
72. Baillargeon J, Piper J, Leach CT. Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Virol* 2000; 16: 149–57.
73. Ihira M, Yoshikawa T, Ishii J, Nomura M, Hishida H, Ohashi M, et al. Serological examination of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease. *J Med Virol* 2002; 67: 534–7.
74. Hall CB, Long CE, Schnabel KC, Caserta MT, McIntyre KM, Costanzo MA, et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994; 331: 432–8.
75. Cone RW, Huang ML, Hackman RC, Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 877–81.
76. Kusuhara K, Ueda K, Okada K, Miyazaki C, Tokugawa K, Hirose M, et al. Do second attacks of exanthema subitum result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection? *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 468–70.
77. van Loon NM, Gummuluru S, Sherwood DJ, Marentes R, Hall CB, Dewhurst S. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1017–19.
78. Caserta MT, McDermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Carnahan JA, Gilbert L, et al.

- Human herpesvirus 6(HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr* 2004; 145: 478-84.
79. Razonable RR, Fanning C, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Wilson J, et al. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002; 185: 110-3.
 80. Desachy A., Ranger-Rogez S, Francois B, Venot C, Traccard I, Gastinne H, et al. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 197-203.
 81. Hall CB, Caserta MT, Schnabel K. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics* 2008; 122(3): 513–20.
 82. Razonable RR, Lautenschlager I. Impact of human herpes virus 6 in liver transplantation. *World J Hepatol* 2010; 2(9): 345–53.
 83. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1571–4.
 84. Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation* 2011; 92(2): 224–9.
 85. Collot S, Petit D, Bordessoule S, Alain M, Touati F, Denis S. Real time PCR for Quantification Human Herpesvirüs 6 DNA from lymph and saliva. *JCM* 2002; 40: 2445-51.
 86. Bailargeon J, Piper J, Leach CT. Epidemiology of Human Herpesvirus 6 infection in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Virol* 2000; 16: 149-57.
 87. Dahl H, Fjaertoft G, Norsted T, Wang FZ, Mousavi-Jazi M, Linde A. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J infect Dis* 1999; 180: 2035-88.
 88. Adams O, Krempe C, Kogler G, Wernet P, Scheid A. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis* 1998; 178: 544–6.
 89. Aubin JT, Poirel L, Agut H, Huraux JM, Bignozzi C, Brossard A, Mulliez N, et al. Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet* 1992; 340: 482–83.
 90. Boutolleau D, Cointe, A. Gautheret-Dejean, M. Mace, H. Agut, L. Grangeot-Keros. Ingrand. No evidence for a major risk of roseolovirus vertical transmission during pregnancy. *Clin. Infect. Dis* 1997; 36: 1634–5.
 91. Lanari M, Papa I, Venturi V, Lazzarotto T, Faldella G, Gabrielli L, et al. Congenital infection with human herpesvirus 6 variant B associated with neonatal seizures and poor

- neurological outcome. *J Med Virol* 2003; 70: 628–32.
92. Maeda T, Okuno T, Hayashi K, Nagata M, Ueda M, Terashima K, et al. Outcomes of infants whose mothers are positive for human herpesvirus-6 DNA within the genital tract in early gestation. *Acta Paediatr Jpn* 1997; 39: 653–7.
 93. Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1968–70.
 94. 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 exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J Med Virol* 1995; 46: 52–5.
 95. Suga S, Yoshikawa T, Kajita Y, Ozaki T, Asano Y. Prospective study of persistence and excretion of human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum and their parents. *Pediatrics* 1998; 102: 900–4.
 96. Brown F, Banken L, Saywell K, Arum I. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 167–76.
 97. Ward KNJ, Andrews CM, Verity E, Miller E, Ross M. Human herpesviruses 6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2005; 90: 619–23.
 98. Zerr DM, Meier AS, Sekle SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A, et al. A Population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005; 352: 768–76.
 99. Yoshikawa T. Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 11–17, 95.
 100. Wang FZ, Pellet PE. Human herpesviruses 6A, 6B, and 7: immunobiology and host response. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. S. Mocarski, B. Roizman, R. J. Whitley, and K. Yamanishi (ed.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, in press. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
 101. Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 2000; 10: 155–73.
 102. Kositanont U, Wasi C, Wanprapar N, Bowonkiratikachorn P, Chokephaibulkit K, Chearskul S, et al. Primary infection of human herpesvirus 6 in children with vertical infection of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1999; 180: 50–5.
 103. Clark D. Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 2004; 11 (2): 112–9.
 104. Mock DJ, Powers JM, Goodman AD, Blumenthal SR, Ergin N, Baker JV, et al. Association of human herpesvirus 6 with the demyelinating lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroviral* 1999; 5: 363–73.

