

HBV: Tanıda Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Yeri

Doç. Dr. Murat Sayan
Kocaeli Üniv. Tıp Fak. Hast.
Rutin PCR Lab.
e-posta: sayanmurat@hotmail.com
Tel: 0533 6479020



KLİMİK Hepatit Akademisi 2016
21 - 24 Ocak, Hatay.

Virologic and Host Markers with HBV Infection

- 1 Intact Hepatitis B Virion (Dane Particle)
- 2 HBV DNA
- 3 Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg)
- 4 Hepatitis B e Antigen (HBeAg)
- 5 Hepatitis B Core Antigen (HBcAg)
- 6 Total Hepatitis B Core Antibody (Total anti-HBc)
- 7 IgM Hepatitis B Core Antibody (IgM anti-HBc)
- 8 Antibody to Hepatitis B e Antigen (Anti-HBe)
- 9 Antibody to Hepatitis B Surface Antigen (Anti-HBs)

Interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results

Tests	Interpretation
HBsAg (–) Total anti-HBc (–) anti-HBs (–)	Susceptible
HBsAg (–) Total anti-HBc (+) anti-HBs (+)	Immune due to natural infection
HBsAg (–) Total anti-HBc (–) anti-HBs (+)	Immune due to Hepatitis B vaccination
HBsAg (+) Total anti-HBc (+) IgM anti-HBc (+) anti-HB (–)	Acutely infected
HBsAg (+) Total anti-HBc (+) IgM anti-HBc (–) anti-HBs (–)	Chronically infected
HBsAg (–) Total anti-HBc (+) anti-HBs (–)	Interpretation unclear; four possibilities: 1. Resolved infection (most common) 2. False-positive anti-HBc, thus susceptible 3. "Low level" chronic infection 4. Resolving acute infection

Table 3.1: Serological, virological and biochemical profiles of hepatitis B virus

	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	HBV DNA (IU/mL)	ALT
Acute HBV	+	-	+	+	+	+/-	High	↑
Natural HBV immunity (resolved infection)	-	+	+	-	-	+/-	Absent	N
Vaccination	-	+	-	-	-	-	Absent	N
Chronic HBeAg positive								
Immune tolerance phase	+	-	+	-	+	-	>20,000 IU/mL	N
Immune clearance phase	+	-	+	-	+	-/+	>20,000 IU/mL (fluctuating)	↑
Chronic HBeAg negative								
Immune control phase	+	-	+	-	-	+	<2,000 IU/mL*	N
Immune escape phase	+	-	+	-	-	+	>2,000 IU/mL*	↑
Occult HBV	-	-	+	-	-	+/-	Very low	N
Reactivation of HBV	+	-	+	+/-	+	+/-	>20,000 IU/mL	↑
+=positive, -=negative, N=normal, ↑=elevated. * HBV DNA cut-off levels may change in the future.								

10-20% of CHB patients with hepatitis flares also positive for anti-HBc IgM with low index value

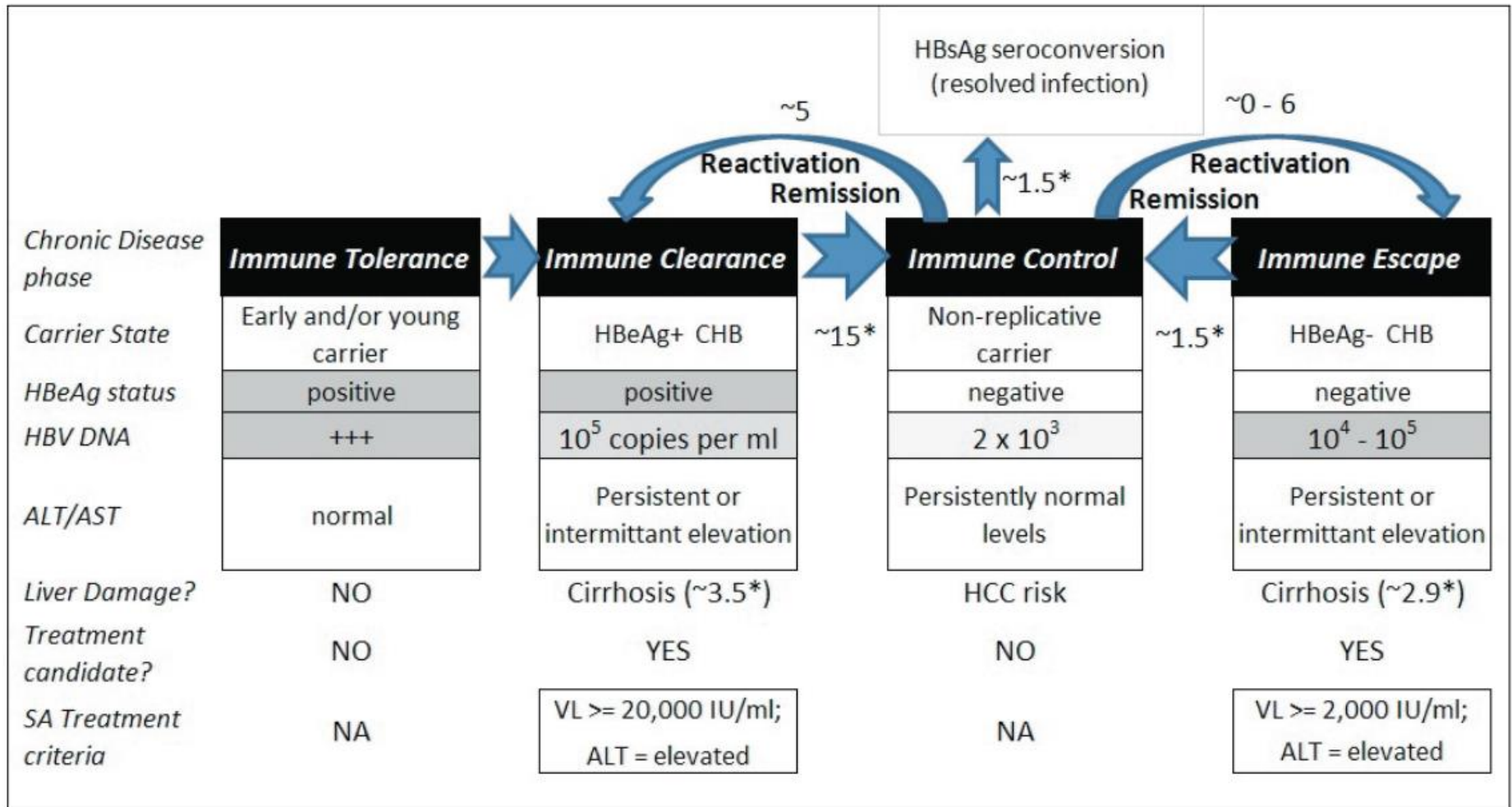
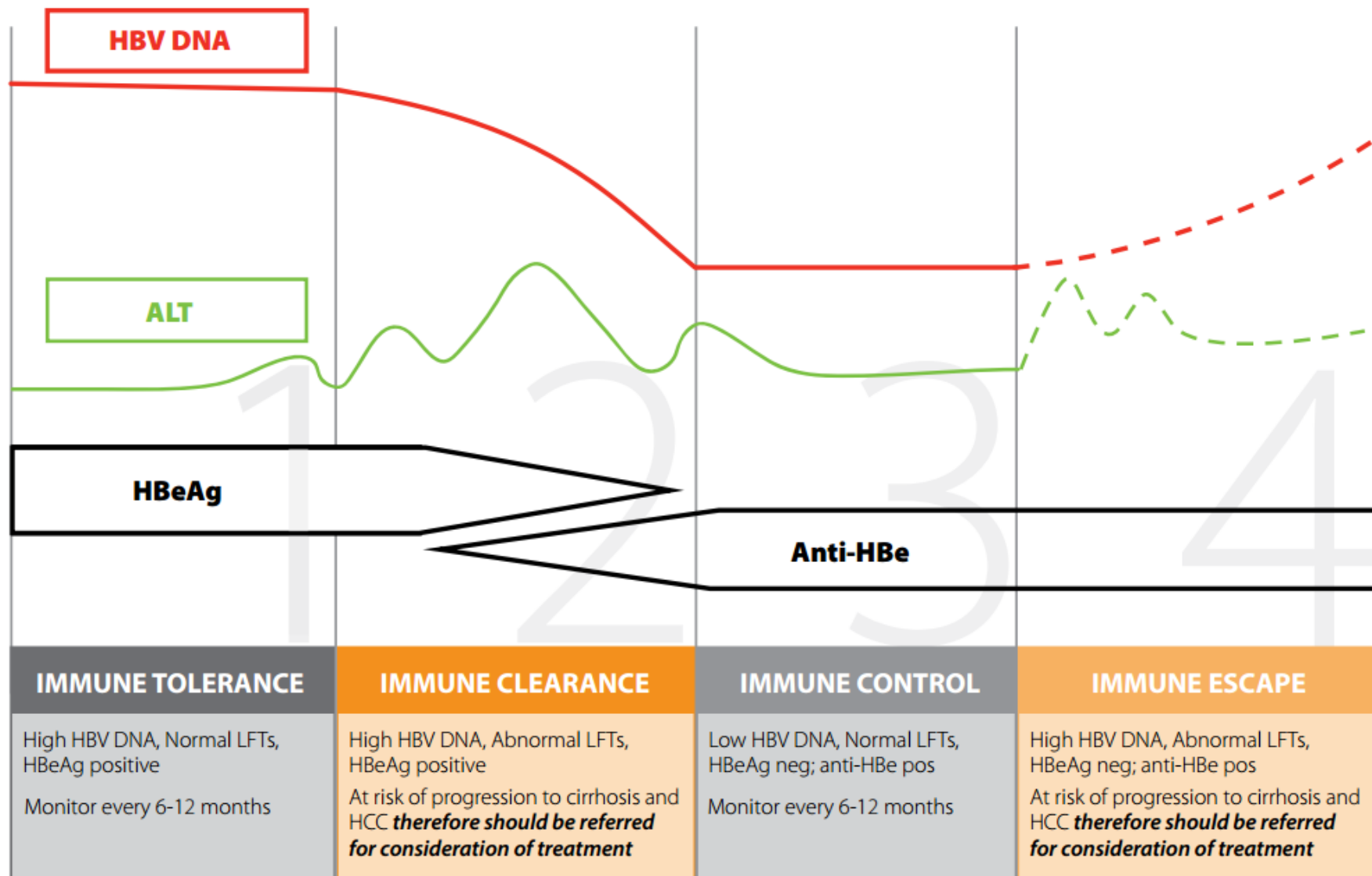


Fig.1. Hepatit B’de kronik taşıyıcılık fazları

Natural History of Chronic HBV: The 4 Phases and Relevance to Treatment Decisions



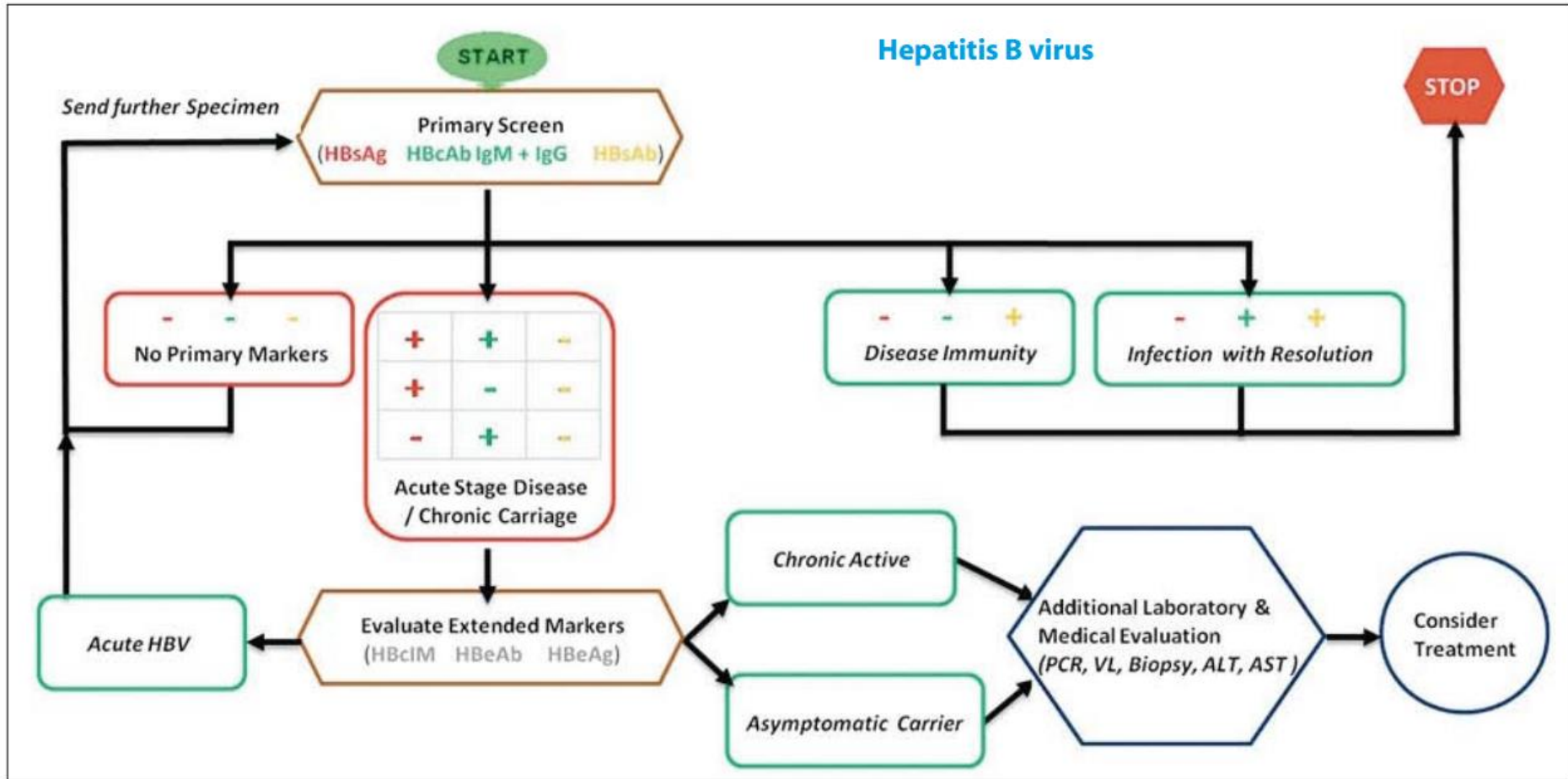


Fig.2. Hepatit B enfeksiyonunda tanısal şema

HBsAg ve antiHBs bir arada pozitif saptanabilmektedir.

