

## بررسی توالی ژن M2 ویروس‌های آنفلانزا جداشده از بیماران ایرانی در سال ۱۳۹۳ به منظور تعیین مقاومت به آدامانتان‌ها

نویسندگان: حوریه صادری<sup>۱</sup>، فریدا بهزادیان<sup>۲\*</sup>، الهام مؤثر<sup>۳</sup>، پرویز اولیاء<sup>۴</sup>

۱. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲. پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران.
۳. پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: fbehzadian@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: فریدا بهزادیان

### چکیده

مقدمه و هدف: آدامانتان‌ها (آمانتادین و ریمانتادین) سال‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت با ویروس آنفلانزای A استفاده شده است. این داروها مانعت‌کننده‌های پروتئین M2 این ویروس می‌باشند و برخی از جانمایی‌های اسید آمینه در قسمت بین‌غشایی این پروتئین سبب مقاومت به این داروها می‌شود. این مطالعه به منظور بررسی تغییرات توالی نوکلئوتیدی مرتبط با مقاومت به آدامانتان‌ها در ژن M2 سابتایپ‌های H1N1 و H3N2 جداشده از بیماران ایرانی در سال ۱۳۹۳ صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: سواب‌های بینی گرفته‌شده در تهران طی زمستان سال ۱۳۹۳ از بیماران دارای علائم شبیه آنفلانزا با روش Real-Time Reverse Transcription PCR مورد بررسی قرار گرفتند تا حضور سابتایپ‌های H1N1 و H3N2 ویروس آنفلانزا تیپ A در آن‌ها تعیین گردد. سپس برخی از نمونه‌های مثبت از نظر این ویروس‌ها در کشت سلولی تکثیر داده شدند. برای تکثیر ژن M با روش Reverse Transcription PCR و آنالیز ژنتیکی چهار جدایه از هر سابتایپ به‌طور تصادفی انتخاب گردیدند.

نتایج: مطالعه جهش‌های نقطه‌ای در توالی ژن M2 جدایه‌های مورد بررسی نشان‌دهنده حضور شایع‌ترین جهش منجرشونده به مقاومت به آدامانتان‌ها یعنی جایگزینی اسید آمینه آسپاراژین به‌جای سرین در موقعیت ۳۱ در همه آن‌ها بود. سایر جهش‌های ایجادکننده مقاومت به آدامانتان‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه و گزارش‌های سایر محققان که نشان‌دهنده شیوع بالای جهش‌یافته‌های مقاوم به آدامانتان در جدایه‌های انسانی ویروس آنفلانزای A است، پیشنهاد می‌شود که آدامانتان‌ها برای درمان آنفلانزا استفاده نشوند.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلانزای A، پروتئین M2، آدامانتان، جهش

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و چهارم-شماره ۱۳۰  
شهریور ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۳  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷  
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۴

## مقدمه

پروتئین M1 و M2 توسط یکی از هشت قطعه ژنومی ویروس آنفولانزای A کد می‌شوند (۵). متأسفانه، مقاومت به آدامانتان‌ها در سویه‌های ویروس آنفولانزای A جداسازی شده در مناطق مختلف جهان گزارش شده و رو به افزایش است و در سویه‌های مقاوم، جانشینی‌های اسید آمینه در قسمت بین غشائی پروتئین M2 در اسید آمینه‌های ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۱، ۳۴، ۳۸ یا ۴۱ دیده شده است (۱، ۱۲-۳). با وجود اهمیت سویه‌های مقاوم به آدامانتان‌ها، گزارش‌های کمی در این زمینه از ایران منتشر شده است (۱۳-۱۵). بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی حضور جهش‌های مقاومت به آدامانتان در هر دو ساب‌تایپ H1N1 و H3N2 ویروس آنفولانزای A جداسازی از بیماران در تهران صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

## جداسازی و شناسایی ویروس

در یک مطالعه مقطعی در زمستان ۱۳۹۳، نمونه سواب بینی بیماران دارای علائم بالینی آنفولانزا با روش Real Time Reverse Transcription PCR مورد بررسی قرار گرفت تا حضور ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 ویروس آنفولانزا تیپ A در آن‌ها مشخص شود. برای این منظور از کیت SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR ساخت شرکت Invitrogen آمریکا براساس روش توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی استفاده شد (۱۶). سپس برخی از نمونه‌های مثبت از نظر این ویروس‌ها به کشت سلولی MDCK تلقیح گردید. ویروس‌های آنفولانزای جداسازی شده تا زمان آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

