

ADEFOVİRE PRİMER DİRENÇLİ BİR KRONİK B HEPATİTİ OLGUSU**A CASE OF CHRONIC HEPATITIS B WITH PRIMARY ADEFOVIR RESISTANCE**

**Tansu YAMAZHAN¹, Rüçhan SERTÖZ², Hüsnü PULLUKÇU¹
Meltem TAŞBAKAN¹, Sercan ULUSOY¹, Selda ERENŞOY²**

ÖZET: Kronik B hepatit (KBH)'li hastalara uygulanan antiviral tedavi, zaman içinde mutant suşların ortaya çıkışına neden olmaktadır. Daha nadir olarak primer dirençli olgularla da karşılaşılmaktadır. Bu raporda, daha önce adefovir kullanmamış ancak primer adefovir direnci saptadığımız bir KBH'li olgunun sunulması amaçlanmıştır. HBeAg pozitif KBH'li 25 yaşındaki erkek hastaya bir yıl süre ile haftada üç kez 10 MÜ interferon-alfa ve lamivudin 100 mg/gün kombine tedavisi uygulanmıştır. Birinci yılın sonunda uygulanan tedaviye virolojik ve biyokimyasal yanıt alınmış ancak anti-HBe serokonversiyonu sağlanamamıştır. Lamivudin tekli tedavisine devam edilen hastada, tedavinin üçüncü yılında lamivudin direnci saptanmıştır [FLM+YMDD+YIDD+YVDD (Inno-LiPA HBV DR, Innogenetics Ghent, Belçika)]. Bunun üzerine lamivudin tedavisine, adefovir eklenmiştir. Kombine antiviral tedavinin sekizinci ayında ALT normalleşmesi ve HBV-DNA negatifleşmesi sağlanamayan hastada, tedavinin 11. ayında adefovir direnci araştırılmış ve DNA dizi analizi ile rtA181T (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems ABD) mutasyonunun varlığı saptanmıştır. Tedavi başlangıcından itibaren adefovir tedavisine yanıt olmaması, primer adefovir direncini düşündürmüş, bu amaçla hastanın tedavi öncesi serum örneği dizi analizi yöntemi ile çalışılmıştır. Aynı mutasyon tedavi öncesindeki serum örneğinde de gösterilmiştir. Adefovir direncinin saptanması ile tedaviye tekrar lamivudin eklenmiş, ancak kombinasyon tedavisinin üçüncü ayında HBV-DNA pozitifliğinin devam ettiği izlenmiştir. Hasta, bu dönemden sonra düzenli takipten çıkmıştır.

Anahtar sözcükler: Hepatit B, adefovir, primer direnç.

ABSTRACT: Implementation of antiviral therapy leads to the emergence of mutant strains during the treatment in chronic hepatitis B. Hepatitis B virus (HBV) with primary antiviral resistance may be rarely encountered. In this report, a chronic hepatitis B case who had never received adefovir dipivoxil but had primary adefovir resistance, was presented. HBeAg positive 25-year-old male patient was treated with interferon (IFN)-alpha (thrice a week 10 MU) and lamivudine (100 mg/daily) combination for one year. At the end of this treatment although HBV-DNA was under the detectable limit and ALT levels returned to normal, anti-HBe antibodies did not develop. During the course of lamivudin treatment on the third year virus was found to be resistant to lamivudin

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (tansu.yamazhan@ege.edu.tr)

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

[FLM+YMDD+YIDD+YVDD (Inno-LiPA HBV DR, Innogenetics Ghent, Belgium)] and adefovir was added to the lamivudin therapy. At the end of eight months of combination therapy, ALT levels did not return to normal and HBV-DNA was still in detectable levels. On the 11th month resistance to adefovir was analysed and rtA181T mutation was found by DNA sequence analysis (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, USA). Since there had been no response to adefovir from the initiation of the therapy, primary adefovir resistance was suspected. Primary adefovir resistance was confirmed by the detection of the same mutation in pre-adefovire treatment serum sample of the patient. Lamivudin was re-added to the therapy, however, HBV-DNA still remained positive on the third month of this combination therapy. The patient got out of routine follow-up after this period.

