



HBV:

Mikrobiyoloji ve Patogenez

Doç.Dr.Murat Sayan
Kocaeli Üniversitesi

Hepatit Akademisi: Temel Bilgiler
24-26 Ocak 2013
Lefkoşe/Kıbrıs

Aile	Cins	Tür	Konak
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	Hepatit B virusu	Vertebralılar
	<i>Avihepadnavirus</i>	Duck hepatit B virusu	Vertebralılar

- Parsiyel (eksik) çift iplikli sirküler DNA taşır
- Genom 3200 nt (3.2 kb) büyüklüğünde.
- Revers transcriptase enzimi var.
- 4 ayrı ORF kodluyor (S, C, P ve X).

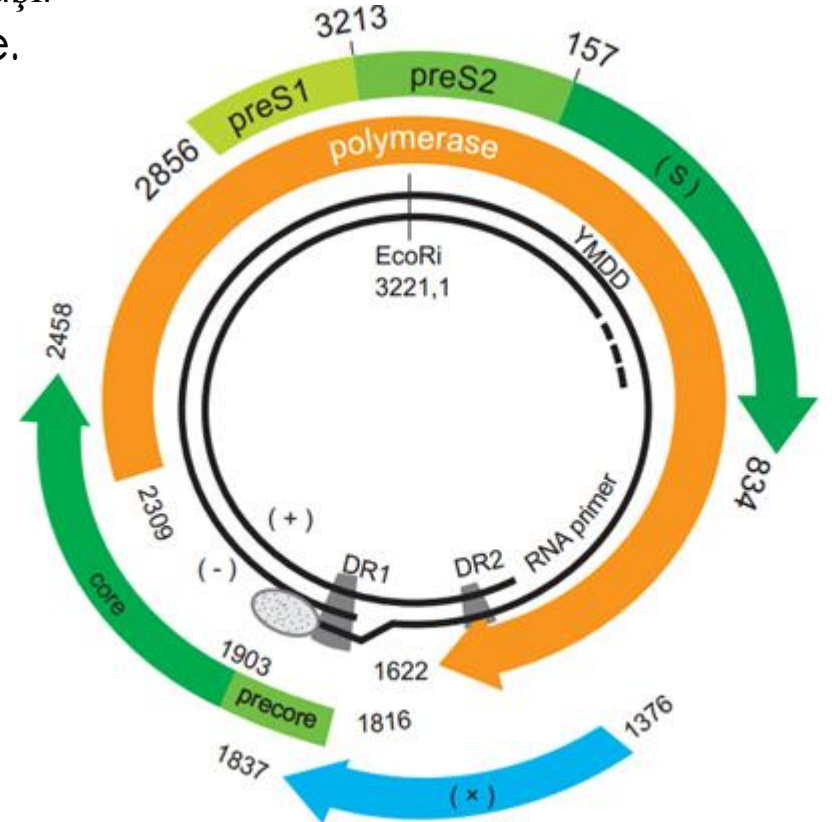
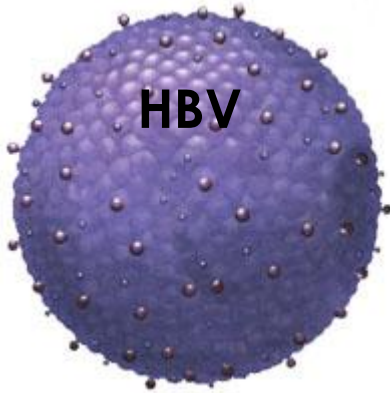
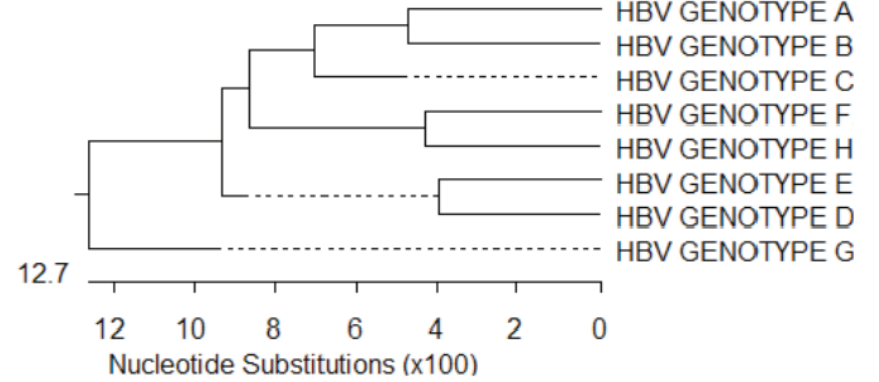


Table 2. Geographic distribution of HBV genotypes and subtypes

Genotype	Subtype	Geographic location
<u>A</u>	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, Mediterranean basin, India
<u>E</u>		Restricted to West Africa
F	F1-F4	Central and South America
<u>G</u>		France, Germany, United States
<u>H</u>		Central America
I		Laos, Vietnam
J		Japan

HBV genotiplerinde filogenetik ağaç; tüm genom sekans uzunluğuna göre (A – H).

