

## HIV pozitif hastalarda HHV-6 prevalansı ve varyant tiplerinin belirlenmesi

### *The prevalence of HHV-6 and variant type in HIV positive patients*

© Gülnur Tarhan<sup>1</sup>, © Neziha Yılmaz<sup>2</sup>, © Salih Cesur<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

<sup>2</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı HIV enfeksiyonu pozitif saptanan hastalarda HHV-6 DNA sıklığının, HHV-6 DNA'sı pozitif saptanan olgularda ise HHV-6 varyant türünün (varyant A veya varyant B) belirlenmesiydi.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya 20 HIV pozitif hasta ile 57 HIV negatif sağlıklı birey dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda HHV-6 DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. HHV-6 DNA pozitif saptanan olgularda HHV-6 varyant türü restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism: RFLP) ile araştırıldı. İstatistiksel değerlendirme SPSS programında yapıldı,  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** HIV pozitif hastalarda HHV-6 DNA pozitifliği %45 (9/20), HIV negatiflerde ise %33,3 (19/57) olarak belirlendi. Toplamda pozitiflik oranı %36,3 (28/77) idi. HIV pozitif hastalarda HHV-6 varyant B saptanırken, varyant A saptanmadı.

**Sonuç:** HIV pozitif hastalarda HHV-6 seropozitifliği ve varyant tiplerinin öneminin belirlenmesi için daha fazla sayıda olgu içeren başka klinik çalışmalara gereksinim olduğu görüşündeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** HIV, HHV-6, varyant A, varyant B, koenfeksiyon

#### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to determine the frequency of HHV-6 DNA in patients with HIV positive infection and HHV-6 variant type (variant A or variant B) in patients with HHV-6 DNA positive

**Material and Method:** Twenty HIV-positive patients and 57 HIV negative healthy subjects were included in the study. HHV-6 DNA was investigated by polymerase chain reaction (PCR) in the patient and control groups. In cases with HHV-6 DNA positive, HHV-6 variant was investigated with restriction fragment length polymorphism (RFLP). Statistical analysis was performed using SPSS program,  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

**Results:** HHV-6 DNA positivity was found to be 45% (9/20) in HIV positive patients and 33.3% (19/57) in HIV negative patients. Overall, the positivity rate was 36.3% (28/77). HHV-6 variant B was detected in HIV positive patients, but variant A was not.

**Conclusion:** We believe that further clinical studies involving more cases are needed to determine the importance of HHV-6 seropositivity and variant types in HIV positive patients.

**Keywords:** HIV, HHV-6, variant A, variant B, coinfection

#### GİRİŞ

HHV-6, ilk defa 1986 yılında Salahuddin ve ark. (1) tarafından AIDS ve çeşitli lenfoproliferatif hastalığı olan olguların periferik kan mononükleer hücrelerinden izole edilmiştir. Virüs konak hücrelerinde primer olarak CD4(+) T lenfositlerine tropizm göstermektedir. HHV-6'nın HIV enfeksiyonlarındaki rolü araştırma safhasındadır. Her

iki virusunda CD4 (+) T hücre lenfotropizmi göstermesi, HHV-6'nın HIV enfeksiyonlarının ilerlemesinde bir kofaktör olabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AIDS'in ileri safhalarında yaygın HHV-6 enfeksiyonu bildirilmiştir (1-5).

HHV-6 izolatları; biyolojik, immünolojik ve moleküler özellikleri bakımından varyant A ve varyant B olmak

**Sorumlu Yazar:** Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 06230, Ulucanlar Cad., Altındağ, Ankara, Türkiye

**E-posta:** scesur89@yahoo.com

**Geliş Tarihi:** 16.08.2019 **Kabul Tarihi:** 01.11.2019 **Doi:** 10.32322/jhsm.605654

**Cite this article as:** Tarhan G, Yılmaz N, Cesur S. HIV pozitif hastalarda HHV-6 prevalansı ve varyant tiplerinin belirlenmesi. J Health Sci Med 2020; 3(1): 12-15.

üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu varyantların *in vitro* hücre tropizmi, T hücre markırlarının ekspresyonundaki etkileri, monoklonal antikorlar ile gösterdikleri reaksiyonlar, restriksiyon endonükleaz profilleri, nükleotid sekansları, seroepidemiolojik özellikleri ve hastalıklar ile olan birliktelikleri birbirinden farklıdır. HHV-6 B'nin ekzantem subitum etkeni olduğu ve immün sistemi baskılanmış bireylerde sıklıkla aktif olduğu bildirilmesine rağmen, HHV-6 varyant A'nın belirli bir hastalık ile kesin ilişkisi tanımlanmamıştır (1-4). Varyant B, varyant A'dan daha fazla görülür ve HIV ile enfekte hastalarda farklı dokulara tropizm gösterir (2).

Bu çalışmada HIV-seropozitif bireylerde HHV-6 DNA sıklığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılması ve HHV-6 DNA pozitif olgularda, RFLP testi ile varyant türünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hasta ve Kontrol Grubu

Çalışma kapsamında, 20 HIV seropozitif birey ve 57 HIV seronegatif birey çalışmaya alındı. HIV seropozitif bireyler Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Viroloji Laboratuvarı-AIDS Araştırma ve Doğrulama Merkezi'ne gelen HIV seropozitif doğrulaması yapılmış kişiler arasından seçildi. HIV negatif kontrol grubu ise çalışmaya gönüllü katılmak isteyen kurum personelinden seçildi.

### Kan Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada grubundaki hasta ve kontrol grubundan periferik venden 2 ml antikoagülanlı (EDTA'lı) kan alındı. Kanlar, DNA ekstraksiyon ve pürifikasyon kitleri kullanılarak ekstrakte edilip, saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi sırasında her bir örneğe spektrofotometrik olarak saflık kontrolü yapıldı, her örnek çalışma gününe kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

### PZR ile Hedef Gen Bölgesinin Çoğaltılması

HHV-6 DNA amplifikasyonu için viral genom üzerinde, diğer herpes viruslar ile reaksiyon vermeyen ve HHV-6'nın genetik olarak değişkenlik gösteren türleri arasında korunmuş Large tegument protein (LTP) bölgesinin 830 baz çiftlik bir sekansı hedef bölge olarak seçildi. Bu amaçla; A: 5'-GAT CCG ACG CCT ACA AAC AC-3', C: 5'-CGG TGT CAC ACA GCA TGA ACT CTC-3' primer dizileri kullanıldı. PZR karışımı, her bir örnek için son tepkime karışımı 50µl olacak şekilde; apirojen su, tampon (1X), enhancer (1X), Mg Cl<sub>2</sub> (2.5 m M), d NTP karışım (200µM), her bir primer (20 p mol/µl), Taq DNA polimeraz (5 U/µl), 5µl test edilecek örnek DNA'sı konularak hazırlandı. Amplifikasyon için tüpler, 94 °C'de 3 dk, 40 döngü olacak şekilde (94 °C'de 45 sn., 62 °C'de 45 sn., 72 °C'de 1.15 sn.), 72 °C'de 4 dk bekletildi.

### PZR Çoğaltma Ürünlerinin Elektroforez ile İncelenmesi

PZR ürünleri %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü. Bu aşamadan sonra jel önceden hazırlanmış etidyum bromür (0.5 mg/ml) çözeltisinde 20 dk tutularak boyandı ve ultraviyole ışık kaynağı üzerinde görülen bantlar değerlendirildi. Tüm çalışmalarda negatif kontroller kullanıldı, 830 bp'lik büyüklükte çoğaltma ürünü gösteren örnekler tiplendirme için restriksiyon enzim analizine alındı.

### Restriksiyon Enzim Analizi

Hind III enzimi için 5 µl tampon (10 x), 2 µl enzim, 20 µl amplifiye ürün, 23µl steril distile su olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışımı, 37 °C'de bir gece inkübe edildi. Örnekler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Etidyum bromür çözeltisinde 20 dakika boyandıktan sonra ultraviyole ışık kaynağı üzerinde bantlar enzim ile kesim bölgelerine göre tür tayini için incelendi (3,6,7).

### Etik Durum

Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan etik onay alındı.

