

Bir Yıldan Uzun Süreli Antiviral İlaç Kullanan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Saptanması*

Detection of Resistance Mutations in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Antiviral Therapy for Over One Year

Sibel AYDOĞAN¹, Koray ERGÜNAY¹, Yasemin BALABAN², Alpaslan ALP¹, Halis ŞİMŞEK², Gonca TATAR², Gülşen HASÇELİK¹, Dürdal US¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Gastroenterology Unit, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 09D09101007). Çalışmaya ait ön bulgular 4. Ulusal Viroloji Kongresi (23-26 Haziran 2011, İstanbul)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 14.05.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.06.2013

ÖZET

Bu çalışmada, tedavi uygulanan kronik hepatit B olgularında, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların, genotipik yöntemler olan DNA dizi analizi ve ters hibridizasyon temeline dayalı *Line Prob* (LiPA) yöntemleri (Inno-Lipa HBV DRv2 ve Inno-Lipa HBV DRv3, Innogenetics, Belçika) ile araştırılması ve mutasyonların saptanmasında bu iki yöntemin performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesinde kronik hepatit B tanısı ile takip edilen ve bir yıl ve/veya daha uzun süre lamivudin (LVD) tedavisi alan 71 hastaya ait serum örneği, bilgilendirilmiş onam alınarak dahil edilmiştir. Hastaların kadın erkek oranı 24/47, yaş ortalamaları ise 43 ± 15.8 (yaş aralığı: 13-71) yıldır. Düşük HBV DNA düzeyi (ortalama: 204.6 IU/ml) olan 20 örnek amplifikasyon elde edilmediğinden dizi analizi ile çalışılmamıştır. LiPA yönteminde ise tüm hasta örneklerine uygulanan konsensus PCR pozitif örnekler çalışmaya alınmıştır. Bu nedenle dizi analizi ile 51 örnek ve LiPA testleri ile 56 örnek değerlendirilmiştir. Dizi analizi ile olguların %25.5 (13/51)'inde, LiPA testleri ile de %16 (9/56)'sında dirençle ilişkili primer ve onarıcı mutasyonlar saptanmıştır. Dizi analizi ile saptanan mutasyonlar; beş örnekte LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı çoklu mutasyonlar (dört örnekte L180M + M204I ve bir örnekte L180M + M204V), üç örnekte LVD direnciyle ilişkili primer tekli

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Sibel Aydoğan, Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu Ankara İli 2 No.lu Genel Sekreterliği; Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 291 2525, E-posta (E-mail): drsaydogan72@gmail.com

mutasyonlar (M204I), LVD direnciyle ilişkili çoklu mutasyonları olan bir örnekte entekavir (ECV) direnciyle ilişkili bir mutasyon (S202G) ve iki örnekte adefovir (ADF) direnciyle ilişkili primer bir mutasyon (N236T) şeklinde izlenmiştir. Ayrıca üç örnekte tek başına ve bir örnekte çoklu mutasyona eşlik eden ilaç direnciyle ilişkilendirilmiş bir mutasyon (Q215S) görülmüştür. Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile saptanan mutasyonlar; dokuz örneğin beşinde LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı çoklu mutasyonlar (bir örnekte L180M + M204I, iki örnekte L80I + L180M + M204I, bir örnekte L80I + M204I ve bir örnekte L80I/V + M204I) şeklinde iken, dört örnekte LVD direnciyle ilişkili primer tekli mutasyonlar (üç örnekte M204I ve bir örnekte M204V) olarak izlenmiştir. Inno-Lipa HBV DRv3 testi ile ise LVD direnciyle ilişkili çoklu mutasyon olan iki örnekte entekavir direnciyle ilişkili iki farklı mutasyon (G202 ve ILM184) varlığı görülmüştür. Ancak ILM184 mutasyonuna ait olan bant zayıf pozitif olarak değerlendirilmiştir. LiPA testi ile örneklerin hiçbirinde adefovir direnciyle ilişkili bir mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda kullanılan testler genel olarak benzer performans göstermiş; ancak uyumsuz sonuçların değerlendirilebilmesi için ardışık serum örneklerinde çalışma yapılmasının daha faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Hepatit B virusu; antiviral ilaç direnci; DNA dizi analizi; line prob testleri.*

