

Antiviral Direnç Analizlerinde Yeni Yaklaşımlar

Doç. Dr. Murat Sayan
Kocaeli Üniv. Hast.
PCR Birim Sorumlusu Öğr. Üyesi.
E-posta: sayanmurat@hotmail.com
Tel: 0533 6479020



7-8 Eylül 2013, Sapanca.

Chronic Hepatitis B

Approved drugs

Interferons



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

**Combined antiviral and
immunomodulatory effect**

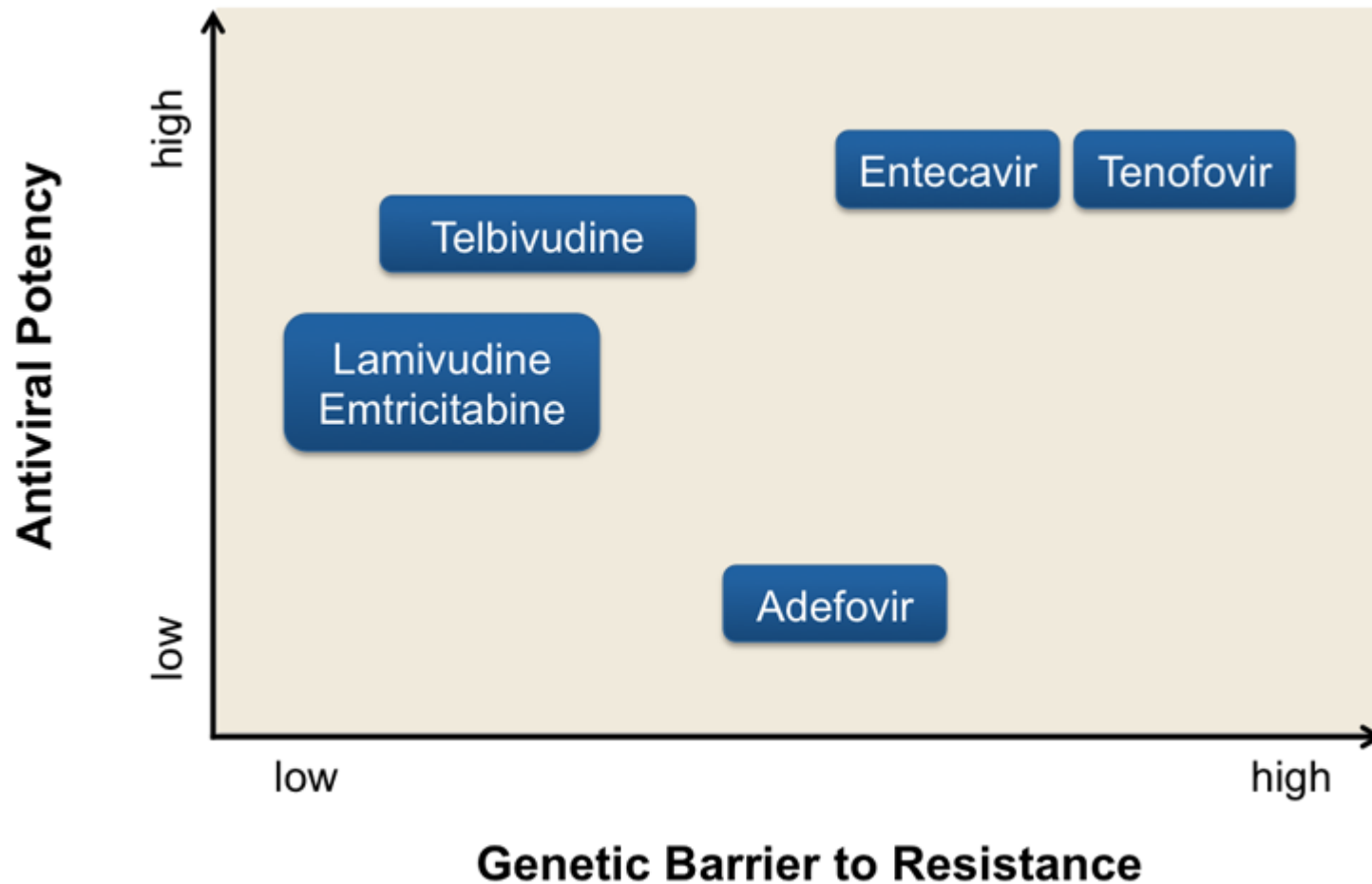
Nucleoside/nucleotide analogues



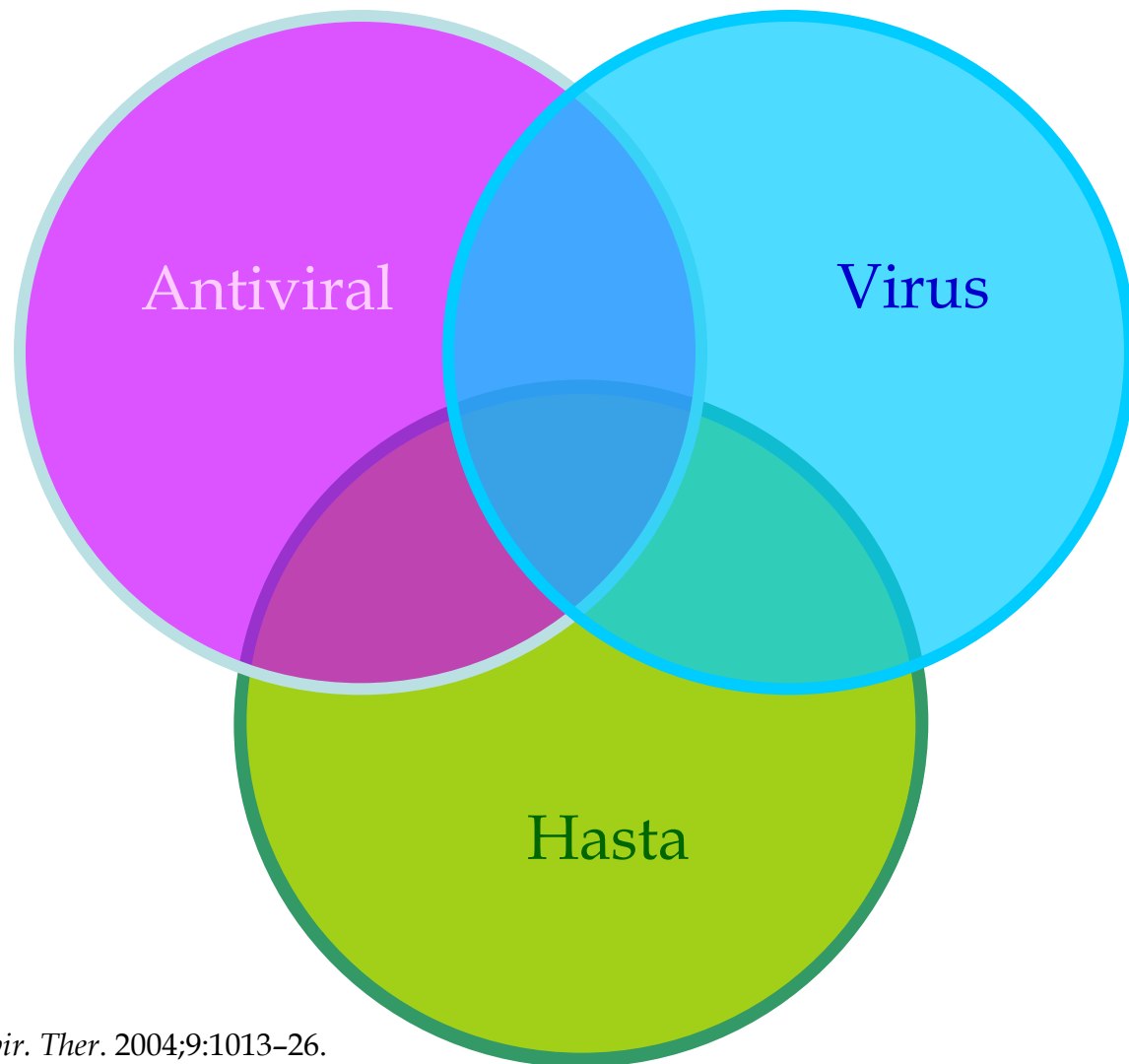
- Lamivudine (*Zeffix*)
- Adefovir (*Hepsera*)
- Entecavir (*Baraclude*)
- Telbivudine (*Sebivo*)
- Tenofovir (*Viread*)

Direct antiviral effect

Kronik hepatit B'nin uzun süreli tedavilerinde direnç sorunu ile karşılaşılmaktadır.