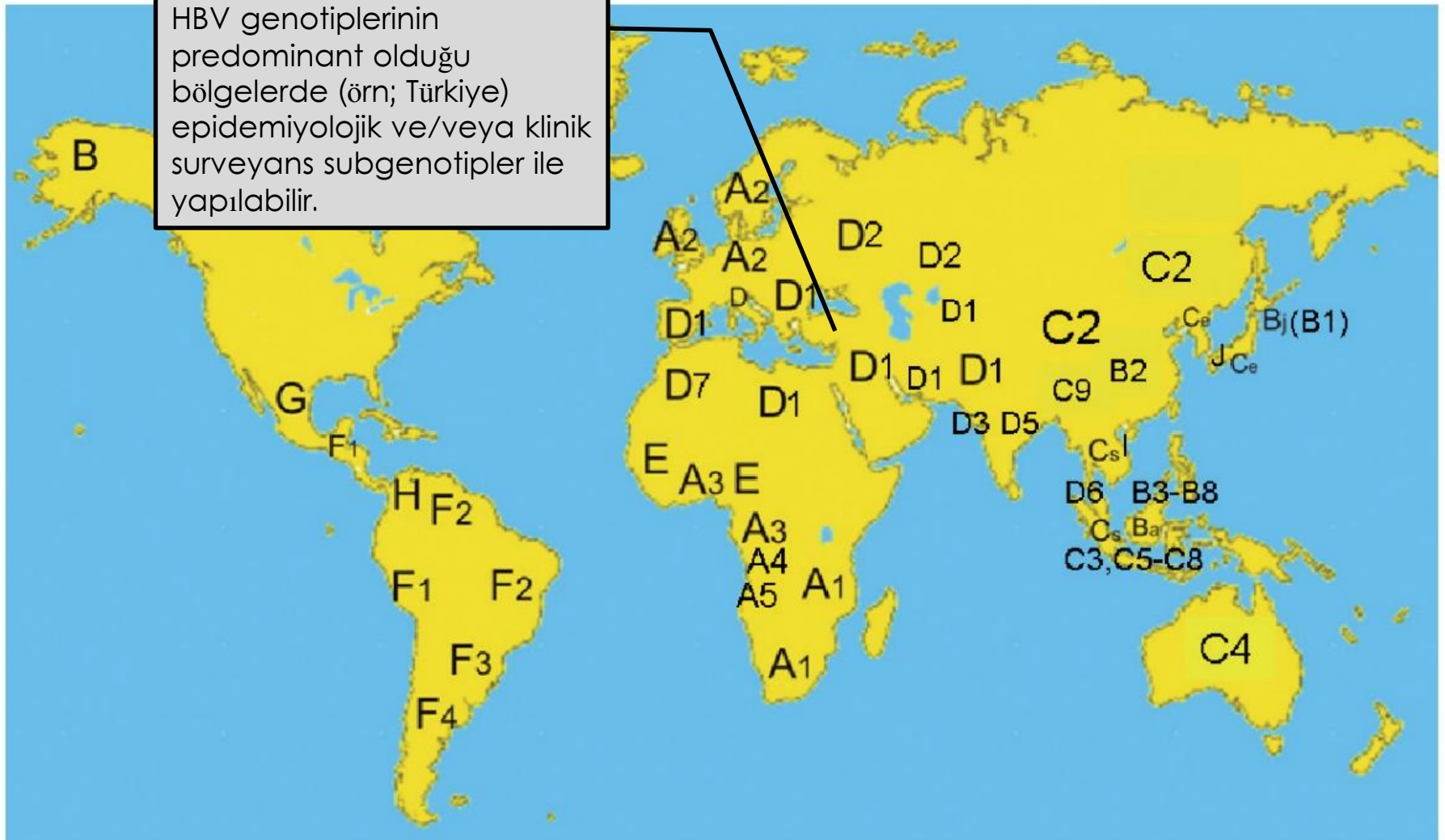


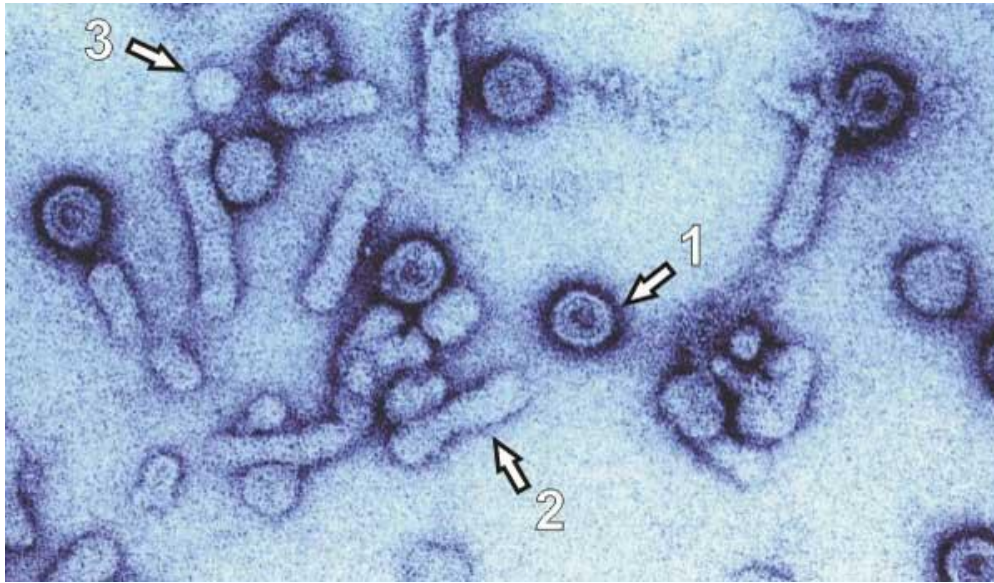
Ülkemizde genotip D predominant, D1 en sık görülen subgenotiptir.

HBV, muhtemelen ~ 35 000 yıl önce insanlarla birlikte evrilmeye başladı.

HBV genotip/subgenotiplerinin küresel dağılımı

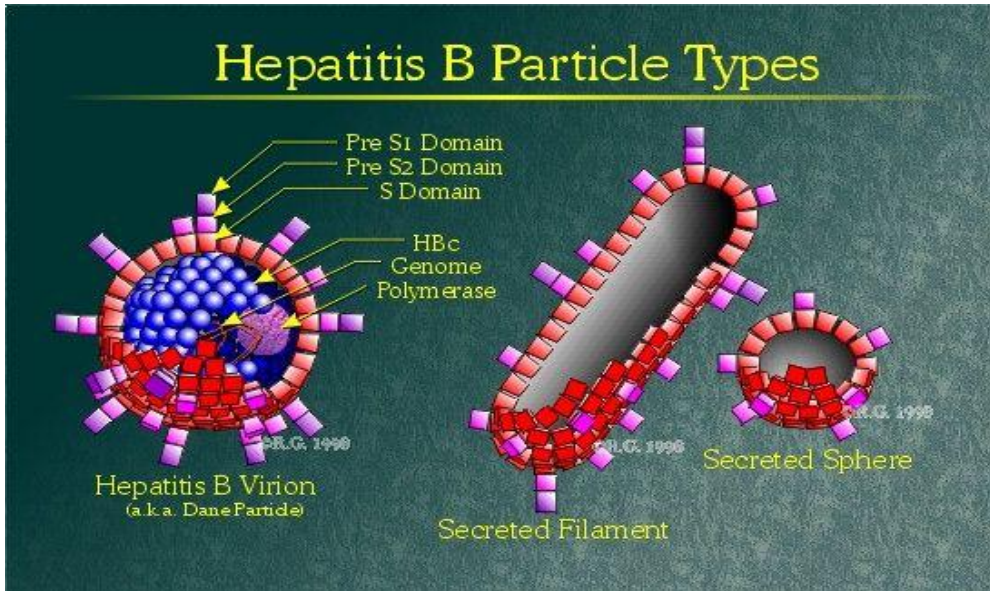
HBV genotiplerinin
predominant olduğu
bölgelerde (örn; Türkiye)
epidemiyolojik ve/veya klinik
surveyans subgenotipler ile
yapılabilir.





HBV partiküllerinin elektron mikroskopik görüntüsü.

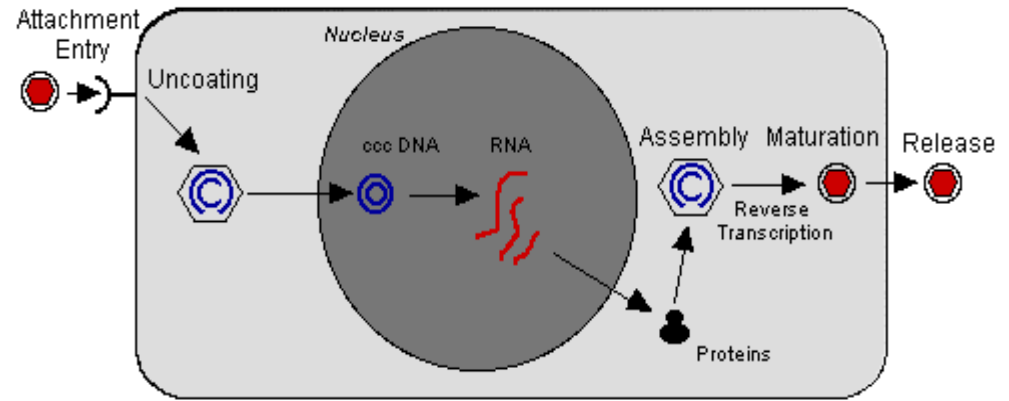
- (1) Dane partikülü
- (2) Flamentöz partikül
- (3) Sferik partikül