## BULGULAR

Çalışmamızda, HHV-6 DNA'sı incelenen 77 kan örneğinin, 28'i pozitif, 49'u negatif olarak saptandı. Pozitiflik oranı, çalışma gruplarına göre değerlendirildiğinde; HIV seronegatif 57 örneğin 19'unun, HIV seropozitif 20 örneğin ise 9'unun PZR testi ile pozitif olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

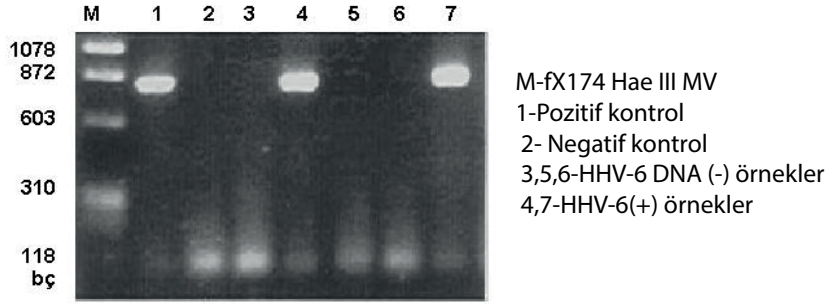
**Tablo 1.** Sağlıklı bireyler ve HIV seropozitif hastalarda HHV-6 PZR testi sonuçları

OLGU	HHV-6 PZR			
	Pozitif	%	Negatif	%
Sağlıklı Bireyler	19/57	33.33	38/57	66,67
HIV-seropozitif hastalar	9/20	45	11/20	55
Toplam	28/77	36.36	49/77	63,63

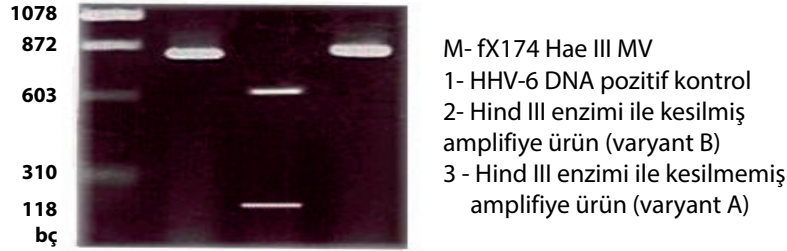
PZR yöntemi ile amplifiye edilen örneklerin, HHV-6 DNA'sı bakımından pozitif veya negatif olarak değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde, 830 bp'lik bir bölgede bir bantın gözlenmesi PZR pozitif, 830 bp'lik bir bölgede bir bantın gözlenmemesi PZR negatif olarak değerlendirildi (Resim 1).

PZR yöntemiyle HHV-6 (+) olan örneklerde HHV-6 varyantlarını belirlemek için: HHV-6 LTP kodlayan genin 830 bp'lik bölgesinde spesifik kesim yeri olan, Hind III restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. 830 bp'lik bölge, izolatların bir kısmında ile 610 bp ve 220 bp olmak üzere 2 fragmente ayrıldı. Diğer bir grup izolatta ise Hind III ile herhangi bir kesim bölgesi ayırt edilmedi.

Hind III ile kesilen izolatlar varyant B, kesilmeyen izolatlar varyant A olarak kabul edildi (Resim 2).



**Resim 1.** Klinik örneklerde HHV-6 DNA'nın amplifikasyonu



**Resim 2.** HHV-6'nin varyant A ve varyant B'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü

RFLP analizi sonucunda tüm çalışma grubunda varyant B %85,71 oranla varyant A (%14,29)'ya göre daha fazla sıklıkla tesbit edildi. Çalışmada HIV negatif bireylerde %21,05 sıklıkla varyant A belirlenirken, HIV pozitif bireylerde varyant A türüne rastlanmadı. Gruplar arasında varyant B türü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, varyant A türü bakımından anlamlı bir fark saptandı ( $p < 0,05$ ) (Tablo 2).

**Tablo 2.** HIV negatif sağlıklı bireyler ve HIV pozitif bireylerde HHV-6 varyant dağılımı

OLGULAR	HHV-6 DNA		HHV-6 VARYANTLARI			
			A		B	
	Pozitif	%	Pozitif	%	Pozitif	%
HIV negatif	19/57	33,33	4/19	21.	15/19	79
HIV pozitif	9/20	45	0/9	0	9/9	100
Toplam	28/57	36,36	4/28	14,3	24/28	85,7