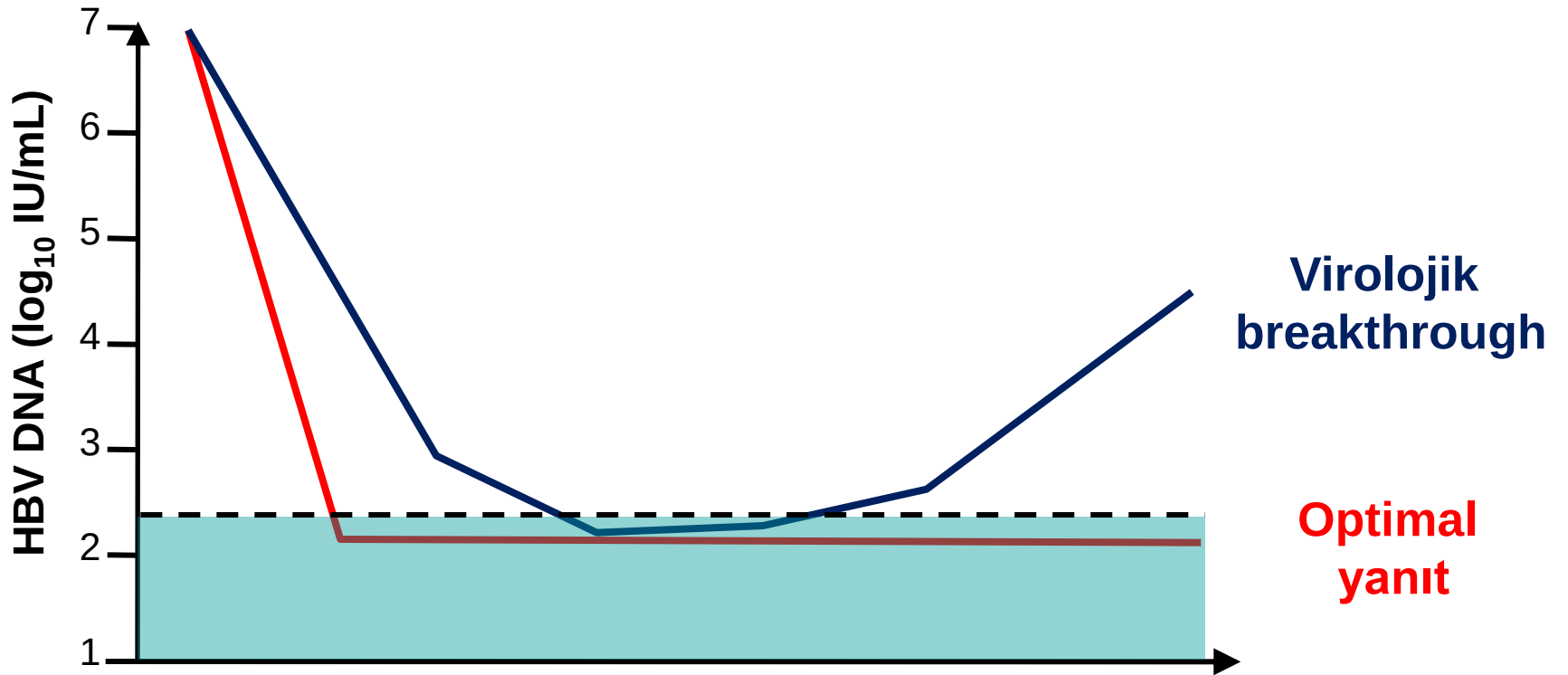


Virolojik breakthrough

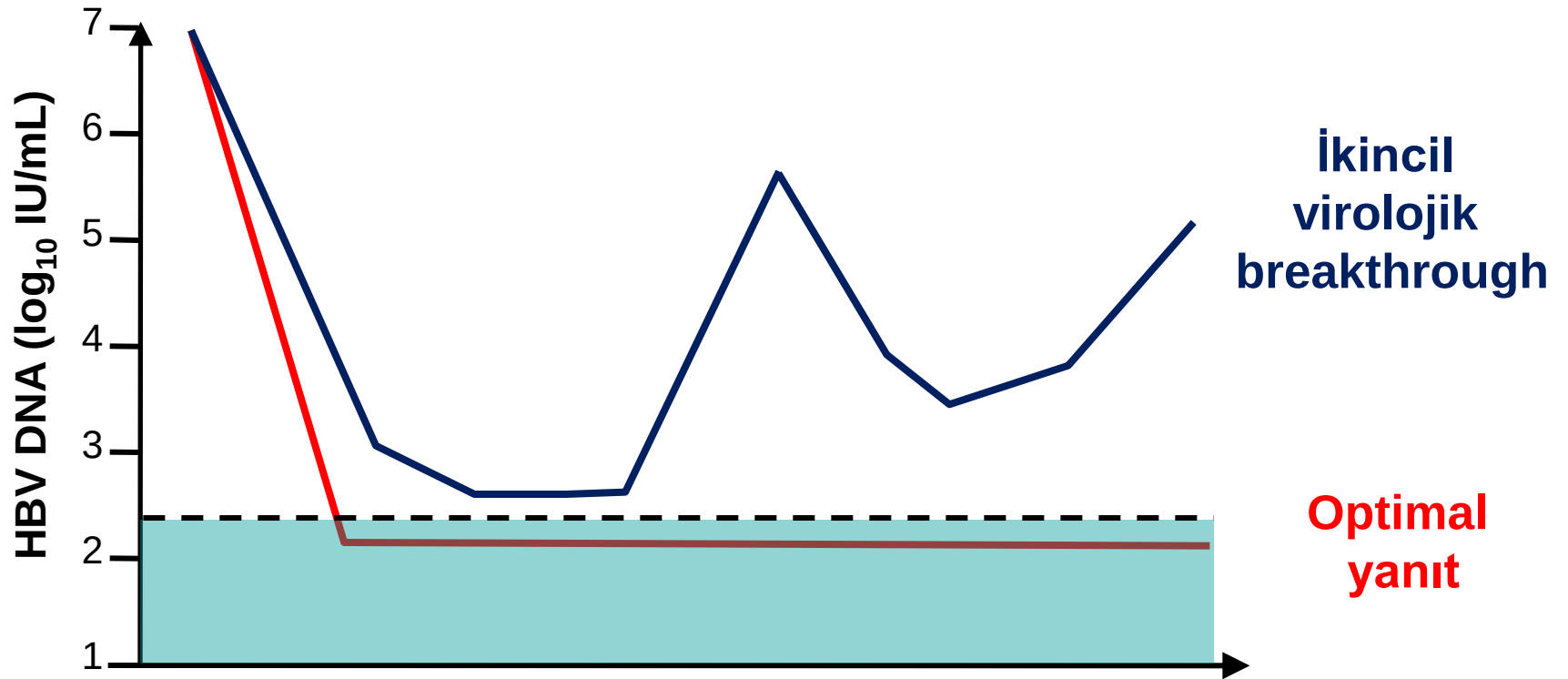


Virolojik breakthrough: direnç mi?

Breakthrough: dip seviyeye göre HBV DNA'nın serumda $\geq 1 \log_{10}$ artışı



İkincil virolojik breakthrough: direnç mi? ne tür bir direnç?



Kronik hepatit B tedavisinde çapraz direnç

Table 5 (revised). Cross-resistance data for the most frequent resistant HBV variants. The amino-acid substitution profiles are shown in the left column and the level of susceptibility is given for each drug: S (sensitive), I (intermediate/reduced susceptibility), R (resistant) [140].

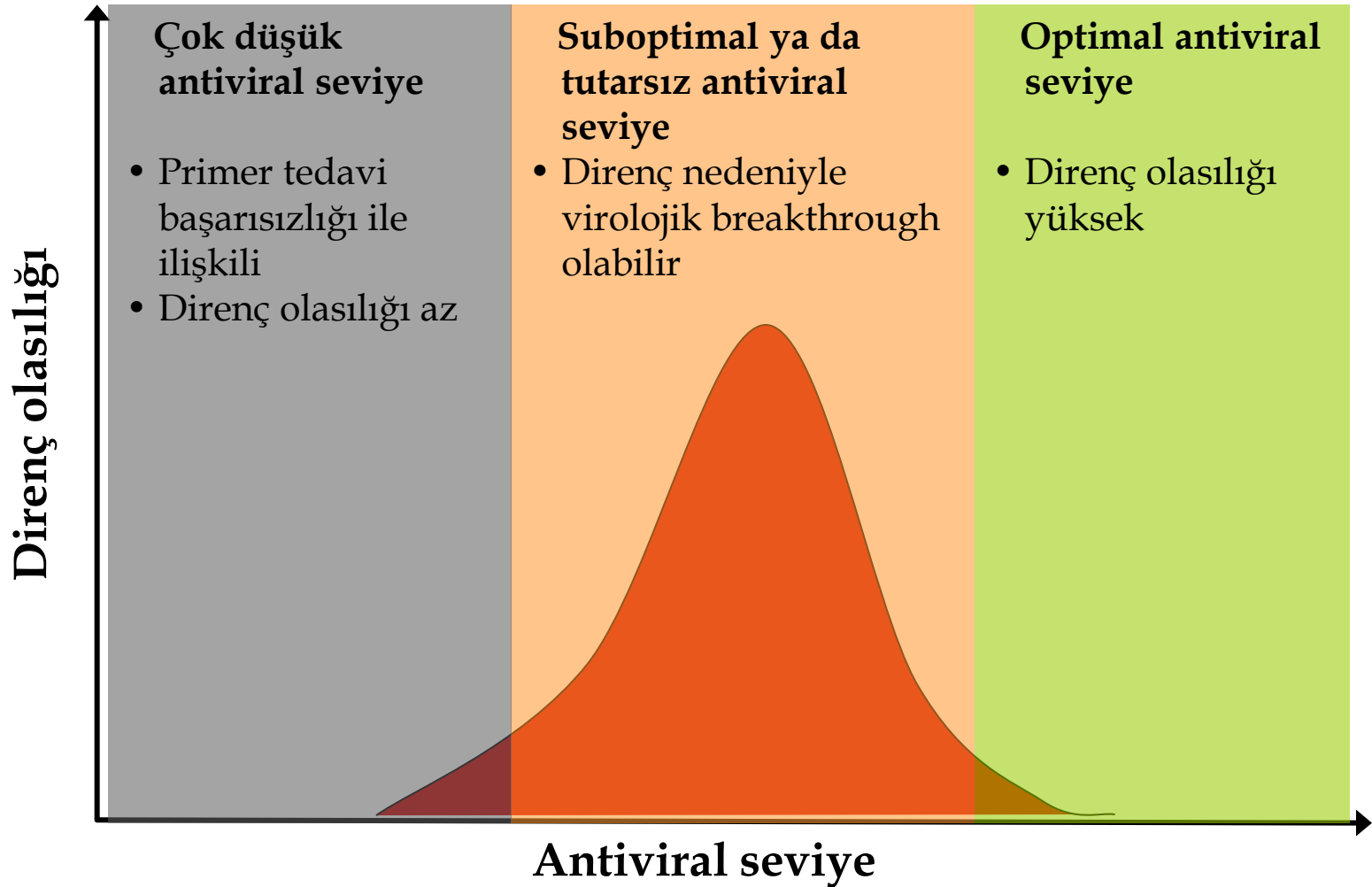
HBV variant	Level of susceptibility				
	Lamivudine	Telbivudine	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
Wild-type	S	S	S	S	S
M204V*	R	S	I	S	S
M204I	R	R	I	S	S
L180M + M204V	R	R	I	S	S
A181T/V	R	R	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
A181T/V + N236T	R	R	S	R	I/R
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

*Single M204V mutation is not usually detected in clinical practice; its cross-resistance profile has been mainly studied *in vitro*.