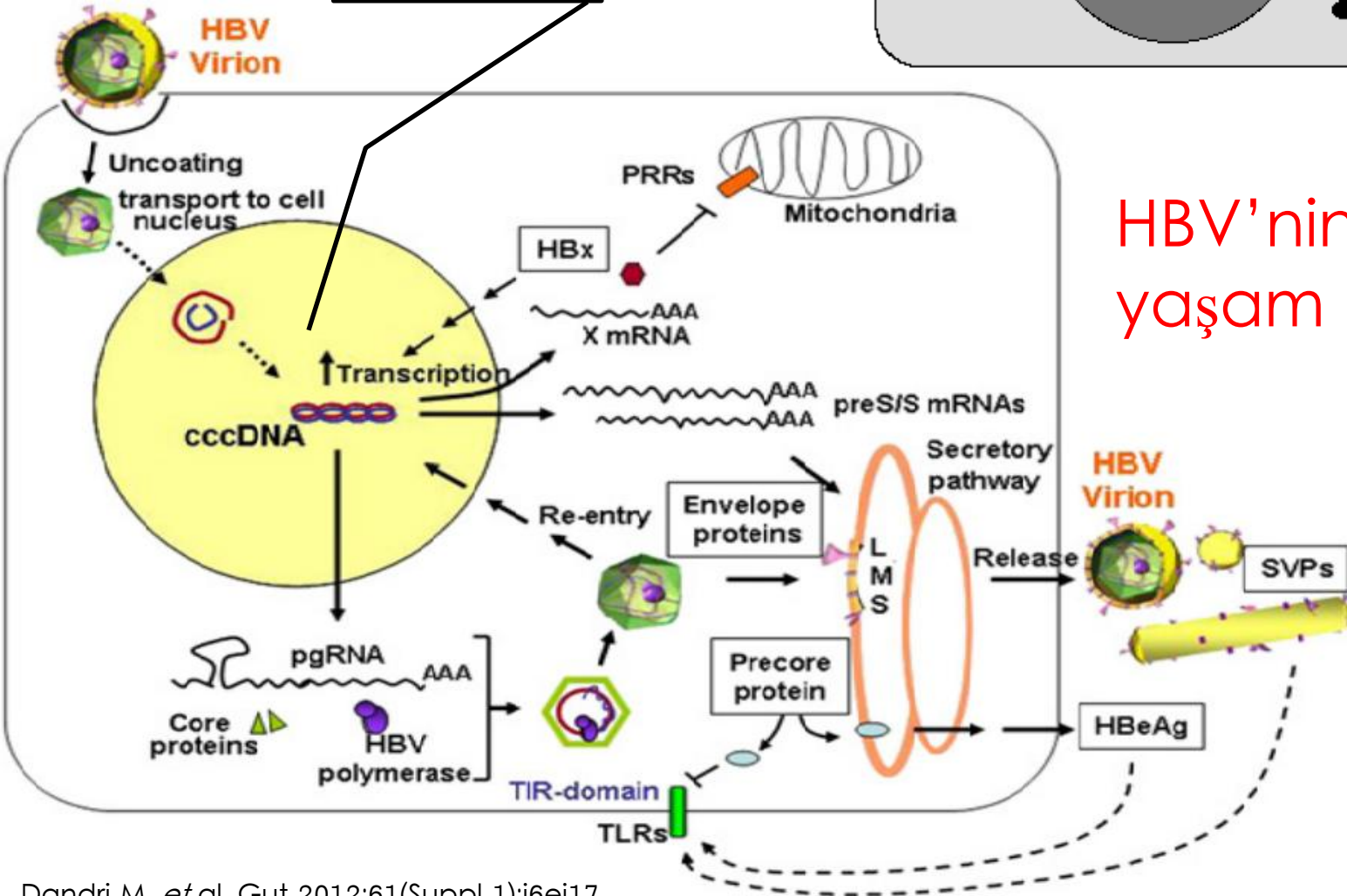
Dane partikülü; "covalently closed circular " **ccc DNA** içerir.

Universitäts Klinikum Heidelberg moleküler biyoloji ders notlarından adapte edilmiştir.
www.klinikum.uni-heidelberg.de

cccDNA ve
pgRNA, HBV
yaşam
döngüsünde
stratejik
merkezdedir.



HBV'nin yaşam döngüsü



HBV replikasyonu

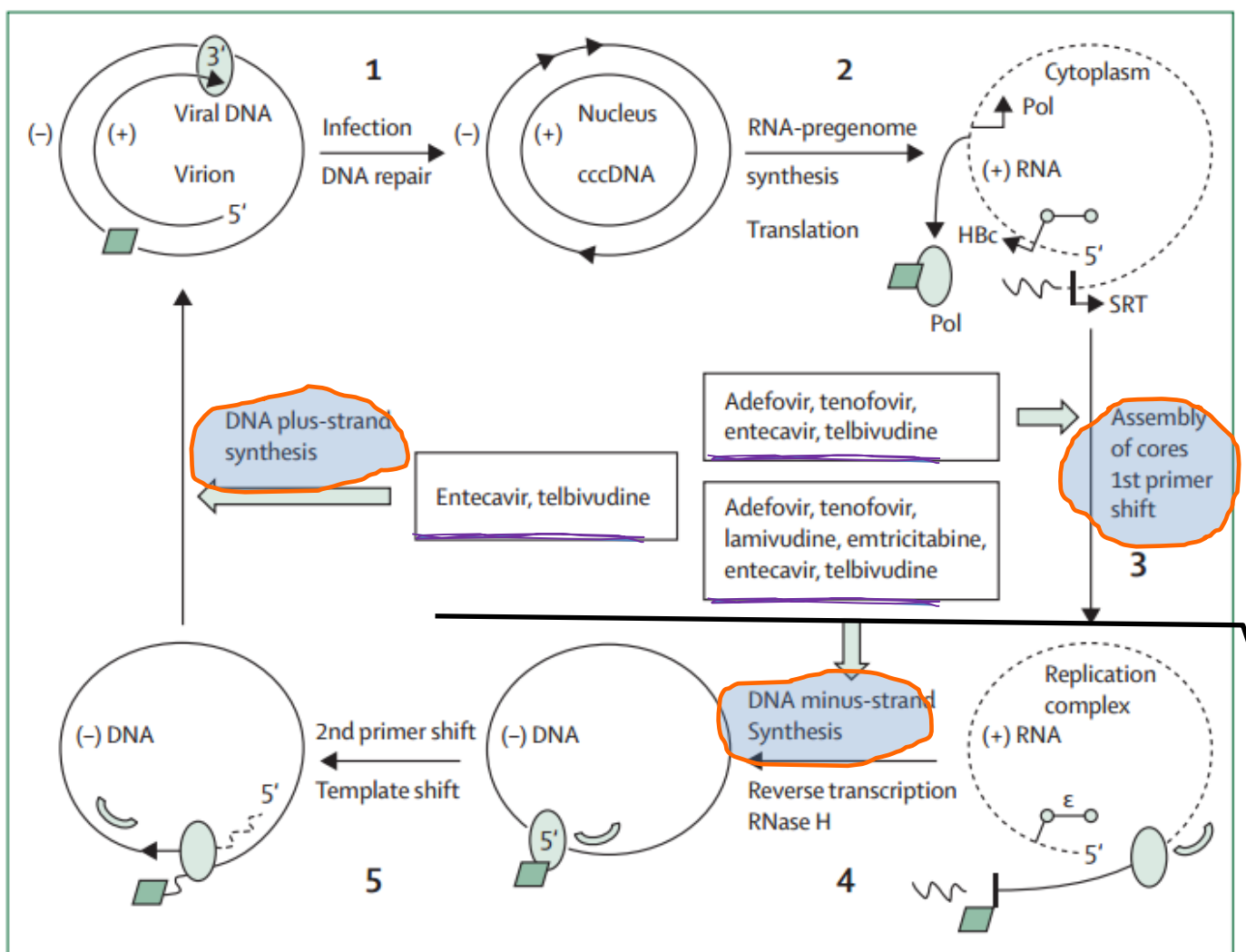


Figure 5: Replication of hepatitis B virus genome and site of action of different antiviral drugs

Oral antiviraller
HBV
replikasyonunda
farklı
basamakları
hedefler.

