

**Müge ÖZGÜLER<sup>1</sup>**  
**Murat SAYAN<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Elazığ Eğitim Araştırma  
Hastanesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları Kliniği,  
Elazığ, TÜRKİYE<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi Hastanesi,  
Merkez Laboratuvarı PCR  
Ünitesi,  
Kocaeli, TÜRKİYE

## Kronik Hepatit B'de Nükleozid Analogu Kullanımına Bağlı Gelişen Aşı Kaçağı Mutasyonu: Bir Olgu Sunumu

Kronik hepatit B, dünya genelinde 400 milyon kişinin etkilendiği global bir halk sağlığı problemidir. Günümüzde aşının oluşturduğu antikorlardan kaçan ve antikor ya da immün kaçak suşlar olarak tanımlanan hepatit B virüsü (HBV) suşları saptanmaya başlanmıştır. Kronik hepatit B'de tedavi amacı, hastalığın progresyonu ile oluşan ve yılda bir milyon kişinin ölümüne sebep olan dekompanze siroz ve karaciğer kanseri gibi durumların oluşmasını engellemektir. Hepatit B yüzey antijenine karşı gelişen antikor yanıtı, hepatit B virüs enfeksiyonu kontrolü için önemli bir basamaktır. Ancak HBsAg kaybı oluşsa bile, tedaviyle HBV DNA tamamen eradike edilememektedir. Günümüzde HBV tedavisiyle ilgili yayınlanan son rehberlerde, interferonların ve daha potent ilaçların optimal resistans potansiyelleri olduğu, entekavir ve tenofovir disoproksil fumaratın ilk basamak tedavide olması gerektiği vurgulanmıştır. HBV polimeraz (pol) geni bütünüyle zarf (S) geni ile örtüşmektedir. 'pol' geninde meydana gelen nükleoz(t)id analog (NA) direnç mutasyonları beraberinde bu gen ile örtüşen HBsAg'de değişikliklere neden olmaktadır. HBsAg'nin 'a' determinantı koruyucu antikor yanıtı ile tanı ve immünoprofilaksi için önemli bir hedefdir. Antikor ya da immün kaçak suşlar olarak tanımlanan bu suşlarda, S geninin 'a' determinantında 124-149. aminoasit pozisyonunda mutasyon bulunmaktadır. S geni mutasyonu ile HBV yüzey antijeni sentezi ve antikora bağlanması önemli oranda değişmekte, aşıli bireylerin enfeksiyona duyarlı hale gelmesine yol açmaktadır. Bu olguda; tedavi altında olup, tedaviye yanıt alınamayan ve aşı kaçak mutasyonu saptanan bir kronik hepatit B olgusu sunulmuştur. Hastamızda oral antiviral kaynaklı aşı kaçak mutasyonu (T127P, T189I, I195M) olduğu saptanmıştır. Aşı kaçak mutasyonları; Anti HBs pozitifliği olsa dahi hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum, toplumda hepatit B enfeksiyonları için aşıli bireylerinde risk altında olmasına sebep olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik Hepatit B, aşı kaçak mutasyonu, ilaç direnci