Corrigendum to: “EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection” [J Hepatol 2012;57:167–185]

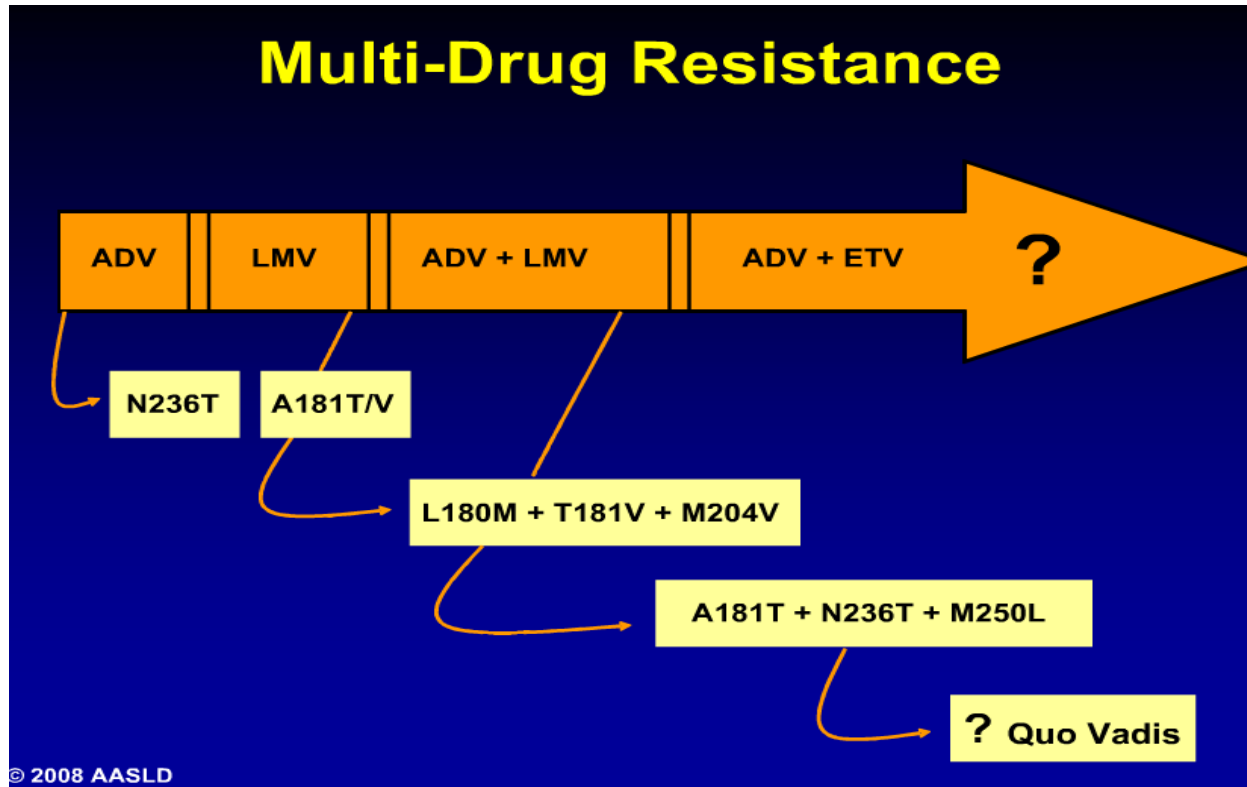
European Association for the Study of the Liver*

Suboptimal yanıt ve antiviral seviye



Çok ilaca dirençli HBV varyantları

- Kural: Farklı sınıftan en az iki nükleoz(t)id analoguna, çapraz olmaksızın direnç saptanmalıdır.



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

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 Direnç

Dirençli viral varyantın tedavi sırasında saptanması

Fenotipik Direnç

Spesifik antivirallerin *in vitro* ortamda inhibitör konsantrasyonlarının (IC) belirlenmesi

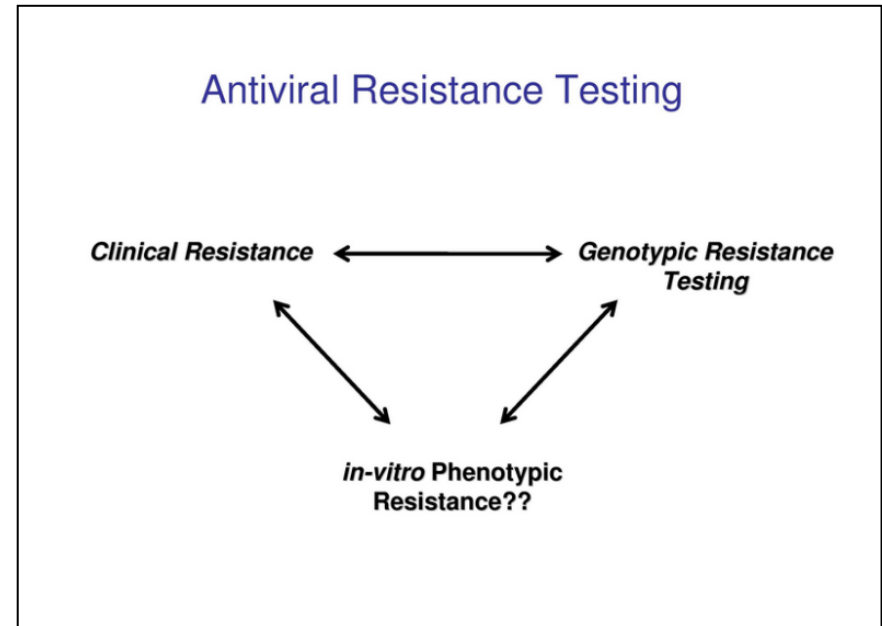
Antiviral direncin analizi

Genotipik yöntemler

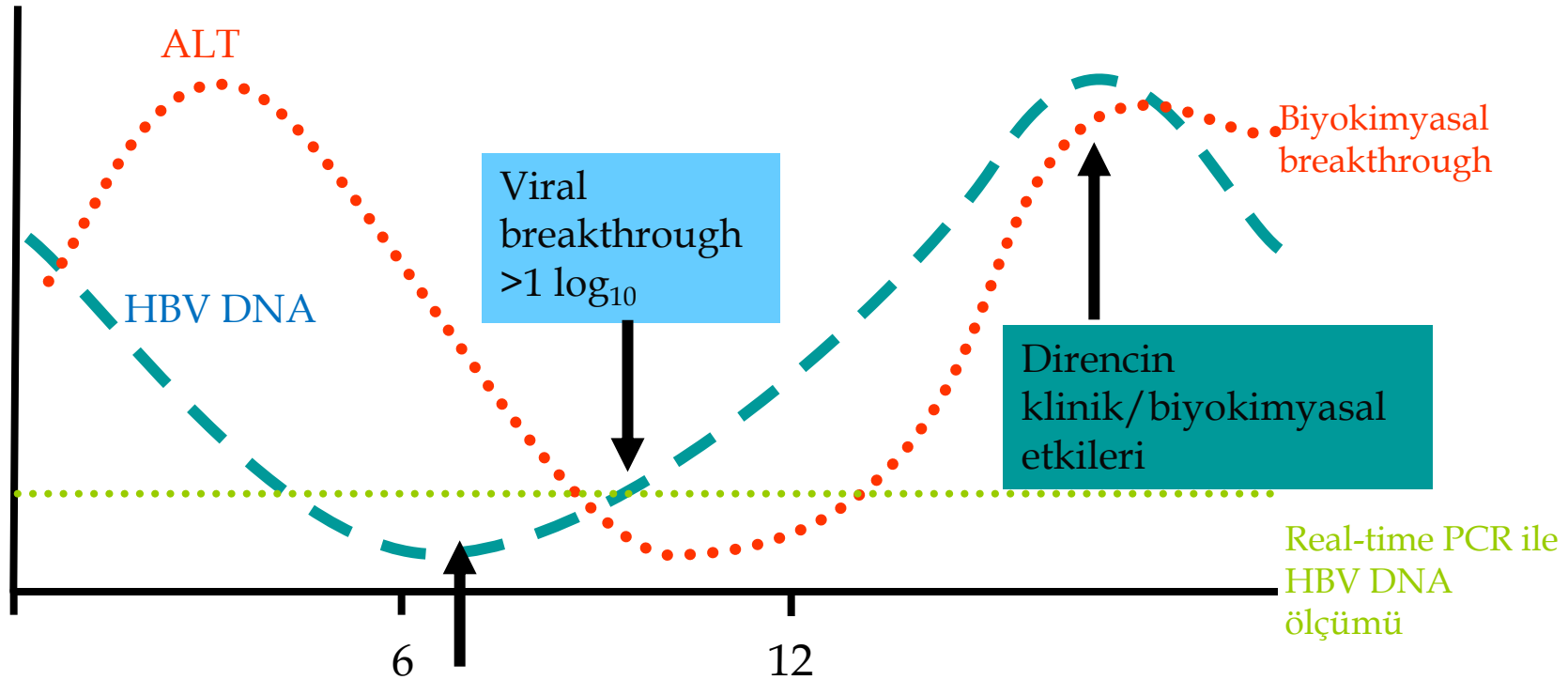
- **Viral populasyonun sekanslanması**
- Yeni nesil sekanslama
 - PCR ürünlerinin sekanslanması
 - Klonlanmış varyantların sekanslanması
- Line probe assay (LiPA)
- RFLP
- Real-Time PCR
- Matrix-assisted laser desorption/ionisation-Time of light Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Fenotipik Yöntemler

