

# Kronik Hepatit B İçin Antiviral Tedavi Alan Hastalarda Antiviral İlaç Direncinin Araştırılması<sup>§</sup>

Demet TİMUR\*, Selma ÖKAHMETOĞLU\*\*, Osman ÖZÜBERK\*\*, Gülten CAN SEZGİN\*\*\*, Ömür Mustafa PARKAN\*\*\*\*, Özge KAAAN\*\*

\*Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri

\*\*Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

\*\*\*Kilis Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Kilis

\*\*\*\*Afşin Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

## ÖZ

**Amaç:** Kronik hepatit B (KHB) tedavisinde günümüzde interferon/pegile interferon ve çeşitli nükleozid/nükleotid analogları kullanılmaktadır. Tedavideki nükleozid analogları; lamivudin, entekavir ve telbivudin iken, tenofovir ve adefovir ise nükleotid analoglarıdır. Ancak nükleozid/nükleotid analoglarının kullanımı ile viral polimeraz geninin çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar antiviral direncine neden olarak ilacın etkinliğini azaltmaktadır. Bu çalışmada, KHB enfeksiyonu tanısı ile takip edilen hastalarda, ilaç direncinden sorumlu gen mutasyonlarının araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi poliklinik ve kliniklerinde KHB tanısı ile takip edilen 45 hasta çalışmaya dâhil edildi. KHB hastalarında ilaç direncinden sorumlu mutasyonları revers transkriptaz gen bölgesinde pirosekanlama yöntemi (Pyromark, Qiagen, Almanya) ile araştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan 45 hastanın 13 (% 28.8)'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptandı. Dört örnekte M204I, 4 örnekte L180M+M204I, 2 örnekte L180M+M204V+V173L, 3 örnekte L180M+M204V mutasyonları bulundu. Bu mutasyonlar, M204I; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire ise duyarlı, L180M+M204I; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V+V173L; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire duyarlı olarak raporlandı. Hastaların tedavisi antiviral ilaç direnç sonuçlarına göre planlandı.

**Sonuç:** KHB hastalarının tedavi takibinde antiviral ilaç direnç analizinin yapılması gerektiği düşüncesine varıldı.

## ABSTRACT

**Investigation of Antiviral Drug Resistance in Patients Receiving Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B**

**Objective:** Today in the treatment of chronic hepatitis B (CHB) treatment, interferon/pegylated interferon and several nucleoside/nucleotide analogues are used. Nucleoside analogues used in the treatment are lamivudine, entecavir and telbivudine whereas tenofovir and adefovir are the nucleotide analogues in use. However, mutations in various regions of viral polymerase gene due to use of nucleoside/nucleotide reduce the effectiveness of the drug, analogues by inducing antiviral resistance. In this study investigation of the mutations responsible for drug resistance in patients with CHB infection was aimed.

**Material and Methods:** Forty-five patients who were being followed with the diagnosis of CHB in polyclinics and clinics of Erciyes University Medical Faculty were included in the study. Mutations responsible for drug resistance in reverse transcriptase gene region were investigated by pyrosequencing method (Pyromark, Qiagen, Germany).

**Results:** Mutations related to drug resistance were detected in 13 of 45 patients. M204I and L180M+M204I, mutations were detected in four samples each, L180M+M204V+V173L and L180M+ M204V mutations in two and three samples respectively. These mutations were reported as follows: M204I; resistant to telbivudine and lamivudine, intermediately susceptible to entecavir and adefovir, and susceptible to tenofovir, L180M+M204I; resistant to lamivudine, telbivudine and entecavir, susceptible to adefovir, tenofovir, L180M+M204V+V173L; resistant to lamivudine, telbivudine and entecavir, susceptible to adefovir, tenofovir, L180M+M204V; resistant to telbivudine and lamivudine, intermediately susceptible to entecavir and adefovir, and susceptible to tenofovir. Treatment of patients was carried out according to the antiviral drug resistance results.

**Conclusion:** It has been concluded that analysis of antiviral drug resistance should be performed in patients with CHB.

**Anahtar kelimeler:** Antiviral direnç, kronik hepatit B

**Keywords:** Antiviral drug, chronic hepatitis B

**Alındığı tarih:** 03.10.2016

**Kabul tarihi:** 15.01.2017

**Yazışma adresi:** Demet Timur, Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kayseri

**e-posta:** drdtimur@hotmail.com

<sup>§</sup> Bu çalışma 1. Ulusal Viroloji Günleri'nde (26-28 Şubat 2016, Ankara) poster bildiri olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonları, uzun süredir etkin bir aşının yaygın olarak uygulanmasına rağmen, günümüzde siroz ve hepatoselüler karsinoma (HCC)'ya kadar ilerleyerek insan hayatını riske atmaya devam etmektedir<sup>(1,2)</sup>. Türkiye orta endemik bölgeler içerisinde yer almaktadır<sup>(3)</sup>. Genotip D ülkemizde en sık rastlanan HBV genotipidir<sup>(4)</sup>.