### Vaccine Escape Mutation due to Using Nucleos(t)id Analog at Chronic Hepatitis B: A Case Report

Chronic hepatitis B is a global public health problem that affected 400 million people all around the world. Currently, hepatitis B virus (HBV) strains which escape from the antibodies formed by vaccines started to be detected and are defined as 'antibodies or immune leakage strains'. Goal of treatment in chronic hepatitis B is to prevent progression to the formation of decompensated cirrhosis and liver cancer causing a million deaths per year. The developed antibody response against hepatitis B surface antigen, is an important step for hepatitis B virus infection control. But, even there is a HBsAg loss, HBV DNA can not be eradicated completely with treatment. Interferons and more potent drugs with optimal resistance potentials are suggested in recently published guidelines for treatment of HBV and it is emphasized that entecavir and tenofovir disoproxil fumarate should be the first step in treatment. HBV polymerase (pol) gene completely coincides with envelopes (S) gene. Nucleos(t)ide analog (NA) resistance mutations occurring at pol gene cause changes in overlapping HBsAg genes. The 'a' determinant of the HBsAg is an important target for protective antibodies response, diagnosis and immunoprophylaxis. These strains were identified as antibodies or immune leakage strains with a mutation in 124 to 149 amino acid position on the 'a' determinant of the S gene. HBV surface antigen synthesis and binding to the antibody varies significantly with S gene mutation and leads vaccinated individuals to become susceptible to infection. In this article; we report a patient with chronic hepatitis B infection caused by vaccine escape mutation who is under treatment and not responding to treatment. We found to oral antiviral induced anti-HBV vaccine leakage mutation (T127P, T189I, the I195M) in our patient. Although anti-HBs positivity vaccine escape mutations lead to the formation of disease. This condition leads to be a risk for the individual who is vaccinated for hepatitis B infection in the community.

**Key Words** Chronic Hepatitis B, vaccine escape mutation, drug resistance

**Geliş Tarihi** : 03.02.2015  
**Kabul Tarihi** : 06.08.2015

#### Yazışma Adresi Correspondence

**Müge ÖZGÜLER**  
Elazığ Eğitim Araştırma  
Hastanesi, Enfeksiyon  
Hastalıkları Kliniği  
Elazığ - TÜRKİYE**mugeozguler@gmail.com**

#### Giriş

Kronik hepatit B, yol açtığı komplikasyonlar nedeniyle önemini koruyan bir hastalıktır. HBV DNA'nın saptanamayan düzeylerin altında tutulmasıyla hastalık progresyon riski azaltılabilmektedir. HBV DNA'nın supresyonu ile karaciğer fibrozisinin regresyonu ve hatta sirozun geri dönüşü sağlanabilmektedir. Bununla beraber; HBsAg kaybı oluşsa bile tedaviyle HBV DNA tamamen eradike edilememektedir (1). Günümüzde rekombinant interferonlar (konvansiyel ve pegile interferonlar),

nükleoz(t)id analogları (lamivudin, telbivudin, adefovir, entekavir ve tenofovir) gibi birçok ilaç kronik hepatit B tedavisinde kullanılmaktadır. Pegile interferonlar; immün modülatör ilaçlar, nükleoz(t)id analogları viral replikasyonu direkt olarak inhibe eden ilaçlardır (2).

HBV'nin genom organizasyonu nedeniyle polimeraz (*pol*) geni ve zarf (*S*) geni üst üste örtüşmektedir. HBV *pol* geninde, NA direnç mutasyonları hem primer hem de kompensatuvar dirençli mutantların seçilmesine neden olmakta bu durum HBsAg'de yapısal değişikliklere neden olabilmektedir(3). Öte yandan, HBV enfeksiyonunun insidansı, yaygın aşılama programlarından sonra büyük oranda azalma göstermiştir (4-5). Ancak NA tedavileri nedeniyle, aşının oluşturduğu antikordardan kaçan HBV suşları bildirilmektedir (3). Antikor ya da immün kaçak suşlar olarak tanımlanan bu suşlarda, *S* geninin 'a' determinantında 124-149. aminoasit pozisyonunda ve çevresinde meydana gelen mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. Antikor yanıtını oluşturan bu bölgede oluşan mutasyonlar sonucunda hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg), antijenik özelliği değişebilmektedir. Bu durumda anti HBs mutant virüsün nötralizasyonu da başarısız olmaktadır. Daha önce aşıyla olan bireylere bulaş ve ya hastalığın ortaya çıkması gibi durumlar oluşabilmektedir (6).

Bu çalışmada öncesinde pegile interferon tedavisi alıp, relaps sonrası entekavir kullanan ve aşı kaçak mutasyonu saptanan bir olgu sunulmuştur.