Mutasyon sıklığı: ökaryot/virus kıyaslama

	Substitusiyon/bölge/yıl	Mutasyon/genom/ replikasyon siklusu
Ökaryot	10^{-8} – 10^{-9}	0.01
Bakteriler ve DNA virusları	10^{-7} – 10^{-9}	0.003
RNA ve ssDNA virusları	10^{-3} – 10^{-4}	1

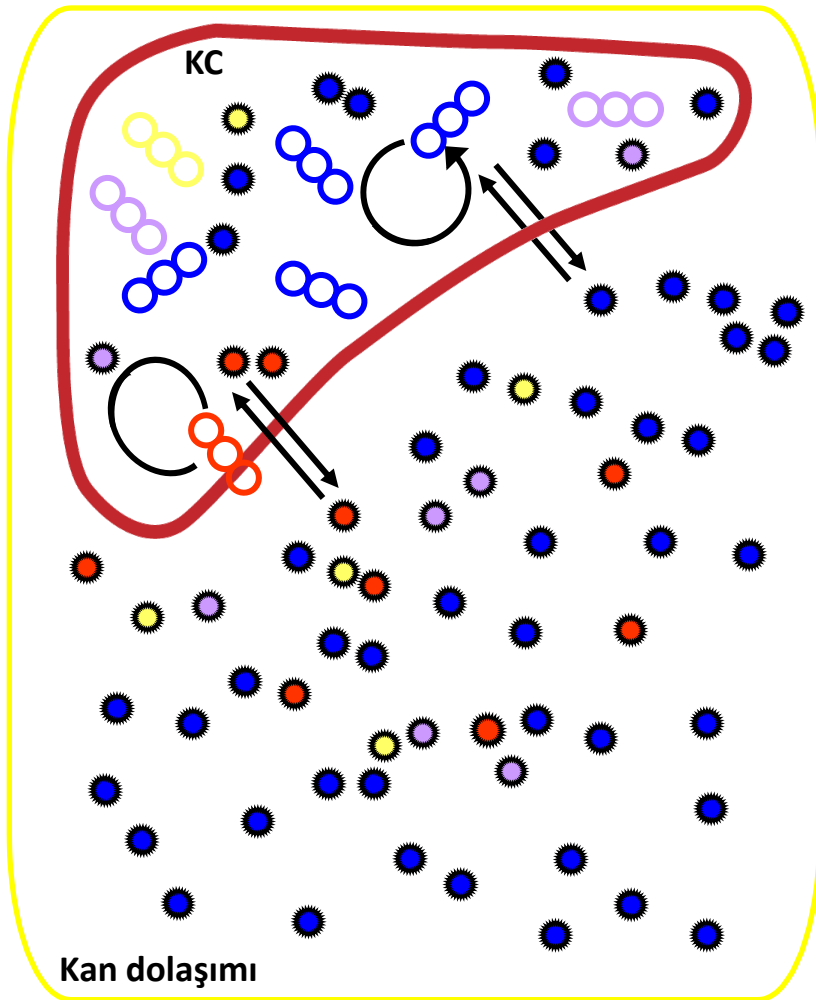
Neden HBV'de varyantlar ve/veya türümsüler* oluşmaktadır.

- Bir kronik HBV taşıyıcısında hergün 10^{12} virion üretilip atılmaktadır.
- Dolaşımdaki HBV konsantrasyonu: $10^8 - 10^{10}$ virion/ml'dir.
- Bayesian kestirimine göre HBV genomunda 1/10 000 nükleotidlik (substitusiyon/bölge/yıl) değişim olmaktadır.
- Bu yüksek substitusiyon sıklığının anlamı HBV genomundaki her bir nükleotidin her gün değişebileceğidir.

*quasispecies

Doğal gelişen mutant varyantlar, ilaç direnci oluşturabilir.

Viral varyantlar KC'de arşivlenir.



Viral quasispecies (türümsüler)

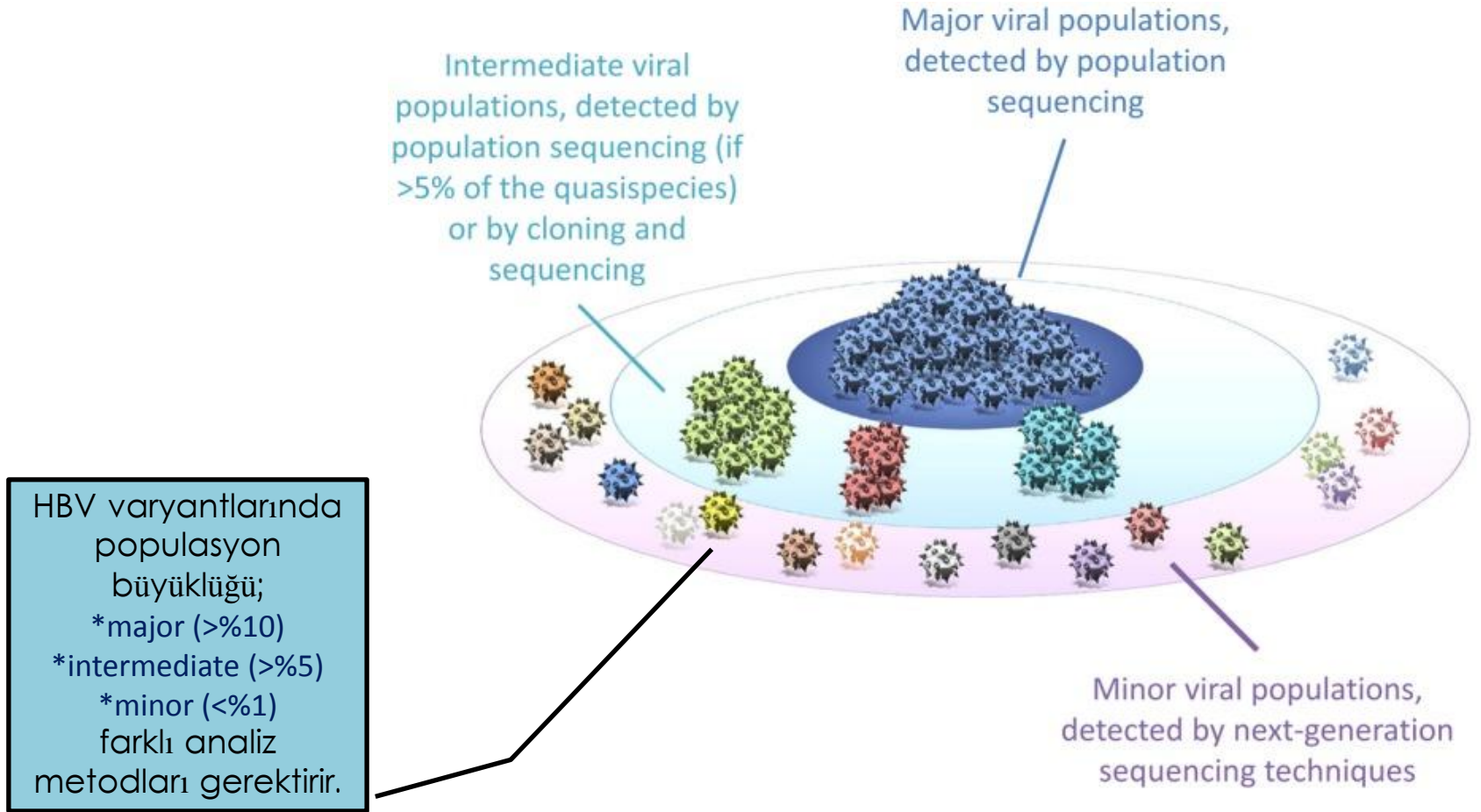
- Ana populasyon
- Minör varyantlar
- Dirençli varyantlar