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



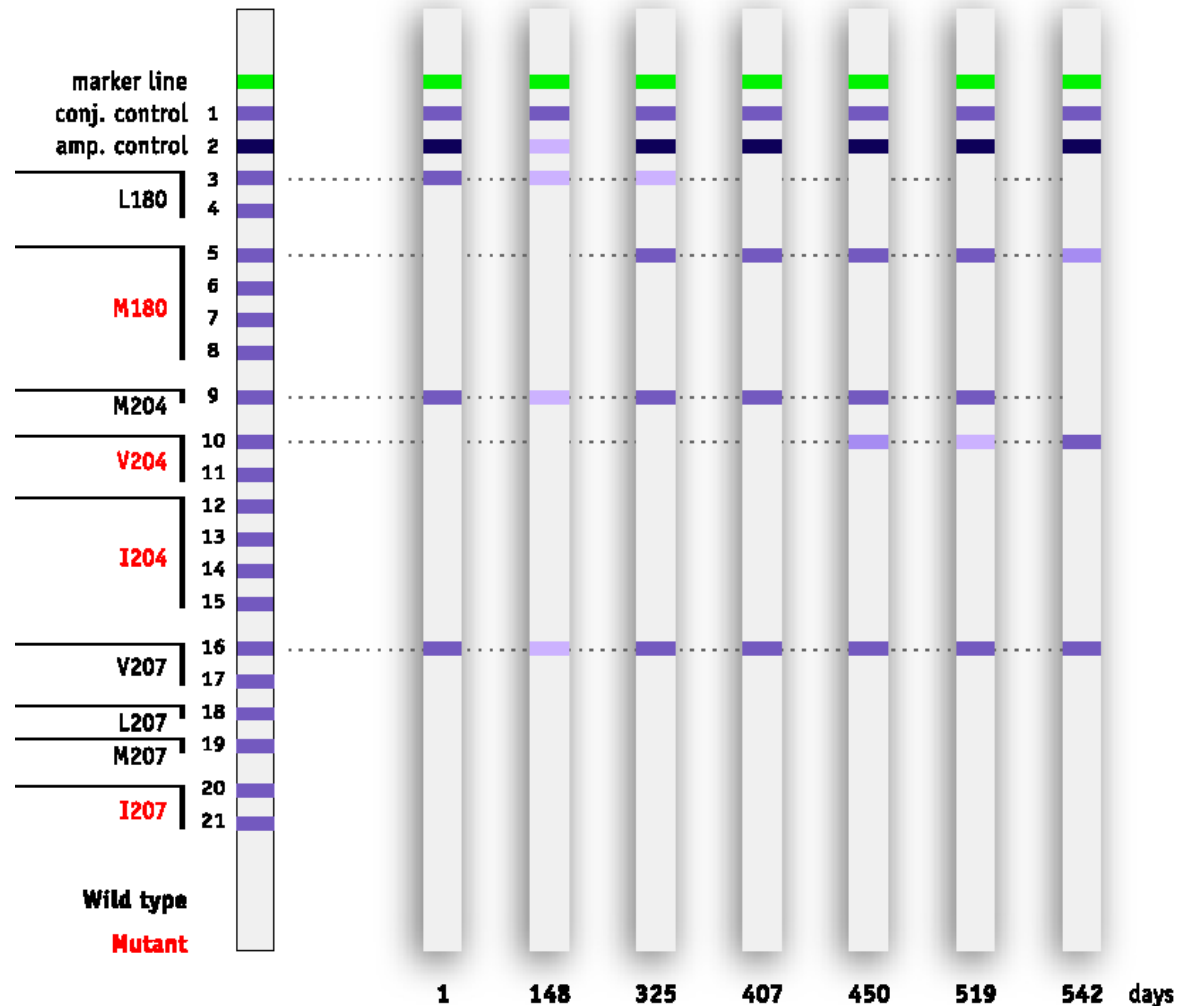
İlaç direncinin tanınması



Direncin tanımlanması

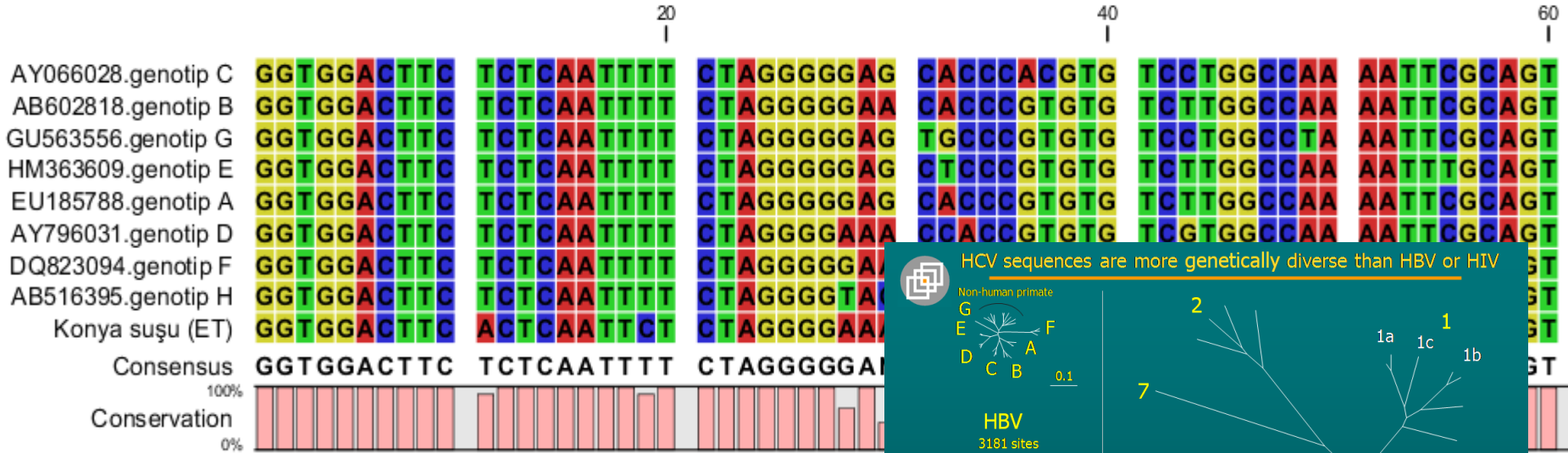
LiPA	+	+	+
RLFP	+	+	+
Populasyon sekanslama	-	+	+

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

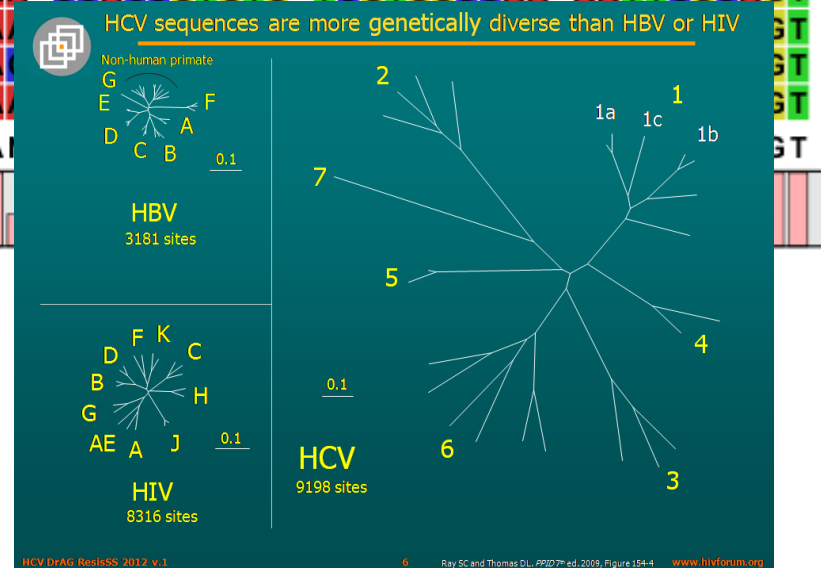


Viral populasyonun sekanslanması

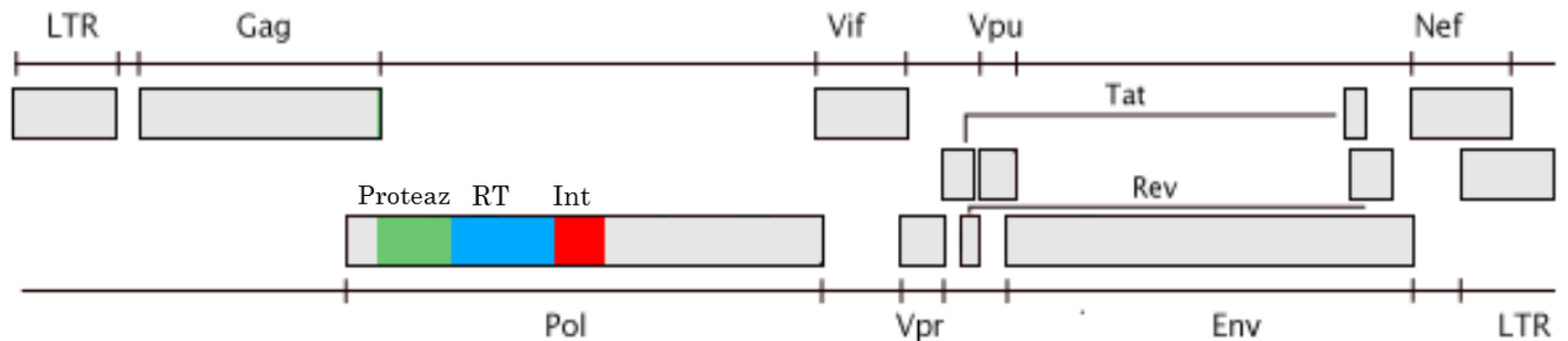
- Hedef DNA hakkında doğru ve geniş bir data sağlar
- Bilinen/bilinmeyen mutasyonları analiz etmek mümkündür.
- Az miktardaki dirençli varyantları saptamada başarılı değil.
- Zaman alıcı ve iş yoğunluklu bir yöntemdir.