Key words: Hepatitis B, adefovir, primary resistance.

GİRİŞ

Kronik B hepatit (KBH)'li hastalarda antiviraller, düşük yan etki profili, kullanım kolaylığı gibi özellikleri nedeniyle özellikle yüksek viral replikasyonu olan hastalarda önemli bir tedavi seçeneğidir. Lamivudin bu amaçla ilk onay alan antiviraldir. Lamivudinden sonra adefovir, tenofovir, entakavir, telbivudin, klevudin ve emtristabin bu alanda bir kısmı kullanımda olan bir kısmı ise faz çalışmaları devam etmekte olan antivirallerdir. Yaygın olarak kullanılan bir antiviral olan lamivudinin, tedavi başlangıcında viral replikasyonu önemli oranda durdurduğu gözlenmekle birlikte, tedavinin uzaması direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Lamivudin tedavisinin ilk yılında %24'lerde olan direnç, dördüncü yılın sonlarında %70'lere yükselmektedir¹. Kodon rt180 (hedef bağlanma bölgesi: B bölgesi) ve/veya kodon rt204 (katalitik bölge: C bölgesi)'de meydana gelen mutasyonlar ile lamivudine in vitro direnç gelişir. Avrupa Karaciğer Çalışma Birliği (EASL) tarafından kesin olarak tanımlanmış lamivudine dirençli mutantlar; rtL180M ve rtM204I/V/S'dir. Referans laboratuvarlar tarafından öne sürülen mutasyonlar ise; rtI53S, rtL80I/V,rtL82I/V, rtF169L, rtV173L, rtA200V, rtV207I, rtS219P ve rtL229V'dir.

Lamivudinden sonra kronik hepatit B tedavisinde kullanılan bir diğer antiviral olan adefovir, farklı kimyasal yapısının yanında, yavaş direnç gelişimi, hem vahşi virusa hem de lamivudine dirençli suşlara karşı etkili olması sayesinde önemli tedavi seçeneklerinden birini oluşturmuştur. Ancak zaman içerisinde bu antivirale karşı da direnç gelişimi bildirilmeye başlanmıştır. Adefovir direncini araştıran çalışmalarda bu oran ilk yılda %0 iken, 2. yılda %2-3, 4. yılda ise %15-18 olarak bildirilmektedir². Çapraz direnç veya tedavi ile ilişkili direncin yanı sıra, nadiren daha önce antiviral tedavi uygulanmamış hastalarda, vahşi virustaki mutasyonlar sonucu mutant virus enfeksiyonları ile de karşılaşılabilir. Bu raporda, daha önce adefovir tedavisi uygulanmamış ve adefovire primer direnç saptanan bir olgu, bu yönü ile ilginç olduğu düşüncesiyle sunulmaktadır.

OLGU SUNUMU

Herhangi bir nedenle hekime başvurduğu sırada karaciğer enzimlerinde yükseklik (ALT: 123 IU/L, AST: 89 IU/L) saptanan 25 yaşındaki erkek hasta, hepatit göstergelerinde HBsAg'i, HBeAg'i, anti-HBc total pozitif; anti-HBc