- Çoklu HBV enfeksiyonu mu?
- AntiHBs yanıtı gelişemeyen HBV varyantları mı var?
- Antiviral tedavinin viral genoma etkisi mi?
- Hatalı laboratuvar sonucu mu?

Örnek No: 58464083

Çalışma No:

Sakla F1

Onay F2

Yaz F10

Sil F9

Red F11

Hareket F12

Dosya F4

Örnek F4

Kapat

Adı Soyadı: 6191

İns./Yaş: Erkek , KURUM HASTASI, Yatan

vis/Klinik: GASTROENTROLOJİ POLİKLİNİ

Doktor: OMER SENTURK

Tarih: 15.04.14 09:59

Pos:

Eski sonuç:

Zamanla

Tanı: R18.1-Kronik viral

Rutin Biyokimya Açıklaması

Rutin Biyokimya : - 15.04.14 11:51 [SGÜNEY]-RH-

Hormon ve Tümör Belirteçleri : - 15.04.14 12:14 [KK]

Hematolojik Tetkikler : - 15.04.14 10:49 [ŞÇELİK]-R

BARKOD	TESTLER	SONUÇ	NORMAL DEĞER	DURUM	AÇIKLAMA	Cihaz	Alarm
58464083	AST (SGOT)	25	5 - 34 (U/L)	Onaylı		2-C16000	
58464083	ALT (SGPT)	18	0 - 55 (U/L)	Onaylı		2-C16000	
58464083	HBSAG	P-315.11	0	Onaylı		1AXSYM1	
58464083	ANTİ HBS	P-423.22	0	Onaylı		1AXSYM1	
58464083	HBEAG	N-0.494	0	Onaylı		1AXSYM1	
58464083	ANTİ HBE	N-1.02	0	Onaylı		1AXSYM1	
58464083	HBV DNA PCR	NEGATİF(-)	0	Onaylı		Ei ile	
58464083	HBV VİRUS YÜKÜ (IU/mL)	NEGATİF(-)	0	Onaylı		Ei ile	

HBsAg ve antiHBs pozitif hastalarda HBV DNA analiz edilebilir seviyelerde ise çoklu HBV enfeksiyonu ve aşı kaçığı HBsAg varyantları analiz edilebilir.

Örnek No: 59443215 Çalışma No: Sakla F1 Onay F1 Yaz F1 Sil F9 Red^P Hareket^H Dosya Örnek F1 Ka

Adı Soyadı: 113481. ins./Yaş: Kadın, 81 hbsag+, Yatan Eski sonuç: Zamanla

vis/Klinik: GASTROENTROLOJİ POLİKLİNİ Serolojik Tetkikler: - 28.05.14 13:21 [DTEMUROGLU] Serolojik Tetkikler Açıklam

Doktor: EMRULLAH DENG Elisa Tetkikleri: - 26.05.14 14:18 [NCUBUKCU]-RH- S Tıbbi Genetik ve PCR: - SERUM

Tarih: 26.05.14 11:17 Pos:

BARKOD	TESTLER	SONUÇ	NORMAL DEĞER	DURUM	AÇIKLAMA
59443215	ANTI-HDV IGM	0.11	0	Onaylı	
59443215	ANTI HDV TOTAL	0.29	0	Onaylı	
59443215	HBSAG	P-2736.55	0	Onaylı	
59443215	ANTI HBS	P-114.69	0	Onaylı	
59443215	ANTI HBC IGG	P-12.04	0	Onaylı	
59443215	ANTI HBC IGM	N-0.26	0	Onaylı	
59443215	HBEAG	N-0.468	0	Onaylı	
59443215	ANTI HBE	P-0.02	0	Onaylı	
59443215	ANTI HAV IGG	P-12.68	0	Onaylı	
59443215	ANTI HIV	N-0.45	0	Onaylı	
59443215	HBV DNA PCR	POZİTİF(+)	0	ONAYSIZ	
59443215	HBV VIRUS YÜKÜ (IU/ml)	8010	0	ONAYSIZ	

Mutant
HBsAg'yi
yakalama
çabaları
gelişme
göstermektedir.

Table 4. Mutant detection: comparison of ARCHITECT® HBsAg prototype, ARCHITECT® HBsAg Qualitative, and PRISM® HBsAg.

Abbott HBsAg recombinant mutant panel	HBsAg concentration (ng/ml)	ARCHITECT® HBsAg prototype (positive, S/CO ≥ 1)	ARCHITECT® HBsAg Qualitative (positive, S/CO ≥ 1)	PRISM® HBsAg (positive, S/CO ≥ 1)
Wild type	0.123	2.19	1.56	2.24
Q129H	0.107	2.04	1.48	1.86
M133L	0.129	2.06	1.54	2.11
<u>D144A</u>	0.053	1.71	<u>0.75</u>	1.14
G145R	0.200	2.52	2.39	3.57
P142L + G145R	0.214	2.58	2.80	5.17
P142S + G145R	0.217	2.61	2.92	4.80
<u>T123A</u>	0.108	1.89	<u>0.66</u>	<u>Not detected</u>
<u>122NT (insertion)</u>	1.143	3.75	4.48	<u>Not detected</u>
<u>122RA (insertion)</u>	0.500	2.64	2.65	<u>Not detected</u>
Negative control	0	0.21	0.19	0.27

Rutin lab. HBsAg sonucu **S/Co** (sample/cutoff) değerine dayanır.



☐	59378783	HBSAG	✱	P-2488.26	0	Onaylı
☐	59378783	ANTİ HBS	✱	N-8.30	0	Onaylı
☐	59378783	ANTİ HBC IGG		P-11.78	0	Onaylı
☐	59378783	HBEAG	✱	N-0.362	0	Onaylı
☐	59378783	ANTİ HBE	✱	P-0.03	0	Onaylı
☐	59378783	ANTİ HCV	✱	N-0.03	0	Onaylı

Otomatize HBsAg kantitasyon sistemleri;

	Architect QT (Abbott Laboratories)	Elecsys HBsAg II Quant (Roche Diagnostics)
Range (IU/mL) (serumda)	0.05–250	0.05–130
Dilusyon	Manuel 1:999 Sistemde 1:500	Manuel > 1:100 - 1:400 Sistemde 1:100 -1:400
Final range (IU/mL)	0.05–250,000	0.05– 52,000
Metod	Kemiluminesan mikropartikül immunoassay	Elektrokemiluminesan

Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Feb;8(2):185-95. doi: 10.1586/17474124.2014.876362.

Hepatitis B surface antigen quantification in chronic hepatitis B and its clinical utility.

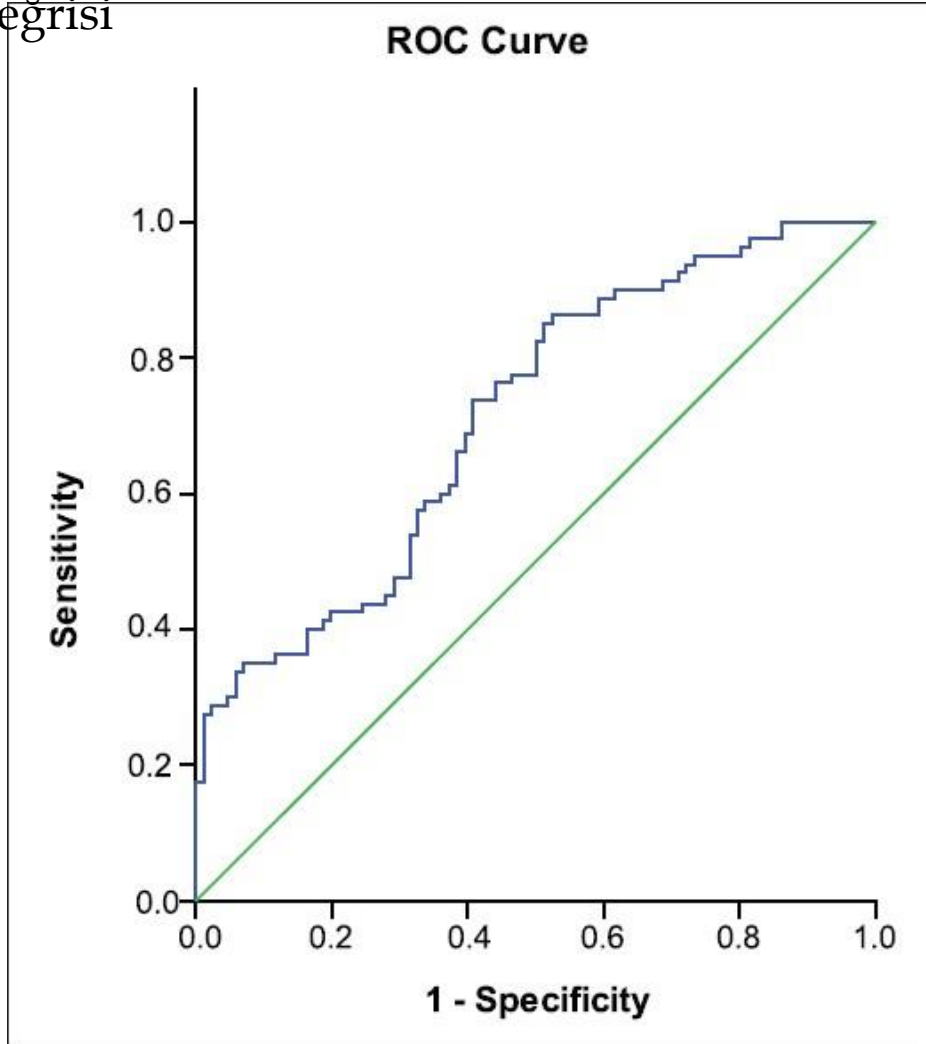
Hadziyannis E¹, Hadziyannis SJ.

Rutin olumsuzluklar;

Kantitatif HBsAg testi iki kat daha maliyetli.

Sağlık Uygulama Tebliği'nde (SUT) kantitatif HBsAg adlı bir parametre bulunmuyor.

HBV DNA yükü >2000 IU/mL olan hastalarda
kantitatif HBsAg ROC (receiver operating characteristics)
eğrisi



ORIGINAL ARTICLE

Year : 2012 | Volume : 30 | Issue : 2 | Page : 150-154

Serum hepatitis B surface antigen levels correlate with high serum HBV DNA levels in patients with chronic hepatitis B: A cross-sectional study

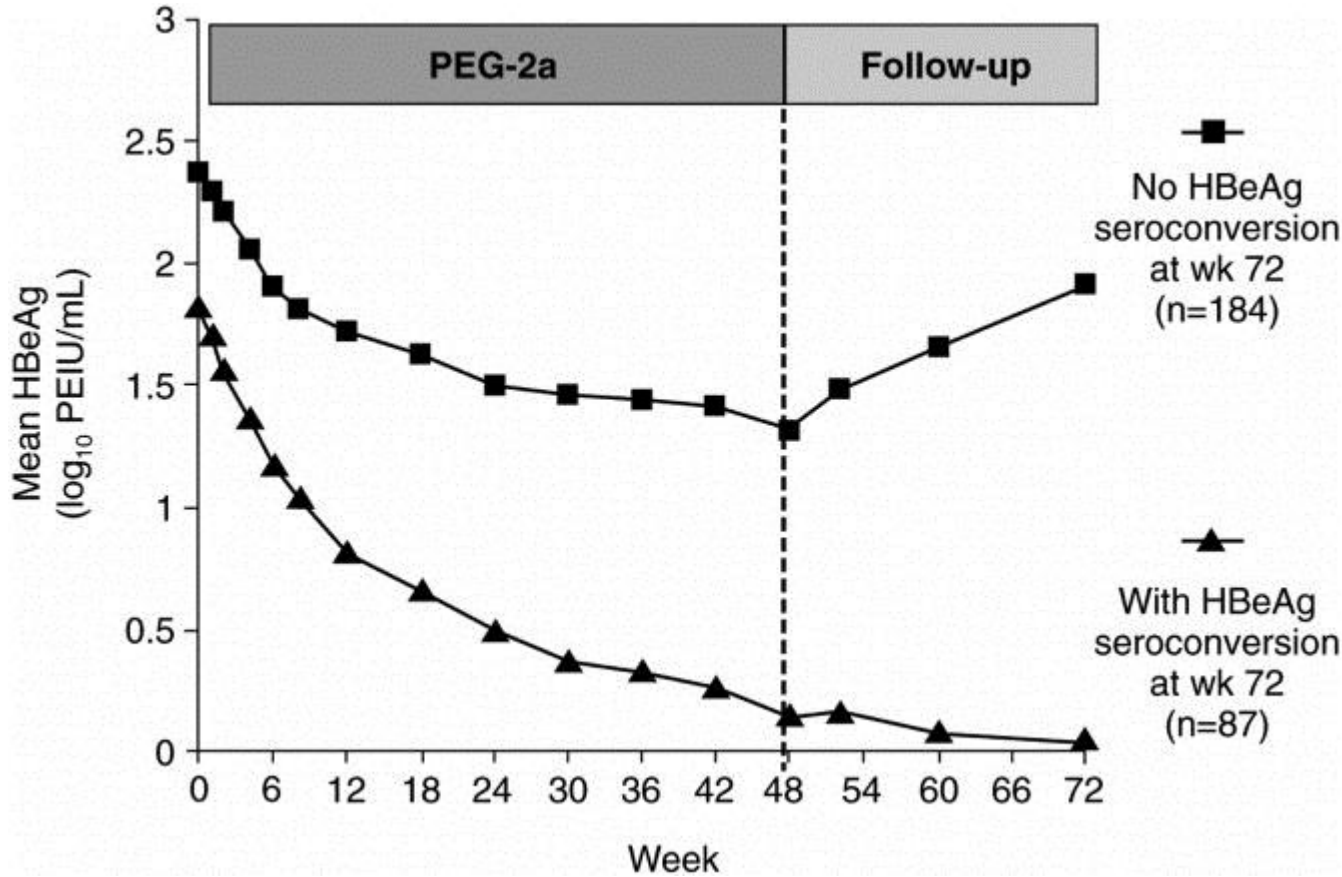
E Gupta¹, A Kumar², A Choudhary¹, M Kumar², SK Sarin²

Unresolved issues and unmet needs

- (1) Improve knowledge and prognosis of the natural history and indications for treatment, particularly in HBeAg-positive immunotolerant patients and HBeAg-negative patients with serum HBV DNA levels below 20,000 IU/ml.
- (2) Assess the role of non-invasive markers (serum and biochemical) for the evaluation of the severity of liver disease and for the follow-up of treated and untreated patients.
- (3) Further clarify the role of serum HBsAg levels in the evaluation of the natural history, prediction of therapeutic responses and treatment individualisation.
- (4) Assess host genetic and viral markers to determine prognosis and optimise patients' management.
- (5) Assess the impact of early diagnosis and early treatment intervention.
- (6) Assess long-term safety and resistance to the current first-line NAs (entecavir and tenofovir).
- (7) Identify markers that predict successful NA discontinuation.

