

Nükleoz(t)id Analogları Tedavisi Altında HBV Aşı Kaçağı Mutasyonları Gelişen Bir Kronik Hepatit B Olgusu

HBV Vaccine Escape Mutations in a Chronic Hepatitis B Patient Treated with Nucleos(t)ide Analogues

Murat SAYAN¹, Mehmet Sait BUĞDACI²

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Medical Faculty Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

² Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Konya.

² Konya Training and Research Hospital, Konya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.02.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.05.2013

ÖZET

Hepatit B virusu (HBV) genomunda yer alan *pol* geni, yüzey (*S*) geni ile üst üste çıkışarak tamamen örtülmektedir. HBV *pol* geninde hem primer hem de kompensatuvar nükleoz(t)id analogu (NA) direnç mutasyonları, hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) kodlayan bölgede değişikliklere neden olabilmektedir. Güncel çalışmalarda HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak "ilaca bağlı gelişen potansiyel aşı kaçağı mutasyonu" (ADAPVEM; Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutant) kavramı kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, NA tedavileri altında çoklu HBV aşı kaçağı mutasyonları gelişen bir kronik hepatit B (KHB) olgusu sunulmuştur. HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 53 yaşındaki kadın hastanın karaciğer biyopsisinde Ishak yöntemine göre histolojik aktivite indeksi 9 ve evresi 2 olarak tespit edilmiştir. Hasta, 24 ay lamivudin, ardından 18 ay entekavir ve son olarak 3 ay süren tenofovir tedavisi almıştır. Tenofovir tedavisinin dördüncü ayında HBV DNA yükü 7.030.000 IU/ml olarak saptanmıştır. Tenofovir monoterapisine eklenen entekavir ile hastada HBV DNA yükünün 400 IU/ml'ye gerilediği izlenmiştir. Hastanın serum örneğinden izole edilen HBV DNA'sının *pol* geni dizilenmiş ve bilinen tüm primer/kompansatuvar NA direnci mutasyonları, çakışan *pol/S* geni bölge mutasyonları ve ADAPVEM'ler analiz edilmiştir. Hasta izolatu, HBV genotip D/altgenotip D1 olarak tanımlanmıştır. HBV *pol* geni RT kangalında lamivudin + telbivudin ile ilişkili primer ilaç direnci mutasyonları (rtV173L + rtL180M + rtM204V) ve lamivudin + adefovir ile ilişkili kompensatuvar mutasyon (rtQ215H) saptanmıştır. Ayrıca HBV *pol/S* geni çakışma bölgesinde çok sayıda aşı kaçağı mutasyonları bir arada (sS143T + sD144E + sG145R + sE164D + sI195M) tespit edilmiştir. Ülkemizde KHB'li hastalarda yaygın olarak kullanılan lamivudin ve telbivudin tedavileri-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Murat Sayan, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, İzmit, Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 303 8571, **E-posta (E-mail):** sayanmurat@hotmail.com

nin ADAPVEM oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle KHB'li hastaların NA ile tedavilerinde ADAPVEM'ler ortaya çıkarılmalı ve halk sağlığı yönünden değerlendirilmelidir.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu; nükleozid/nükleotid analogu; ilaç direnci; mutasyon; aşı kaçacağı; direkt dizileme.

ABSTRACT

The hepatitis B virus (HBV) polymerase (*pol*) gene completely overlaps with the envelope (*S*) gene. Nucleos(t)ide analogue (NA) resistance mutations in the *pol* gene of HBV, either from selection of primary or secondary resistance mutations, typically result in changes in the overlapping hepatitis B surface antigen (HBsAg). Recent studies have conferred a new acronym to these HBV *pol/S* gene overlap mutants; ADAPVEMs, for antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants. The present report aimed to assess the determined multiple HBV vaccine-escape mutants in a Turkish patient with chronic hepatitis B (CHB), undergoing NAs treatment. The liver biopsy of HBsAg positive, HBeAg negative 53-year old female patient with CHB, revealed a score as histological activity index; 9 and fibrosis; 2 according to Ishak classification. NA treatment backgrounds consisted of 24 months lamivudine, followed by 18 months entecavir and lastly 3 months tenofovir monotherapies. Since HBV DNA load was determined as 7.030.000 IU/ml at the 4th month of tenofovir therapy, entecavir was added as current treatment regimen, and tenofovir + entecavir therapy decreased the HBV DNA load (400 IU/ml). Sequence analysis was performed for HBV *pol/S* gene and overlapping *pol/S* gene amino acid substitutions, primary/compensatory NA resistance mutations and antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutations (ADAPVEM) were analysed. The patient isolate was identified as genotype D/subgenotype D1 of HBV. Primary drug resistance mutations (rtV173L + rtL180M + rtM204V) to lamivudine and telbivudine and a compensatory mutation (rtQ215H) to lamivudine and adefovir were described in the HBV *pol* gene sequence. However, multiple HBV vaccine-escape mutations (sS143T + sD144E + sG145R + sE164D + sI195M) have been determined on the HBV overlapping *pol/S* gene region. Lamivudine and telbivudine which are the frequently preferred drugs for the treatment of CHB in Turkey, have the potential to lead to ADAPVEMs. Thus ADAPVEMs should be monitored in infected and NA treated CHB patients and their public health risks should be assessed.