Kendi rutinimizde HBV *pol*/RT geninde, yaklaşık >740 bp bir bölgeyi sekanslıyoruz.



HIV’de RT, proteaz ve integras bölgeleri antiretroviral tedavinin hedefidir.



Yeni nesil sekanslama; **pyrosekanslama**

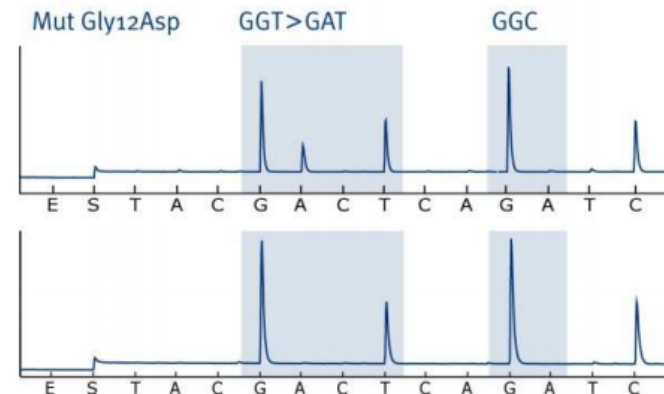
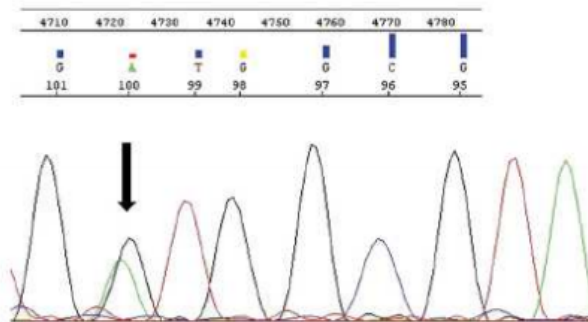


Sample & Assay Technologies

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

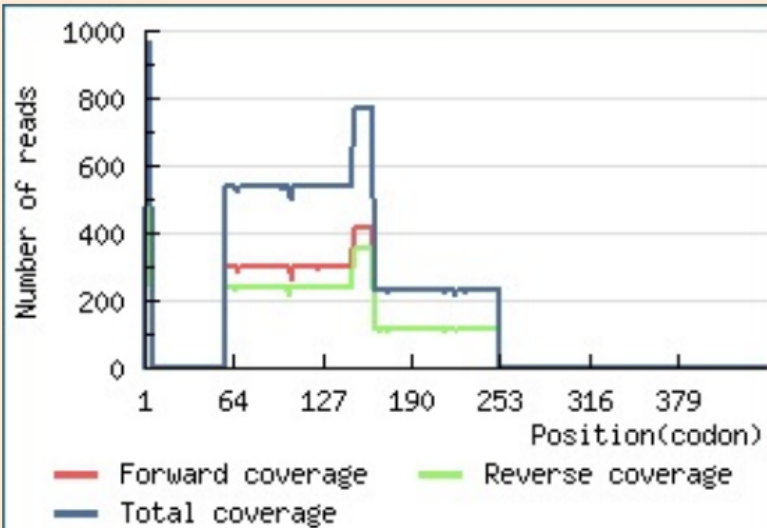


Yeni nesil sekanslama; **ultra deep sekanslama**

DeepChek®-HIV NGS Expert System

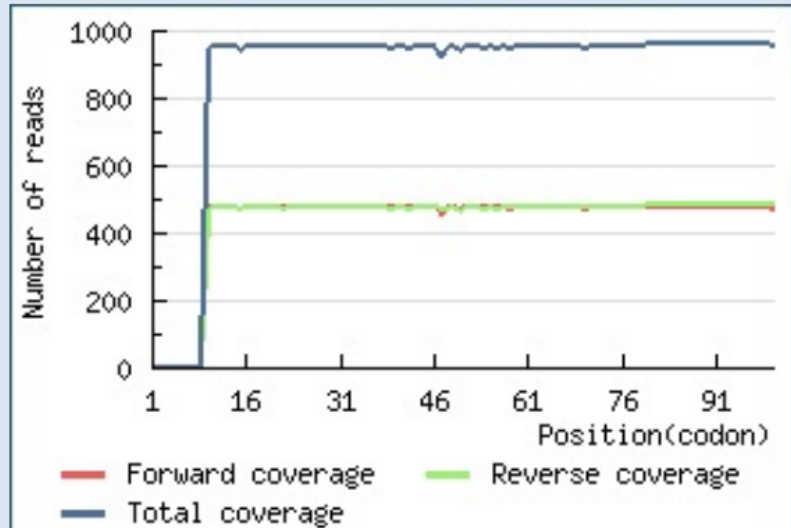
Coverage

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	

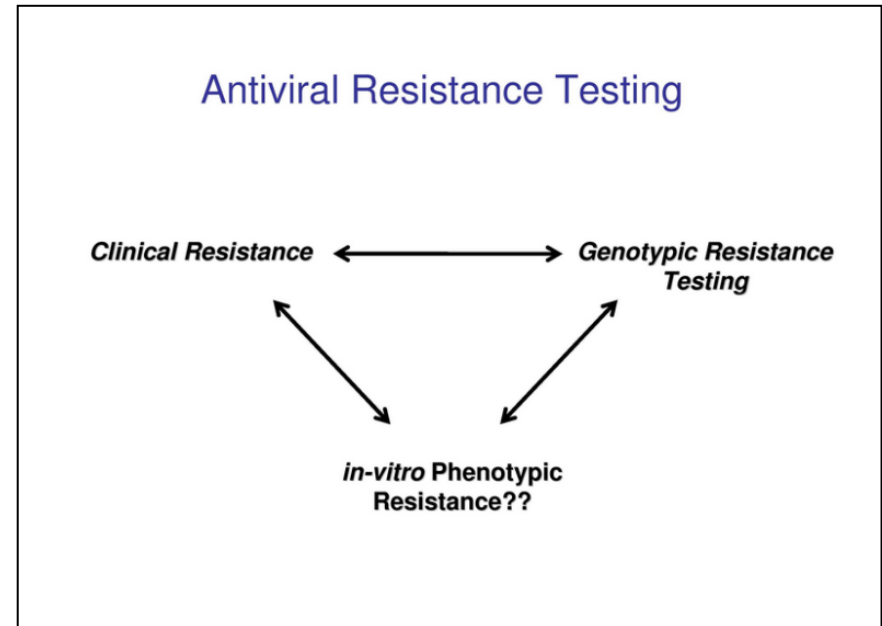
Antiviral direncin analizi

Genotipik yöntemler

- Viral popülasyonun 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

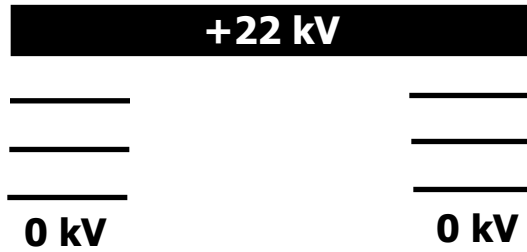


MALDI - TOF MS

Kütle Spektrometrisi

‘Elektrospray iyonizasyonu’

John Fenn,
2002 Kimya Nobel Ödülü

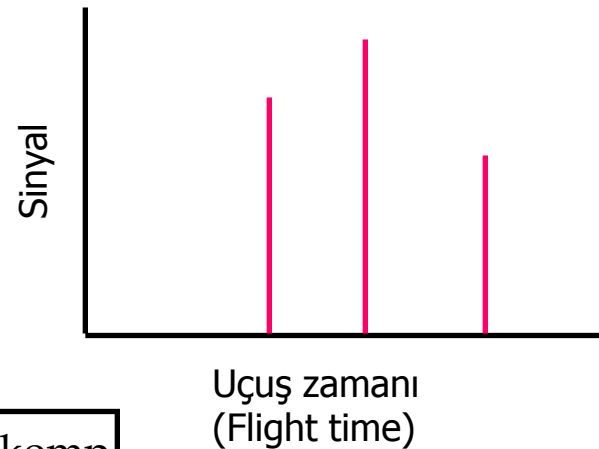
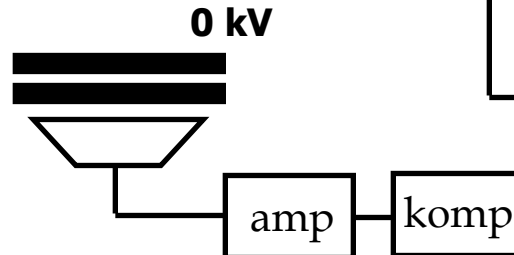
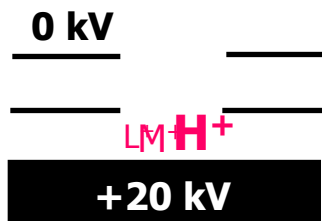


1) İyonlar kaynak bölgesine girerek yansıtıcıya doğru ilerler.