Kantitatif HBeAg testinin tanısal değeri olabilir mi?

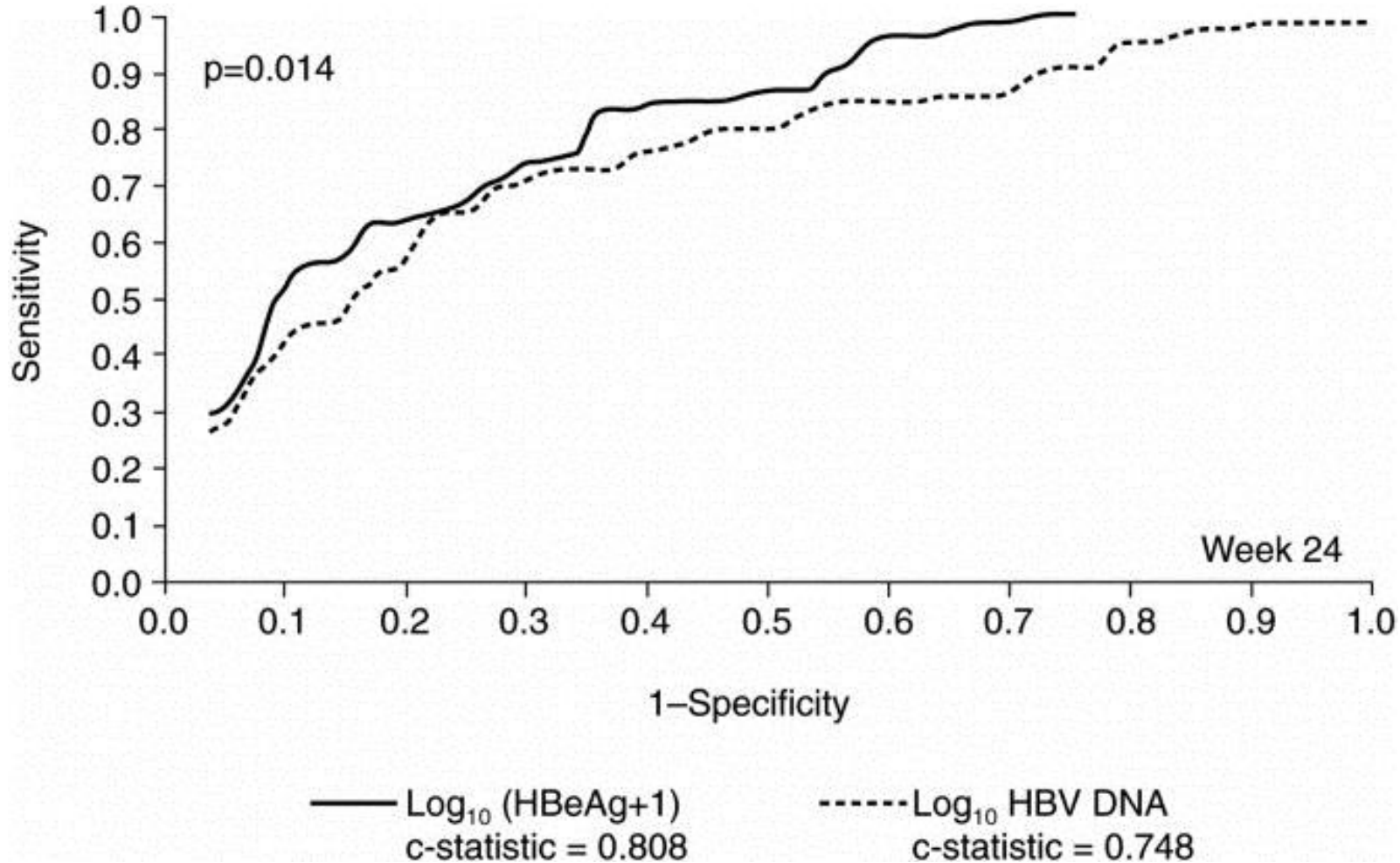
peg-IFN tedavisinde kullanışlı olabileceği düşünülüyor. Ancak daha çok veriye ve standart bir yaklaşıma ihtiyaç var.



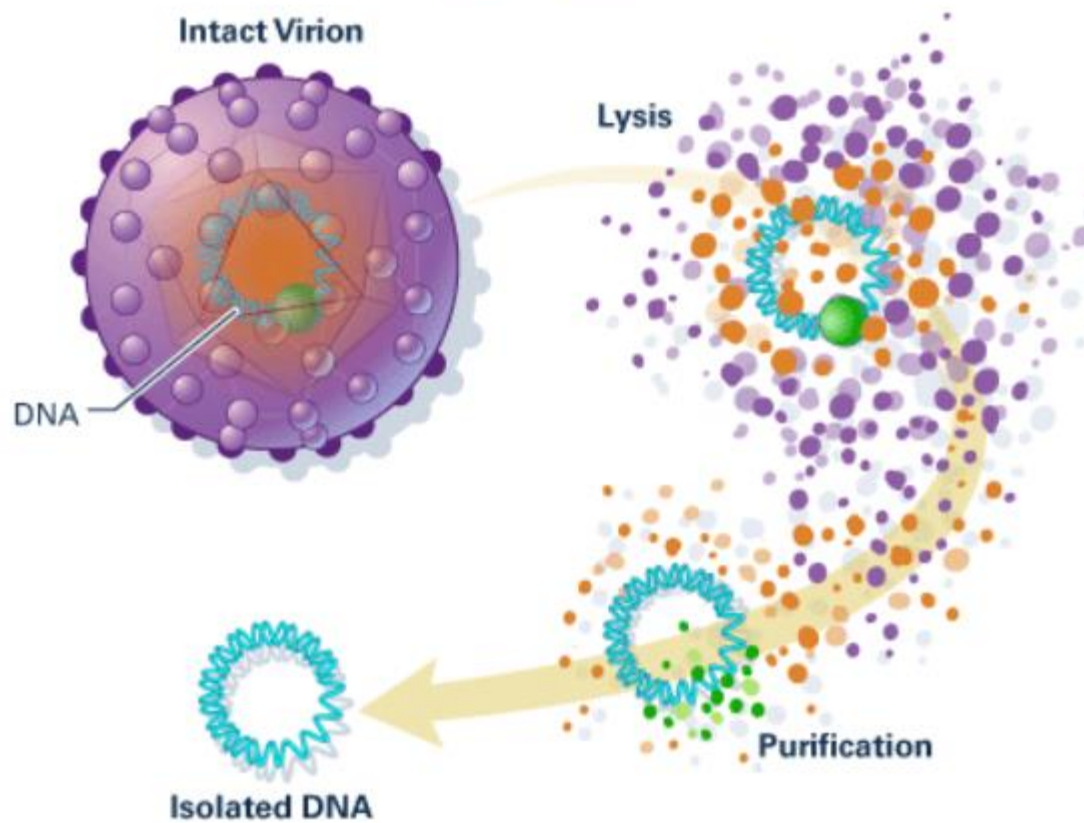
Kantitatif HBeAg - serum HBV DNA karşılaştırmasında ROC analizi:

Bir test ne kadar solda ve yukarda ise tanısal değeri daha yüksektir.

peg-IFN tedavisinde serum HBV DNA ölçümünden daha kullanışlı olabilir.

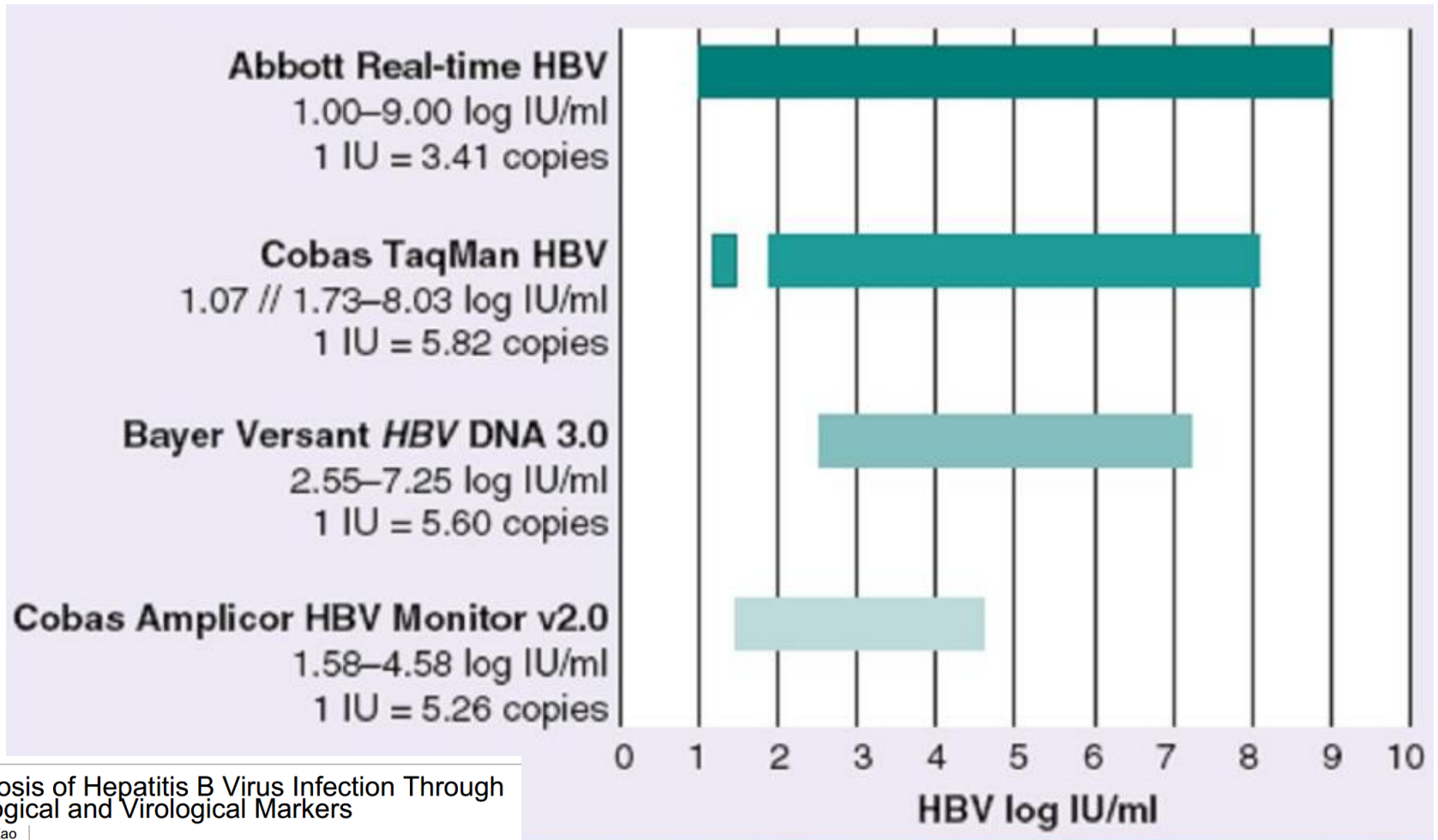


HBV DNA



- WHO göre HBV DNA yükü «IU/ml» olarak verilmelidir. Kopya/ml'ye dönüştürme katsayısı ile çevirebilir.
- NIH göre 100 000 kopya/ml «klinik anlamlı» seviyedir.
- 100 000 IU/ml = 10^5 = 5 log
- <25 - >10⁸ IU/ml sınırlarında lineer analiz, rasyoneldir.

**HBV DNA'da
Kantitasyon sınırlarını
giderek
genişlemektedir.**



Farklı HBV DNA ölçüm değerlerinde dönüştürme nasıl yapılabilir?

Conversion of viral load: from one unit to another³³

Although WHO has recommended that HBV DNA be expressed in terms of IU/ml, a number of different units are used to express the viral load. To convert from IU/mL to copies/mL, IU/mL value should be multiplied by 5.6. Some other equations which would help in conversion from one unit to another are as follows:

$$\begin{aligned}\text{HBV-DNA } 1 \text{ pg/ml} &= 2.83 \times 10^5 \text{ copies/ml} = 5.45 \log_{10} \text{ copies/ml} \\ \text{HBV-DNA } 10^9 \text{ genome Eq/ml} &= 200 \text{ million IU/mL} \\ \text{HBV-DNA } 20000 \text{ IU/mL} &= 10^5 \text{ copies/ml} = 0.35 \text{ pg/mL}\end{aligned}$$

Tedavi takibinde, her HBV DNA artışı tedavi başarısızlığı değildir. Viral kinetiğin etkisi HBV’de çok belirgindir.