ABSTRACT

Primary mutations conferring hepatitis B virus (HBV) antiviral resistance and associated secondary/compensatory mutations were investigated in this study by DNA sequencing (SEQ) and two commercial Line Probe Assays (LiPAs) (Inno-Lipa HBV DRv2 and Inno-Lipa HBV DRv3, Innogenetics, Belgium). A total of 71 subjects under follow-up for chronic hepatitis B and receiving lamivudine (LVD) therapy for one year or longer at the Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Gastroenterology Unit were included in the study with informed consent. Male to female ratio and mean age was noted as 47/24 and 43 ± 15.8 (age range: 13-71) years, respectively. Twenty samples with low HBV DNA levels (mean: 204.6 IU/ml) could not be interpreted by SEQ due to insufficient amplification. All samples with a positive consensus PCR were further analysed via LiPAs, as directed by the manufacturer. Thus a total of 51 and 56 samples could be evaluated via SEQ and LiPA assays, respectively. In 13 of the 51 (25.5%) samples by SEQ and in 9 of 56 (16%) samples by LiPAs, primary and compensatory mutations associated with resistance were identified. Multiple mutations that comprise L180M + M204I in four and L180M + M204V in one sample and single mutations (M204I) in three samples were identified by SEQ. In one sample which had multiple mutations associated with LVD resistance single mutations (S202G, N236T) associated with entecavir resistance and in two other such samples mutations associated with adefovir resistance were detected by SEQ. Also, in three samples aminoacid substitution at position rt215 (Q→S) as alone and in one sample with multiple mutations were observed via SEQ. In five of nine samples primary and compensatory multiple mutations (L180M + M204I in one sample, L80I + L180M + M204I in two samples, L80I/V + M204I in one sample) and primary single mutations associated with LVD resistance (M204I/V) in four samples were detected by Inno-Lipa HBV DRv2. Two different mutations (G202, ILM184) were observed in two samples with multiple mutations associated LVD resistance via Inno-Lipa HBV DRv3. However, mutation at position rt184 was evaluated as a weak positive. Any mutation associated with adefovir resistance was not detected by LiPA. As a result, SEQ and LiPAs displayed comparable performances for the detection of HBV drug resistance mutations. We suggested that for the evaluation of discordant results, it should be better to test consecutive serum samples.

Key words: *Hepatitis B virus; antiviral drug resistance; DNA sequencing; line probe assays.*

GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonları, 30 yıldan uzun süredir etkili profilaktik aşının kullanılıyor olmasına rağmen, hala günümüzde siroz ve hepatoselüler karsinoma (HCC)'ya

kadar ilerleyerek insan hayatını tehdit eden global bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya popülasyonunun yaklaşık üçte biri eski ya da yeni HBV enfeksiyonuna ait serolojik bulgu taşımakta ve bunların yaklaşık 350-400 milyon kadarında kronik enfeksiyon gelişmektedir. Ayrıca her yıl yaklaşık bir milyon kişi hepatit B enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen akut/kronik hepatit, siroz ve HCC gibi hastalıklar sonucu hayatını kaybetmektedir¹.

Ülkemizde de HBV'ye bağlı kronik hepatit ve komplikasyonları, ayrıca hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcılığı önemli bir halk sağlığı sorunudur. HBV sıklığı yönünden Türkiye orta endemik bir bölge olup, toplum genelinde HBsAg pozitifliği %1.7-21 arasında rapor edilmiştir².

Kronik hepatit B (KHB) tanısı ile takip edilen hastalarda, antiviral ilaç direncine neden olan mutasyonların erken dönemde tespiti, özellikle tedavi altındaki hastalarda klinik öneme sahiptir. Direnç mutasyonlarının saptanması, gereksiz ilaç kullanımının önlenerek erken dönemde en uygun tedavi protokolünün belirlenmesini sağlayacak ve sonuçta ciddi, hayatı tehdit eden komplikasyonların gelişme insidansını azaltacaktır. Buna ek olarak, gereksiz ilaç kullanımının getireceği toksisite riski ve ekonomik yükün azaltılması da elde edilecek önemli kazanımlardır^{3,4}.