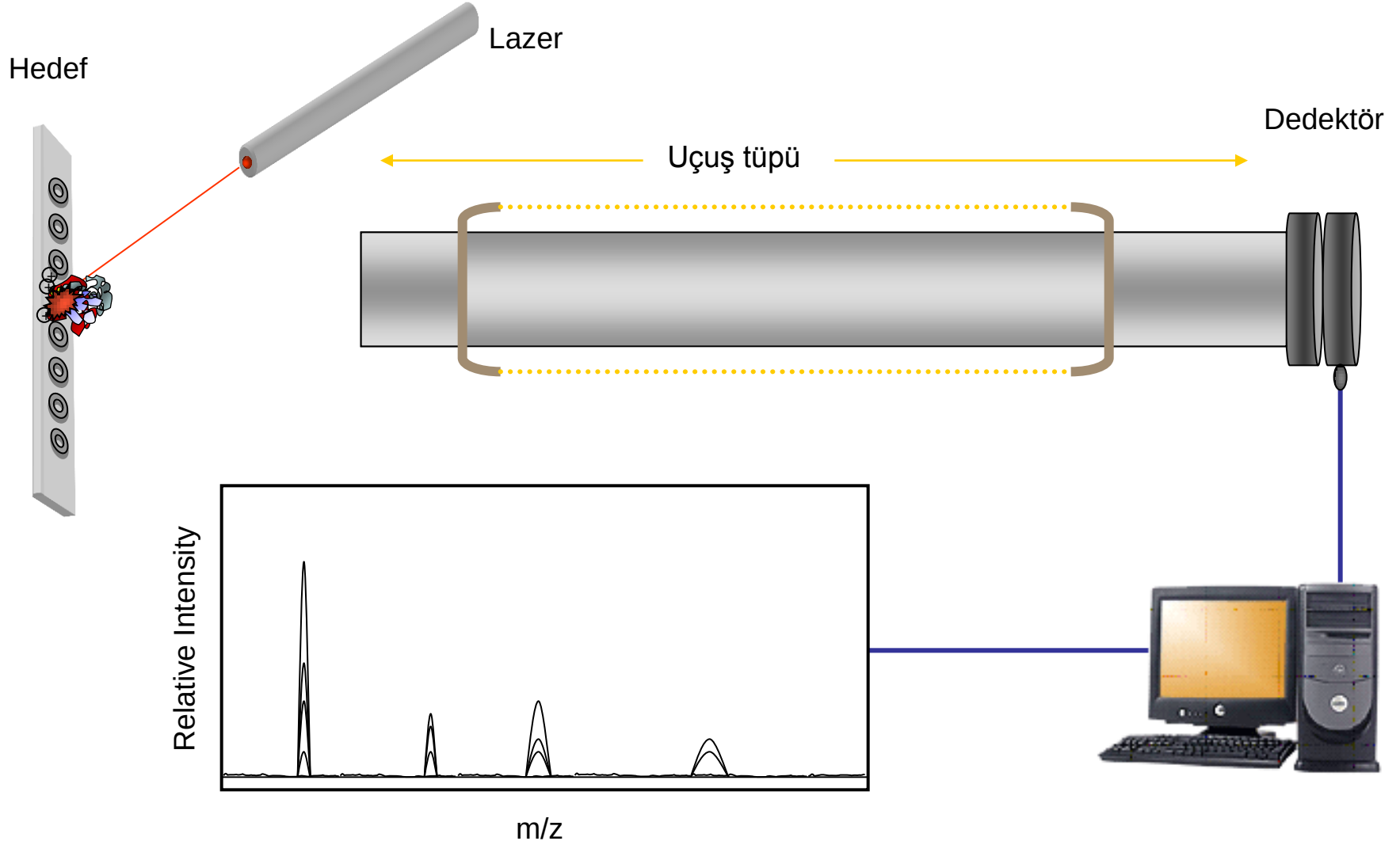
2) İyonlar, boşlukta sahip oldukları relatif kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayrılırlar.

3) İyonlar yansıtıcıya çarparak geri dönerler.

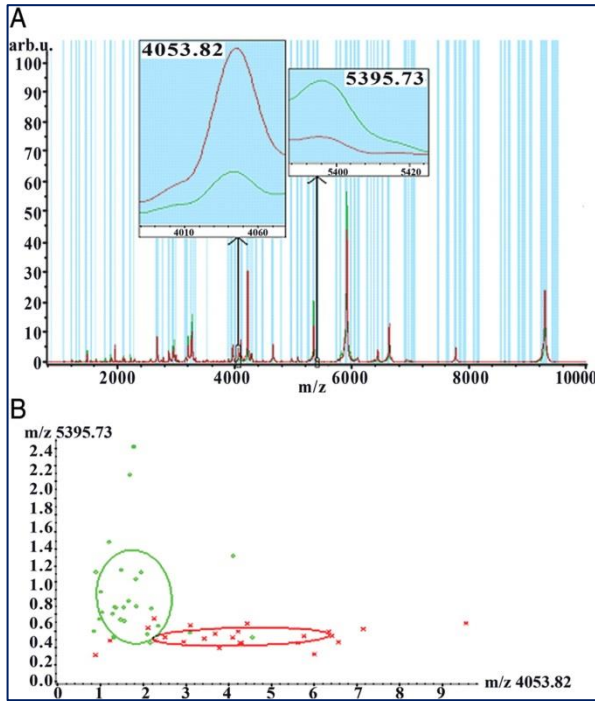
4) İyonlar detektöre çarparlar.



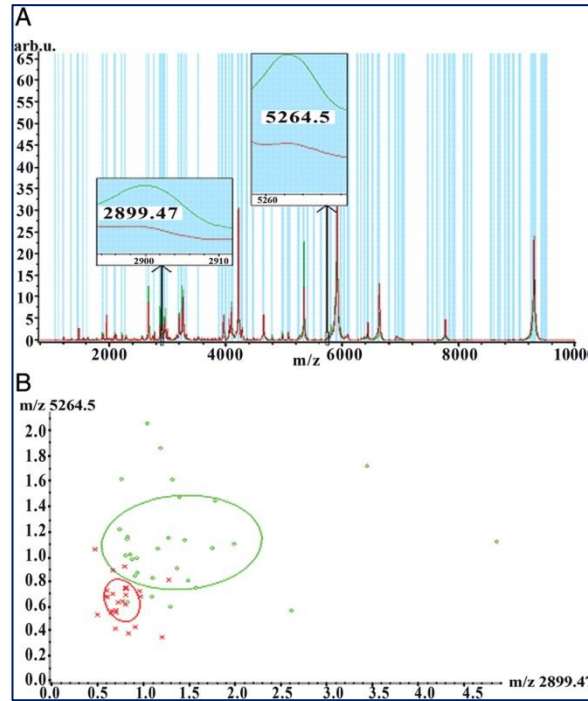
Kütle Spektrometrisi ile Proteomiks çalışması



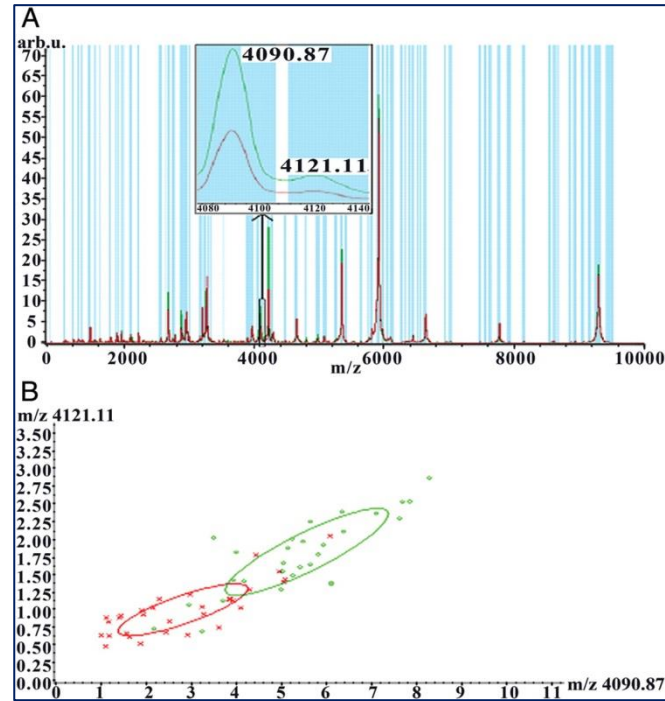
Kronik hepatit B'li hastalarda hepatoselüler karsinomun surveyansında MALDI TOF proteomik profilleme