IgM, anti-HBe ve anti-HBs antikorları negatif, HBV-DNA değerinin 1450 pg/ml (Digene Hybrid Capture, Digene Corporation, ABD) olarak saptanması üzerine kronik B hepatiti olarak değerlendirilmiştir. Hasta, diğer hepatit etkeni viruslar yönünden incelenmiş ve anti-HAV IgM negatif, anti-HAV total pozitif, anti-HCV ve anti-HDV ise negatif olarak saptanmıştır. Karaciğer biyopsisi sonucu histolojik olarak kronik aktif B hepatiti tanısı kanıtlanan hastaya bir yıl süre ile haftada üç kez 10 MÜ interferon (IFN)-alfa ve lamivudin 100 mg/gün ile kombinasyon tedavisi uygulanmıştır. Birinci yılın sonunda IFN tedavisi kesilen hastanın, HBV-DNA'sı (Digene Hybrid Capture System HBV DNA, Digene Corporation, ABD, 5 pg/ml=1.425X10⁶ kopya/ml) saptanamayacak düzeye inmiş, ALT değeri normale dönmüş, ancak anti-HBe serokonversiyonu sağlanamamıştır. Lamivudin tedavisine devam edilen hastada, bu tedavinin 3. yılında ALT: 269 IU/L ve HBV-DNA: 791 pg/ml olarak saptanması üzerine, lamivudin direnci araştırılmış ve FLM+YMDD+YIDD+YVDD (Inno-LiPA HBV DR, Innogenetics Ghent, Belçika) mutasyonu saptanmıştır. Bunun üzerine lamivudin tedavisine, adefovir (10 mg/gün) eklenmiştir. Kombine antiviral tedavi ile ALT normalleşmesi ve HBV-DNA negatifleşmesi sağlanamayan hastada, tedavinin 3. ayında lamivudin kesilerek adefovir ile devam edilmiştir. Adefovir tedavisinin 5. ayında ALT: 80 IU/L ve HBV-DNA: 4x10⁶ kopya/ml (Robogene Hepatit B virus kantitasyon kiti, Roboscreen, Almanya) olarak saptanmıştır. Adefovir tedavisine yanıt alınmadığı için adefovir direnci araştırılan olguda, DNA dizi analizi ile rtA181T mutasyonu saptanmıştır. Aynı analizde, N236 mutasyonu saptanmamıştır.

Nükleik asit izolasyonu, serumdan "High Pure Viral Nucleic Acid Isolation" kiti (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) ile yapılmış, HBV DNA'nın 56 ve 1416. nükleotidler arası iki türlü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır³. Elde edilen HBV-DNA PCR ürünleri polimeraz gen bölgesinin rt6-rt345 kodonları arasını görecektir şekilde üç farklı primer ile nükleik asit dizi reaksiyonuna alınmıştır (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit ve ABI PRISM 310 Genetic Analyser-Perkin Elmer, ABD). Elde edilen DNA dizileri, DNASTar programında (DNASTAR Inc, ABD) aminoasit dizilerine çevrilip gen bankasından alınan dizilerle birlikte hizalanmıştır.

Adefovire dirençli tanımlanmış mutantlar rtA181T/V ve rtN236T'dir. Referans laboratuvarlar tarafından öne sürülen mutasyonlar ise, rtV84M, rtH90D, rtT128N, rtY135C, rtV214A, rtQ215S, rtI235M, rtN238D ve rtS256C/G'dir⁴. Bunlar içinde örneğimizde; V84, H90, V214, Q215, I235, S256'da bir mutasyona rastlanmamıştır. Kodon rt135'de ise daha önce tanımlanmamış rt Y135S varlığı gözlenmiştir.

Tedavi başlangıcından itibaren adefovir tedavisine yanıt olmaması, primer adefovir direncini düşündürmüştür. Bu amaçla hastanın tedavi öncesi serum örneği de dizi analizi ile çalışılmış ve rt A181T mutasyonu saptanarak adefovir direncinin primer, yani tedavi öncesindeki dönemde de var olduğu gösterilmiştir. Adefovir direnci sonrası tedaviye tekrar lamivudin eklenmiştir. Kombinasyon tedavisinin 3. ayında HBV-DNA düzeyi 7.4x10⁶ kopya/ml (Robogene Hepatit B virus kantitasyon kiti, Roboscreen, Almanya) olarak saptanmıştır. Hasta, bu dönemden sonra düzenli takipten çıkmıştır.