Hasta No: 746004	735631	Bu hastada bakılan testler:	Göster	Yazdır	Kapat
Adı: A. [REDACTED]		HBV VİRUS YÜKÜ (IU/ml)	☐ Grafik		
Soyadı: E. [REDACTED] AR		Doğum Tarihi: 10.01.1983	☒ Veri		
Test Adedi: 8	Ortalama: 1349.25	Yeniden Hesapla	Ölçek		
Normal Değer:	Standart Sapma: 1442.41	☒ Değerleri göster	☒ Standart		
	CV %: 106.90		☐ Otomatik		
ÖRNEK NO	MATERYAL	TARİH	SONUÇ	BİRİM	
58266457	SERUM	07.04.2014 11:14:16	46		09.04.14 08:57:58
51710752	SERUM	27.06.2013 09:04:24	38		17.07.13 15:09:41
46181997	SERUM	07.11.2012 10:08:28	NEGATİF (-)		14.11.12 08:23:46
40817615	SERUM	28.02.2012 10:13:37	NEGATİF (-)		06.03.12 13:36:26
40588205	SERUM	17.02.2012 10:31:24	NEGATİF (-)		22.02.12 10:14:53
38795754	SERUM	25.11.2011 10:29:56	<30		29.11.11 10:06:40
31216353	SERUM	11.11.2010 14:12:00	7540		22.11.10 11:10:40
27682772	SERUM	12.05.2010 11:20:52	3170		14.05.10 09:54:36

Hasta No: 108327

328353

Bu hastada bakılan testler:

HBV VİRUS YÜKÜ (IU/ml)

Göster

☐ Grafik☒ Veri

Yazdır



Kapat

Adı: ~~REZİT~~Soyadı: ~~REZİT~~

Doğum Tarihi: 01.07.1937

Test Adedi: 16

Ortalama: 8298.50

Standart Sapma: 8570.65

CV %: 103.28

Yeniden Hesapla

Ölçek

☒ Standart☐ Otomatik☒ Değerleri göster

Normal Değer:

ÖRNEK NO	MATERYAL	TARİH	SONUÇ BİRİM	
58674520	SERUM	22.04.2014 14:54:44	NEGATİF (-)	02.05.14 11:21:43
56267016	SERUM	17.01.2014 08:51:19	NEGATİF (-)	29.01.14 16:18:38
53998507	SERUM	10.10.2013 10:13:12	<30	25.10.13 11:10:50
52117473	SERUM	16.07.2013 09:09:55	NEGATİF (-)	18.07.13 13:59:03
47934296	SERUM	22.01.2013 10:42:51	NEGATİF (-)	31.01.13 11:38:15
45842555	SERUM	19.10.2012 10:24:35	NEGATİF (-)	02.11.12 14:04:26
44040519	SERUM	24.07.2012 10:00:36	NEGATİF (-)	27.07.12 12:42:28
42089186	SERUM	25.04.2012 10:16:24	NEGATİF (-)	27.04.12 13:42:56
40145737	SERUM	26.01.2012 10:50:56	NEGATİF (-)	02.02.12 15:31:49
37563087	SERUM	26.09.2011 09:13:49	NEGATİF (-)	29.09.11 09:24:24
33719430	SERUM	16.03.2011 11:52:18	<30	21.03.11 10:12:57
31953609	SERUM	22.12.2010 10:13:06	<20	24.12.10 13:56:26
30250023	SERUM	27.09.2010 09:49:53	<20	01.10.10 10:14:36
28545035	SERUM	24.06.2010 10:08:07	47	28.06.10 15:06:51
27431179	SERUM	29.04.2010 11:24:02	729	03.05.10 10:15:21
24425976	SERUM	01.12.2009 09:52:50	132000	03.12.09 10:08:21

Ham analiz sonucu kliniğe gönderilmemelidir.

Örnek No: 58772286 Çalışma No: Sakla F1 Onay F1 Yaz F1 Sil F9 Red F1 Hareket F1 Dosya Örnek F1 Kapat

Adı Soyadı: 5391. ins./Yaş: Kadın KURUM HASTASI, Yatan Eski sonuç: Zamanla

vis/Klinik ENFEKSİYON HASTALIKLARI P Rutin Biyokimya : - 28.04.14 12:14 [GBEKTAS]-RH Rutin Biyokimya Açıklaması

Doktor: EMEL AZAK KARA Hormon ve Tümör Belirteçleri : - 28.04.14 12:18 [G Hematolojik Tetkikler: - 28.04.14 11:15 [SÇELİK]-R

Tarih: 28.04.14 09:39 Pos:

BARKOD	TESTLER	SONUÇ	NORMAL DEĞER	DURUM	AÇIKLAMA	Cihaz
58772286	GLUKOZ(AKS)	95	70 - 105 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58772286	ÜREA	24	15 - 55 (mg/dl)	Onaylı		
58772286	BUN	11.0	7 - 25.7 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58772286	KREATİNİN	0.62	0.6 - 1.3 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58772286	CKD-EPI	122.7	. - . (mL/dk/1.73m²)	Onaylı		
58772286	MDRD	114.6	. - . (mL/dk/1.73m²)	Onaylı		
58772286	BUN / KREATİNİN ORANI	17.74	12 - 20 ()	Onaylı		
58772286	TOTAL BİLİRUBİN	0.30	0.2 - 1.2 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58772286	DİREKT BİLİRUBİN	0.20	0.0 - 0.50 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58772286	İNDİREKT BİLİRUBİN	0.10	0.2 - 0.8 ()	Onaylı		
58772286	AST (SGOT)	18	5 - 34 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58772286	ALT (SGPT)	22	0 - 55 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58772286	GGT	18	9 - 64 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58772286	LDH	191	125 - 220 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58772286	HBSAG	P-3457.38	0	Onaylı		1AXSYM1
58772286	ANTİ HBS	N-0.01	0	Onaylı		1AXSYM1
58772286	HBEAG	N-0.334	0	Onaylı		1AXSYM1
58772286	ANTİ HBE	P-0.02	0	Onaylı		1AXSYM1
58772286	HBV DNA PCR	POZİTİF(+)	0	ONAYSIZ		El ile
58772286	HBV VIRUS YÜKÜ (IU/ml)	<30	0	ONAYSIZ	14	El ile

Örnek No: 58936171

Çalışma No:

Sakla F5

Onay F5

Yaz F10

Sil F9

Red^P

Hareket^H

Dosya

Örnek F5

Kapat

Adı Soyadı: 8325

ins./Yaş: Erkek

KURUM HASTASI, Yatan

Eski sonuçlu

Zamanla

Tanı: B18.1-Kronik viral

vis/Klinik: ENFEKSİYON HASTALIKLARI P

Doktor: MELİHA MERİC KC

Tarih: 05.05.14 10:41

Pos:

Rutin Biyokimya : - 05.05.14 15:16 [SGÜNEY]-RH-

Hormon ve Tümör Belirteçleri : - 05.05.14 15:43 [M.

Hematolojik Tetkikler: - 05.05.14 11:48 [ŞÇELİK]-R

Rutin Biyokimya Açıklaması

BARKOD	TESTLER	SONUÇ	NORMAL DEĞER	DURUM	AÇIKLAMA	Cihaz
58936171	GLUKOZ(AKS)	86	70 - 105 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58936171	ÜREA	28	15 - 55 (mg/dl)	Onaylı		
58936171	BUN	13.0	7 - 25.7 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58936171	KREATİNİN	0.97	0.6 - 1.3 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58936171	CKD-EPI	61.1	- - (mL/dk/1.73m²)	Onaylı		
58936171	MDRD	58.0	- - (mL/dk/1.73m²)	Onaylı		
58936171	BUN / KREATİNİN ORANI	13.40	12 - 20 ()	Onaylı		
58936171	TOTAL BİLİRUBİN	0.90	0.2 - 1.2 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58936171	DİREKT BİLİRUBİN	0.40	0.0 - 0.50 (mg/dL)	Onaylı		1-C16000
58936171	İNDİREKT BİLİRUBİN	0.50	0.2 - 0.8 ()	Onaylı		
58936171	AST (SGOT)	28	5 - 34 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58936171	ALT (SGPT)	31	0 - 55 (U/L)	Onaylı		1-C16000
58936171	HBV DNA PCR	POZİTİF(+)	()	ONAYSIZ		El ile
58936171	HBV VIRUS YÜKÜ (IU/ml)	<30	()	ONAYSIZ	1	El ile

Chronic Hepatitis B

Approved drugs

Interferons



- Conventional IFN- α
- Peg-IFN α -2a (*Pegasys*)

Combined antiviral and immunomodulatory effect

Nucleoside/nucleotide analogues

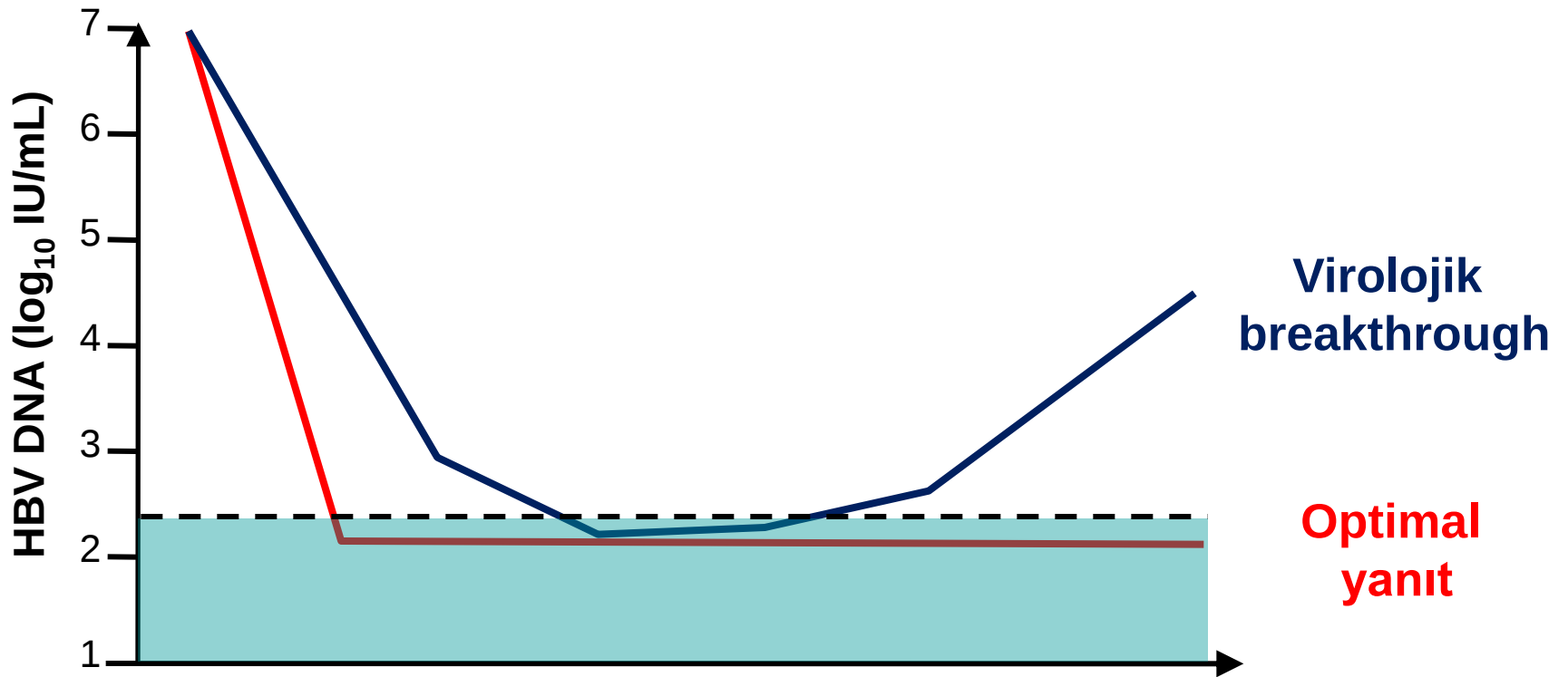


- Lamivudine (*Zeffix*)
- Adefovir (*Hepsera*)
- Entecavir (*Baraclude*)
- Telbivudine (*Sebivo*)
- Tenofovir (*Viread*)

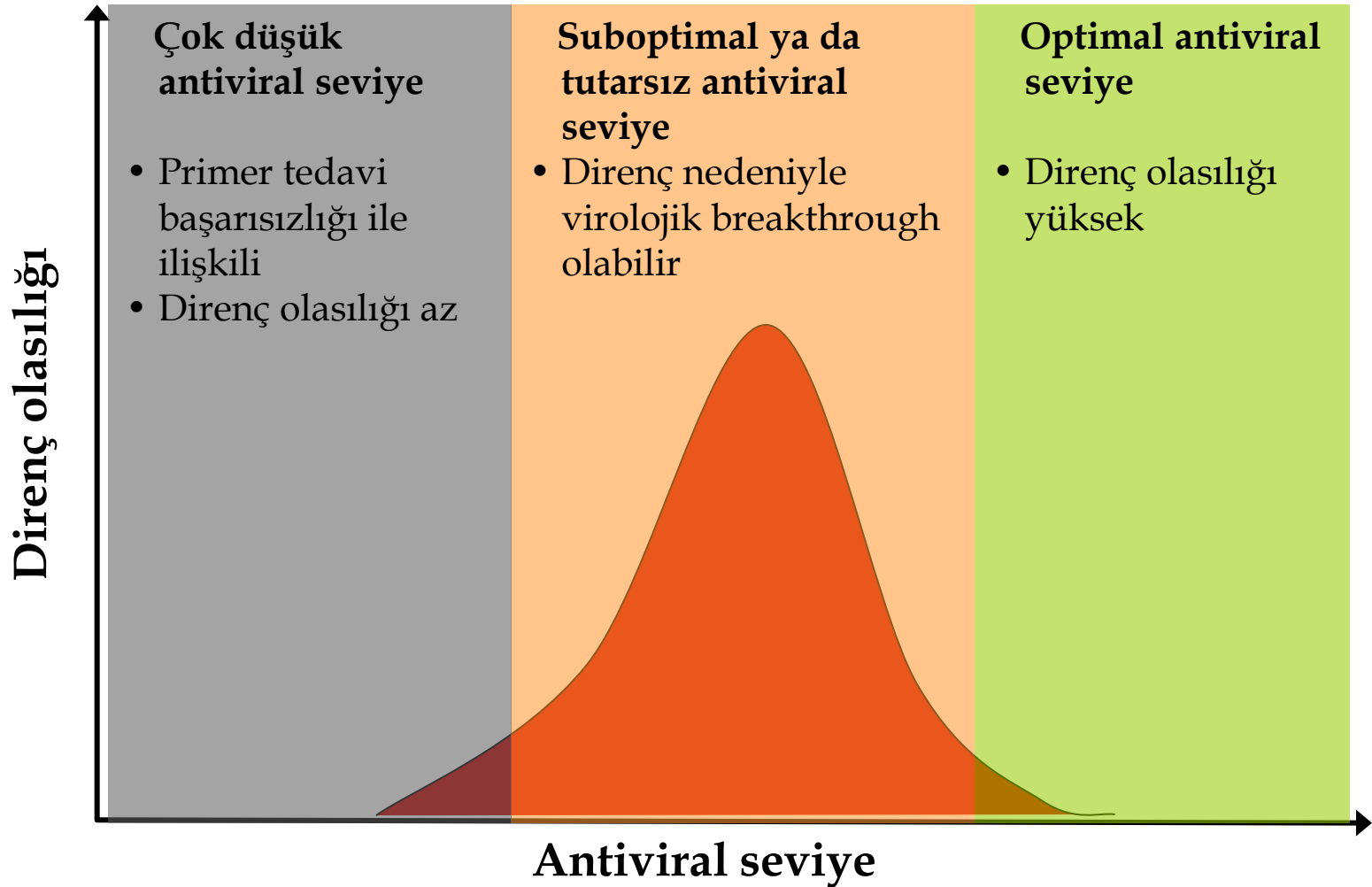
Direct antiviral effect

Virolojik breakthrough: direnç mi?