I. Sağlıklı kontrol (kırmızı) ve HBV hastası (yeşil).



II. Sağlıklı kontrol (kırmızı) ve HCC hastası (yeşil).



III. HBV hastası (kırmızı) ve HCC hastası (yeşil).

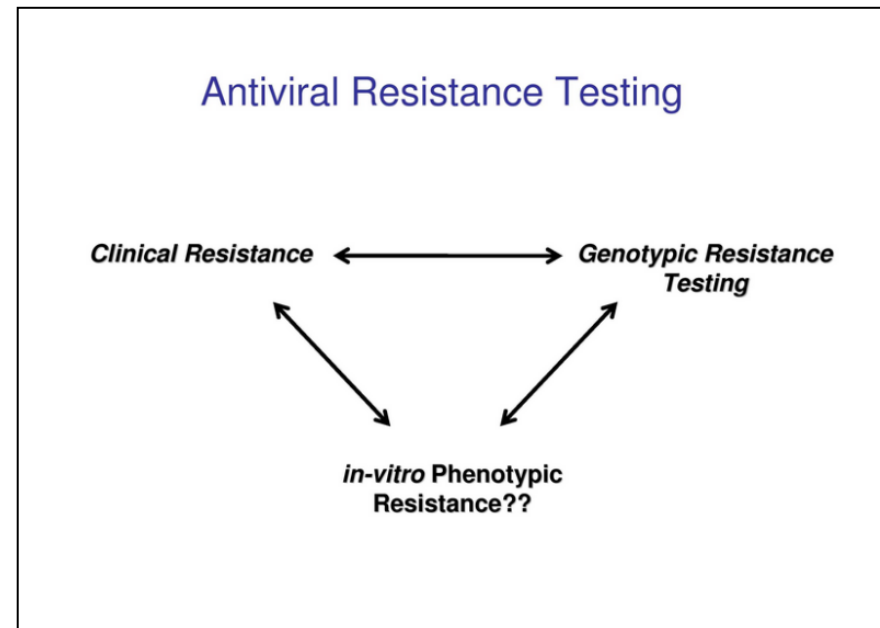
Antiviral direncin analizi

Genotipik yöntemler

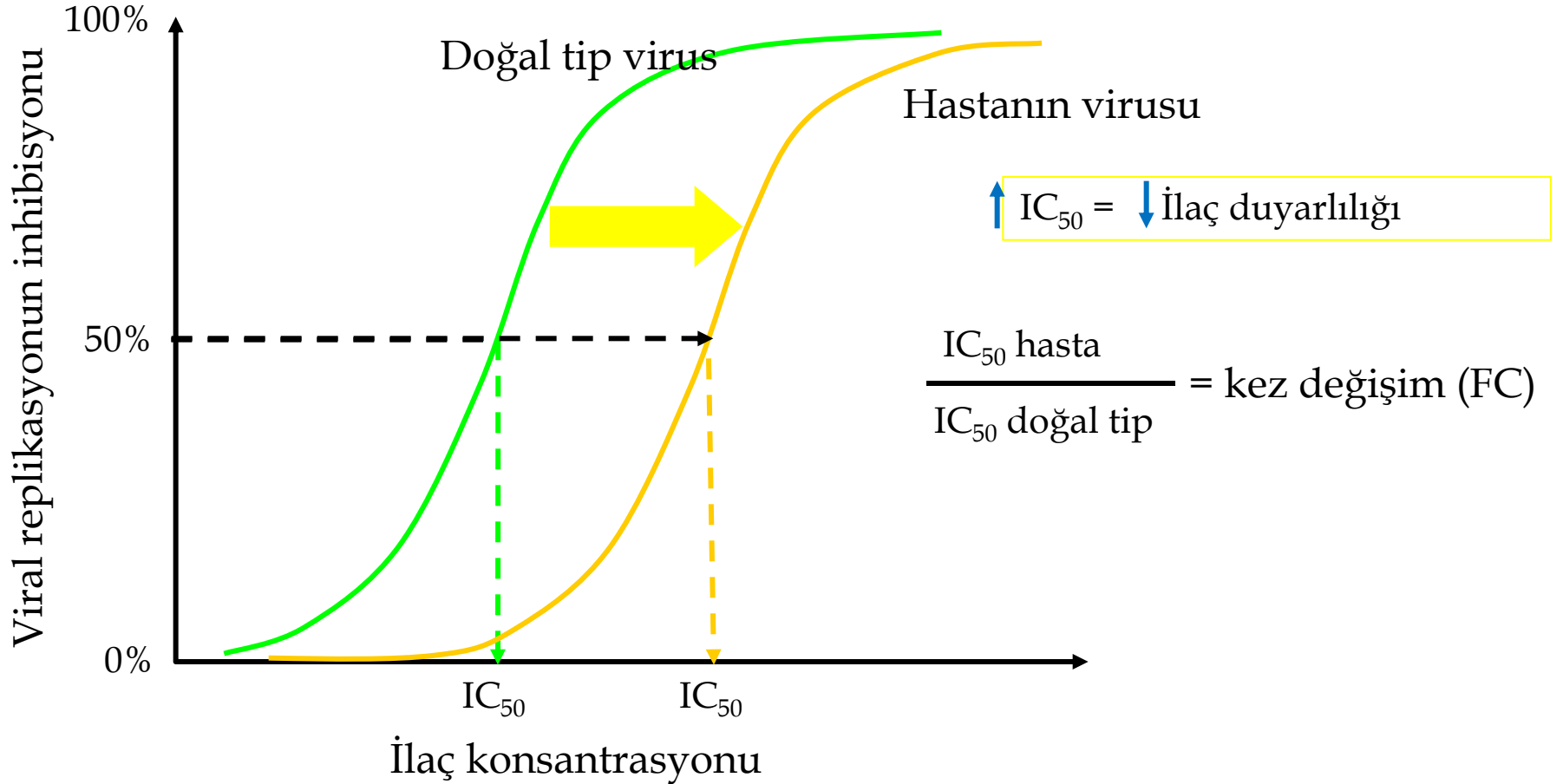
- Viral populasyonun sekanslanması
- Yeni nesil sekanslama
 - PCR ürünlerinin sekanslanması
 - Klonlanmış varyantların sekanslanması
- Line probe assay (LiPA)
- RFLP
- Real-Time PCR
- Matrix-assisted laser desorption/ionisation-Time of light Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Fenotipik Yöntemler

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



In vitro fenotipik yöntem nasıl çalışır?



Tablo 1. Antiviral ilaç direnci analizlerinde kullanılabilecek metodların karşılaştırılması

	Viral popülasyonun sekanslanması	Pyrosekanslama/ Ultra deep sekanslama	LiPA	Klonlama	RFLP
Teknik	Popülasyon sekanslama	Yeni nesil sekanslama (Sanger sonrası)	Oligonukleotid proba hibridleme	PCR ürün klonlaması	PCR ve kesilmiş uzunlukta polimorfizm analizi
Duyarlılık	Sekans içeriği ve hedef bölgenin ikincil yapılarından etkilenebilir. Minör subpopülasyon kaçırılabilir	Sekans içeriğinden ve hedef bölgenin ikincil yapılarından etkilenebilir	Minör subpopülasyon kaçırılabilir	Sekans içeriğinden etkilenebilir	Minör subpopülasyon kaçırılabilir
Analitik duyarlılık	Mutant varyant oranı > %10 olmalı	Mutant varyant oranı > %1 olmalı	Mutant varyant oranı > %5 olmalı	Analitik duyarlılık sorunu yok	Mutant varyant oranı > %5 olmalı
Özgüllük	Hatalı sinyaller okunabilir	Hatalı sinyaller okunabilir	Yeni mutasyonlar için yeniden dizayn gerekiyor	Hatalı sinyaller okunabilir	Yeni mutasyonlar için yeniden dizayn gerekiyor
Mutasyon tanımlama	Bilinen ve potansiyel tüm yeni mutasyonlar analiz edilebilir	Bilinen ve potansiyel tüm yeni mutasyonlar analiz edilebilir	Sadece ticari olarak sunulan mutasyonlar analiz edilebilir	Bilinen ve potansiyel tüm yeni mutasyonlar analiz edilebilir	Bilinen mutasyonlar analiz edilebilir.
Kullanılabilirlik	Saflaştırılmış ve yeterli PCR ürünü gerekiyor (Viral yük > 1000 IU/ml)	Saflaştırılmış ve yeterli PCR ürünü gerekiyor (Viral yük > 1000 IU/ml)	Yeterli PCR ürünü gerekiyor (Viral yük >200 IU/ml)	Yeterli sayıda klon gerekiyor (Viral yük > 1000 IU/ml)	Restriksiyon enzim setleri gerekiyor (Viral yük > 1000 IU/ml)
Maliyet	Düşük/kabul edilebilir	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Zorluk derecesi	Zaman alıcı, pahalı donanım ve ileri deneyimli personel gerekmektedir	Zaman alıcı, pahalı donanım ve ileri deneyimli personel gerekmektedir	İleri deneyimli personel gerekmektedir	Zaman alıcı, pahalı donanım ve ileri deneyimli personel gerekmektedir	Zaman alıcı ve ileri deneyimli personel gerekmektedir
Rutin olarak;	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun değil	Uygun değil
Edinme	Manuel	Manuel/Ticari	Ticari	Manuel	Manuel