Bu çalışmada, KHB enfeksiyonu tanısı ile takip edilen ve bir yıldan uzun süredir lamivudin tedavisi alan olgularda, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların, DNA dizi analizi ve ters hibridizasyon temeline dayalı ticari testler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesinde Eylül 2009-2010 tarihleri arasında KHB tanısı ile takip edilen, bir yıl ve/veya daha uzun süre lamivudin (LVD) tedavisi alan 71 hasta dahil edildi. Hastaların 47 (%66)'si erkek, 24 (%34)'ü kadın olup, yaşları 13-71 yıl arasında (yaş ortalaması 43 yıl) değişmekteydi. Hastalar, HBV viral yük ve karaciğer enzim düzeylerinin rutin kontrolü için gastroenteroloji ünitesine başvurdıkları zaman onam formları imzalatıldı ve kan örnekleri alınarak serumları ayrıldıktan sonra çalışmaya kadar -80°C'de saklandı.

HBV Serolojisi

HBV serolojisi (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total) kemilüminesan immünolojik yöntem ile (Architect® HBsAg, Abbott, Almanya); ALT ve AST düzeyleri modüler bir otoanalizör ile (Roche/Hitachi, Japonya) çalışıldı.

HBV DNA Eldesi

Serum örneklerinden 200 µl kullanılarak High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostic, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda nükleik asit izolasyonu yapıldı ve HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

HBV Test, version 2.0, Roche, ABD) yöntemi (saptama aralıkları: 20 IU/ml-1.7 x 10⁸ IU/ml) ile saptandı.

PCR Amplifikasyonu

HBV DNA pozitif saptanan örnekler polimeraz gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla iki türlü PCR uygulandı. Birinci tur PCR reaksiyonu için örnek başına 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her bir primerden 25 pmol içerecek şekilde karışım hazırlandı ve 5 µl DNA ve 2.5 U Taq polimeraz eklenerek önceden tanımlanan ısı döngüleri ile amplifiye edildi⁵. İkinci tur reaksiyon için ise birinci tur PCR ürününden 1 µl eklenerek aynı koşullarda karışım hazırlandı ve amplifiye edildi. HBV polimeraz geninin amplifikasyonunda 1. tur için 5'-CAC CTG CAG CCT CAT TTT GTG GGT CAC CAT A-3'F ve 5'-CAT AAG CTT CAC AAT TCG TTG ACA TAC TTT CCA AT-3'R; 2. tur için 5'-TCG CTG GAT GTG TCT GCG GCG TTT TAT-3'F ve 5'-ACC CCA TCT TTT TGT TTT GTT AGG-3'R primerleri kullanıldı⁵.

DNA Dizi Analizi

PCR ürünleri Invisorb Rapid PCR kiti (Invitek, Almanya) ile saflaştırıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve ardından "BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, ABD) ile ikinci tur sens primeri kullanılarak dizi reaksiyonu gerçekleştirildi. Dizi reaksiyonu ürünleri, sodyum asetat/etanol presipitasyon yöntemiyle saflaştırıldıktan sonra "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, ABD) cihazında analiz edildi. HBV polimeraz geninin 470. nükleotid ile 720. nükleotidleri arasında yer alan 250 baz uzunluğundaki kısmı dizilendikten sonra "Bioedit" yazılımı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırıldı ve dirençle ilişkili mutasyon varlığı araştırıldı.

Ters Hibridizasyon Yöntemi

Bu amaçla Inno Lipa HBV DRv2 ve Inno Lipa HBV DRv3 (Innogenetics, Belçika) ticari kitleri kullanıldı. Saflaştırılmış olan DNA örnekleri biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak amplifiye edildikten sonra 867 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant oluşturan ürünler hibridizasyon çalışmasına alındı. Testin tüm basamakları AutoBlot 3000H (MedTEC, ABD) cihazında çalışıldı. Reaksiyon sonunda okuma kartı kullanılarak test şeritleri üzerindeki bant oluşumları görsel olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 71 hastanın hepsinde HBsAg pozitif olup bir hastada ek olarak anti-HBs pozitifliği (14.76 IU/ml) saptanmıştır. Hastaların 16 (%22.5)'sında HBeAg ve 54 (%76)'ünde anti-HBe pozitifliği bulunurken, bir hastada HBeAg ve anti-HBe'nin her ikisi de negatif olarak belirlenmiştir. Hastaların ortalama ALT düzeyleri 75.45 U/L, ortalama HBV DNA düzeyleri 4.2 x 10⁷ IU/ml olarak saptanmıştır.