Günümüzde kronik hepatit B (KHB) tedavi seçenekleri interferon/pegile interferon ve çeşitli nükleozid/nükleotid analoglarıdır<sup>(5)</sup>. Tedavideki nükleozid analogları; lamivudin, entekavir ve telbivudin iken, tenofovir ve adefovir ise nükleotid analoglarıdır<sup>(6)</sup>. Ancak nükleozid/nükleotid analoglarının kullanımı ile viral polimeraz geninin çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar antiviral direncine neden olarak ilacın etkinliğini azaltmaktadır<sup>(7)</sup>. Oral antiviral olarak kullanılan lamivudinin uzun süreli kullanımı sonucunda mutant suşlar ortaya çıkmaktadır. Dirençli mutantlar 4-5 yıllık bir sürede %60 oranına kadar ulaşabilmekte ve bu durum virolojik yanıt oranının düşmesiyle sonuçlanmaktadır<sup>(6)</sup>. Bu çalışmada, KHB enfeksiyonu tanısı ile takip edilen hastalarda, ilaç direncinden sorumlu gen mutasyonlarının araştırılması amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi poliklinik ve kliniklerinde KHB tanısı ile takip edilen, yaşları 7-69 arasında değişen ve 15'i kadın, 30'u erkek olan 45 hasta çalışmaya dâhil edilmiştir. KHB hastalarında ilaç direncinden sorumlu mutasyonları revers transkriptaz gen bölgesinde pirosekanslama yöntemi (Pyromark, Qiagen, Almanya) ile araştırıldı.

### DNA İzolasyonu

Hastalara ait serum örneklerinden deoksiribo-

nükleik asit (DNA) izolasyonu EZ1 virus mini kit v2.0 (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda EZ1 Advanced XL (Qiagen, Almanya) otomatik nükleik asit izolasyon cihazında yapıldı.

### PCR Amplifikasyonu

HBV DNA amplifikasyonunda iki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı hazırlandı. Master A ve B kullanılarak hazırlanan "master" karışımdan 20 µl her DNA örneğinden 10 µl alınıp; Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında PCR amplifikasyonu yapıldı.

### Pirosekanslama

HBV antiviral direnç analizi pirosekanslama yöntemi (Qiagen, Almanya) ile araştırıldı. HBV antiviral direnç analizi için, örnek başına altı pirosekanslama reaksiyonu uygulandı. PCR ürünlerinin "streptavidin sepharose" boncukları ile karşılaştırma işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı, örnekler denatüre edildi. Elde edilen tek sarmal DNA ile sekans primerinin bağlanma işlemi gerçekleştirildi. Altı adet sekans primeri kullanıldı ve 169, 173; 180, 181, 184; 194; 202, 204; 236; 250 kodonlarındaki antivirallere ait direnç mutasyonları belirlendi. Pyromark Q24 cihazında analiz işlemleri tamamlandı ve HBV antiviral sonuçları belirlendi. Antiviral ilaç direnç sonuçları Avrupa Karaciğer Derneği önerileri doğrultusunda değerlendirildi<sup>(2)</sup>.

### BULGULAR

Çalışmaya alınan 45 hastanın 13 (% 28.8)'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptandı. Bu 13 hastanın dördünde (%31) M204I, dördünde (%31) L180M+M204I, ikisinde (%15) L180M+M204V+V173L, üçünde (%23) L180M+M204V mutasyonları bulundu. Bu mutasyonlar, M204I; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve

**Tablo 1 Hastalarda saptanan antiviral ilaç direnç paternleri, önceden verilen tedaviler ve dirençle eşzamanlı laboratuvar değerleri.**

Direnç paterni	Hasta sayısı	Tedavi	AST/ALT	HBV DNA(IU/ml)	HbeAg
M204I	1. hasta	Lamivudin	17/19	629	(-)
	2. hasta	Lamivudin	132/219	10500	(+)
	3. hasta	Lamivudin	33/33	49063719	(+)
	4. hasta	Belirlenemedi*	20/11	18320	(-)
L180M+M204I	1. hasta	lamivudin	16/15	1760000	(-)
	2. hasta	lamivudin	40/54	20200000	(+)
	3. hasta	lamivudin	27/42	70432410	(+)
	4. hasta	lamivudin	38/43	6005	(-)
L180M+M204V+V173L	1. hasta	lamivudin	28/60	>100000000	(+)
	2. hasta	lamivudin	30/67	>100000000	(+)
L180M+M204V	1. hasta	lamivudin	1036/923	>100000000	(-)
	2. hasta	lamivudin	21/26	138000	(-)
	3. hasta	lamivudin	28/99	264112203	(-)