Key words: Hepatitis B virus; nucleoside/nucleotide analogue; drug resistance; mutation; vaccine escape; direct sequencing.

GİRİŞ

Nükleoz(t)id analogları (NA) kronik B hepatiti tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. NA; L-nükleozidler [lamivudin (LAM), telbivudin (LdT)], deoksiguanozin analogu [entekavir (ETV)] ve asiklik fosfonatlar [adefovir (ADV) ve tenofovir (TDF)] olmak üzere üç ayrı gruptan oluşmaktadır. Günümüzde Amerika, Güney Amerika, birçok Asya ülkeleri ve ülkemizin de içinde bulunduğu Avrupa'da, kronik hepatit B tedavisinde onay almış olan LAM, LdT, ADV, ETV ve TDF kullanılmaktadır¹.

Hepatit B virusu (HBV), yüksek replikasyon kapasitesi ($> 10^{12}$ virion/gün) ve ters transkripsiyon işleminde hata düzeltememe özelliklerinden dolayı yüksek mutasyon sıklığına sahiptir (10^{-5} substitusyon/baz/siklus). Bu, HBV genomundaki her bir nükleotidin gün içinde değişebileceği ve tedavi öncesinde NA direnci ile ilişkili mutasyonların meydana gelebileceği anlamına gelebilir². Kronik hepatit B'nin NA ile uzun süreli tedavisin-

de karşılaşılan en önemli sorun, kullanılan antiviral ajana dirençten sorumlu mutasyonların gelişmesidir. Primer ya da kompensatuvar (replikasyon kapasitesini onarıcı/viral yükü artırıcı) nitelikte olabilen mutasyonlar HBV DNA yükünde artışa ve tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir^{1,3}. Öte yandan, HBV'nin genom organizasyonunda polimeraz (*pol*) ve yüzey (*S*) genleri üst üste çakışır pozisyonadadır ve bu nedenle NA ilaç direnci mutasyonları, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) yapısında aminoasit değişikliklerine neden olabilmektedir. Son yıllarda HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak "ilaça bağlı gelişen potansiyel aşı kaçağı mutasyonu" (ADAPVEM; Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutant) kavramı kullanılmaya başlanmıştır^{4,5}. Bu raporda, HBV genotip D/altgenotip D1 ile enfekte, çoklu HBV aşı kaçağı mutasyonları saptanan kronik hepatit B'li bir olgu sunulmaktadır.

OLGU SUNUMU ve MUTASYONLARIN TESPİTİ

HBsAg pozitif, HBeAg negatif ve karaciğer biyopsisinde Ishak yöntemine göre histolojik aktivite indeksi 9, evresi 2 olan kronik hepatit B'li 53 yaşındaki kadın hasta, 24 ay LAM (Zeffix, 100 mg/gün, Glaxo Wellcome Laboratories, İngiltere), ardından 18 ay ETV (Baraclude, 1 mg/gün, Bristol-Myers Squibb Company, ABD) ve 3 ay süren TDF (Viread, 245 mg/gün, Gilead Sciences, ABD) monoterapisi almıştı. TDF tedavisinin 4. ayında HBV DNA yükünün 7.030.000 IU/ml olması nedeniyle hastaya rutin HBV ilaç direnci analizi yapıldı.