TARTIŞMA

Bir nükleotid analogu olan adefovir, vahşi tip virusa olduğu kadar prekor mutanlara ve lamivudine dirençli suşlara karşı da oldukça etkili olması sayesinde antiviral tedavi planlanan kronik B hepatitli hastalarda önemli bir tedavi seçeneğini oluşturmaktadır. Adefovir direncinde mutasyon tipi, gelecek tedavileri belirleme bakımından önemlidir. İki majör adefovir direnç mutasyonu; B ve D kangallarında yer alan A181T/V ve N236T/N238D mutasyonlarıdır⁵. A181V mutasyonu diğer nükleoz(t)id analoglarına duyarlılığı azaltırken, N236T mutasyonunun çapraz dirence katkıda bulunmadığı ya da çok az katkısı olduğu saptanmıştır. Diğer mutasyonlar C ve D kangalları arasında 215 pozisyonunda yer alır, ancak bu bölgedeki mutasyonun etkisinin nasıl olduğu açık değildir⁶. İn vitro direnç testlerinde N236T mutasyonu sonucunda, adefovirin inhibitör konsantrasyonunda 7.3 kat, tenofovirden 2.6 kat, telbivudinde 2.4 kat, lamivudinde 2 kat, entekavirde 0.67 kat artış saptanmıştır⁷. Bu sonuç, adefovir direnci ile tenofovir, telbivudin ve lamivudin arasındaki çapraz direncin minimum olduğunu, entekavir ile çapraz direncin olmadığını göstermektedir. A181V mutasyonu ile ilişkili adefovir direncinden, telbivudin, lamivudin ve entekavir etkilenirken, en az direncin tenofovire karşı olduğu gösterilmiştir⁷. Ancak direncin klinik yansımalarının takibinde uzun süreli izlem çalışmalarının yetersiz olduğu da bilinmektedir⁸.

Olgumuzda lamivudin direnci, ardından adefovir kullanımı öncesinde adefovir direncinin saptanmış olması, çapraz direnç olasılığını düşündürmüş olmakla birlikte, lamivudin ve adefovir arasında çapraz direnç beklenen bir durum değildir. Sık rastlanan lamivudin direnç mutasyonları primer olarak diğer nükleozid analoglarına dirence neden olmaktadır. Ancak özellikle L180M mutasyonunun famsiklovire çapraz dirence neden olduğu, A181T ve Q215S mutasyonlarının ise adefovir ve tenofovire karşı çapraz direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁹. Bu durumda hasta daha önce bu iki ilacı kullanmamış olsa bile lamivudin tedavisine bağlı çapraz direncin görülebildiği de bildirilmektedir⁹.

Lamivudin direnci saptandığı durumlarda adefovir, alternatif tedavide ilk düşünülen ilaçtır. Adefovir direncine neden olan mutasyonların görülme oranı ilk yıl içinde hiç saptanmazken, ilk üç yıl içinde %5.9 oranında olduğu bildirilmektedir¹⁰. Olgumuzda olduğu gibi adefovire yanıtızsızlık söz konusu olduğunda, ilk yıl içinde direnç gelişiminin oldukça düşük olması, bizi primer direnç varlığını araştırmaya yöneltmiştir. Schildgen ve arkadaşları⁷, primer adefovir direnci saptadıkları üç olguyu sundukları makalelerinde, bu durumun nadir bir HBV varyantından kaynaklandığını (rt1233V) ve bu suşların hepsinin tenofovire duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, doğal olarak adefovir dirençli HBV mutanları ile de karşılaştıklarını belirtmişlerdir⁷. Bizim olgumuzda rt 1233V mutasyonu saptanmamıştır.