تکثیر ژن M: چهار جدایه از هر ساب‌تایپ به طور تصادفی برای تکثیر ژن M با روش Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) و آنالیز ژنتیکی انتخاب گردیدند. ابتدا این جدایه‌ها دو بار در سلول MDCK تکثیر داده شدند. سپس با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک ویروسی ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما ایران، RNA

ویروس‌های آنفولانزا به عنوان عامل اصلی بیماری‌های تنفسی حاد در دنیا شناخته شده‌اند. سازمان بهداشت جهانی گزارش کرده است که حدود یک میلیارد مورد عفونت آنفولانزای فصلی در هر سال رخ می‌دهد که ۳ تا ۵ میلیون بیماری حاد و ۳۰۰ تا ۵۰۰ هزار مرگ را سبب می‌گردد. امروزه در جمعیت‌های انسانی دو ساب‌تایپ ویروس آنفولانزای A یعنی H1N1 و H3N2 در گردش می‌باشند (۱). به منظور کاهش دوره بیماری، ترشح ویروس و میزان بستری شدن و مرگ در افراد عفونت یافته با ویروس آنفولانزای A از داروهای ضدویروسی استفاده می‌شود (۲). این داروها برای پیشگیری از عفونت با این ویروس‌ها نیز مصرف می‌شدند؛ ولی با ایجاد واکنش‌های مؤثر، از این امر کاسته شده است (۳). آدامانتان‌ها یعنی آمانتادین و ریمانتادین، داروهایی هستند که سال‌هاست برای پیشگیری و درمان عفونت با ویروس آنفولانزای A استفاده می‌شوند. این داروها ممانعت‌کننده‌های پروتئین M2 این ویروس می‌باشند (۲، ۴).

دو پروتئین M1 (پروتئین ماتریکس) و پروتئین M2 (کانال یونی در پوشش ویروس) توسط قطعه هفتم ژنوم ویروس آنفولانزای A کد می‌شوند. پروتئین M2 نقش اساسی در اوایل چرخه تکثیر ویروس دارد. بعد از اندوسیتوز ویروس و قرارگرفتن آن در اندوزوم، این پروتئین در نتیجه اسیدی شدن اندوزوم فعال شده و سبب ورود پروتون‌ها به داخل ویرون می‌گردد که منجر به جداسدن میانکنش الکتروستاتیک بین کمپلکس ریبونوکلوپروتئین و پروتئین ماتریکس و آزاد شدن ریبونوکلوپروتئین به داخل سیتوزول سلول آلوده می‌شود. از نظر ساختمانی، پروتئین M2 ویروس آنفولانزای A دارای ۹۷ اسید آمینه بوده و دارای قسمت‌های N ترمینال خارج سلولی (اسیدهای آمینه ۱ تا ۲۳)، بین غشائی (اسیدهای آمینه ۲۴ تا ۴۶) و C ترمینال داخل سلولی (اسیدهای آمینه ۴۷ تا ۹۷) است. دو

MDCK، ویروس را جدا نماییم. چهار جدایه از هر ساب تایپ به طور تصادفی انتخاب شدند و بعد از دو بار تکثیر در سلول MDCK، تکثیر ژن M با روش Reverse Transcription PCR و الکتروفورز قطعات حاصل صورت گرفت که شکل ۱ نمونه‌ای از آن را نشان می‌دهد. توالی‌های ژن M جدایه‌های مورد مطالعه در پایگاه ژنی NCBI ثبت گردید که عدد دسترسی آن‌ها برای سویه‌های H1N1 از KT206209 تا KT206212 و برای سویه‌های H3N2 از KT220422 تا KT220425 بود.

شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن M ویروس‌های آنفلوآنزای A ساب تایپ‌های H1N1 و H3N2 مورد مطالعه که در سال ۱۳۹۳ جدا شده بودند با سویه واکسن همان سال، به ترتیب ۹۸/۴۷-۹۹/۰۸ درصد و ۹۸/۷۷-۹۹/۲۸ درصد بود. شباهت توالی اسید آمینه‌ای پیش‌بینی شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی برای پروتئین‌های M1 ویروس‌های آنفلوآنزای A ساب تایپ‌های H1N1 و H3N2 مورد مطالعه به ترتیب ۹۸/۸۱ درصد و ۹۹/۹ درصد و برای پروتئین‌های M2 به ترتیب ۹۸/۹۶-۹۶/۹ درصد و ۹۸/۹۶-۹۹/۹ درصد به دست آمد.