### Olgu Sunumu

Kronik hepatit B nedeniyle takip ve tedavi edilen 34 yaşında erkek hasta, halsizlik şikayeti ile kliniğimize başvurdu. Hastanın anamnezinden yaklaşık dört yıl önce HBV DNA  $8.4 \times 10^4$  kopya/mL, ALT normal, HAI: 10, Fibrozis: 2 olduğu ve hastaya pegile interferon alfa 2a tedavisi başlandığı öğrenildi. Tedavinin 24. haftasında HBV DNA:  $1.7 \times 10^7$  kopya/mL olması üzerine tedavisinin kesilerek entekavir 0.5 mg tablet tedavisi başlanıldığı öğrenildi. Yaklaşık üç yıldır bu tedaviyi alan hastanın yapılan kontrollerinde HBV DNA  $3 \times 10^7$  kopya/mL olması üzerine ilaç duyarlılığı değerlendirildi.

HBV genotip/altgenotip tespiti, bilinen tüm primer/kompansatuvar NA dirençli mutasyonları ve *pol* geni ile çakışan *S* geni (HBsAg proteini; 111.-227. aminoasitler arası) mutasyonları aynı anda analiz edildi. Bu amaçla HBV *pol* geni (ters transkriptaz; RT bölgesi, 80.-250. aminoasitler arası) viral popülasyonu sekanslama tekniği ile dizilindi. Hasta serum örneğinden HBV DNA izole edildi ve çoğaltıldı (Anatolia Geneworks, Bosphore® Viral DNA Extraction Spin Kit ve Magnesia® 16 Magnetic Bead Extraction System, İstanbul, Türkiye). HBV *pol* geni amplifikasyonu (742 bp) için forward (F:5'-tcgtgggtgactctctcaatt-3') ve revers (R:5'-cgttgacagacttccaatcaat-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 uygulandı. 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. 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 RT kangalı ile çakışan *S* gen bölgesinde; 121., 135., 137., 139.-149., 151-153., 155-157., 161., 164., 172., 173., 175., 176., 182., 193-196. aminoasit pozisyonları mutasyonlar yönünden analiz edildi.

HBV genotip D/subgenotip D1 olarak tiplendirildi. Klinik önemde NA primer ilaç direnci mutasyonları; *rtL180M*, *rtS202G*, *rtM204V* ve kompensatuvar mutasyon; *rtQ215L/P/Q/R* saptandı. HBsAg proteininde *sI195M* mutasyonu tanımlandı.

Saptanan NA primer ilaç direnci mutasyonları lamivudin (180M+204V), telbivudin (204V) ve entekavir (202G+204V+180M) ilaç direnci olarak değerlendirildi ve hastanın entekavir tedavisi kesilerek tenofovir ile değiştirildi. Hasta bu tedaviyle yakın takip ile izlenmeye başlandı. Tenofovir tedavisinin birinci ayında HBV DNA 2000 IU/mL saptandı. Tedavinin 12. ve 24. haftasında HBV DNA negatifliği saptandı.

### Tartışma

HBsAg'ye karşı gelişen antikor yanıtı, HBV enfeksiyonu kontrolü için önemli bir basamaktır. HBsAg'nin 'a' determinantı ve çevresi koruyucu antikor yanıtı ile tanı ve immünoprofilaksi için önemli bir hedeftir. Ancak bu bölgede gelişebilen bazı mutasyonlar HBsAg kaçış mutantların indüksiyonuna neden olmaktadır. Özellikle kronik hepatit B'nin NA ile tedavileri sırasında antiviral ilişkili potansiyel aşı kaçak mutasyonları (ADAPVEM) bu alanda yeni bir kavram olarak örneklenebilir (7).

HBsAg tipik aşı kaçak mutasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda *S* geni 145. aa pozisyonundaki varyantlar sıklıkla saptanmaktadır (7). Kullanılan oral antivirallere bağlı olarak gelişen *rtM204I/sI195M* ve *rtM204V/sW196S pol/S* gen varyantı kombinasyonlarının HBsAg antijenitesini düşürdüğü ve 145aa pozisyonunun etkilerine benzer sonuçlara yol açtığı bildirilmektedir (8).