cccDNA varyantları

cccDNA:

- HBV'nin normal replikasyon döngüsü ve üretimi
- Yeni virus üretiminde kalıp görevi
- **Dirençli varyantların arşivlenmesi**

Hedeflenen HBV varyantlarına uygun analiz metodları seçilmelidir.



HBV genom organizasyonu ve ORF'lerin çıkışması.

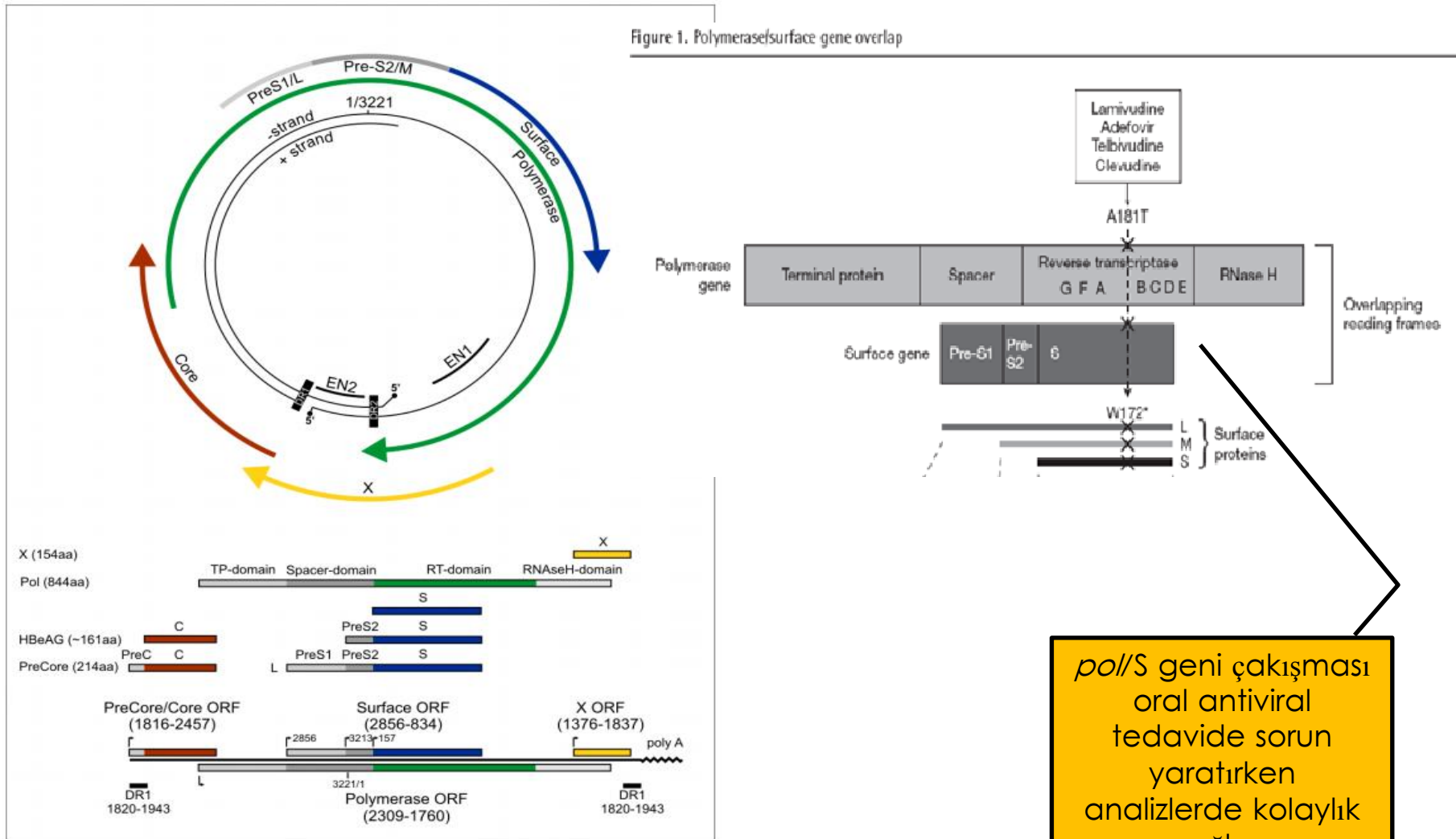


Figure 2. Genome organization and transcripts of the human hepatitis B virus.

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

HBV'nin genom organizasyonu www.HepatologyTextbook.com'dan adapte edilmiştir.

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 çakışması	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

HBsAg kaçış
mutasyonları;
tanı testlerinden,
aşıdan,
HBlg'den ve
bağışık yanıtın
kaçış....

Mutant HBsAg'yi yakalama
çabaları gelişme göstermektedir.