HBV genotip/altgenotip tespiti, bilinen tüm primer/kompensatuvar NA direnci mutasyonları ve *pol* geni ile çakışan *S* geni (HBsAg proteini; 111.-227. aminoasitler arası) mutasyonları HBV *pol* geni (ters transkriptaz; RT bölgesi, 80.-250. aminoasitler arası) dizilenecek analiz edildi⁶. Bu amaçla serum örneğinden HBV DNA izole edildi (Anatolia Genetworks, Bosphore® Viral DNA Extraction Spin Kit ve Magnesia® 16 Magnetic Bead Extraction System, İstanbul, Türkiye). HBV *pol* geni amplifikasyonu (742 bp) için ileri (F:5'-tcgtggtggacttctctcaatt-3') ve geri (R:5'-cgttgacagactttccaatcaat-3') primerler kullanıldı. PCR koşulları için 95°C'de 10 dakika ön denatürasyon, ardından 35 döngü 95°C'de 45 saniye, 60°C'de 45 saniye ve 72°C'de 45 saniye ısı/zaman döngüsü uygulandı⁶. Tüm PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile saflaştırıldı. Dizileme protokolünde Phire Hot Start DNA polimeraz (Finnzymes Oy, Finlandiya) enzimi kullanıldı. Dizileme, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., ABD), 36 cm kapiller ve POP-7 TM polimer (Applied Biosystems Inc., ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc., ABD) platformunda gerçekleştirildi. Elde edilen diziler Geno2pheno Drug Resistance programında (Center of Advanced European Studies and Research, Almanya) analiz edildi. Geno2pheno programı, fasta formatındaki bilinmeyen nükleik asit dizilerini databazında bulunan referans dizilerle karşılaştırmaktadır. Karşılaştırma sonrasında HBV *pol* geni RT kangalında; 80., 84., 85., 91., 169., 173., 180., 181., 184., 191., 194., 202., 204., 214., 215., 233., 236-238. ve 250. aminoasit pozisyonları primer ilaç direnci ve kompensatuvar mutasyonlar yönünden analiz edildi³. Ayrıca HBV RT kangalı ile çakışan *S* gen bölgesinde; 121., 135., 137., 139.-149., 151-153., 155-

Tablo I. Kronik Hepatit B'li Hastada Saptanan HBV *pol/S* Geni Mutasyonları ve Klinik Özellikleri

HBV genomu	Mutasyon tipi	Mutasyon özelliği	Klinik özellik	Kaynak
<i>Pol</i> geni (RT kangalı)	rtV173L + rtL180M + rtM204V	Primer ilaç direnci mutasyonları	Lamivudin; dirençli Telbivudin; dirençli Entekavir; orta duyarlı Adefovir; duyarlı Tenofovir; duyarlı	1-3, 13, 14
	rtQ215H	Kompansatuvar mutasyon	Lamivudin; viral yükü onarıcı Telbivudin; etkisiz Entekavir; etkisiz Adefovir; viral yükü onarıcı Tenofovir; etkisiz	3, 10, 13, 14
<i>S</i> geni	sS143T + sD144E + sG145R + sE164D + sI195M	HBV aşı kaçacağı mutasyonları	sS143T; aşıdan kaçış sD144E; aşıdan kaçış sG145R; aşı ve tanı testlerinden kaçış rtV173L/sE164D birlikte; aşı ve HBİg'den kaçış rtM204V/sI195M birlikte; ADAPVEM	7, 14 7, 14 2, 5, 7, 14 2, 5, 8, 14 2, 4, 5, 8, 9, 14

157., 161., 164., 172., 173., 175., 176., 182., 193-196. aminoasit pozisyonları mutasyonlar yönünden analiz edildi⁷.

Hasta izolatu, HBV genotip D/altgenotip D1 olarak tiplendirildi. HBV *pol* geni RT kangalında primer ilaç direnci mutasyonları ve kompansatuvar mutasyon saptandı. Bunun yanı sıra RT kangalı ile çakışan *S* gen bölgesinde çok sayıda aşı kaçacağı mutasyonları bir arada saptandı (Tablo I). Mutasyonların tespitinden sonra hastaya ETV + TDF kombinasyon tedavisi başlandı ve halen HBsAg pozitif ve viral yükü 400 IU/ml olan hasta takibe alındı.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ülkemizde ilk kez, bilinen önemli HBV aşı kaçacağı mutasyonları (sS143T, sD144E, sG145R, sE164D ve sI195M) tek bir olguda, bir arada tanımlanmıştır^{5,7}. Kronik hepatit B (KHB)'nin NA tedavilerinde gelişen ilaç direnci mutasyonları HBsAg'nin yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilmektedir^{4,5}. HBsAg proteininde "a" determinantı olarak bilinen majör nötralizasyon kangalı ve çevresinde meydana gelen mutasyonlar, hepatit B aşılmasına yanıtın azalmasına neden olmaktadır. HBV aşı kaçacağı mutasyonları aynı zamanda HBsAg tanı testlerinde yalancı negatifliklere ve hepatit B immünoglobulini (HBİg) ile korumada yetersizliğe yol açabilmektedir^{5,7,8}. Bu nedenle KHB'li hastalarda, NA tedavilerinde, *pol* geninin yanı sıra *S* geninin de analiz edilmesi yararlı ve gerekli olabilir.