HBV ilaç direncinde insersiyon/delesyon (In/del) analizi

Genom üzerinde **insersiyonun** tanımlanması ve klinik önemi

Summary Data

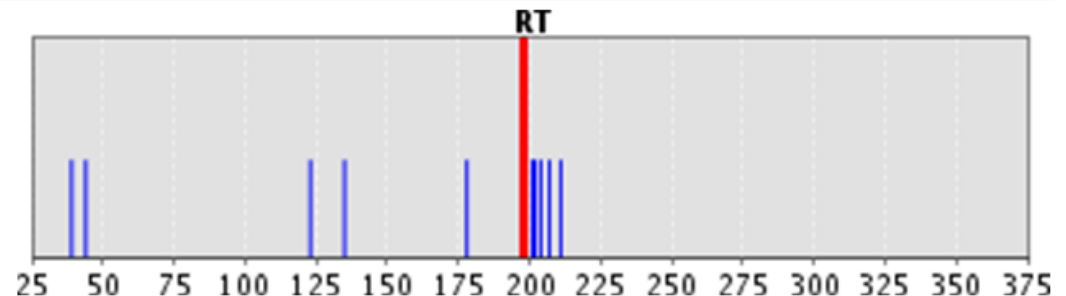
Sequence includes RT: codons: 36 - 222

RT AA Insertion: codon 197

- AA: V
- NA: GTT

Sequence Quality Assessment

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



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

HBV ilaç direncinde insersiyon/delesyon (In/del) analizi

Genom üzerinde delesyonun tanımlanması ve klinik önemi

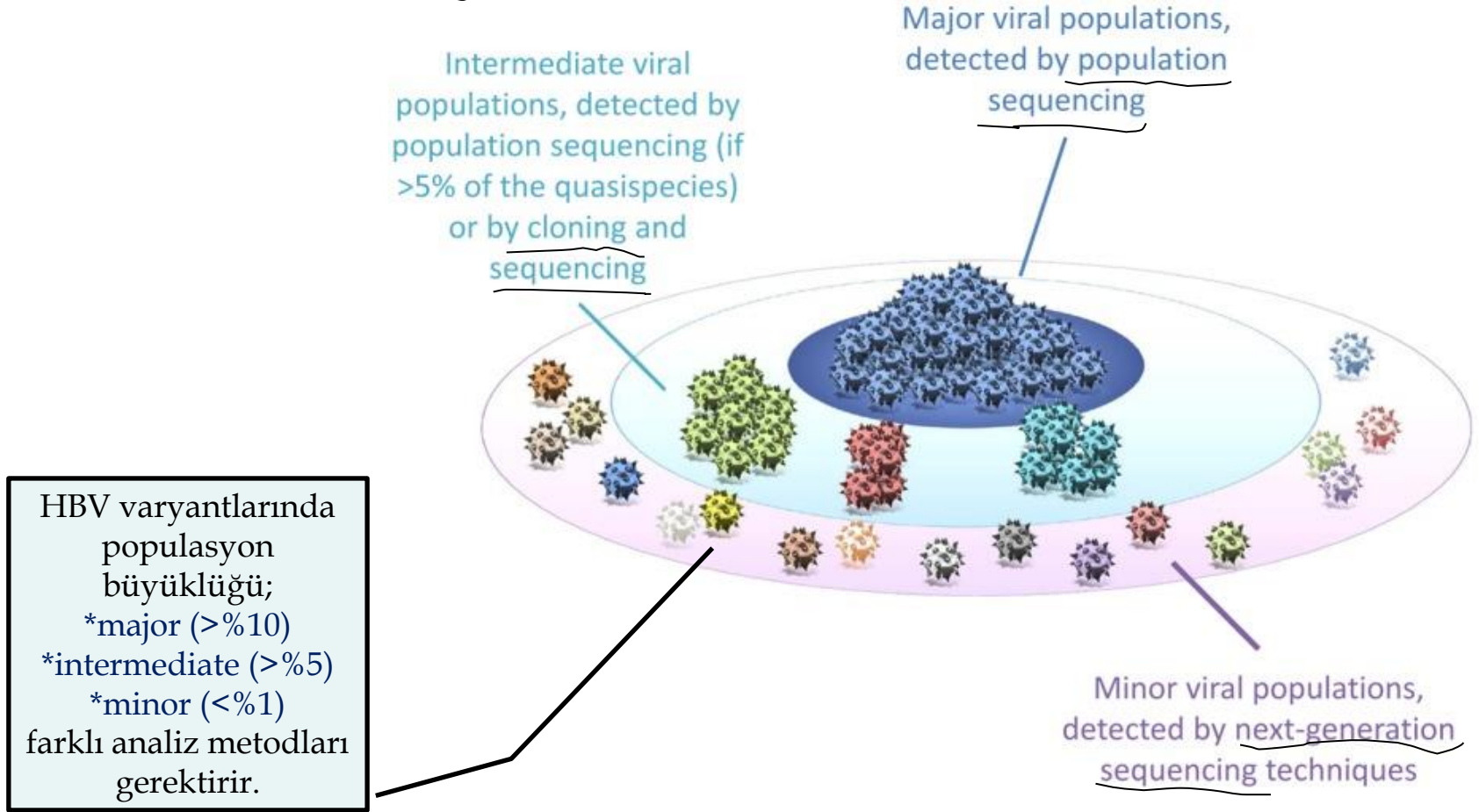
- H.Y. 22 yaş/kadın/istanbul
- LAM +TDF kombinasyon tedavisinde
- HBV viral yük: 16 000 000 IU/ml
- HBeAg: pozitif
- ALT/AST: 124/85 U/L
- Biyopsi: HAİ: 3, Fibrozis:3
- HBV genotip: D
- HBV subgenotip: D1
- HBV rekombinasyon: yok
- Polimeraz geni mutasyonu: A194X
- HBsAg geni mutasyonu: yok
- Adapvem: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

Ardışık oral antiviral tedavi çoklu HBV ilaç direnci yaratabilir.

Sequential NUCs therapy	Resistance detection method	Primary resistance	Compensatory resistance	Resistance to
LAM	Population sequencing (13th month)	M552V (rtM204V)	L528M (rtL180M), V555V (rtV207V)	LAM
LAM + ADV	NT	NT	NT	-
ADV	LIPA (11th month)	rtN236T	-	ADV, TDF (intermediate)
ADV	Clonal analysis (on 6 clones) (11th month)	rtM204I rtA181V	rtL80V	LAM, ADV, LdT ,
ADV + ETV	Direct sequencing (5th month)	-	rtQ215H	-
ETV	Direct sequencing (18th month)	tM204V	<u>rtV173L</u> , rtL180M	LAM , ETV (intermediate)
ETV	LIPA (18th month)	rtM204V, rtN236T, rtA181V/T	<u>rtV173L</u> , rtL180M, rtL80I/V	LAM, ADV and TDF (intermediate)
ETV + TDF	Direct sequencing (4th month)	rtM204V	<u>rtV173L</u> , rtL180M	LAM and ETV (intermediate)
ETV + TDF	LIPA (4th month)	rtM204V	<u>rtV173L</u> , rtL180M	LAM and ETV (intermediate)
ETV + TDF	Clonal analysis (on 5 clones) (4th month)	rtM204V	<u>rtV173L</u> , rtL180M	LAM and ETV (intermediate)

M.Sayan, et al. Multidrug – resistant hepatitis B virus strain in a chronic Turkish patient: A case report.
Hepatitis Monthly 2010;10(2):141-146

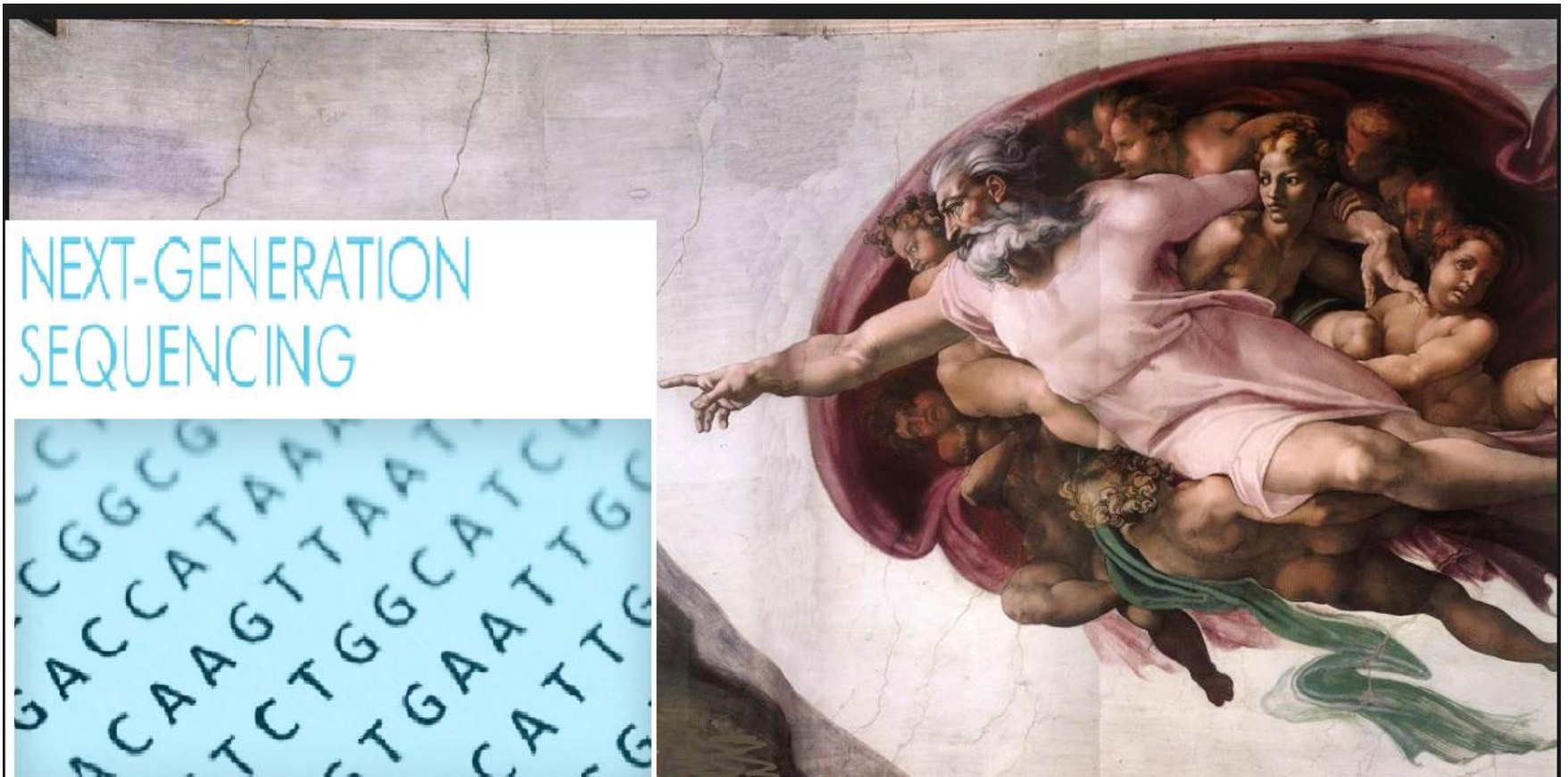
Günün sonunda
hedeflenen HBV varyantlarına uygun
analiz metodu seçilmelidir.



Creation of Adam, 1510

Cappella Sistina, Vatican City, Vatican

Painting, Fresco, 280 x 570 cm



Soru & Cevap