## TARTIŞMA

Herpesvirus enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülen viral enfeksiyonlardır. Tüm herpes grubu viruslarda olduğu gibi, HHV-6'da genellikle asemptomatik olarak ko-  
nağa girdikten sonra, özellikle CD+4 T lenfositlerine afinitesi nedeniyle bu hücrelerde çoğalmakta ve aynı hücrelerde latent olarak kalmaktadır. Vücutta latent halde bulunan virus; çeşitli nedenler ile immün sistemin baskılandığı durumlarda tekrar aktivite kazanmaktadır. HHV-6'nın reaktivasyon veya reenfeksiyonunun pek çok klinik tablo ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Virusun primer olarak CD+4 T hücre lenfotropizm göstermesi, HHV-6'nın HIV enfeksiyonlarının ilerlemesinde önemli rolü olabileceğini düşündürmüştür. HIV seronegatif sağlıklı bireyler ve HIV-seropozitif hastaların tükürük ve kanlarında HHV-6 DNA varlığının PZR yöntemi ile araştırıldığı çeşitli çalışmalar-

da, HHV-6 DNA; HIV seronegatif ve HIV seropozitif bireylerin tükürüklerinde sırası ile %3-63, %0-96 oranında, kanlarında ise %10-49, %10-75 oranında tesbit edilmiştir. RFLP testi ile yapılan tür ayrımı çalışmalarında ise HIV seropozitif hastalarda ve HIV seronegatif bireylerde HHV-6 B varyantının daha yaygın olduğu gösterilmiştir (2,4,8). Fox ve ark. (3) ise, HIV pozitif hastalar ve HIV negatif olan bireylerde HHV-6 antikor prevalansının istatistiksel olarak farklılık göstermediğini ve bu nedenle HHV-6 enfeksiyonunun HIV enfeksiyonunu güçlendirmede sonucuna varmışlardır. Spira ve ark. (4) da benzer şekilde HIV enfeksiyonu ile HHV-6 arasında korelasyon olmadığını bildirmişlerdir

Çalışmamızda, HIV seronegatif sağlıklı bireyler ve HIV-seropozitif bireylerin kan örneklerinde HHV-6 DNA sırası ile %33,33 ve %45 sıklıkta saptanmıştır. HIV seropozitif bireylerde saptanan bu oran HIV enfeksiyonlarında HHV-6 virusunun önemli olabileceğini düşündürmektedir.

HHV-6 varyant A ve varyant B'nin sıklığının ülkelere göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Avrupa, ABD ve Japonya'daki primer bebek enfeksiyonları, ağırlıklı olarak HHV-6B'dir (%97-100), Afrika'da ise, sağlıklı bebeklerin % 86-100'ü HHV-6 varyant A'yı primer enfeksiyon olarak edinir (9).

Sunduğumuz çalışmada, HHV-6 DNA pozitif örneklerde Hind III enzimi kullanarak yaptığımız RFLP testi sonucunda HIV-seronegatif bireylerde HHV-6 A %21,05 sıklıkla tespit edilirken, HIV seropozitif bireylerde HHV-6 A türüne rastlanılmamıştır. HHV-6B türü ise %100 oranında tesbit edilmiştir.

Çalışmamızda, diğer çalışmalar ile uyumlu olarak, HIV seropozitif hastalarda varyant B türünün varyant A'ya göre daha yaygın olduğunu belirledik.

HHV-6A'nın epidemiyolojisi ve hastalıklarla ilişkileri daha

az tanımlanmıştır. AIDS hastalarında HHV-6 enfeksiyonu/reaktivasyonu, hem lenf düğümlerinde hem de genel olarak viral yükte artışa neden olur, bunun sonucunda viremi, birçok organda yaygın enfeksiyon, aktif santral sinir sistemi enfeksiyonu, pnömoni ve retinit hatta ölüme neden olabildiği bildirilmiştir. HHV-6 ile ilişkili bilateral posterior üveit ve optik nörit, AIDS'in klinik belirtileri olan veya olmayan HIV ile infekte bireylerde bildirilmiştir. Bu bulgular, HHV-6'nın AIDS'in ilerlemesinde kofaktör olabileceği ve HIV'in latent enfeksiyondan replikatif faza geçmesine katkıda bulunabileceği görüşüne neden olmuştur. Mevcut verilere rağmen, HHV-6'nın HIV-1 enfeksiyonunun progresyonunda rol oynadığına dair kesin kanıtlar hala eksiktir (9).