Breakthrough: dip seviyeye göre HBV DNA'nın serumda $\geq 1 \log_{10}$ artışı
(1 ay arayla iki kez)



Suboptimal yanıt ve antiviral seviye



Genotipik direnç türleri

HBV polimeraz
geninde nükleoz(t)id
analoglarının hedef
bölgesinde;

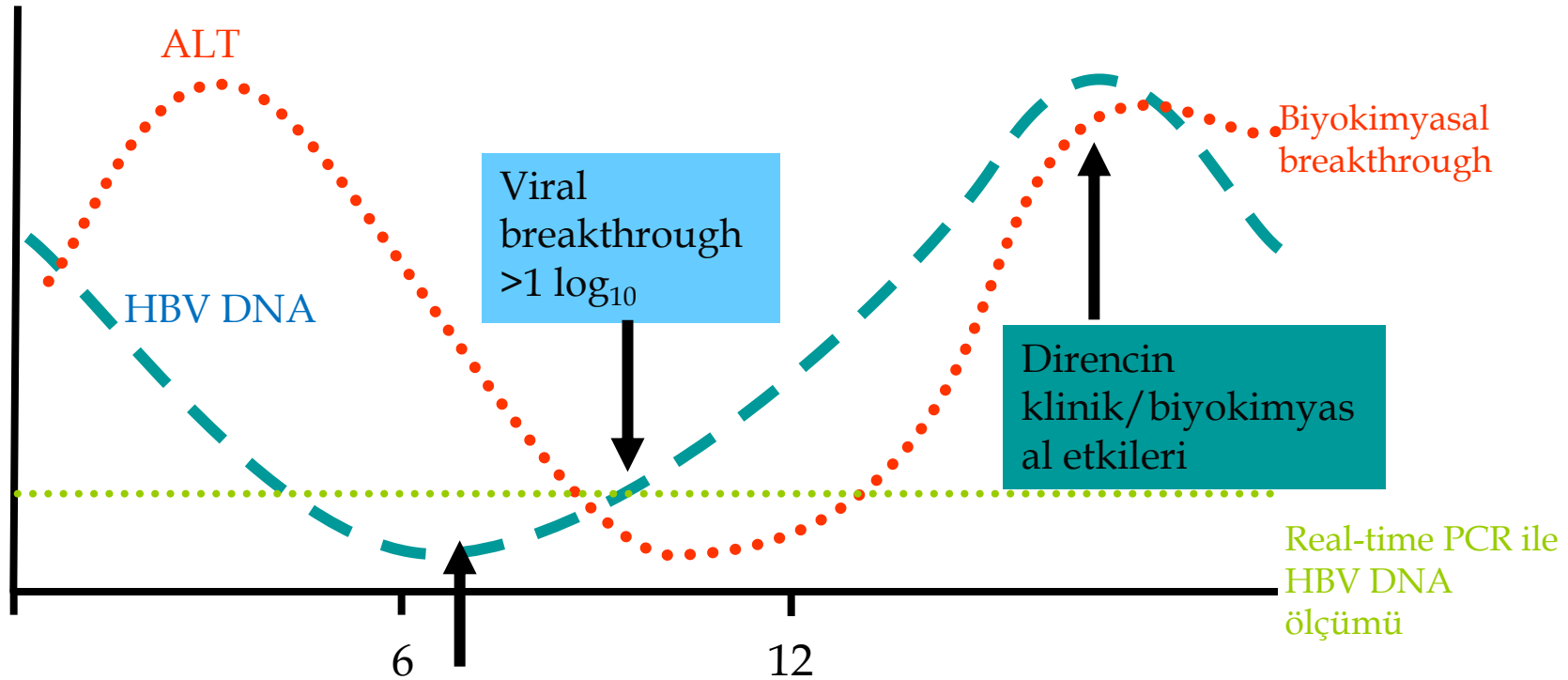
Primer ilaç direnci mutasyonları

HBV pol geni üzerinde antiviral ajana duyarlılığı azaltan a.a. değişiklikleridir

Sekonder - kompansatuar mutasyonlar

Viral fitnessi 'viral polimeraz aktivitesini' düzelterken, HBV'nin replikasyon kapasitesini onaran a.a. değişiklikleridir

İlaç direncinin tanısı



Direncin tanımlanması

LiPA	+	+	+
RLFP	+	+	+
Populasyon sekanslama	-	+	+

Table 3. Characteristics of genotypic resistance mutations to the nucleos(t)ide analogues in the treatment-naïve hemodialysis patients

Mutation characteristic	Mutation pattern	Nucleos(t)ide analogue	Patient no. (%)
Primary resistance mutation	rtA181G/L/S/T	LAM, LdT, L-FMAU, ADV, TDF (PR)	5 (5.5)
	rtT184I/K/S	ETV (PR)	2 (2.2)
	rt194S/X/T	TDF (PR)	3 (3)
	rtS202N/R/T	ETV (PR)	3 (3)
	rtM204I/L/K/V ± rtV173L ± rtL180M	LAM, LdT, L-FMAU, FTC	10 (10.5)
	rtM204I/V + rtT184K/S	LAM, LdT, ETV	2 (2.2)
	rtI233V	ADV	1 (1)
	rtM250I/R	ETV (PR)	2 (2.2)
Total			28 (30)
Compensatory mutation	rtQ149K	ADV	14 (15)
	rtL180V/R	LAM, L-FMAU, FTC, TDF	2 (2.2)
	rtV214A	LAM, L-FMAU, ADV, TDF	9 (10)
	rtQ215H/P/S	LAM, L-FMAU, ADV, TDF	19 (20)
	rtN238D/T	ADV	5 (5)
Total			49 (52)

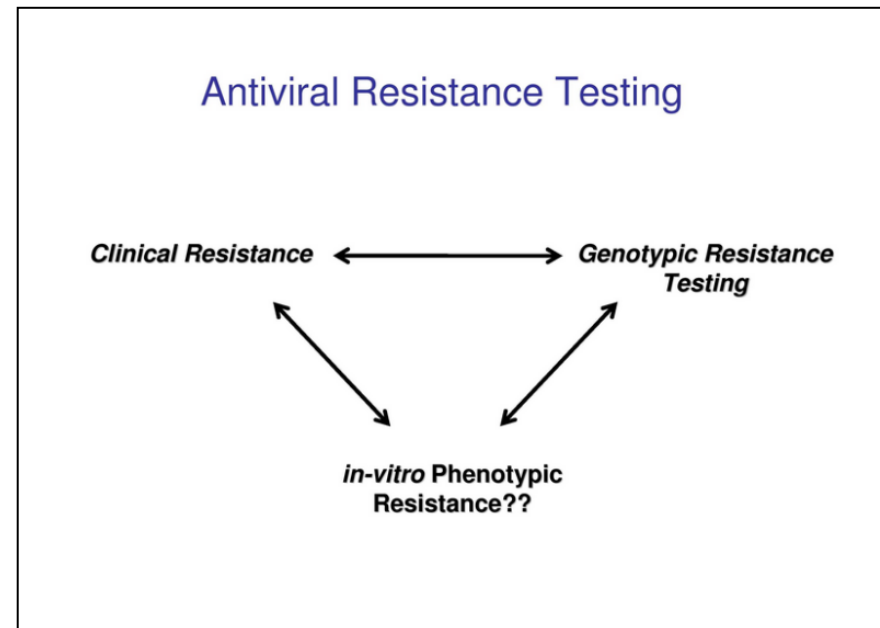
Antiviral direncin analizi

Genotipik yöntemler

- **Viral populasyonun sekanslanması**
- Yeni nesil sekanslama
 - PCR ürünlerinin sekanslanması
 - Klonlanmış varyantların sekanslanması
- Line probe assay (LiPA)
- RFLP
- Real-Time PCR
- Matrix-assisted laser desorption/ionisation-Time of light Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Fenotipik Yöntemler

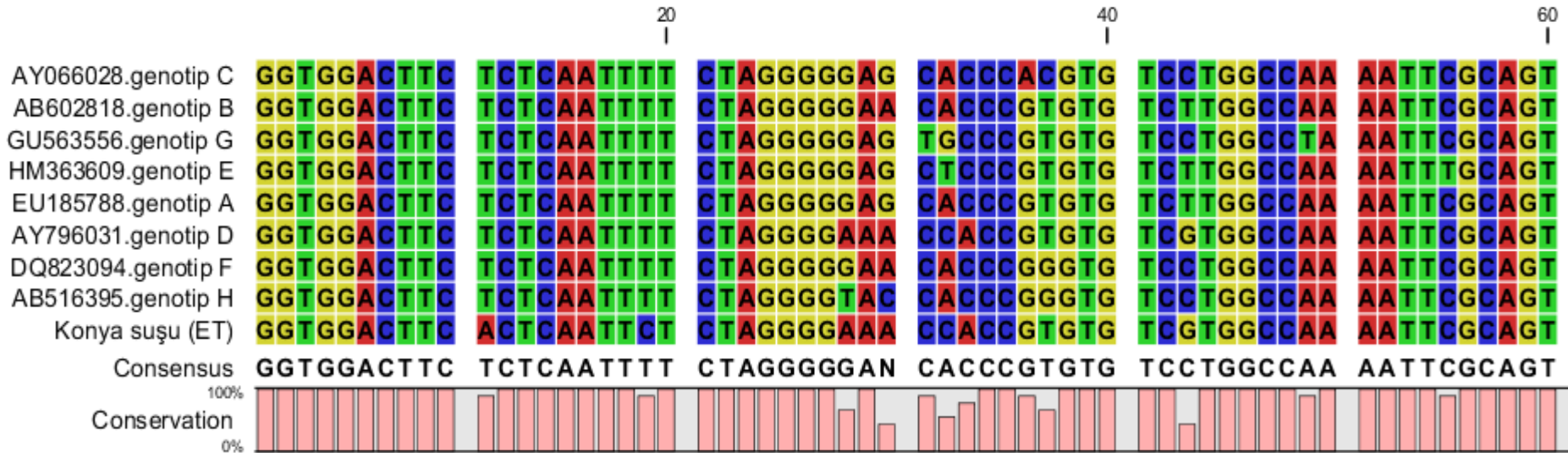
- Hayvan hepadnavirus modelleri
- Transfeksiyon temelli modeller
- Hücreden yoksun enzim deneyleri



Direkt Sekanslama

Kendi rutinimizde HBV *pol*/RT geninde, yaklaşık >700 bp bir bölgeyi sekanslıyoruz.

- Hedef DNA hakkında doğru ve geniş bir data sağlar
- Bilinen/bilinmeyen mutasyonları analiz etmek mümkündür.
- Az miktardaki dirençli varyantları saptamada başarılı değil.
- Zaman alıcı ve iş yoğunluklu bir yöntemdir.



Sequence Information			
Identifier:	Abant İzzet Baysal, F.K.		
Genotype:	D		
Dual Infection:	No indication of dual infection was found (100% confidence)		
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 94.98%)		
Included <i>RT</i> domain codons:	82 - 226 (similarity to reference = 92.41%)		
Included <i>SHB</i> protein codons:	74 - 218 (similarity to reference = 94.48%)		
Mutations <i>RT</i> domain:	H124Y, Y135S, L180M, S202G, M204V, F221Y, T222Y, A223R, V224L, T225L, N226P		
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, I195M, L213I, P214T, L215A, L216C, P217Y, I218P		
Escape mutations <i>SHB</i> protein:	I195M (LAM ve LdT ile ilişkili potansiyel aşı kaçığı mutasyonu)		
Drug Resistance			
Drug	Scored mutations	Resistance analysis	
Lamivudine, Zeffix®	180M,204V	resistant	
Adefovir, Hepsera®	none	susceptible	
Entecavir, Baraclude®	202G,204V,180M	resistant	
Tenofovir DF	none	susceptible	
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	204V	resistant	

Yeni nesil sekanslama; **pyrosekanslama**

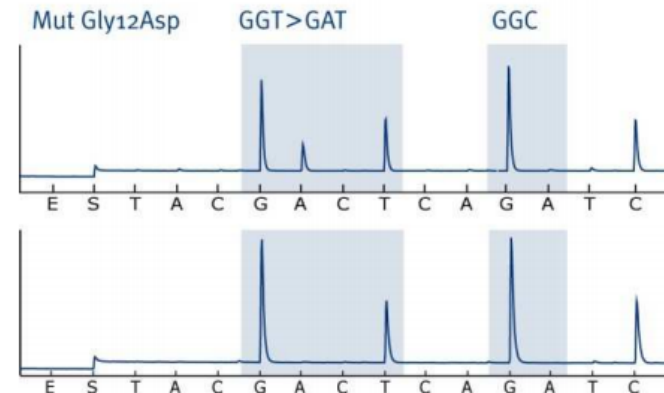
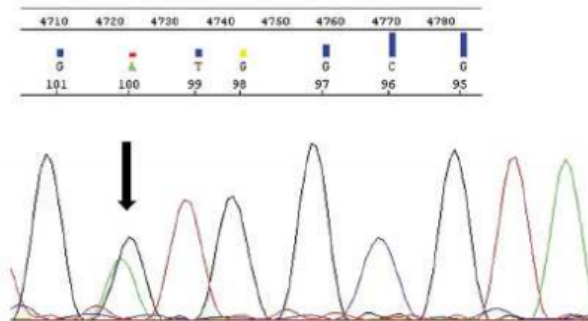


Sample & Assay Technologies

Pyrosequencing at a glance

Traditional Sequencing vs Pyrosequencing

	Traditional Sequencing	PyroMark Pyrosequencing
Application	Whole genome sequencing Research for unknown genes Sequencing of long stretches of DNA	Detection of short sequences of DNA for ■ SNP (Mutation) Analysis ■ Methylation Analysis ■ Microbial Identification
Starting material	Unknown sequences	Known sequences (but with unknown mutations)
Regulatory	No standardized system	Commercial available kits
Time	6 h up to several days	~ 30 – 60min