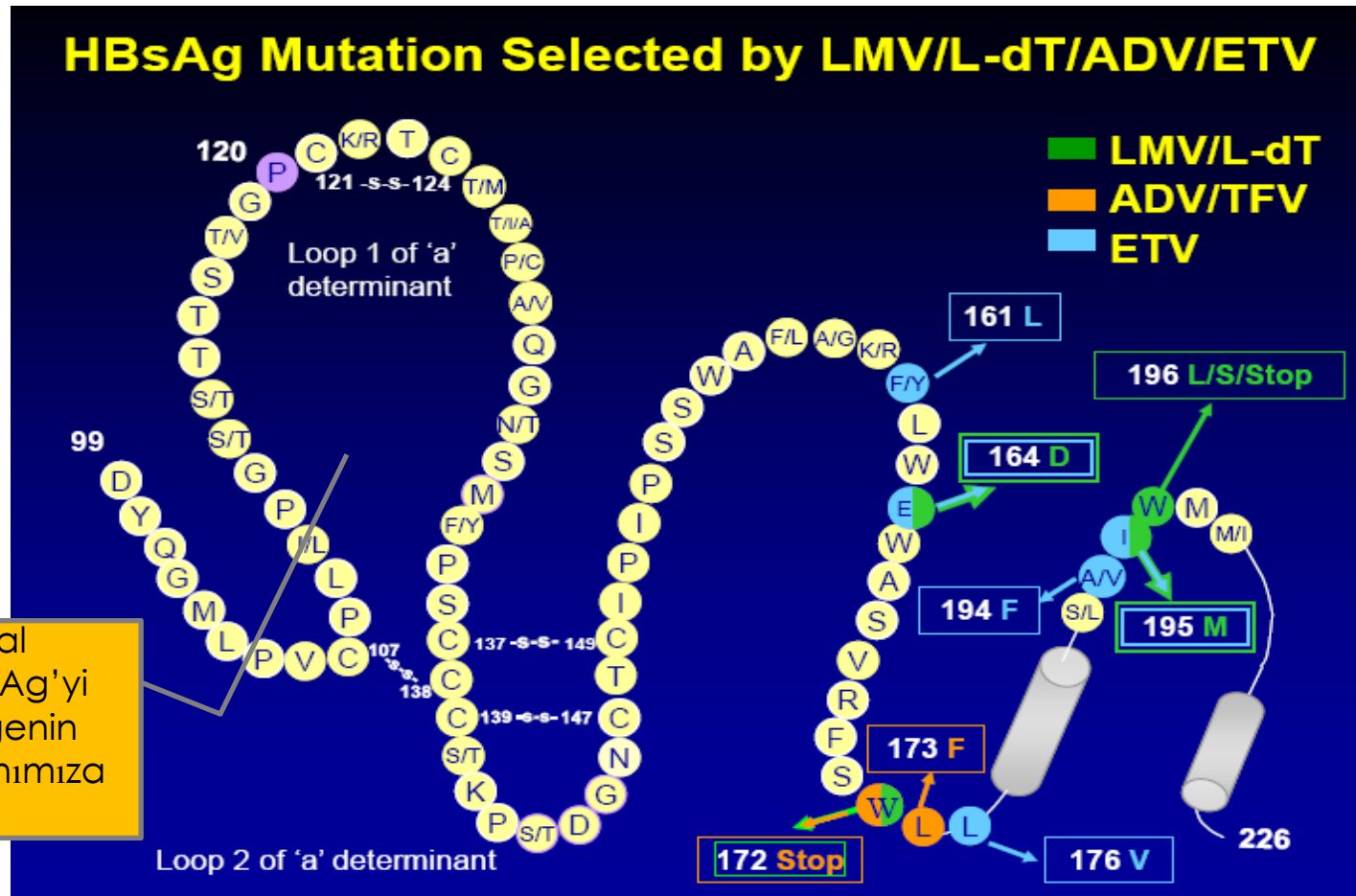
Table 4. Mutant detection: comparison of ARCHITECT® HBsAg prototype, ARCHITECT® HBsAg Qualitative, and PRISM® HBsAg.

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

Ülkemizde kronik B hepatitli hastalarda saptanan tipik HBsAg kaçış mutasyonları.

Mutasyon kategorisi	Mutasyon paterni	Kombine paternler
HBİg kaçacağı mutasyon	sT118A/R, sP120K/Q/T, sT123A, sC124G, sQ129R, sM133L, sY134N, sD144E, sG145E/K/R	• sT118R + sG145E/K/R
Aşı kaçacağı mutasyon	sP120S, sT126I, sM133L, sS143L, sD144E, sG145R, sS193L	• sS143L+ sG145R
Hepatit B yanlış tanı mutasyonu	sP120S/T, sT123A , sT131I, sM133L, sM133T, sS143L, sG145R	–
İmmün sistem kaçacağı 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

Antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutant:
ADAPVEM





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid



Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B

M. Sayan^{a,*}, S.C. Akhan^b

^a Clinical Laboratory, PCR Unit, Faculty of Medicine, University of Kocaeli, 41380 İzmit-Kocaeli, Turkey

^b Department of Clinical Bacteriology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Kocaeli, Kocaeli, Turkey

- 2007 – 2010 yıllarını kapsayan ve toplam 442 hastadan oluşan çalışma
 - 7 tip ADAPVEM motifi saptandı
 - Saptanan ADAPVEM'ler lamivudin, telbivudin ve adefovir ile ilişkili.
 - ADAPVEM prevalansı; **%10 (46/442)**
 - **Tedavi alanlarda; 24%** (44/186)
 - **Tedavi naiflerde; 0.7%** (2/256)

Table 4. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutant (ADAPVEM) in the treatment naive hemodialysis patients

Mutation characteristic	Mutation pattern	Nucleos(t)ide analogue	Patient no. (%)
ADAPVEM	rtV173L/sE164D	LAM	1 (1)
	rtM204V/sI195M	LAM, LdT	4 (4.5)
	rtM204I/sW196L	LdT	1 (1)
	rtA181T/sW172L	ADV, TDF	2 (2)
	rtT184S/sL175F	ETV	1 (1)
	rtT184S/sL176V	ETV	1 (1)
Total			10 (10.6)

Abbreviations are in Table 3.

HBeAg negatif saptanan kronik hepatit B'li hastalar HBV DNA negatif hale gelir mi?

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.

Kronik hepatit B progresyonunda etkili olan faktörler vardır.

Table 1. Risk factors associated with disease progression in chronic hepatitis B patients

Viral factors	Host factors	Environmental factors
High viral load	Advanced age	Aflatoxin exposure
Genotype (HBV-C > HBV-B; HBV-D > HBV-A)	Male gender	Alcohol consumption
Basal core promoter mutation	Genetic alterations	Cigarette smoking
Pre-S deletion	Family history of HCC	Concurrent infection with hepatitis C or D virus or with HIV
	Ethnicity (Asian > Caucasian)	Diabetes mellitus
		Obesity
		Metabolic syndrome

HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HIV, human immunodeficiency virus.

<http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2011.26.3.255>

<http://www.kjim.or.kr>

HBV genotip E ve C daha enfeksiyözdür, bu genotiplerle kronikleşme ve KC kanseri riski daha fazladır.

Hepatit B'nin patogenezinde esas yıkımı konağın bağışıklık sistemi yaratır.