Yapılan çalışmalarda, aşılama programından sonra HBV enfeksiyonunun önemli oranda azaldığı saptanmış ancak bazı hasta gruplarında kaçak HBsAg mutantların enfeksiyona neden olduğu vurgulanmıştır. Bu hastalarda, farklı koruyucu önlemlerin alınması gerektiği belirtilmektedir (9, 10).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, NA tedavisi altındaki hastada lamivudin ve adefovir kaynaklı çoklu aşı kaçak mutasyonlarının (sS143T + sD144E + sG145R + sE164D + sI195M) saptandığı belirtilmektedir (3).

Bu olgu, HBV genotip D, subgenotip D1 ile enfekte, HBV *pol* geni RT, kangalında rtL180M + rtS202G + rtM204V primer ilaç direnci ve rtQ215L/P/Q/R kompanse edilebilir mutasyonlar bulunmaktadır. HBsAg proteininde kullanılan NA tedavisine bağlı olarak sI195M (oral antiviral kaynaklı anti-HBV aşı kaçak mutasyonu) mutasyonu gelişmiştir. HBV aşı kaçak mutasyonları toplum sağlığı için ciddi risk oluşturabilir. Bu nedenle

kronik hepatit B'nin NA tedavilerinde antiviral seçiminin özenle yapılması ve HBsAg varyantlarının surveyansı önemli olabilir.

Sonuç olarak; HBV ciddi komplikasyonları olan önemli bir halk sağlığı problemidir. Kronik hepatit B'li hastalarda NA tedavilerine bağlı olarak potansiyel aşı kaçak mutasyonları gelişebilmektedir. Bu durum; toplumda, aşıları olan tüm bireyler için, HBV enfeksiyonu açısından önemli bir risk oluşturabilir. Bu nedenle NA tedavilerine bağlı olarak gelişen potansiyel aşı kaçak mutasyonlarının takip edilmesi ve bildirilmesi yararlı olacaktır.

### Kaynaklar

1. Vallet-Pichard A, Pol S. Hepatitis B virus treatment beyond the guidelines: Special populations and consideration of treatment withdrawal. *Therap Adv Gastroenterol* 2014; 7: 148-155.
2. Caviglia GP, Abate ML, Pellicano R, Smedile A. Chronic hepatitis B therapy: Available drugs and treatment guidelines. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2015; 61: 61-70.
3. Sayan M, Buğdacı MS. HBV vaccine escape mutations in a chronic hepatitis B patient treated with nucleos(t)ide analogues. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47: 544-549.
4. Boccalini S, Pellegrino E, Tiscione E, et al. Sero-epidemiology of hepatitis B markers in the population of Tuscany, Central Italy, 20 years after the implementation of universal vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9: 636-641.
5. Amponsah-Dacosta E, Lebelo RL, Rakgole JN, et al. Evidence for a change in the epidemiology of hepatitis B virus infection after nearly two decades of universal hepatitis B vaccination in South Africa. *J Med Virol* 2014; 86: 918-924.
6. Kaymakoglu S, Baran B, Onel D, et al. Acute hepatitis B due to immune-escape mutations in a naturally immune patient. *Acta Gastroenterol Belg* 2014; 77: 262-265.
7. Golsaz Shirazi F, Amiri MM, Mohammadi H, et al. Construction and expression of hepatitis B surface antigen escape variants within the "a" determinant by site directed mutagenesis. *Iran J Immunol* 2013; 10: 127-138.
8. Zhang M, Ge G, Yang Y, et al. Decreased antigenicity profiles of immune-escaped and drug-resistant hepatitis B surface antigen (HBsAg) double mutants. *Viro J* 2013; 10: 292.
9. Lai MW, Lin TY, Tsao KC, et al. Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination. *Gastroenterology* 2012; 143: 400-407.
10. Lin YM, Jow GM, Mu SC, Chen BF. Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 571875.