همه هشت جدایه مورد بررسی ویروس‌های آنفلوآنزای A ساب تایپ‌های H1N1 و H3N2 دارای شایع‌ترین جهش مقاومت به آدامانتان بودند که این جهش سبب جانیشینی اسید آمینه اسپاراژین به جای سرین در اسید آمینه ۳۱ پروتئین M2 می‌شود. سایر جهش‌های گزارش شده در مطالعات خارجی در قسمت بین غشائی پروتئین‌های M2 در اسید آمینه‌های ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۴، ۳۸ یا ۴۱ که منجر به مقاومت به این داروها می‌شود، در جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده نگردید. اسید آمینه‌های موجود در این محل‌ها در این جدایه‌ها مشابه سویه واکسن و به ترتیب لوسین، والین، آلانین، گلایسین، لوسین، تریپتوفان و اسپارتیک اسید بودند.

ویروسی از ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت هر یک از این جدایه‌ها در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به دست آمد. پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه M ژنوم هر دو ساب تایپ با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.2.5) طراحی گردید که توالی و اندازه قطعه تکثیر داده شده در جدول ۱ نشان داده شده است. تکثیر ژن M جدایه‌ها با استفاده از کیت one-step RT-PCR ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما ایران و پرایمرهای طراحی شده با برنامه زیر صورت گرفت: نسخه برداری معکوس در ۵۰°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت مرحله طولیل شدن انتهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. قطعه‌های تکثیر داده شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد شناسایی شدند.

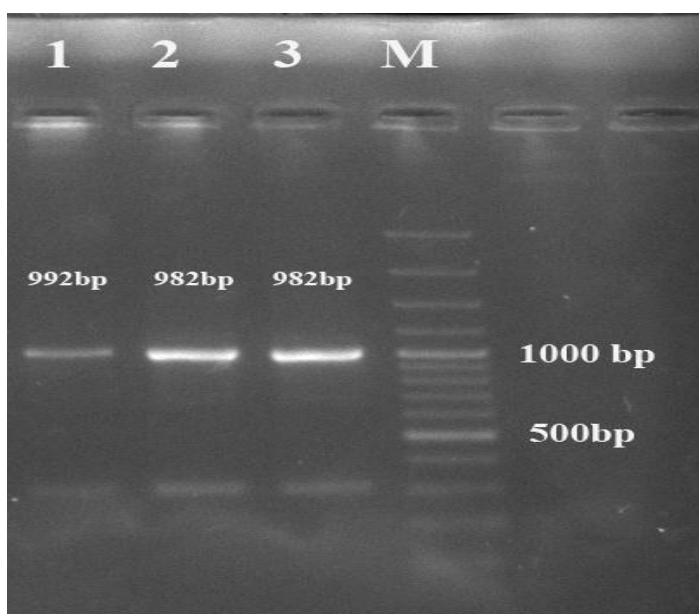
تعیین توالی و مطالعه آن: قطعه‌های تکثیر داده شده با استفاده از کیت GF-1 PCR Clean-up شرکت Vivantis مالزی از ژل استخراج گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین توالی، مشابه پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه M بود. تعیین توالی در هر دو جهت با استفاده از کیت BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing و ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer Sequencer ساخت شرکت Applied Biosystems آمریکا توسط آزمایشگاه تعیین توالی First BASE Laboratories در مالزی انجام شد. همه توالی‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شدند. هم‌ردیف‌سازی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.2.5) در مقایسه با سویه واکسن همان سال تعیین گردید.

## نتایج

از برخی از نمونه‌های سواب بینی که در آزمایش Real Time Reverse Transcription PCR ساب تایپ‌های H1N1 و H3N2 ویروس آنفلوآنزا تیپ A مثبت شده بودند، توانستیم بعد از تلقیح به کشت سلولی

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه M ژنوم هر ساب تایپ ویروس آنفولانزا و اندازه قطعه تکثیر داده شده

اندازه قطعه (bp)	توالی پرایمر (5'→3')		ساب تایپ ویروس
	Forward	Reverse	
۹۸۲	Forward	GATGAGTCTTCTAACCGAGG	H1N1
	Reverse	TTTACTCTAGCTCTATGTTGACA	
۹۹۲	Forward	TATTGAAAGATGAGCCTTCTAA	H3N2
	Reverse	TTTACTCCAACCTCTATGCTGACA	



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز یک سویه جدا شده از بیماران در این مطالعه (چاهک ۳). کنترل‌های مثبت H1N1، H3N2 و مارکر وزن نردبانی ۱۰۰ جفت بازی به ترتیب در چاهک‌های ۱ و ۲ و ۴ قرار داده شده‌اند.