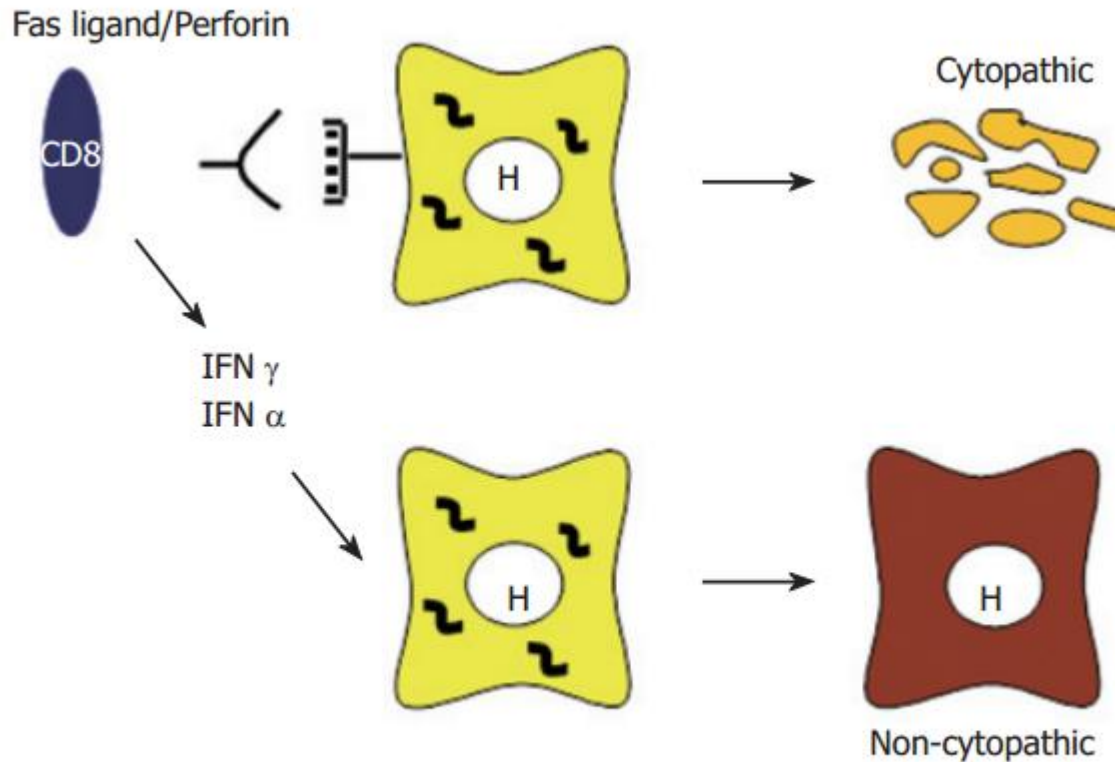
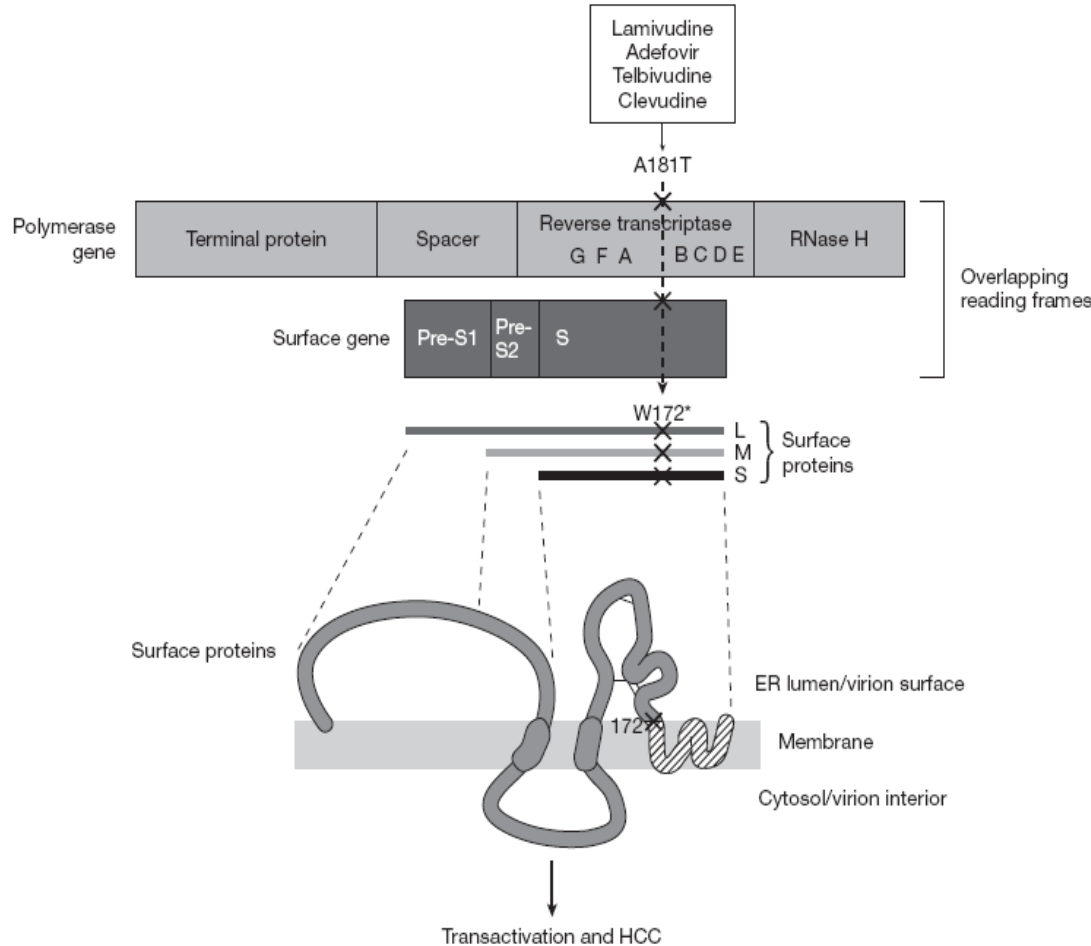


Figure 1 Cytopathic and non-cytopathic T cell responses against HBV infection.

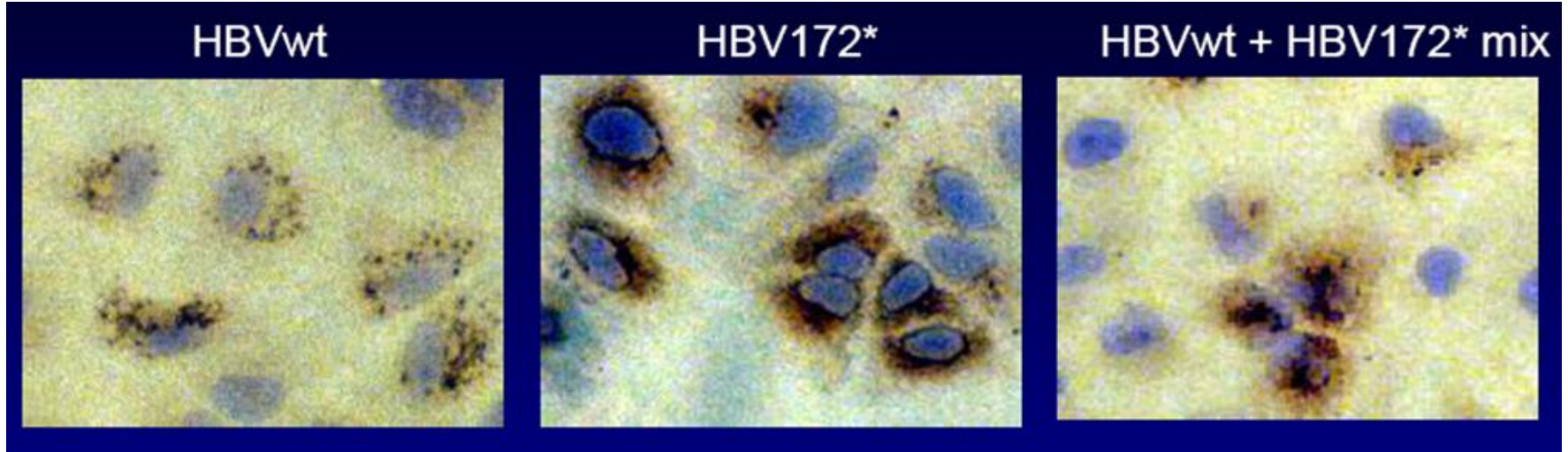
Kronik HBV'de antiviral tedavi, HCC'ye gidişi kolaylaştırabilir mi?