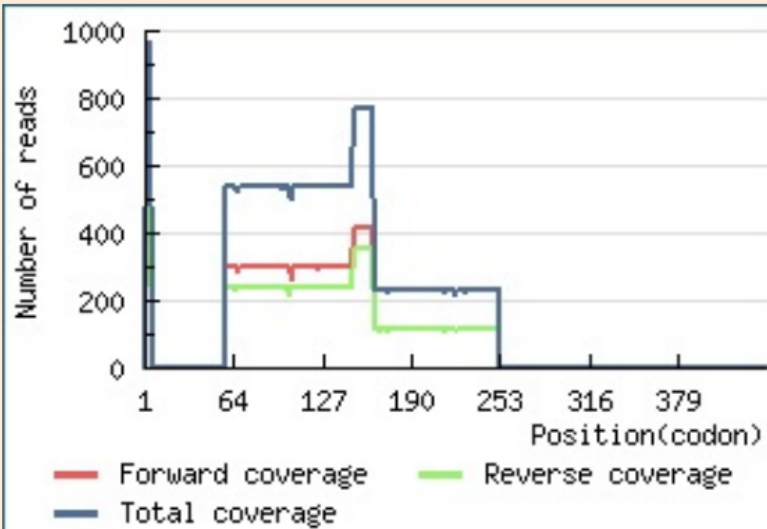


Yeni nesil sekanslama; **ultra deep sekanslama**

DeepChek®-HIV NGS Expert System

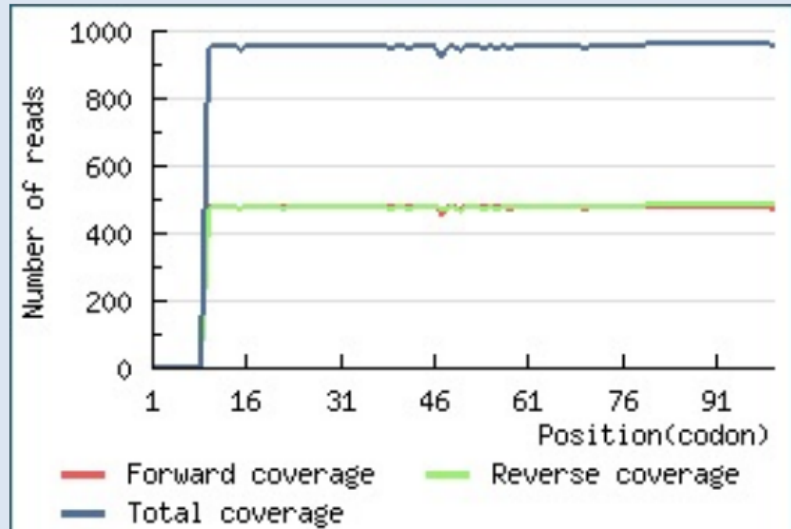
Coverage

Reverse Transcriptase



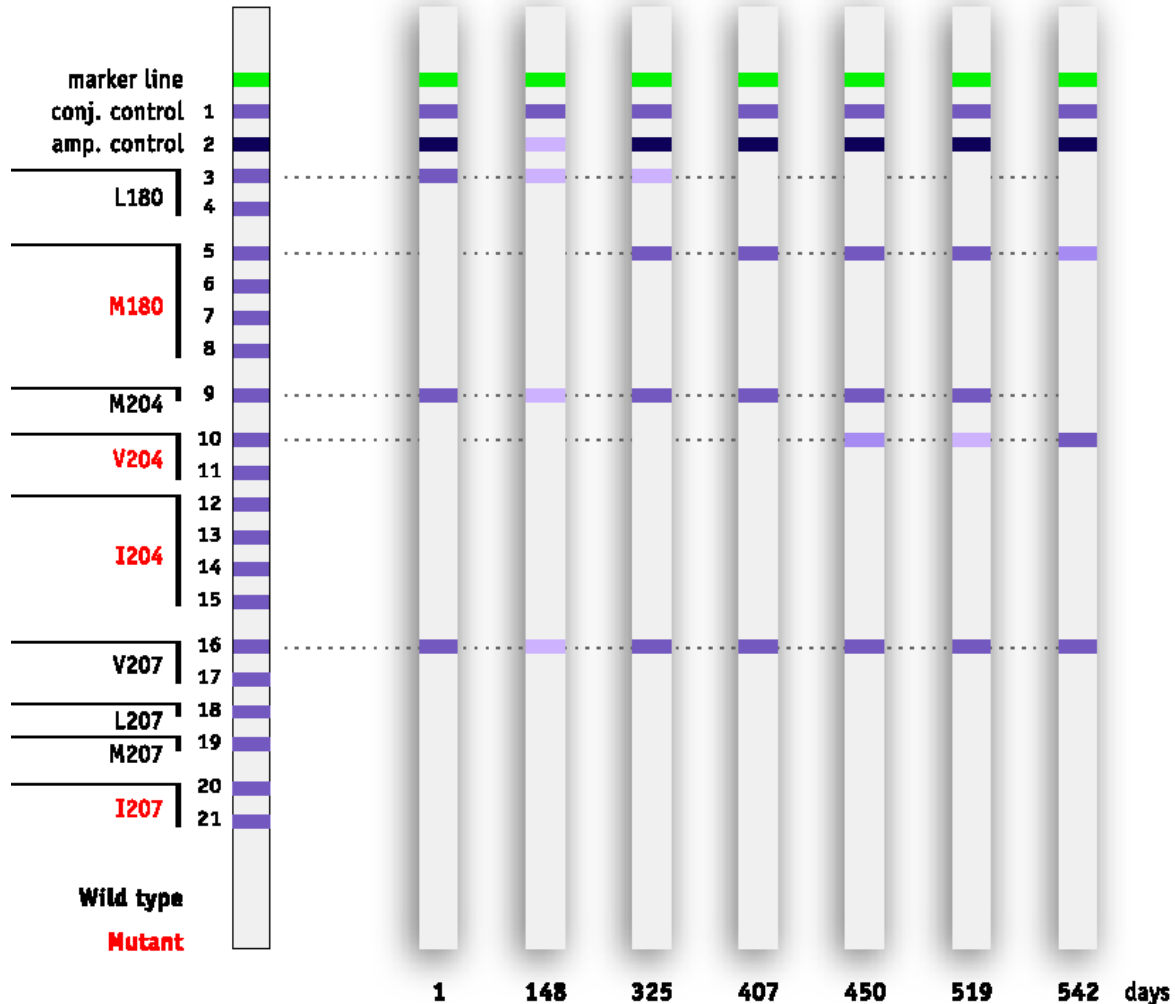
Threshold	Minimum number of required sequences	Low covered position
20%	25	
5%	100	
1%	500	163-251

Protease

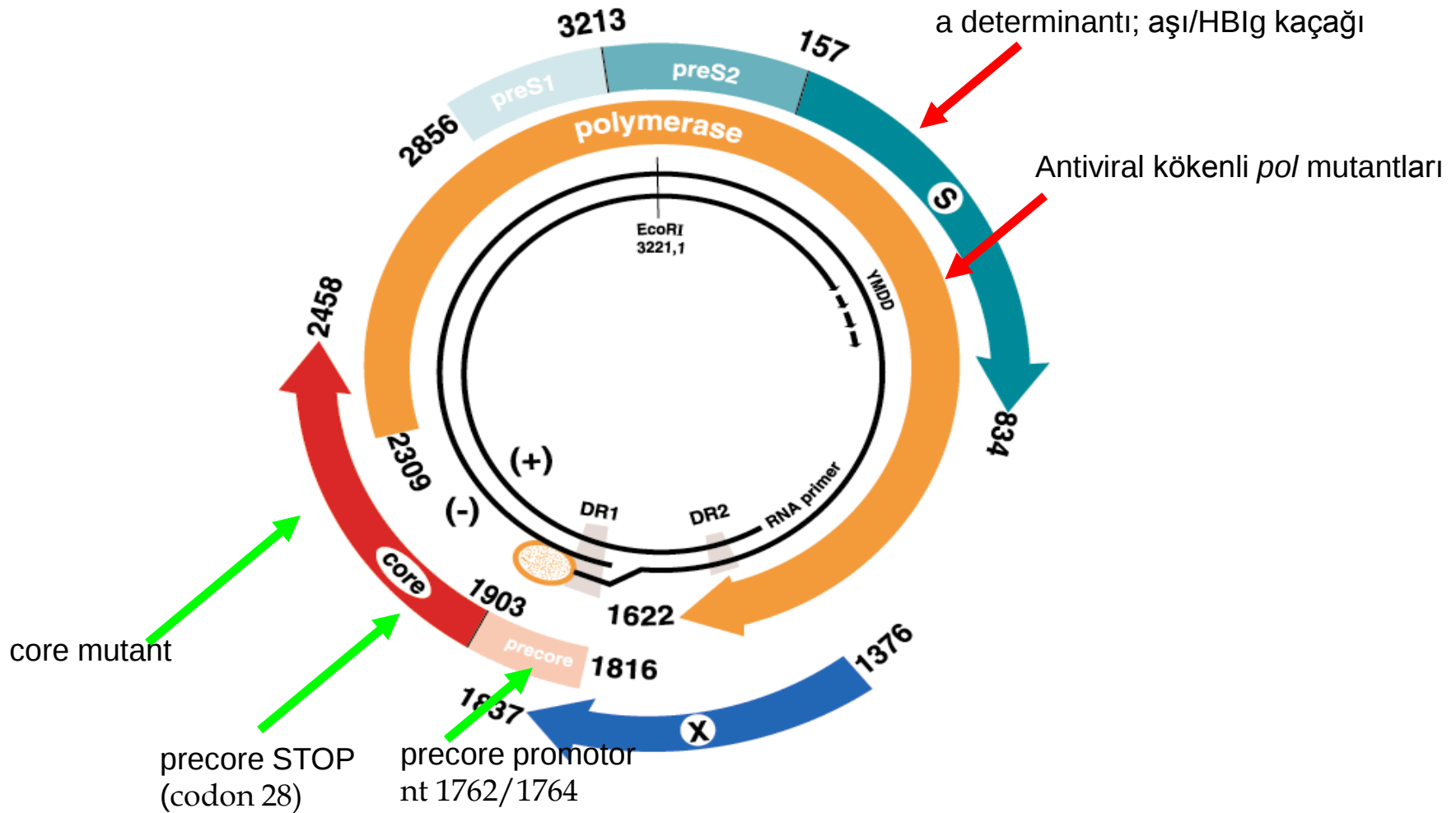


Threshold	Minimum number of required sequences	Low covered position
20%	25	
5%	100	
1%	500	

LiPA; Bilinen HBV primer ilaç direnci mutasyonlarını doğal tip motiflerle birlikte gösterir (v2, v3...)



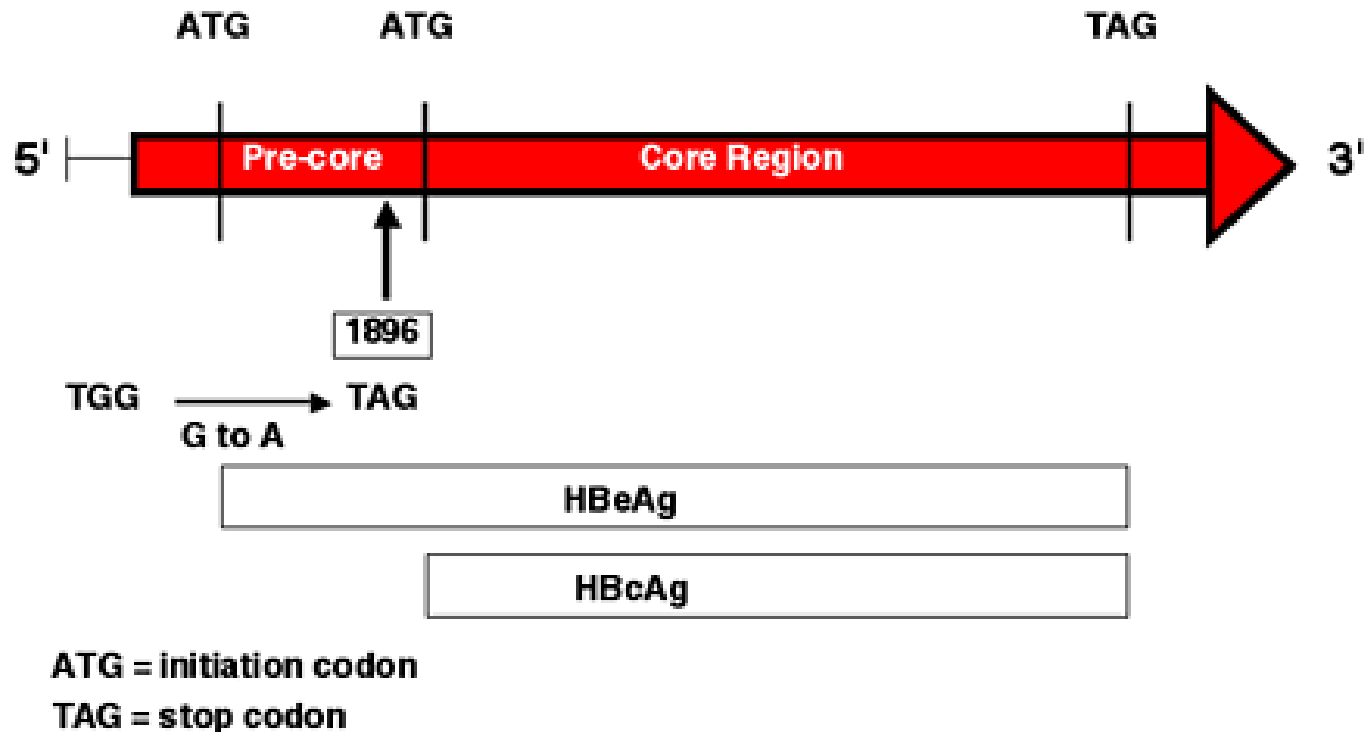
HBV genomunda gelişen mutasyonlar klinik önemde varyantları oluşturur.



HBV varyantlarının oluşturduğu mutasyonlar farklı klinik sonuçlar üretir.