DNA Dizi Analizi

Düşük HBV DNA düzeyi olan 20 örnekte (ortalama: 204.6 IU/ml = 1190.8 kopya/ml) DNA amplifikasyonu oluşmadığından direnç analizi çalışılmamıştır. Çalışılan 51 örneğin 13 (%25.5)'ünde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar, 5 ör-

nekte LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı çoklu mutasyonlar (4 örnekte L180M + M204I ve 1 örnekte L180M + M204V), 3 örnekte LVD direnciyle ilişkili primer tekli mutasyonlar (M204I), LVD direnciyle ilişkili çoklu mutasyonları olan 1 örnekte entekavir (ECV) direnciyle ilişkili bir mutasyon (S202G) ve 2 örnekte adefovir (ADF) direnciyle ilişkili primer bir mutasyon (N236T) şeklinde izlenmiştir. Ayrıca, 3 örnekte tek başına ve bir örnekte çoklu mutasyona eşlik eden ilaç direnciyle ilişkilendirilmiş bir mutasyon (Q215S) görülmüştür.

Inno-Lipa HBV DRv2/v3

PCR sonrası 71 hasta örneğinden 56'sında 867 bç büyüklüğünde bant oluşturan ürün saptanmış ve bu örnekler ilaç direnciyle ilgili mutasyonların tespiti için değerlendirilmeye alınmıştır. Bant izlenmeyen 15 örneğin ortalama HBV DNA düzeyi 615 IU/ml (3579.3 kopya/ml) olarak hesaplanmıştır.

Çalışılan 56 örneğin 9 (%16)'unda antiviral ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile saptanan mutasyonlar; 9 örneğin 5'inde LVD direnciyle ilişkili primer ve onarıcı çoklu mutasyonlar (1 örnekte L180M + M204I, 2 örnekte L80I + L180M + M204I, 1 örnekte L80I + M204I ve 1 örnekte L80I/V + M204I) iken, 4 örnekte LVD direnciyle ilişkili primer tekli mutasyonlar (3 örnekte M204I ve 1 örnekte M204V) olarak izlenmiştir. Inno-Lipa HBV DRv3 testi ile ise LVD direnciyle ilişkili çoklu mutasyon olan 2 örnekte entekavir direnciyle ilişkili iki farklı mutasyon (G202 ve ILM184) varlığı görülmüştür. Ancak ILM184 mutasyonuna ait olan bant, zayıf pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin hiçbirinde adefovir ve tenofovire direnç oluşturan bir mutasyon saptanmamıştır. Çalışılan her iki testle saptanan mutasyonlar karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Antiviral ilaçlara dirençli HBV suşlarının tanımlanması, serumda HBV DNA'yı tespit eden duyarlı moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile ivme kazanmıştır. Bu yöntemler sayesinde antiviral tedavi altında vireminin çok düşük olduğu zamanlarda dahi HBV DNA düzeylerinde minör değişikliklerin ($< 0.5 \log_{10}$) olabileceği gösterilmiştir. İlaç direncinin gelişimi klinik olarak vireminin kalıcı olması ya da ilerleyici artışı olarak tanımlanmakta ve bu da tedavi sırasında serum HBV DNA düzeylerinde en az $1 \log_{10}$ artış olarak ifade edilmektedir. Tedaviye uyumu doğrulanan olgularda antiviral direnç testlerinin yapılması önerilmektedir^{6,7}.

Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Ünitesi'nde kronik hepatit B (KHB) tanısı ile takip edilen ve bir yıl ve daha uzun süreli lamivudin (LVD) tedavisi alan 71 hastada, ilaç direncinden sorumlu ana mutasyonların saptanması amacıyla, genotipik yöntemler olan DNA dizi analizi ve ters hibridizasyon temeline dayalı ticari *line prob* yöntemleri olan Inno Lipa HBV DRv2 ve Inno Lipa HBV DRv3 testleri çalışılmıştır. Hasta örneklerinin 20'sinde DNA amplifikasyonu olmadığından bu örnekler dizi analizi çalışmasına alınamamıştır. Bu örneklerin ortalama HBV DNA düzeyleri 204.6 IU/ml (1190.8 kopya/ml) olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya ali-

Tablo I. Çalışmada DNA Dizi Analizi ve Inno-Lipa HBV DRv2/v3 Testleri ile Saptanan Mutasyonlar

| Örnek no | Dizi analizi | Inno-Lipa |
|----------|---------------------|-------------------------|
| 7 | Q215S | - |
| 8 | L180M, M204V, S202G | L180M, M204I, S202G |
| 16 | Q215S | - |
| 20 | L180M, M204I | L80I, L180M, M204I |
| 25 | N236T | M204V |
| 26 | - | L80I, M204I |
| 27 | L180M, M204I | L80I, L180M, M204I |
| 34 | M204I | L80I/V, M204I, T184ILFM |
| 44 | - | M204I |
| 45 | L180M, M204I, Q215S | M204I |
| 46 | M204I | - |
| 48 | M204I | - |
| 49 | - | M204I |
| 51 | L180M, M204I | - |
| 56 | N236T | - |
| 66 | Q215S | - |

nan 51 örneğin 13 (%25.5)'ünde antiviral ilaç direncine yol açtığı bilinen aminoasit değişiklikleri saptanmıştır. Bunlardan LVD direnciyle ilişkili primer mutasyon olan M204I üç örnekte tek başına, iki örnekte L180I + M204I, bir örnekte L180M + M204I + Q215S ve bir örnekte de L180M + M204I + S202A olarak çoklu mutasyonlar halinde izlenmiştir.

Hepatit B virusu polimeraz enziminin C bölgesinde 203-206. kodonların yer aldığı YMDD motifinde rtM204V/I/S olarak ifade edilen mutasyonların LVD'ye karşı direnç gelişimine neden olduğu bilinmektedir^{8,9}. 180. kodonda oluşan L180M/C mutasyonunun ise tek başına direnç oluşumunda yeterli olmadığı, ancak rtM204V/I/S ile birlikte bulunduğu hem replikasyonu hem de LVD direncini artırdığı gösterilmiştir⁸. Yapılan çalışmalarda YVDD mutasyonuna hemen daima L180M mutasyonunun eşlik ettiği, YIDD tipi mutasyonların ise tek başına da görülebileceği bildirilmektedir¹⁰⁻¹². Çalışmamızda da dizi analizi ile YVDD mutasyonu bir örnekte L180M ve S202G mutasyonları ile bir arada bulunmuştur. Ancak Inno-Lipa HBV DRV2 testi ile bir örnekte YVDD mutasyonu tek başına izlenmiş ve ayrıca bu örnekte dizi analizi ile bu mutasyon saptanmadığı gibi, bunun yerine adefovir direnciyle ilişkilendirilen N236T mutasyonu görülmüştür. Ülkemizden bildirilen iki çalışmada da YVDD mutasyonu tek başına bulunmuş ve bu mutasyonlara ilerde L180M mutasyonunun eşlik edebileceği belirtilmiştir^{13,14}.

Geniş gen dizileri içeren veri tabanlarının analizi ile rtL80V/I mutasyonunun LVD direnci ile ilişkili olduğu ve LVD'ye dirençli izolatların %85'inin rtL80I kodladığı tespit edilmiştir¹⁵. Warner ve arkadaşları, rtL80I mutantının *wild type* virus ile karşılaştırıldığında,

kendi başına daha az etkinlikte replike olduğunu ve LVD'ye aşırı duyarlı olmakla birlikte, LVD direncini etkilemeden rtM204V/I mutantlarının replikasyon yeteneğini artırdığını göstermişlerdir¹⁵. Bizim çalışmamızda dizi analizinde 80. kodon bölgesi değerlendirme alanımız içinde bulunmadığından, bu bölgedeki mutasyonlar belirlenememiştir. Buna karşın Inno-Lipa HBV DRv2 değerlendirmesi ile dört örnekte (20, 26, 27, 34 no'lu örnekler) rtM204I mutasyonuna eşlik ettiği saptanmıştır.