#### بحث

انتقال زیادی دارند و بیماری‌زا می‌باشند (۸). همین امر منجر به مطالعه جهت یافتن داروهائی شده است که بر مراحل دیگر چرخه تکثیر ویروس آنفولانزا مؤثر باشند که از آن جمله می‌توان به اوسلتامیویر و زانامیویر که ممانعت‌کننده نورآمینیداز ویروس آنفولانزا هستند اشاره نمود (۱، ۴).

در جدایه‌های مقاوم به آدامانتان در کشورهای مختلف، جهش‌های نقطه‌ای منفرد در نوکلئوتیدهای ژن M2 دیده شده که سبب جانشینی اسید آمینه‌های ۲۶، ۲۷، ۳۰، ۳۱، ۳۴، ۳۸ یا ۴۱ می‌شوند و فراوان‌ترین آن در اسید آمینه ۳۱ است که سبب جانشینی اسپاراژین به جای

ویروس‌های آنفولانزای A مقاوم به آدامانتان‌ها از ساب تایپ H3N2 از سال ۲۰۰۳ در سرتاسر دنیا در حال گردش می‌باشند؛ ولی اولین افزایش در بروز ویروس‌های آنفولانزای A ساب تایپ H1N1 مقاوم به آدامانتان در سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ میلادی گزارش گردید (۶، ۷). نشان داده شده است که مقاومت به آدامانتان‌ها آسان‌تر از مقاومت به سایر ممانعت‌کننده‌های تکثیری ایجاد می‌شوند و سویه‌های مقاوم نه فقط در طی درمان ضدویروسی ایجاد می‌شوند، بلکه در عدم حضور این فشار دارویی نیز ایجاد و منتشر می‌گردند. این ویروس‌های مقاوم از نظر ژنتیکی پایدار بوده و قابلیت

بهداشت دانشگاه تهران و مرکز ملی آنفولانزا همه سویه‌های ویروس آنفولانزای A سب‌تایپ‌های H3N2 جدا شده در طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ میلادی دارای جهش S31N بودند (۱۳-۱۵). از محدودیت‌های این مطالعه، تعداد کم جدایه‌های مورد بررسی به علت هزینه بالای روش‌های مورداستفاده از جمله تعیین توالی بود؛ اما در هر دو سب‌تایپ H1N1 و H3N2 ویروس‌های آنفولانزای A جدا شده از بیماران ایرانی در سال ۱۳۹۳، مقاومت به داروهای آدامانتان (آمانتادین و ریمانتادین) را نشان داد که مشابه نتایج به دست آمده در سایر مطالعات داخل و خارج کشور است. به نظر می‌رسد با توجه به فراوانی مقاومت به آدامانتان‌ها در ویروس‌های آنفولانزای A بهتر است از داروهای دیگر در موارد نیاز به درمان استفاده شود.

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه افرادی که در تهیه نمونه‌های مورد بررسی ما را یاری نمودند، قدردانی می‌شود. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشگاه شاهد انجام گرفته است.

#### منابع

1. Li TC, Chan MC, Lee N. Clinical implication of antiviral resistance in influenza. *Viruses* 2015; 7(9): 4929-44.
2. Treanor JJ. Influenza Viruses. In: RA Kaslow, LR Stanberry, JW Le Duc. editors. *Viral Infections of Humans- epidemiology and control*. New York: Springer Science + Business Media; 2014; 455-78.
3. Saito R, Li D, Shimomura C, Masaki H, Le MQ, Nguyen HL, et al. An off-seasonal amantadine-resistant H3N2 influenza outbreak in Japan. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2006; 210(1): 21-7.
4. Król E, Rychłowska M, Szewczyk B. Antiviral-current trends in fighting influenza. *Acta biochimica Polonica* 2014; 61(3): 495-504.
5. Pielak RM, Chou JJ. Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1808(2): 522-9.
6. Abed Y, Goyette N, Boivin G. Generation and characterization of recombinant influenza A(H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49(2): 556-9.