105. Corral I, Quereda C, Perez Elias MJ, Moreno S. Search for human herpesvirus 6 DNA in cerebrospinal fluid from AIDS patients with progressive multifocal leucoencephalopathy. *J Neuroviral* 2003; 9: 136-7.
106. Challoner PB, Smith KT, MacLeod PJD, David L, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Lindsley BJ, et al. "Plaque-Associated Expression of Human Herpesvirus 6 in Multiple Sclerosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 16: 7440-4.
107. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-52.
108. Moore FJA, Wolfson C. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002; 106: 63-83.
109. Liedtke W, Opalka B, Zimmermann CW, Lignitz E. "Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue". *Journal of the Neurological Sciences* 1993; 116(1): 6-11.
110. Arbuckle JH, Medveczky PG. "The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration". *Microbes and Infection* 2011; 13(8-9): 731-41.
111. Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins, JG, Komaroff A. "The chronic fatigue syndrome: A comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group". *Ann of Intl Med* 1994; 121(12): 953-9.
112. Buchwald D, Cheney PR, Peterson DL, Henry B, Wormsley SB, Geiger A, et al. "A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection". *Ann of Intl Med* 1992; 116(2): 103-13.
113. Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, Reeves WC, Lloyd A, et al. "Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: Prospective cohort study". *BMJ* 2006; 333(7568): 575.
114. Ablashi DV, Eastman HB, Owen CB, Roman MM, Friedman J, Zabriskie JB, et al. "Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients". *Journal of Clinical Virology* 2000; 16(3): 179-91.
115. Nicolson GL, Gan R, Haier J. "Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: Association with signs and symptoms". *APMIS* 2003; 111(5): 557-66.
116. Patnaik, M, Komaroff AL, Conley E, Ojo-Amaize EA, Peter JB. "Prevalence of IgM Antibodies to Human Herpesvirus 6 Early Antigen (p41/38) in Patients with Chronic Fatigue Syndrome". *Journal of Infectious Diseases* 1995; 172(5): 1364-7.
117. Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, Benedetti L, Crowley RW, Komaroff AL, et al.

- "Detection of Human Herpesvirus 6 in Plasma of Children with Primary Infection and Immunosuppressed Patients by Polymerase Chain Reaction". *Journal of Infectious Diseases* 1995; 171(2): 273–80.
118. Araujo JC, Doniger J, Kashanchi F, Hermonat PL, Thompson J, Rosenthal LJ. Human herpesvirus 6A ts suppresses both transformation by H-ras and transcription by the H-ras and human immunodeficiency virus type 1 promoters. *J Virol* 1995; 69: 4933–40.
 119. Daibata M, Taguchi T, Kamioka M, Kubonishi I, Taguchi H, Miyoshi I. Identification of integrated human herpesvirus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1002–4.
 120. Luppi M, Barozzi P, Marasca R, Torelli G. Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia* 1994; 8(1): 41–5.
 121. Chen M, Wang H, Woodworth CD, Lusso P, Berneman Z, Kingma D, et al. Detection of human herpesvirus 6 and human papillomavirus 16 in cervical carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 1509–16.
 122. Yadav M, Arivananthan M, Kumar S. HHV-6 antigen and viral DNA detected in cervical cells from archived tissue using histochemical staining and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1996; 7: 23–33.
 123. Di Paolo JA, Popescu NC, Ablashi DV, Lusso P, Zimonjic DB, Woodworth CD. Multistage carcinogenesis utilizing human genital cells and human papillomaviruses. *Toxicol Lett* 1994; 72: 7–11.
 124. Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JL, Cheng AF. Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors. *J Clin Pathol* 2001; 54: 48–53.
 125. Yadav M, Arivananthan M, Chandrashekrana A, Tan BS, Hashim BY. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus-encoded antigen in oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 393–401.
 126. Zerr DM, Huang ML, Corey L, Erickson M, Parker HL, Frenkel LM. Sensitive methods for detection of human herpesviruses 6 and 7 in saliva collected in field studies. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1981–3.
 127. Black JB, Pellet PE. Antiviral assays for human herpesviruses 6 and 7. 2000; 129–38.
 128. Osman HK, Wells C, Baboonian C, Kangro HO. Growth characteristics of human herpesvirus 6: comparison of antigen production in two cell lines. *J Med Virol* 1993; 39: 303–11.
 129. Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol* 2005; 32(3): 183–93.