Dizi analizi ile dört hasta örneğinde Q215S mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon 215. kodonda bulunan glutamin aminoasidinin yerini serin aminoasidinin almasıyla oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda adefovir (ADF) alan hastalarda gösterilmesine rağmen, bu mutasyonun klinikle ilişkisi henüz tam olarak net değildir¹⁶. Amini-Bavil-Olyae ve arkadaşları¹⁷, bu mutasyonun moleküler ve fonksiyonel etkilerini in vitro olarak değerlendirmişler ve sonuçta bu mutasyonun virusun replikasyon yeteneğini etkilemediğini ve LVD ve ADF'ye olan duyarlılığı da değiştirmedeğini göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, Q215S mutasyonunun D genotipi ile enfekte hastalarda sıklıkla görüldüğünü ve hatta hiç tedavi almamış hastalarda da ortaya çıktığını belirtmişler, dolayısıyla klinikle ilişkili direnç mutasyonundan ziyade arka planda bulunan polimorfizmleri temsil ettiğini ifade etmişlerdir¹⁷.

Bir deoksiguanozin analogu olan entekavir (ETV), daha önce hiç tedavi almamış ya da LVD'ye dirençli kronik hepatit B hastalarının tedavisinde kullanılması önerilen bir antiviral ajandır^{18,19}. Yapılan in vitro ilaç duyarlılık ve klinik çalışmaların sonuçlarına göre, primer LVD direncinden sorumlu rtM204V/I mutasyonunun seçilmesi ile ETV'ye karşı çarpaz direnç gelişmektedir⁹. Bu nedenle ETV'nin tedavi seçeneği olarak düşünüldüğü durumlarda, LVD'ye dirençli varyantların varlığı önem kazanmaktadır. Sayan ve arkadaşları²⁰, LVD tedavisi almış ve LVD direnç mutasyonlarının (rtM204V/I + L180M) geliştiği ETV naif KHB hastalarında ETV'ye karşı direncin gelişebildiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda dizi analizi ve Inno-Lipa HBV DRv3 testleri ile bir hasta örneğinde (8 no'lu hasta) LVD direnci oluşturan mutasyon profilleri ile birlikte ETV direncinden sorumlu olarak gösterilen S202G mutasyonu saptanmıştır. Ayrıca Inno-Lipa HBV DRv3 testi ile bir hasta örneğinde ETV direnci ile ilişkili ILMF184 mutasyonuna ait zayıf bir bant izlenmiş, ancak dizi analizi ile doğrulanmadığından yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmiştir.

Osiowy ve arkadaşlarının²¹ yaptıkları çalışmada, ADF tedavisi alan 38 hastanın 9'unda rtN236T mutasyonunun varlığı gösterilmiş ve bu hastalardan yedisinin daha önce LVD tedavisi altında iken LVD'ye karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Inno-Lipa testi sonuçlarına göre araştırmacılar, rtN236T ve rtM204V/I/S mutasyonlarının LVD tedavisinin ADF ile değiştirilmesinden sonra birlikte ortaya çıktığını düşünmüşlerdir²¹. Ayrıca LVD'ye dirençli yedi hastadan alınan 16 örneğin 13'ünde Inno-Lipa ile rtN236T mutasyonunun da saptanmış olması, ardışık olarak gelişen genotipik LVD ve ADF direnciyle ilgili daha önceki raporları desteklediği şeklinde yorumlanmıştır²¹. Aynı araştırmacılar Inno-Lipa ile dizi analizi sonuçları arasındaki uyumun değerlendirilmesi sonucu, 236. kodon mutasyonunu saptamada her iki test arasında %90.5 oranında tam uyum saptamışlar ancak tek zamanlı alınan bir örnekte dizi analizi ile bu mutasyonu gösterirken Inno-Lipa testinde