Kronik B hepatitli hastaların tedavisinde kullanılan antivirallere karşı direnç gelişimi söz konusu olduğunda, bu direncin kliniğe yansması ve yeni tedavi stratejilerinin ne olacağı henüz netleşmemiş bir konudur. Lamivudin direnci gelişen hastalarda, direncin süresi ile ilişkili olarak tedaviye devam edildiğinde hepatit alevlenmesinin, dekompanseasyonun ve hepatik fibrozisde

kötüleşmenin arttığı saptanırken, adefovir direncinin klinik olarak daha ılımlı seyrettiği, önemli hepatit alevlenmelerinin lamivudin direncindekinden daha az olduğu bildirilmektedir. Olgumuzda önce lamivudin ardından primer adefovir direnci saptanmıştır. Lamivudin direnci saptandıktan sonra adefovir tedaviye eklenmiş ve kombine tedavinin üçüncü ayında lamivudin kesilerek adefovir ile tedaviye devam edilmiştir. Her iki ilaca da direnç saptandıktan sonra iki antiviralin birlikte uygulanması, bu konuda başka bir seçeneğin olmamasından kaynaklanmıştır. Van Bömmel ve arkadaşları¹¹, lamivudine dirençli olgularda adefovir ile tenofovirin etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında, 48 hafta sonunda HBV-DNA düzeyinin 10⁵ kopya/ml'nin altına düşme oranının, adefovir grubunda %44, tenofovir grubunda ise %100 olduğunu bildirmişlerdir. Yine bu konuda umut vaat eden yeni bir nükleozid analogu olan entekavir için ilk iki yılda direnç gelişimi saptanmazken, lamivudine dirençli hastalarda tedavinin ikinci yılında entekavir direncinin %9 olduğu bildirilmektedir¹².

Kronik hepatit B tedavisinde antiviral direnç, hepatit alevlenmesi, hepatik dekompanseasyon, HBeAg serokonversiyonunda azalma ve karaciğer hastalığında kötüleşmeye neden olabilir. Çapraz direnç profili ikinci seçenekleri de etkileyecektir. Bu nedenle başlangıç tedavisi dikkatle seçilmeli ve olgumuzda olduğu gibi antiviral tedaviye yanıtızlık söz konusu olduğunda primer direnç varlığından şüphelenilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Lok AS, Lai CL, Leung N, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125: 1714-22.
2. Keeffe EB, Dieterich DT, Han HS, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 936-62.
3. Yang H, Westland CE, Delaney WE, et al. Resistance surveillance in chronic hepatitis B patients treated with adefovir dipivoxil for up to 60 weeks. *Hepatology* 2002; 36: 464-73.
4. Locarnini S. Hepatitis B viral resistance mechanisms and diagnosis. VIDRL (Victorian Infectious Disease Reference Laboratory) Conference Report (hbvadocate.org/news/reports/locarnini.html).
5. Locarnini S, Shaw T, Sozzi T, et al. HBV mutants associated with clinical resistance to adefovir dipivoxil display only small decreases in antiviral sensitivity in vitro. *Hepatology* 2004; 40: 244A.
6. Tenney DJ, Langley DR, Oliver AJ, et al. Hepatitis B virus resistance to entecavir involves novel changes in the viral polymerase. *Hepatology* 2004; 40: 245A.
7. Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 354: 1807-12.
8. Hadziyannis SJ, Tassapoulos NC, Heathcote EJ, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 800-7.
9. Zoulim F, Poynard T, Degos F et al. A prospective study of the evolution of lamivudine resistance mutations in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *J Viral Hepat* 2006; 4: 278-88.
10. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Long term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2743-6.
11. Van Bömmel F, Wünsche T, Mauss S, et al. Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 1421-5.
12. Colonna R. Entecavir two year resistance update: no resistance observed in nucleoside naive patients and low frequency resistance emergence in lamivudine refractory patients. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; November 11-15, 2005; San Francisco, California. Program and Abstracts Book, Abstract no: 962.