130. Blumberg BM, Mock DJ, Powers JM, Ito M, Assouline JG, Baker JV, Chen B, Goodman AD. The HHV 6 paradox: ubiquitous commensal or insidious pathogen. A two –step in situ PCR approach. *J Clin Virol* 2000; 16: 159-78.
131. Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 2005; 128: 516-27.
132. Lautenschlager I, Linnavuori K, Hockerstedt K. Human herpesvirus -6 antigenemia after liver transplantation. 2000; 69: 2561-6.
133. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR –based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3274-9.
134. Pozo F, Tenoria A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1999; 79: 1-19.
135. Humar SD, Tipples GA. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. *Methods* 2003; 112: 99-105.
136. Martro E, Cannon MJ, Dollard SC, Spira TJ, Laney AS, Ou CY, Pellet PE. Evidence for both lytic replication and tightly regulated human herpesvirus 8 latency in circulating mononuclear cells, with virus loads frequently below common thresholds of detection. *J Virol* 2004; 78: 11707-14.
137. Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis* 1998; 178: 1520-6.
138. Clark DA, Kidd IM, Collingham KE, Tarlow M, Aueni T, Riordan A, et al. Diagnosis of primary human herpesvirus 6 and 7 infections in febrile infants by polymerase chain reaction. *Arch Dis Child* 1997; 77: 42-5.
139. Bland RM, Mackie PL, Shorts T, Pate S, Paton JY. The rapid diagnosis and clinical features of human herpesvirus 6. *J Infect* 1998; 36: 161-5.
140. Norton RA, Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Hocknell P, Dewhurst S. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3672-5.
141. Coen DM, Schaffer PA. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 278–88.
142. Karlsson T, Mannonen L, Loginov R, Lappalainen M, Höckerstedt K, Lautenschlager I. Development of a newquantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAemia after liver transplantation. *J Virol Methods* 2012; 181: 25-36.
143. Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin*

- Microbiol 1989; 27: 651–3.
144. Ruell J, Barnes C, Mutton K, Foulkes B, Chang J, Cavet J, et al. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 55–61.
 145. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 932–40.
 146. Wasserman R, August CS, Plotkin SA. Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 109–15.
 147. Broers AE, van Der HR, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95: 2240–5.
 148. Allen UD, Tellier R, Doyle J. The utility of plasma polymerase chain reaction for human herpes virus-6 among pediatric bone marrow transplant recipients: results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 473–7.
 149. Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 820–5.
 150. Radonić A, Oswald O, Thulke S, Brockhaus N, Nitsche A, Siegert W, Schetelig J. Infections with human herpesvirus 6 variant B delay platelet engraftment after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 131: 480–2.
 151. Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Hara J, Fujisaki H, Matsuda Y, Ohta H, et al. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1065–70.
 152. Betts BC, Young JA, Ustun C, Cao Q, Weisdorf DJ. Human herpesvirus 6 infection after hematopoietic cell transplantation: is routine surveillance necessary? *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1562–8.
 153. Imbert-Marcille BM, Tang XW, Lepelletier D, Besse B, Moreau P, Billaudel S, Milpied N. Human herpesvirus 6 infection after autologous or allogeneic stem cell transplantation: a single-center prospective longitudinal study of 92 patients. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 881–6.
 154. de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, et al. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 831–9.

155. Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 15: 2005-11.
156. Hentrich M, Oruzio D, Jäger G, Schlemmer M, Schleuning M, Schiel X, Hiddemann W, Kolb HJ. Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 66-72.
157. Ogata M, Kikuchi H, Satou T, Kawano R, Ikewaki J, Kohno K, Kashima K, Ohtsuka E, Kadota J. Human herpesvirus 6 DNA in plasma after allogeneic stem cell transplantation: incidence and clinical significance. *J Infect Dis* 2006; 193: 68-79.
158. Yoshikawa T, Asano Y, Ihira M, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. *J Infect Dis* 2002; 185: 847-53.