سرین (S31N) می‌گردد (۱۰، ۱۷). مطالعات نسبتاً زیادی در زمینه ویروس‌های آنفولانزای A مقاوم به آدامانتان‌ها در کشورهای مختلف دنیا صورت گرفته است، از جمله در همه جدایه‌های ویروس آنفولانزا A/H3N2 فصلی جدا شده از انسان در سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ میلادی در کشور اوگاندا جهش S31N دیده شده است (۱۸). در مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۰۹ میلادی در ژاپن نیز بیش از ۵۰۰۰ توالی ویروسی مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد همه کلاسترهای مقاوم، دارای جهش S31N بودند، یعنی فقط ژن‌های M دارای موتاسیون S31N باقی مانده و سویه‌های دارای این جهش می‌توانند به شکل مؤثری آن را به نسل بعد انتقال دهند (۱۹). در یک مطالعه دیگر جدایه‌های H3N2 از ۳۴ بیمار در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۸ میلادی در یونان میزان جهش S31N از صفر درصد به ۲۵ درصد رسید که به استفاده گسترده از داروهای آدامانتان نسبت داده شد (۲۰). مطالعات محدودی در زمینه مقاومت به آدامانتان‌ها در ویروس‌های آنفولانزای A ایران در سایت‌های معتبر اینترنتی منتشر شده است. در بررسی صورت گرفته در دانشکده

7. Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. The origin and global emergence of adamantane resistant A (H3N2) influenza viruses. *Virology* 2009; 388(2): 270-8.
8. Hayden FG, de Jong MD. Emerging influenza antiviral resistance threats. *Journal of Infectious Diseases* 2011; 203(1): 6-10.
9. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zang Y, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 196(2): 249-57.
10. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, Davis XM, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005; 366 (9492): 1175-81.
11. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, et al. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One* 2015; 10(3): e0119115.
12. Hurt AC. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Current Opinion in Virology* 2014; 8: 22-9.

13. Yavarian J, Azad TM, Zheng X, Gregory V, Lin YP, Hay A. Amantadine resistance in relation to the evolution of influenza A (H3N2) viruses in Iran. *Antiviral Research* 2010; 88(2): 193-6.
14. Yavarian J, Mokhtari Azad T, Shafiei Jandaghi NZ, Nategh R. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in Iran. *Acta Virologica* 2009; 53(2): 135-8.
15. Yavarian J, Shafiei Jandaghi NZ, Naseri M, Mokhtari Azad T. Characterization of variations in PB2, NS1, M, neuraminidase and hemagglutinin of influenza A (H3N2) viruses in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; 7(3): e9089.
16. World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). 2009. Available from [http://www.who.int/csr/resources/publications/swi-neflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Assay-2009\\_20090430.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swi-neflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf).
17. Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 2008; 451: 591-6.
18. Byarugaba DK, Ducatez MF, Erima B, Mworzi EA, Millard M, Kibuuka H, et al. Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Uganda. *PloS one* 2011; 6(11): e27803.
19. Furuse Y, Suzuki A, Kamigaki T, Oshitani H. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology Journal* 2009; 6: 67.
20. Melidou A, Kyriazopoulou V, Diza E, Alexiou S, Pierroutsakos Y. Antiviral resistance of influenza A (H3N2) strains isolated in northern Greece between 2004 and 2007. *Euro Surveillance* 2009; 14(4). 19104.

## Survey of M2 gene sequence of influenza viruses isolated from Iranian patients in 2014 for determination of adamantane resistance

Horieh Saderi<sup>1</sup>, Farida Behzadian<sup>2,\*</sup>, Elham Moasser<sup>2</sup>, Parviz Owlia<sup>1</sup>

1. Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
2. Research Centre for Biosciences and Biotechnology, Malek-Ashtar University, Tehran, Iran

\* Corresponding author e-mail: fbehzadian@yahoo.com

### Abstract

**Background and Objective:** Adamantanes, amantadine, and rimantadine have been used for many years for prevention and treatment of influenza virus A infections. These drugs are influenza virus M2 protein inhibitors and some amino acids substitutions in transmembrane portion of this protein cause resistance to them. This study was done for survey of adamantane resistance related nucleotide sequence changes in M2 gene of H1N1 and H3N2 subtypes isolated from Iranian patients in 2014.

**Material and Methods:** Nasal swabs of patients with influenza-like symptoms were collected from Tehran through winter 2014 and were examined by Real Time Reverse Transcription PCR to evaluate presence of subtypes of H1N1 and H3N2 of influenza viruses A in them. Then, some positive samples for these viruses were propagated in cell culture. Four isolates from each subtype were randomly selected for M gene amplification by Reverse Transcription PCR and genetic analysis.

**Results:** The study of point mutations in M2 gene sequence of isolates showed presence of most prevalent adamantane resistance related mutation; substitutions of serine with asparagine in amino acid 31; in all of them. Other mutations conferring resistance to adamantanes were not found.

**Conclusion:** According to results of this study and reports from other investigators, which showed the high prevalence of adamantane resistant mutants in human influenza virus A isolates, it is recommended that adamantanes not be used for the treatment of influenza.

**Keywords:** Influenza virus A, M2 protein, Adamantanes, Mutation