Contreas ve ark (10) HIV periodontitisi olan hastalarda HHV-6 polimeraz zincir reaksiyonu pozitiflik oranını (%71), HIV negatif periodontitisi olan hastalardan (%21) anlamlı oranda yüksek bildirmişlerdir. Leach ve ark. (11) HIV ile infekte kanseri olan çocuklar, HIV ile enfekte kanserli çocuklar ve HIV enfeksiyonu olmayan kanserli çocuklarda yaptıkları çalışmada, HHV-6 ve CMV enfeksiyonlarının sıklığını, HIV enfeksiyonu ve kanseri olan çocuklarda daha sık saptamışlardır. Çalışmada, HHV-6A varyantı, yalnızca HIV ile infekte kanser hastalarında saptandığı rapor edilmiştir.

Sunduğumuz çalışmanın kısıtlayıcı yönleri; HIV pozitif hastalarla ilgili detaylı klinik bilgiye sahip olmadığımız için bu hastalarda HHV-6 seropozitifliği ve HHV-6 varyant B'nin klinik önemini değerlendirmek mümkün olmamıştır, ayrıca çalışmaya dahil edilen hasta sayısı azdır. Buna karşın, çalışmada hem hasta grubu hem de kontrol grubunda HHV-6 DNA'sının ve varyant tiplerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi yönüyle ilginçtir. Ayrıca, Türkiye'de HIV pozitif hastalarda HHV-8 seropozitifliğinin araştırıldığı çalışmalar olmasına rağmen, HIV pozitif hasta grubunda HHV-6 seropozitifliği ve varyant tiplerinin araştırıldığı çalışma mevcut değildir. Çalışmamız literatür tarandığı kadarıyla Türkiye'de bu konuda yapılmış ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, HIV pozitif hastalarda HHV-6 seropozitifliği ve varyant tiplerinin öneminin belirlenmesi için daha fazla sayıda HIV pozitif hasta içeren geniş kapsamlı klinik çalışmalara gereksinim olduğu görüşündeyiz.

## MADDİ DESTEK VE ÇIKAR İLİŞKİSİ

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların çikara dayalı bir ilişkisi yoktur.

## KAYNAKLAR

1. Braun DK, Dominguez G, Pellet PE. Human Herpesvirus-6. Clin Mic Rev 1997; 10: 521-67.
2. Dolcetti R, Luca DD, Mirandola P, et al. Frequent detection of Human Herpesvirus-6 DNA in HIV associated lymphadenopathy. Lancet 1994; 344: 543.
3. Fox J, Briggs M, Tedder RS. Antibody to human herpesvirus 6 in HIV-1 positive and negative homosexual men. Lancet 1988; ii, 396-7.
4. Spira TJ, Bozeman LH, Sanderlin KC, et al. Lack of correlation

between human herpesvirus-6 infection and the course of human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 1989; 161: 567-70.

5. Corbellino M, Lusso P, Gallo RC. Disseminated human herpesvirus 6 infection in AIDS. Lancet 1993; 342: 1242.
6. Lindquister GJ, Inoue N, Allen RD, et al. Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the Human Herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome. Arch Virol 1996; 141: 367-79.
7. Aubin JT, Collandre H, Candotti D, et al. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by southernblotting and polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29, 367-72.
8. Kositanont U, Wasi C, Wanprapar N, et al. Primary infection of human herpesvirus 6 in children with infection of human immunodeficiency virus type 1. J Infect Dis 1990; 180: 50-5.
9. Munawwar A, Singh S. Human herpesviruses as copathogens of HIV infection, Their role in HIV transmission, and disease progression. J Lab Physicians 2016; 8: 5-18.
10. Contreras A, Mardirossian A, Slots J. Herpesviruses in HIV-periodontitis. J Clin Periodontol 2001; 28: 96-102.
11. Leach CT, Pollock BH, McClain KL, Parmley RT, Murphy SB, Jenson HB. Human herpesvirus 6 and cytomegalovirus infections in children with human immunodeficiency virus infection and cancer. Pediatr Infect Dis J 2002 ;21: 125-32.
12. Karlı B, Önel M, Eraksoy H, Ağaçfidan A. İstanbul'da anti-HIV-1 pozitif hastalarda HHV-8 prevalansının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47: 493-9