HBV aşı kaçacağı mutasyonlarına sahip olan suşlar, aşılanmış bireylere de bulaşabilme potansiyeli taşıdığından, lokal ya da global hepatit B bağışıklama programlarında risk oluş-

turabilirler⁸. Ülkemizde yapılan bir çalışmada KHB'nin tüm klinik fazlarında ADAPVEM'lerin gelişebildiği ve NA tedavilerinde (%24) ADAPVEM oluşumunun naif bireylere göre (%0.7) predominant olduğu gösterilmiştir⁹. LAM ve LdT kullanımının yaygın ya da zorunlu olduğu popülasyonlarda (ülkemizde Sağlık Uygulama Tebliği'ne göre KHB'li hastalarda HBV DNA seviyesi < 10⁷ IU/ml ise NA tedavisi ancak LAM ya da LdT ile başlatılabilmektedir) ADAPVEM oluşumunun dikkatle izlenmesi halk sağlığı açısından önemli olabilir⁹.

Kronik B hepatitli hastaların NA tedavilerinde HBV genomunun RT kangalı, primer ilaç direnci mutasyonları yönünden analiz edilirken bu bölge ile çakışan S geni mutasyonlarının da birlikte analiz edilmesi mümkündür. Bu amaçla analiz için direkt dizileme metodunun seçilmesi yararlı olabilir^{6,10}. Direkt dizileme metoduyla HBV enfeksiyonlarında kompensatuvar mutasyonlar da saptanabilir (örn; olgumuzda saptanan rtQ215H mutasyonu). HBV *pol* geninde NA hedef bölgesinde meydana gelen kompensatuvar mutasyonlar, KHB'li hastaların tedavilerinde hatalı ilaç değişikliklerine neden olabilir. Ülkemizden bildirilen çalışmalara göre, hem NA tedavisi naif hem de LAM ve/veya ADV tedavilerindeki KHB hastalarında rtQ215H/Q/P/S kompensatuvar mutasyonları sık saptanmaktadır^{6,10-12}. Öte yandan sunduğumuz olguda saptanan L-nükleozidler ile ilişkili rtV173L mutasyonu da kompensatuvar karakterdedir ve halk sağlığını olumsuz etkileme potansiyelindeki sE164D mutasyonunun (HBV aşı kaçağı + HBlg kaçağı) oluşumuna neden olmaktadır (Tablo I)^{2,5}. Direkt dizileme metodu aynı zamanda HBV suşunun genotip ve altgenotip tespitinde de kullanılabilir. Bu çalışmada sunulan olgu, ülkemizde çok sık görülen genotip D/altgenotip D1 ile enfektedir¹³. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, HBV genotip D predominant olarak saptanmakta; altgenotipler olarak ise sıklık sırasına göre D1 (%70-100), D2 (%2-22), D3 (%2-10) ve D4 (%0.5-2) bildirilmektedir^{6,9,11-16}. HBV'nin altgenotiplendirilmesi ülkemizde olduğu gibi HBV genotiplerinin predominant olduğu toplumlarda, HBV ile enfekte hastaları epidemiyolojik olarak izlemede yararlı ve kullanışlı olabilir.

Sonuç olarak, KHB'li hastalarda NA monoterapilerinde primer ilaç direnci mutasyonları ve kompensatuvar mutasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu mutasyonların analizi sırasında HBV S geninin de değerlendirilmesi, NA ile ilişkili potansiyel aşı kaçağı mutasyonlarının saptanmasında ve halk sağlığı yönünden izlenmesinde yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 2012; 57(1): 167-85.
2. Harrison TJ. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. Semin Liver Dis 2006; 26(2): 87-96.
3. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. J Hepatol 2006; 44(3): 593-606.
4. Clements CJ, Coghlan B, Creati M, et al. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? Bull World Health Organ 2010; 88(1): 66-73.
5. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. J Clin Virol 2002; 25(2): 97-106.

6. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan S, Hülügü S, Çekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analogues resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B infection. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3): e136-41.
7. Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol* 2006; 78(1): 24-36.
8. Teo CG, Locarnini SA. Potential threat of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants to public health. *Antivir Ther* 2010; 15(3 Pt B): 445-9.
9. Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape HBV mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2011; 15(10): e722-6.
10. Sayan M, Akhan SC, Meric M. Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naive Turkish patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepatitis* 2010; 17(1): 23-7.
11. Sayan M, Akhan SC, Senturk O. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogues in add-on and switch strategies. *Hepat Mon* 2011; 11(10): 835-42.
12. Sayan M, Cavdar C, Dogan C. Naturally occurring polymerase and surface genes variants of hepatitis B virus in Turkish hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65(6): 495-501.
13. Sayan M, Dogan C. Genotype/subgenotype distribution of hepatitis B virus among hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Ann Hepatol* 2012; 11(6): 849-54.
14. Yıldız O, Aygen B, et al; Hepatitis B Study Group. Lamivudine resistance mutations in patients infected hepatitis B virus genotype D. *World J Gastroenterol* 2011; 17(45): 4987-92.
15. Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, et al. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(12): 1783-8.
16. Sayan M, Hülügü S, Akhan SÇ, et al. Entecavir resistance in entecavir naive lamivudine treated chronic hepatitis B patients. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 425-32.