\* Hastaya ait dosyada ilaç raporu bulunamamıştır.

adefovire orta duyarlı, tenofovire ise duyarlı, L180M+ M204I; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+ M204V+V173L; lamivudin, entekavir ve telbivudine dirençli, adefovir ve tenofovire duyarlı, L180M+M204V; lamivudin ve telbivudine dirençli, entekavir ve adefovire orta duyarlı, tenofovire duyarlı olarak raporlandı. Bu hastaların direnç paternleri, önceden verilen tedaviler ve dirençle eşzamanlı laboratuvar değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Hastaların tedavisi antiviral ilaç direnç sonuçlarına göre yapılmıştır.

M204I mutasyonu saptanan pediatrik hastada, lamivudin direnci geliştikten sonra tedavisine interferonla devam edilirken, lamivudine direnç belirlenen geriye kalan 9 hastanın tedavisine tenofovir ile devam edilmiştir.

Antiviral direnç analizi sonucunda L180M+M204V ve L180M+M204I mutasyonu saptanan iki hasta eksitus olduğu için sonraki tedavileri bilinmemektedir.

## TARTIŞMA

KHB tedavisinde pegile interferon, yüksek etkinliği ve kullanım süresinin sınırlı olması

nedeniyle standart interferonların yerini almıştır. Pegile interferon ile tedaviye yanıt hızlarının yüksek olmasına karşın, uzun süreli izlemde relaps oranlarının fazla olduğu saptanmıştır<sup>(8)</sup>. Deri altına enjeksiyon şeklinde uygulanması ve yan etkilerinin sık görülmesi dezavantajlarını oluşturmaktadır. Dekompanse HBV ile ilişkili siroz veya otoimmün hastalığı olan kişilerde, kontrolsüz şiddetli depresyon ya da psikoz hastalarında ve gebelikte pegile interferon kullanımı kontrendikedir.

Entekavir ve tenofovir güçlü HBV inhibitörüdür ve direnç gelişimine yatkın değildir. İlk sırada kullanılacak monoterapi tedavi seçeneği olarak güvenle kullanılabilir. Adefovir tenofovirden daha pahalı, daha az etkilidir ve daha çok dirence neden olur. Telbivudin güçlü bir tedavi seçeneğidir, ama tedavi başarısı HBV DNA viral yükünden etkilenmektedir<sup>(2)</sup>.

Lamivudin tedavisinin maliyeti uygundur, ancak uzun süreli monoterapi tedavisi lamivudin dirençli HBV mutantlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dirençli mutantlar 4-5 yıllık bir sürede %60 oranına kadar ulaşabilmekte ve bu durum virolojik yanıt oranının düşmesiyle sonuçlanmaktadır<sup>(6)</sup>. Primer yanıtsızlık duru-

munda uyumlu bir hastada antiviral direnç araştırılmaktadır. Dirençli bir varyantın saptanması durumunda bu varyanta etkili olan diğer potent antivirale geçilmektedir. Benzer durumda tedaviye uyumlu olan hastalardaki virolojik kırılma durumunda direncin genotipik olarak tayini önerilmektedir. Günümüzde tenofovir direncine rastlanmamıştır. Tenofovir direncinin saptanması durumunda referans bir laboratuvar da doğrulanması gerekmektedir<sup>(2)</sup>.

Aydoğan ve ark.<sup>(9)</sup> Ankara'da bir üniversite hastanesinde yaptıkları çalışmada, 51 örneğin 13'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar, dört örnekte L180M+M204I ve bir örnekte L180M+M204V, üç örnekte M204I, bir örnekte L180M+M204V+S202G ve iki örnekte N236T şeklinde izlenmiştir<sup>(9)</sup>. Çalışmamızda ise, 45 hastanın 13'ünde (%28.8) ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmış olup, öncesinde 12'sinin lamivudin tedavisi almış olduğu belirlenmiştir. On üç hastanın yedisinde (%54) LMV ve telbivudin direnci ile ilişkili mutasyonlar, dördünde (%31) M204I, üçünde (%23) L180M+M204V, altısında (%46) LMV, telbivudin ve entekavir direnci ile ilişkili mutasyonlar, dördünde (%31) L180M+M204I, ikisinde (%15) L180M+M204V+V173L) bulunmuştur.