Figure 1. Polymerase/surface gene overlap

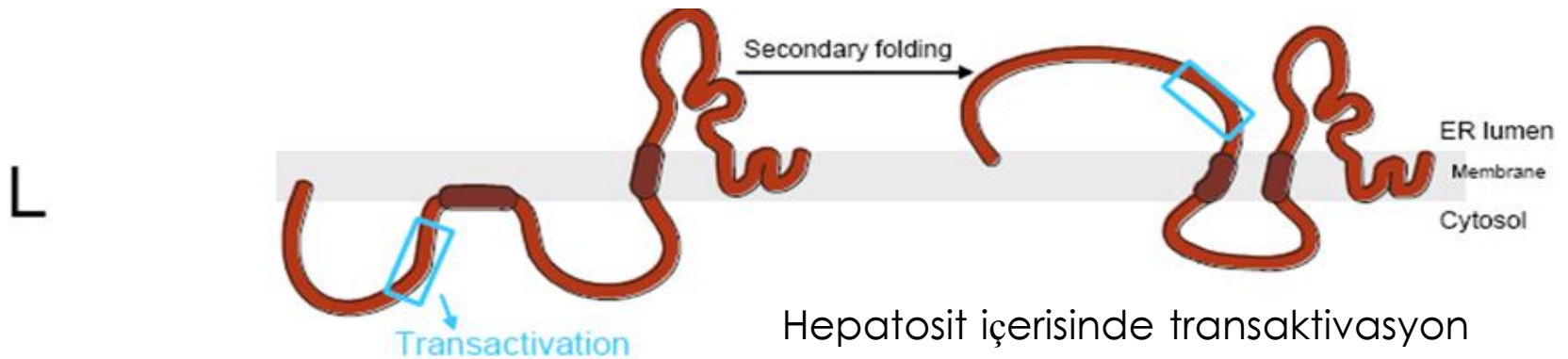


- *pol* geninde rtA181T mutasyonu (LAM ve ADV tedavisinde oluşur);
- S geninde sW172* (stop kodon) mutasyonunu ortaya çıkarır.
- S proteini bölünür, sekretuar defekt gelişir. Hücrede stres ve hasar başlar.

rtA181T / sW172* mutantları hepatosit içerisinde birikir.



Anti – S immunohistokimyasal boyama (kahverengi)/hücre nükleusları (mavi)



14002 no lu hasta

Tedavi öncesinde

- Erkek/30y.
- HBeAg (+)
- ALT:308 U/L
- HBV DNA: 8 000 000 IU/ml
- İ.Ü. Tıp Fakültesinde takip ediliyor.

- **Direkt sekanslama**
A181T / sW172* pozitif
(primer LAM ve ADV direnci)
- **Klonlama**
A181T / sW172* pozitif
(primer LAM ve ADV direnci)

Tenofovir tedavisi başladıktan sonra; 1.ay

Identifier:	14002 AA no lu Örnek
Genotype:	D
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 98.68%)
Included <i>RT</i> domain codons:	67 - 344 (similarity to reference = 97.84%)
Included <i>SHB</i> protein codons:	58 - 227 (similarity to reference = 98.82%)
Mutations <i>RT</i> domain:	S116P, H124Y, Y135S, L217LP, N248H, Q267L
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, L216*

3.ay

Identifier:	14002 AA no lu Örnek
Genotype:	D
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 97.68%)
Included <i>RT</i> domain codons:	88 - 344 (similarity to reference = 96.89%)
Included <i>SHB</i> protein codons:	80 - 227 (similarity to reference = 96.62%)
Mutations <i>RT</i> domain:	L91I, L93V, S116P, H124Y, Y135S, A181T, N248H, Q267L
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, S171FS, W172*, P188HP, L209*L

6.a

Identifier:	14002 AA no lu Örnek
Genotype:	D
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 98.34%)
Included <i>RT</i> domain codons:	86 - 344 (similarity to reference = 97.3%)
Included <i>SHB</i> protein codons:	78 - 227 (similarity to reference = 98%)
Mutations <i>RT</i> domain:	S116P, H124Y, Q130*Q, Y135S, A181T, N248H, Q267L
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, S171F, W172*

12.ay

Identifier:	14002 AA no lu Örnek
Genotype:	D
Subgenotype:	D1 (similarity to subgenotype profile = 98.05%)
Included <i>RT</i> domain codons:	82 - 344 (similarity to reference = 97.34%)
Included <i>SHB</i> protein codons:	73 - 227 (similarity to reference = 98.71%)
Mutations <i>RT</i> domain:	L91I, N118D, N131D, Y135S, Q215S, N248H, M309K
Mutations <i>SHB</i> protein:	T127P, S207R

HBV ilaç direncinde In/del analizinin önemi

- H.Y. 22 yaş/kadın/istanbul
- LAM +TDF kombinasyon tedavisinde
- HBV viral yük: 16 000 000 IU/ml
- HBeAg: pozitif
- ALT/AST: 124/85 U/L
- Biyopsi: HAİ: 3, Fibrozis:3
- HBV genotip: D
- HBV subgenotip: D1
- HBV rekombinasyon: yok
- In/del: pozitif
- Polimeraz geni mutasyonu: A194X
- HBsAg geni mutasyonu: yok
- Adapvem: negatif
- Hastanın HBV *pol* geni rt domaininde 24 bazlık bir delesyon saptandı.
- Delesyonlu virüs popülasyonu tahminen % 20 civarında.
- Delesyona uğrayan nükleotid dizisi: TCTAATTCCAGGATCTTCAACCAC
- Silinen aminoasitler: STSRNINY
- Silinen aminoasitler, *pol* geni mutasyonlarını içermediği için in/del etkisiz.

In/del analizi

Genom üzerinde **insersiyonun** tanımlanması ve klinik önemi

Summary Data

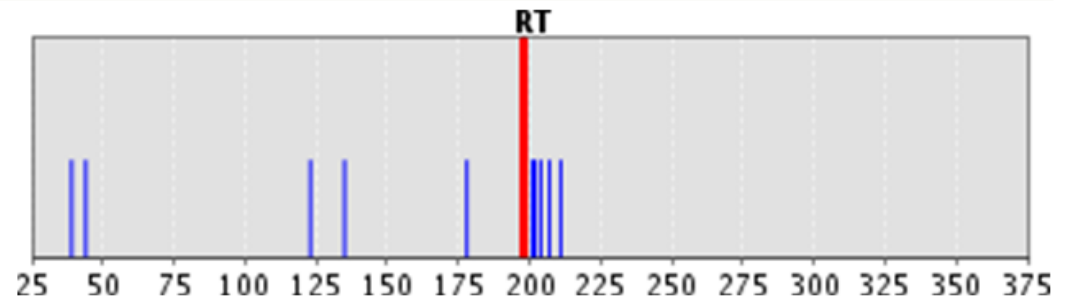
Sequence includes RT: codons: 36 - 222

RT AA Insertion: codon 197

- AA: V
- NA: GTT

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	<i>None</i>
RT	Ambiguous Positions:	<i>None</i>
RT	Unusual Residues:	197, 198, 199



Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance. Red lines indicate QA problems.

Soru & Cevap