Gen bölgesi	Mutasyon	Moleküler sonuçları	Klinik anlamı
<u>Pre-S + S</u>	Büyük S proteini promotor	Yetersiz viral toplanma	Kolestatik fibrozis
	S geni mutasyonları	B ve T lenfosit epitoplarında değişiklik	Kaçış mutasyonlarının oluşumu; • Tanı testlerinden, • Aşıdan, • HBIg'den • Bağışık yanıttan kaçış.
Pre-C	Pre-C stop	HBeAg kaybı	HBeAg negatif şiddetli hepatit
Kor	Kor	T lenfosit epitoplarında değişiklik	Kronik şiddetli hepatit
<u>RT/pol</u>	Pol	Yetersiz replikasyon	Viral latensi ve kronikleşme
		Nükleoz(t)id analoglarına direnç	Tedavi başarısızlığı
Fonksiyonel elementler	Kor promotor	Artmış replikasyon ve kor ekspresyonu	Şiddetli hepatit, ilaç direncinin modülasyonu
		Azalmış HBeAg sentezi	HBeAg seronegatifliği
	En-1	Azalmış replikasyon	Kronik hepatit

Stop-codon Mutation in Precore Region of HBV Genome

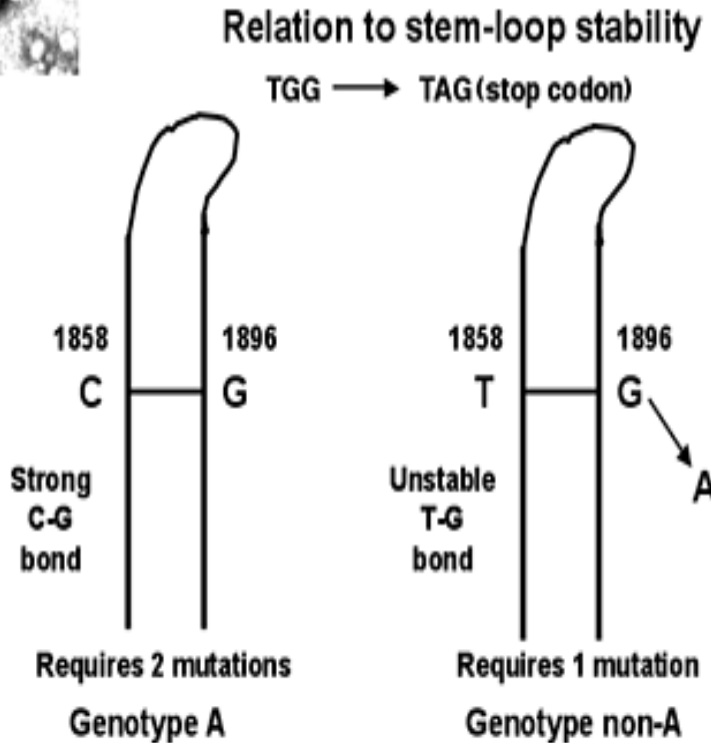


- HBV'nin C geninde 2 farklı lokusta transkripsiyon gerçekleşir. 1901. nt HBcAg'yi, 1814. nt HBeAg'yi kodlar.
- PreCore bölgede 1896. nt de bir missense mutasyon (G/A → TGG/TAG = stop kodon) gelişir.
- PreCore stop-kodon mutasyonu nedeniyle HBeAg üretilemez

- PreCore stop-kodon mutasyonlarının sıklığı HBV genotiplerine göre değişir.
- Genotip A'da G/A değişimi için C'inde değişmesi gerekir. Halbuki non-A genotiplerde G/A değişimi çok kolaydır.
- Bu nedenle PreCore stop-kodon mutasyonları non-A genotiplerin yaygın görüldüğü **Akdeniz ve Asya ülkelerinde** daha sık görülmektedir.



Precore Mutation and HBV Genotype



- Stem-loop yapısı virusun kapsid oluşumunda kritik role sahiptir.
- Buradaki mutasyon loop'un stabilitesini arttırır.

HBeAg negatif kronik hepatit B

Gen bölgesi	Mutasyon	Moleküler sonuçları	Klinik anlamı
Pre-C	Pre-C stop	HBeAg kaybı	HBeAg negatif şiddetli hepatit
Kor	Kor	T lenfosit epitoplarında değişiklik	Kronik şiddetli hepatit

- Bu profildeki hastalar pre-kor/kor promotor mutasyonları taşıyabilir:
 - En sık karşılaşılan; 1764. A/T ve 1766. G/A mutasyonlarıdır.
- pre-C gen bölgesinin sonunda stop kodon oluşur ve HBeAg prekürsörü olan pre-C/C füzyon proteini sentezlenemez.
- Bu hastalarda anti-HBe serokonversiyonu gelişse bile viral replikasyon süregen bir halde devam eder.
- Pre-kor stop kodon mutantları sıklıkla;
 - Fulminan hepatit ve kronik aktif hepatit B'de gözlenmektedir.
 - Asemptomatik taşıyıcılar ve akut –kendiliğinden sonlanan hepatitlerde de gözlenmiştir.

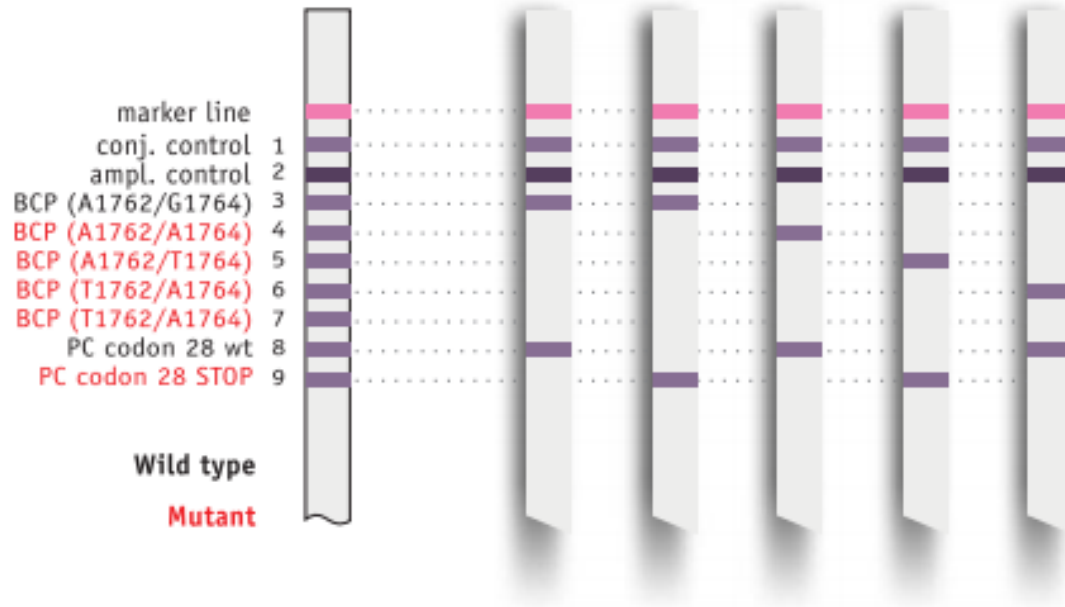
Hepatology 2009. (www.HepatologyTextbook.com).

Baumert TF, *et al.* World J Gastroenterol 2007; 13(1): 82–90.

Kao JH. Korean J Intern Med 2011; 26: 255–261

INNO-LiPA HBV PreCore

Line probe assay for the simultaneous detection of hepatitis B virus wild-type motif and mutations in the basal core promoter (BCP) and precore region.

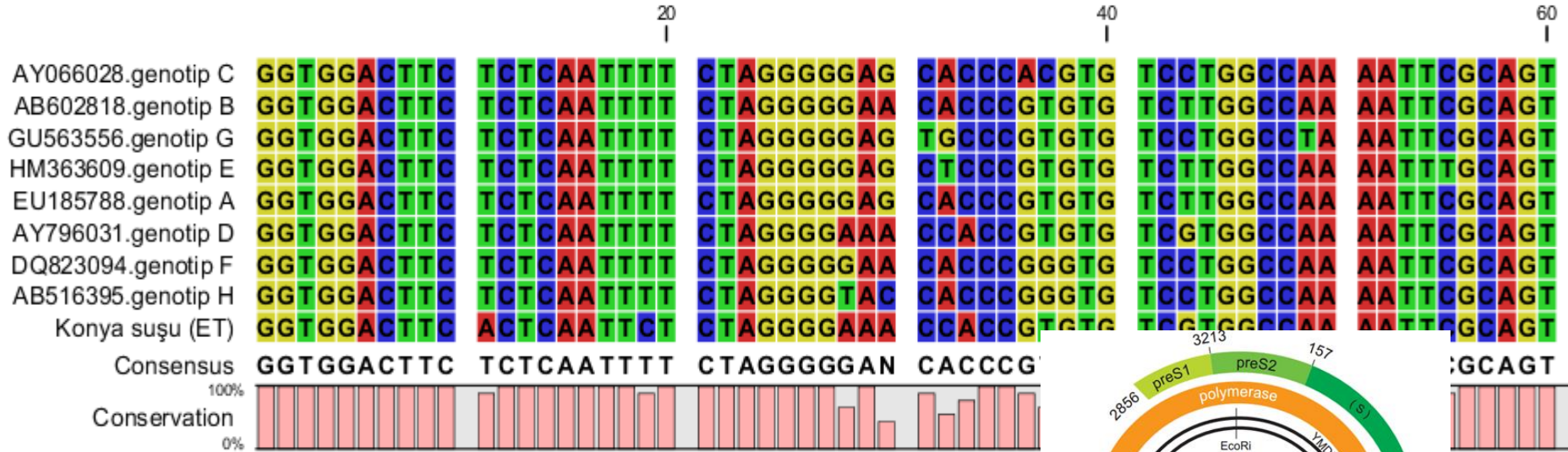


Relevance of HBV precore in clinical research

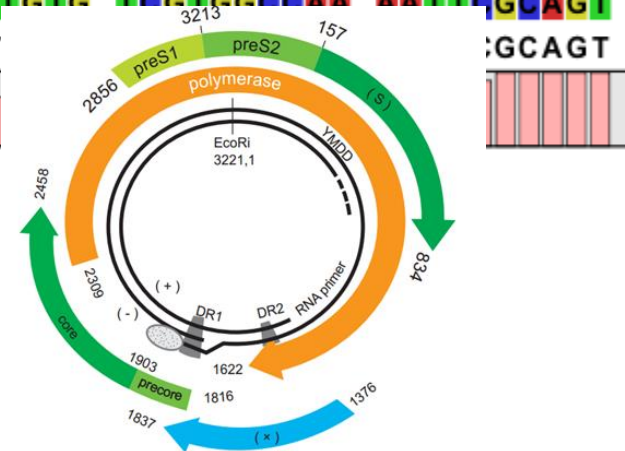
- Interferon-alpha therapy response
- Fulminant hepatitis (HBV reactivation)
- Rate of lamuvidine-resistant mutants
- Hepatocellular carcinoma

HBV infeksiyonlarında BCP ve preCore mutasyonu ve genotip analizinin birlikte ele alınması yararlı olabilir.

HBV genotipler/subgenotipler; viral populasyonun sekanslanması



HBV genomu 3200 nt (3.2 kb) büyüklüğünde.



Filogenetik analiz genotiplendirmede altın standarttır.

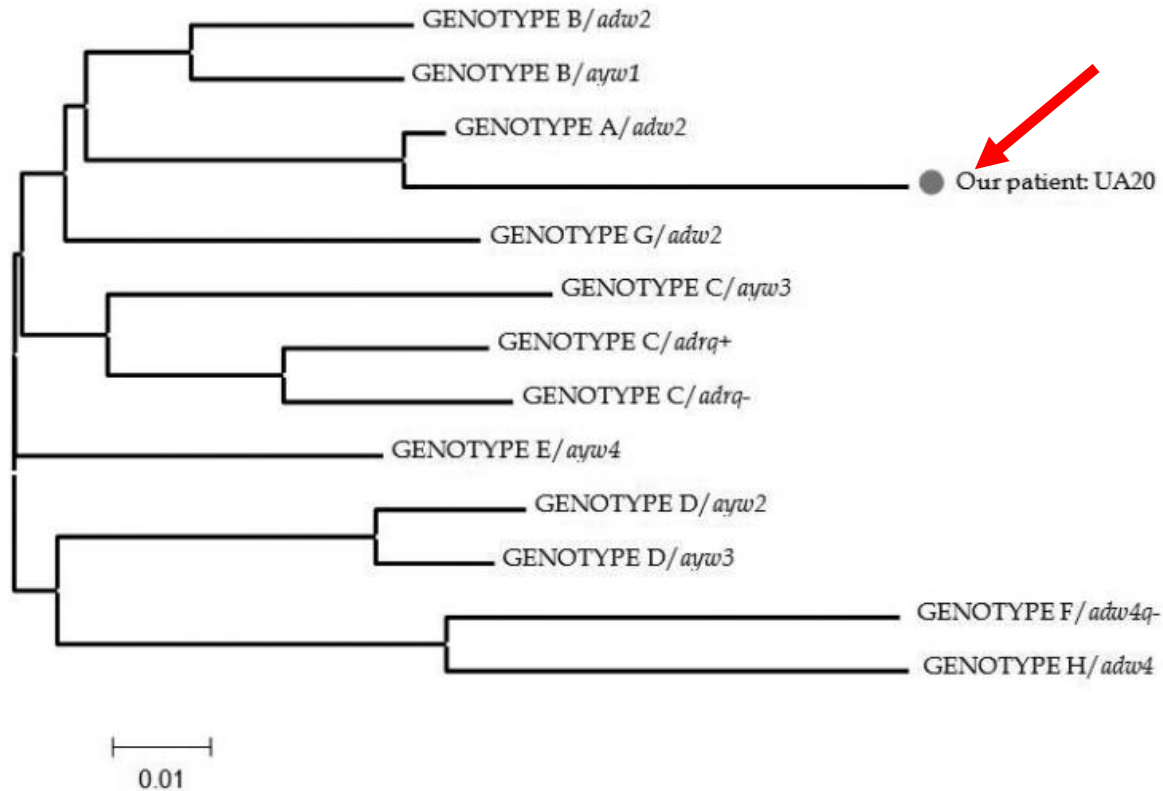


Figure 1. Phylogenetic tree obtained by distance matrix/UPGMA comparison (with Kimura-2 correction) after bootstrapping 1000 replicates of sequence segment at amino acid positions between 80-250 from the reverse transcriptase domain of the polymerase region of hepatitis B virus (UA20 is our patient, the others are from the gene bank)

Hepat Mon. 2010; 10(4): 302-305

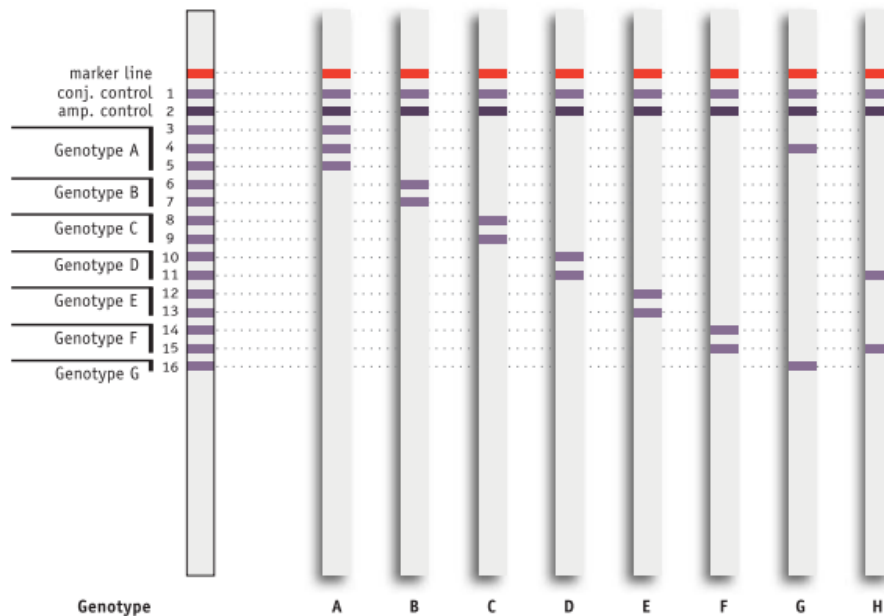
Genotype A2/adw2 Strain of Hepatitis B Virus in Turkey: A Case Report

Murat Sayan ^{1*}, Sila Cetin Akhan ², Mithat Bozdayi ^{3,4}

Line immuno probe assay (LiPA) **mix enfeksiyonları** saptamada daha başarılıdır.