gösterememişlerdir. Libbrecht ve arkadaşlarının²² çalışmasında ise, 1-3 yıl süreyle LVD alan kronik hepatit B hastalarında Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile ilaç direnci oluşturan mutasyonlar araştırılmış ve sonuçlar dizi analizi verileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Inno-Lipa testi LVD'ye direnç oluşturan primer ve onarıcı mutasyonların yanında ADF direncine neden olan mutasyon gelişiminin de saptanmasında kullanılabilir duyarlı ve özgül bir test olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer bulgu, ADF tedavisi almadığı halde altı hastada ADF direnç mutasyonlarının gösterilmiş olmasıdır²². Dolayısıyla LVD monoterapisi uygulanan hastalarda dahi ADF'ye direnç oluşturan mutasyonların var olabileceği akılda tutulmalı ve ileride LVD başarısızlığı nedeniyle tedavinin değiştirilmesi düşünüldüğünde bu durum göz önüne alınmalıdır. Bizim çalışmamızda ADF tedavisi almadığı halde iki hasta örneğinde dizi analizi ile rtN236T mutasyonu saptanmış ancak Inno-Lipa HBV DRv2 testiyle gösterilememiştir. Ne yazık ki, hastalardan ardışık serum örnekleri alınamadığından tekrar mutasyon analizi yapılamamıştır.

HBV tedavisinin optimizasyonu için, HBV suşlarına replikasyon kapasitesi kazandıran mutasyonlar ortaya çıkmadan önce, en erken dönemde ilaç direncini tespit etmeyi sağlayan duyarlı yöntemlere gereksinim vardır. Genotipik direncin izlenmesi, fenotipik direncin gelişimini önceden tahmin etmek ve doğrulamak, sonuçta yeni tedavi seçeneklerini belirleyebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Genotipik direncin belirlenmesinde kullanılan DNA dizi analizinin en önemli avantajı, henüz direnç mutasyonunun bilinmediği yeni antiviral ilaç alan hastalarda herhangi bir yeni mutasyonu saptayabilmesidir. Bu yöntemin majör dezavantajı ise zaman alıcı olması ve yoğun emek gerektirmesidir. Bu yöntemin aynı zamanda, tüm HBV popülasyonunda %30'dan az oranda görülen minör türleri tespit etmede yetersiz kaldığı da vurgulanmaktadır²³⁻²⁵. Inno-Lipa testi ise viral popülasyonda %5 kadar az oranda ortaya çıkan mutantları da tespit edebilen, özgüllüğü, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek bir test olarak tanımlanmaktadır. Ancak, sadece bilinen mutasyonları saptayabilmesi ve bu nedenle de her yeni antiviral ilaç direnci tanımlandığında güncelleştirilmeye gereksinim duyması, bu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Ayrıca hibridizasyon esaslı çalışmalarda fenotipe etkisi olmayan tek nükleotid polimorfizmlerinin prob bağlanmasını bozabileceği ve yanlış negatif sonuçlar oluşturabileceği belirtilmektedir²³⁻²⁵. Çalışmamızda bu testin hibridizasyon, yıkama ve renk gelişim basamaklarının tümü tam otomatik olarak yapılmış, bu da önemli ölçüde çalışma kolaylığı sağlamıştır. Bunun dışında, sonuçların objektif olarak değerlendirilmesi ve doğru olarak yorumlanması için, bilgisayar destekli bir tarama programının eklenmesiyle test yönteminin standardize edilmesi, veri toplanmasına yardımcı olabilir ve kişisel hataya bağlı olarak gelişebilecek belirsiz ya da negatif sonuçları önleyebilir.

DNA dizi analizi ve Inno-Lipa HBV DRv2/v3 yöntemleri ile HBV'nin antiviral ilaçlara karşı direnç geliştirmesine yol açan mutasyonların araştırıldığı bu çalışmada elde ettiğimiz veriler karşılaştırmalı olarak Tablo I'de sunulmuştur. Uyumsuz sonuçlar irdelendiğinde; 8 numaralı hasta örneğinde dizi analizi ile saptanan YVDD mutasyonuna karşılık Inno-Lipa ile YIDD mutasyonunun tespit edildiği izlenmektedir. Lok ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında, bir hastada YIDD mutasyonunun YVDD'ye dönüşüm gösterdiği ve bu