Akhan ve ark.<sup>(10)</sup> beş yıllık süredeki kronik hepatit B enfeksiyonu tedavisi gören 583 hastaya retrospektif olarak genotiplendirme ve direnç analizi yapmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 167 hastanın dokuzunda lamivudin direnci, üçünde adefovir direnci ve birinde adefovir ile lamivudin direnci saptanmıştır<sup>(10)</sup>.

Kırdar ve ark.<sup>(11)</sup> bir yıl lamivudin tedavisi kullanmış, kronik hepatitli 50 hastanın 12'sinde (%24) lamivudin direnci saptanmıştır. On iki hastanın altısında (%50) tek başına M204I mutasyonu, dördünde (%33) L180M+ A181T mutasyonları tek başına ya da M204I ile birlikte,

iki hastada (%16.7) M204I ile birlikte kompensatuvar mutasyonlardan L180M belirlenmiştir<sup>(11)</sup>.

Çin'de 2. basamak bir hastanede entekavir tedavisi sırasında takip edilen 81 hastanın 18'inde pirosekanslama yöntemi ile altı adet LMV direnci ile ilişkili çoklu mutasyon (L180M+M204V), 10 adet LMV direnci ile ilişkili tekli mutasyon (sekiz adet M204V, iki adet M204I), bir adet adefovir direnci ile ilişkili mutasyon (A181V) ve bir adet entekavir direnci ile ilişkili mutasyon (L169T+M204V+M250V) bulunmuştur<sup>(6)</sup>.

İtalya'da 38 kronik hepatit B hastasında lamivudin direnci M204I tek başına (7/17, %41), kompensatuvar mutasyonlar ile birlikte ikili mutasyonlar M204V+L180M (3/17, %17.6) ve üçlü mutasyonlar M204V+L180M+V173L (2/17, %11.7) olarak bulunmuştur<sup>(12)</sup>. Bu çalışmada, adefovir direnci ile ilişkili bulunan mutasyonlar Q215S, A181V, N236T ve V214E'dir<sup>(12)</sup>. Bu mutasyonlardan tekli olanlar dokuz hastada, ikili olanlar beş hastada ve üçlü olanlar üç hastada saptanmıştır. A194T ile ilişkili tenofovir direnci bir hastada bulunmuştur<sup>(12)</sup>.

Sonuç olarak, KHB tedavisi sırasında antiviral ilaç direnci düşünülen 45 hastanın 13'ünde antiviral ilaç direnci saptanmış olup, tedavi buna göre yönlendirilmiştir. KHB tedavi protokolü hastadan hastaya değişmekte olup, tedavi takibinde antiviral ilaç direnç analizinin yapılması gerekliliği düşüncesine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Lee GH, Inoue M, Toh JK, et al. Two-step evolution of the hepatitis B drug-resistant mutations in a patient who developed primary entecavir resistance. *Liver Int* 2013; 33:642-6. <https://doi.org/10.1111/liv.12104>
2. European association for the study of the liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57:167-85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.010>
3. Emekdaş G, Cavuşlu S, Öncül O, Cigdem A,

- Armagan A.** Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *Eur J Epidemiol* 2006; 2:299-305.
4. **Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, et al.** Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004; 149:2115-29. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0363-2>
5. **Petersen J, Thompson AJ, Levrero M.** Aiming for cure in HBV and HDV infection. *J Hepatol* 2016; 65:835-48. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.043>
6. **Sun M, Tan G, Song J, Wang J, Wu X.** Profile of HBV polymerase gene mutations during entecavir treatment in patients with chronic hepatitis B. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016; 40:590-6. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.02.005>
7. **Ergünay K, Kahramanoğlu Aksoy E, Şimşek H ve ark.** Tedavi naif kronik hepatit B olgularında bazal antiviral direncin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:628-35. <https://doi.org/10.5578/mb.6192>
8. **Akhan S, Aynioğlu A, Çağatay A, ve ark.** Kronik hepatit B virüsü enfeksiyonunun yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği viral hepatit çalışma grubu uzlaşısı raporu. *Klinik Derg* 2014; 27(Suppl):S2-18. <https://doi.org/10.5152/kd.2014.26>
9. **Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y, ve ark.** Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:472-81. <https://doi.org/10.5578/mb.5625>
10. **Akhan S, Gürel E, Sayan M.** Kronik hepatit B hastalarının beş yıllık tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi. *Klinik Derg* 2009; 22:82-7.
11. **Kırdar S, Yaşa MH, Aydın N, Gültekin Korkmazgil B.** Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının moleküler yöntem ile belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46:135-40.
12. **de Francesco MA, Gargiulo F, Spinetti A, et al.** Clinical course of chronic hepatitis B patients receiving nucleos(t)ide analogues after virological breakthrough during monotherapy with lamivudine. *New Microbiol* 2015; 38:29-37.