INNO-LiPA HBV Genotyping

Line probe assay for the identification of hepatitis B virus genotypes A to H.



Note: Genotype H indicated by reactivity of lines 11 and 15

- HBV DNA yükü >200 IU/ml (990 kopya/ml) olmalı

Features and benefits

■ Distinct advantage in detection of mixed genotype infections

LiPA technology detects up to 16.3% more mixtures than direct sequencing: confirmed by clonal analysis.¹

Table 2. Geographic distribution of HBV genotypes and subtypes

Genotype	Subtype	Geographic location
A	A1	Sub-Saharan Africa
	A2	Northern Europe
	A3	Western Africa
B	B1	Japan
	B2-B5	Taiwan, China, Indonesia, Vietnam, Philippines
	B6	Alaska, Northern Canada, Greenland
C	C1-C3	Taiwan, China, Japan, Korea, Southeast Asia
	C4	Australia
	C5	Philippines, Vietnam
D	D1-D5	Africa, Europe, <u>Mediterranean basin</u> , India
E		Restricted to West Africa
F	F1-F4	Central and South America
G		France, Germany, United States
H		Central America
I		Laos, Vietnam
J		Japan

HBV genotipleri tüm genom sekans uzunluğuna göre (A – H).

Genomdaki farklılık %8

Subgenotip

Şimdilik 24 tane.

Genomdaki farklılık %4

Ülkemizde genotip D predominant, D1 en sık görülen subgenotiptir.

Türkiye’de HBV genotip/subgenotip dağılımı

HBV (+)	Naif grup	Tedavi grubu (viral breakthrough saptanan)
Hasta	n=249	n=150
Genotip	D; 248 (%99.6) H; 1(%0.4)	D; 150 (%100)
Subgenotip	D1; 220 (%88.8) D3; 17 (%6.8) D2; 10 (%4) D4; 1 (%0.4)	D1; 129 (%86) D3; 11 (%7.3) D2; 9 (%6) D4; 1 (%0.6)

*Veriler, Klimik derneği VHÇG ulusal HBV ilaç direnci surveyansından derlenmiştir.

Türkiye’de HBsAg serotip ayw2 baskındır.

Sayan M, Annals of Hepatology 2012, 11(6):849-854

Sequence Information		
Identifier:	Abant İzzet Baysal, F.K.	
Genotype:	D	
Dual Infection:	No indication of <u>dual infection</u> was found (100% confidence)	
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 94.98%)	
Included <i>RT</i> domain codons:	82 - 226 (similarity to reference = 92.41%)	
Included <i>SHB</i> protein codons:	74 - 218 (similarity to reference = 94.48%)	
Mutations <i>RT</i> domain:	H124Y, Y135S, L180M, S202G, M204V, F221Y, T222Y, A223R, V224L, T225L, N226P	
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, I195M, L213I, P214T, L215A, L216C, P217Y, I218P	
Escape mutations <i>SHB</i> protein:	I195M (LAM ve LdT ile ilişkili potansiyel aşı kaçığı mutasyonu)	
Drug Resistance		
Drug	Scored mutations	Resistance analysis
Lamivudine, Zeffix®	180M,204V	resistant
Adefovir, Hepsera®	none	susceptible
Entecavir, Baraclude®	202G,204V,180M	resistant
Tenofovir DF	none	susceptible
Telbivudine, Tyzeka®, Sebivo®	204V	resistant

Ülkemizde kronik B hepatitli hastalarda saptanan tipik HBsAg kaçış mutasyonları.

Mutasyon kategorisi	Mutasyon paterni	Kombine paternler
HBİg kaçığı mutasyon	sT118A/R, sP120K/Q/T, sT123A, sC124G, sQ129R, sM133L, sY134N, sD144E, sG145E/K/R	• sT118R + sG145E/K/R
Aşı kaçığı mutasyon	sP120S, sT126I, sM133L, sS143L, sD144E, sG145R, sS193L	• sS143L+ sG145R
Hepatit B yanlış tanı mutasyonu	sP120S/T, sT131I, sM133T, sS143L	-
İmmün sistem kaçığı mutasyon	sY100C/S, sQ101H/R, sP105A/R, sL109R, sI110L, sS114A/T, sS117G/N, sG119I/R/V, sP120T, sT123A/D/N, sP127T, sA128V, sG130E/K/R, sT131N, sS132C/P, sY134F, sT140I, sS143T, sD144E, sG145R	• sY100C + sS117G + sG119I/R/V + sP120K/Q/T + sT123A/D/N • sP105A + sY134F • sP127T + sS143T • sY100S + sP105R + sA128V + sG130E/K/R • sY100C + sQ101H + sI110L • sT131N + sT140I • sS114A/T + sS132C

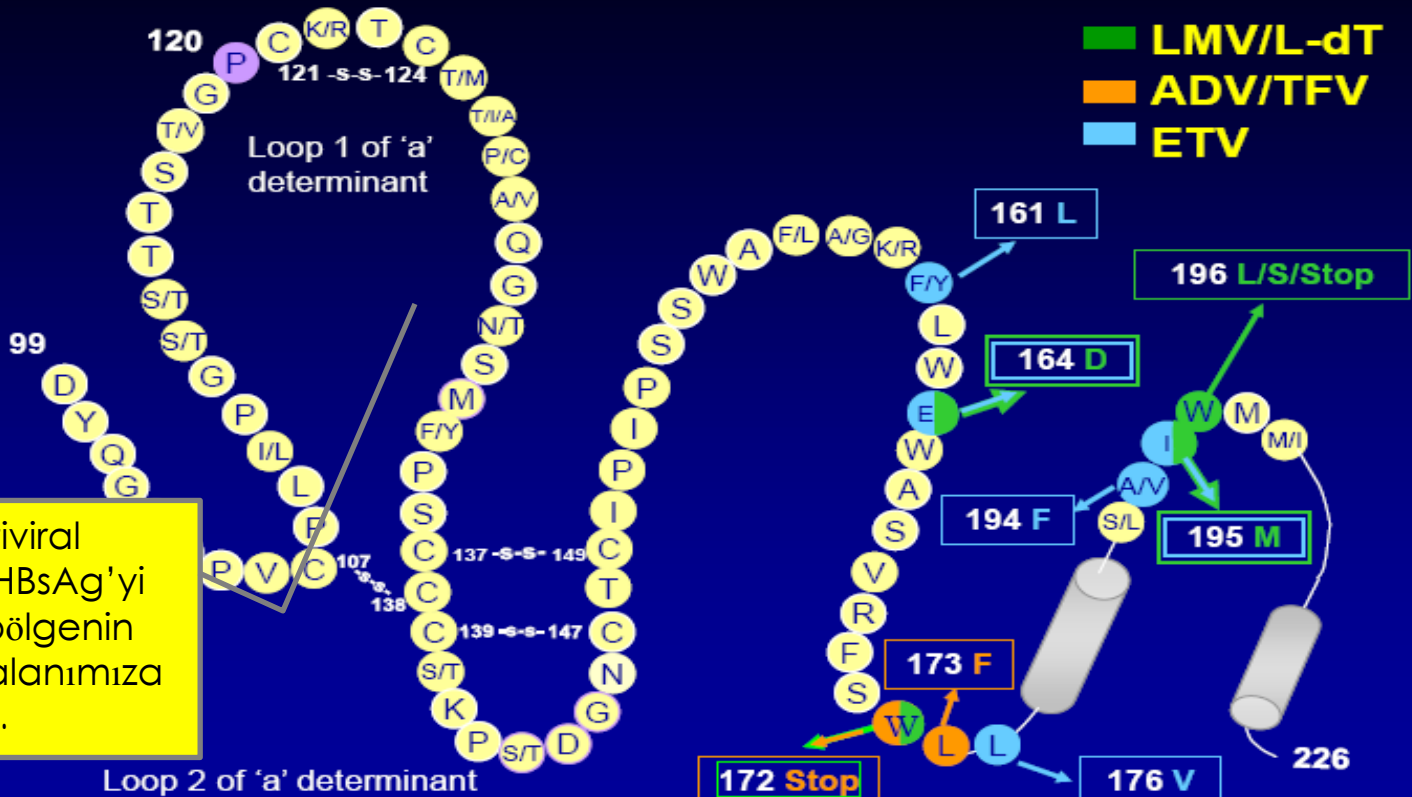
Sheldon J. J Antimicrob Chemoth 2008; 61: 766–768.

Locarnini S. Hepatol Int 2008; 2:147–151

Sayan M, et al. Jap J Infect Dis 2012; 65(6): 495–501.

Antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutant: ADAPVEM

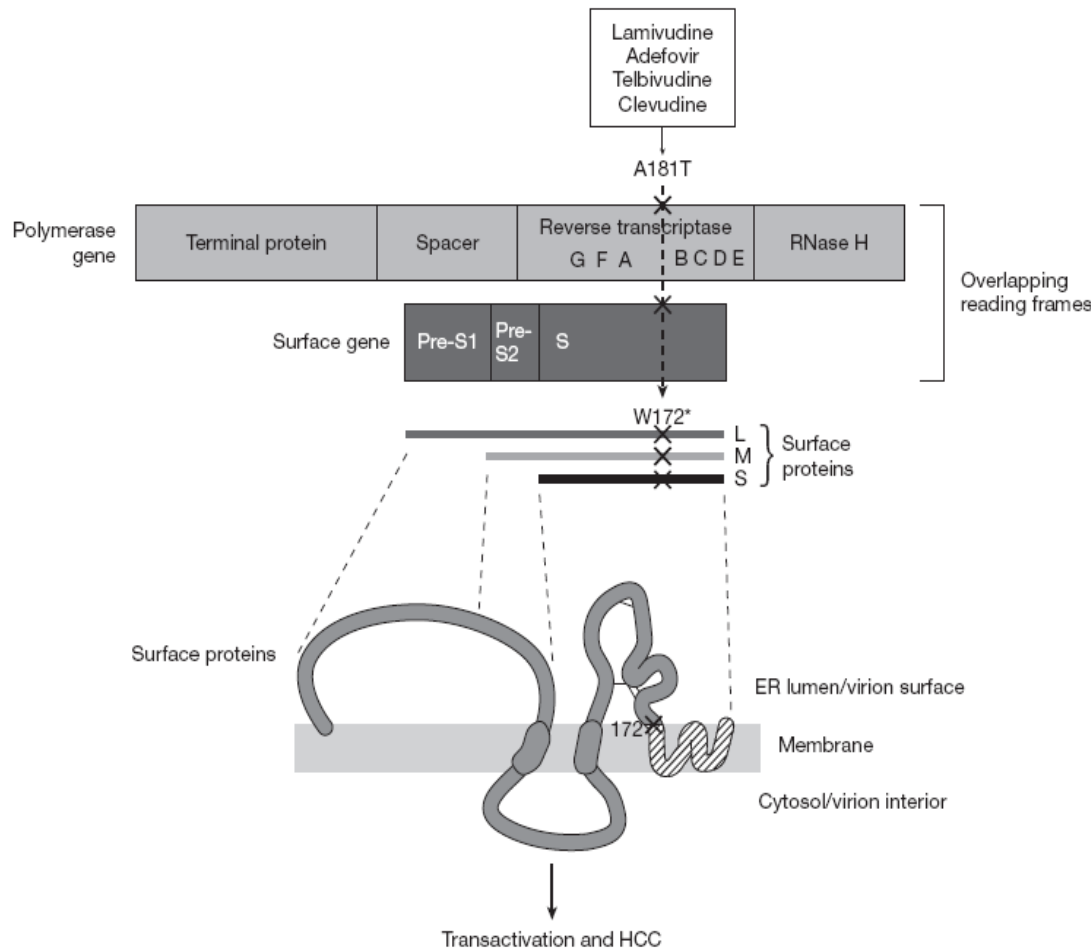
HBsAg Mutation Selected by LMV/L-dT/ADV/ETV



Oral antiviral tedavilerle HBsAg'yi kodlayan bölgenin tamamı ilgi alanımıza girdi.

Kronik HBV'de antiviral tedavi, HCC'ye gidişi kolaylaştırabilir mi?

Figure 1. Polymerase/surface gene overlap



- **A181T** mutasyonu özellikle LAM ve ADV tedavisinde ortaya çıkıyor.
- **ADAPVEM:** HBV S geninde **sW172*** (stop kodon) mutasyonu tetikleniyor.
- S proteini bölünüyor ve sekretuar defekt geliyor. Hücrede stres ve hasar oluşturuyor.

Warner N, Locarnini S. Antiviral Therapy 2009; 14:139-142.

Soru & Cevap