hastanın aynı zamanda L180M mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir. Dizi analizi ile ADV direncine neden olan N236T mutasyonu saptanan örneklerden birinde Inno-Lipa testi ile LVD direnci oluşturan primer mutasyon (M204V) saptanırken diğerinde ise mutasyon izlenmemiştir (Tablo I). Yine dizi analizi ile LVD mutasyonları saptanan üç örnekte (46, 48 ve 51 no'lu örnekler) Inno-Lipa testi ile mutasyon bulunmazken, Inno Lipa ile M204I mutasyonu izlenen iki örnekte (26 ve 44 no'lu örnekler) dizi analizi ile mutasyon görülmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, ilaç direncine neden olan mutasyon profilleri literatürdeki verilerle benzerlik göstermiştir. Çalışmamızın sınırlamaları arasında, mutasyon analizlerinin her hastadan alınan tek bir serum örneğinde çalışılmış olması ve uyumsuz sonuçların tekrar test edilememiş olmaları bulunmaktadır. DNA dizi analizi ve hibridizasyon testleri antiviral direnç mutasyonlarını yakalamada etkin yöntemlerdir. Ancak hibridizasyon testi sadece tanımlı mutasyonları test ederken, dizi analizi ile mevcut tüm mutasyonlar saptanabilmektedir. Bu nedenle dizi analizi ile farklı LVD mutasyonları ve çoklu LVD mutasyonlarına eşlik eden diğer antiviral ilaç mutasyonlarını saptamak mümkün olmuştur. Antiviral direncin saptanmasında bu testler birbirlerini tamamlayıcıdır ve saptanan mutasyonların klinik yorumunun yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57(1): 167-85.
2. Yıldırım B, Barut S, Bulut Y, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C viruses in the province of Tokat in the Black Sea region of Turkey: a population-based study. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20(1): 27-30.
3. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection, and interpretation. *J Hepatol* 2006; 44(3): 593-606.
4. Yeon JE. Technique for the early detection of drug-resistant HBV DNA during antiviral therapy. *Intervirology* 2008; 51(Suppl 1): 7-10.
5. Bozdayi AM, Uzunalimoğlu Ö, Türkyılmaz AR, et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10(4): 256-65.
6. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl 1): S34-43.
7. Bowden S. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26(2): 97-103.
8. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137(5): 1593-608.
9. Zoulim F, Locarnini S. Optimal management of chronic hepatitis B patients with treatment failure and antiviral drug resistance. *Liver Int* 2013; 33(Suppl 1): 116-24.
10. Pai SB, Bozdayi AM, Rai RB, et al. Emergence of a novel mutation in the FLLA region of hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(7): 2618-24.
11. Sayan M, Akhan SC, Sentürk O. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies. *Hepat Mon* 2011; 11(10): 835-42.
12. Tan YW, Ge GH, Zhao W, et al. YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naive patients: a multi-center study. *Braz J Infect* 2012; 16(3): 250-5.
13. Arslan U, Ural O, Fındık D. YMDD motif variants detected by Inno-Lipa HBV DR assay in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(3): 445-50.

14. Akarsu M, Őengönül 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.
15. Warner N, Locarnini S, Kuiper M, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2285-92.
16. Gallego A, Sheldon J, Garcia-Samaniego J, et al. Evaluation of initial virological response to adefovir and development of adefovir-resistant mutations in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2008; 15(5): 392-8.
17. Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Mohebbi SR, et al. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome. *J Hepatol* 2009; 51(4): 647-54.
18. Shaw T, Locarnini S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2(6): 853-71.
19. Jafri SM, Lok AS. Antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2010; 14(3): 425-38.
20. Sayan M, Hülägü S, Akhan SÇ, Őentürk Ö, Meriç M, Çekmen M. Entecavir resistance in entecavir naive lamivudine treated chronic hepatitis B patients. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 425-32.
21. Osiowy C, Villeneuve JP, Heathcote EJ, Giles E, Borlang J. Detection of rtN236T and rtA181V/T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil in samples from patients with chronic hepatitis B virus infection by the INNO-LiPA HBV DR line Probe Assay (Version 2). *J Clin Microbiol* 2006; 44(6): 1994-7.
22. Libbrecht E, Doutreloigne J, Van De Velde H, et al. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a line probe assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12): 3935-41.
23. Niesters HG, Zoulim F, Pichoud C, et al. Validation of the INNO-LiPA HBV DR Assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1283-9.
24. Lupo J, Larrat S, Hilleret MN, et al. Assessment of selective real-time PCR for quantitation of lamivudine and adefovir hepatitis B virus-resistant strains and comparison with direct sequencing and line probe assays. *J Virol Methods* 2009; 156(1-2): 52-8.
25. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 426-39.
26. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3729-34.