Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم-شماره ۱۳۰
شهریور ۱۳۹۶

بررسی توالی ژن M2 ویروس‌های آنفولانزا جداشده از بیماران ایرانی در سال ۱۳۹۳ به‌منظور تعیین مقاومت به آدامانتان‌ها

نویسندگان: حوریه صادری[۱]، فریدا بهزادیان[۲*]، الهام مؤثر[۳]، پرویز اولیاء[٤]

۱. مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲. پژوهشکدهٔ علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران.
۳. پژوهشکدهٔ علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران.
٤. مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: فریدا بهزادیان E-mail: fbehzadian@yahoo.com

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

چکیده

مقدمه و هدف: آدامانتان‌ها (آمانتادین و ریمانتادین) سال‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت با ویروس آنفولانزای A استفاده شده است. این داروها ممانعت کننده‌های پروتئین M2 این ویروس می‌باشند و برخی از جانشینی‌های اسید آمینه در قسمت بین غشائی این پروتئین سبب مقاومت به این داروها می‌شود. این مطالعه به‌منظور بررسی تغییرات توالی نوکلئوتیدی مرتبط با مقاومت به آدامانتان‌هادر 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 آنفولانزا با روش Real-Time Reverse Transcription PCR موردبررسی قرار گرفتند تا حضور ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 ویروس آنفولانزا 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 PCRو آنالیز ژنتیکی چهار جدایه از هر ساب‌تایپ به‌طور تصادفی انتخاب گردیدند.

نتایج: مطالعهٔ جهش‌های نقطه‌ای در توالی ژن M2 جدایه‌های موردبررسی نشان‌دهندهٔ حضور شایع‌ترین جهش منجرشونده به مقاومت به آدامانتان‌ها یعنی جایگزینی اسید آمینهٔ آسپاراژین به‌جای سرین در موقعیت ۳۱ در همهٔ آن‌ها بود. سایر جهش‌های ایجادکنندهٔ مقاومت به آدامانتان‌ها یافت نشد.

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

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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

مقدمه

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 ۳تا۵ میلیون بیماری حاد و ۳۰۰تا۵۰۰ هزار مرگ را سبب می‌گردد. امروزه در جمعیت‌های انسانی دو ساب‌تایپ ویروس آنفولانزای A یعنی H1N1 و H3N2 در گردش می‌باشند (۱). به‌منظور کاهش دورهٔ بیماری، ترشح ویروس و میزان بستری‌شدن و مرگ در افراد عفونت‌یافته 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 واکسن‌های 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، ٤).

دو پروتئین M1 (پروتئین ماتریکس) و پروتئین M2 (کانال یونی در پوشش ویروس) توسط قطعهٔ هفتم ژنوم ویروس آنفولانزای A کد می‌شوند. پروتئین M2 نقش اساسی در اوایل چرخهٔ تکثیر ویروس دارد. بعد از اندوسیتوز ویروس و قرارگرفتن آن در اندوزوم، این پروتئین در نتیجهٔ اسیدی‌شدن اندوزوم فعال‌شده و سبب ورود پروتون‌ها به داخل ویریون می‌گردد که منجر به جداشدن میانکنش الکتروستاتیک بین کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس و آزادشدن ریبونوکلئوپروتئین 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 ٢٤ تا ٤٦) و C ترمینال داخل سلولی (اسیدهای آمینه ٤٧ تا ٩٧) است. دو پروتئین M1 و M2 توسط یکی از هشت قطعهٔ ژنومی ویروس آنفولانزای A کد می‌شوند (۵).

متأسفانه، مقاومت به آدامانتان‌ها در سویه‌های ویروس آنفولانزای A جداشده 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 ٢٦، ٢٧، ٣٠، ٣١، ٣٤، ٣٨ یا ٤١ 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 مطالعهٔ حاضر به‌منظور بررسی حضور جهش‌های مقاومت به آدامانتان در هر دو ساب‌تایپ H1N1 و H3N2 ویروس آنفولانزای A جداشده از بیماران در تهران صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی ویروس

در یک مطالعهٔ مقطعی در زمستان ۱۳۹۳، نمونهٔ سواب بینی بیماران دارای علائم بالینی آنفولانزا با روش Real Time Reverse Transcription PCR موردبررسی 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 توصیه‌شده توسط سازمان بهداشت جهانی استفاده شد (١٦). سپس برخی از نمونه‌های مثبت از نظر این ویروس‌ها به کشت سلولی MDCK تلقیح گردید. ویروس‌های آنفولانزای جداشده تا زمان آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

تکثیر ژن M: چهار جدایه از هر ساب‌تایپ به‌طور 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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

ویروسی از ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت هر یک از این جدایه‌ها در ۲۰ میکرولیتر آب‌مقطر به دست آمد. پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعهٔ M ژنوم هر دو ساب‌تایپ با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.2.5) طراحی گردید که توالی و اندازهٔ قطعهٔ تکثیرداده‌شده 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 طراحی‌شده با برنامهٔ زیر صورت گرفت: نسخه‌برداری معکوس در ۵۰°C به‌مدت ۳۰ دقیقه، ٤۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۵°C به‌مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸°C به‌مدت ٤۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۱ دقیقه و در نهایت مرحلهٔ طویل‌شدن انتهایی در ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه. قطعه‌های تکثیرداده‌شده روی ژل آگارز ۱/۵درصد شناسایی شدند.

تعیین توالی و مطالعهٔ آن: قطعه‌های تکثیرداده‌شده با استفاده از کیت GF-1 PCR Clean-up شرکت Vivantis مالزی از ژل استخراج گردید. پرایمرهای مورداستفاده برای تعیین توالی، مشابه پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر قطعهٔ 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 امریکا توسط آزمایشگاه تعیین توالیFirst BASE Laboratories در مالزی انجام شد. همهٔ توالی‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت شدند. هم‌ردیف‌سازی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.2.5) در مقایسه با سویهٔ واکسن همان سال تعیین گردید.

نتایج

از برخی از نمونه‌های سواب بینی که در آزمایش Real Time Reverse Transcription PCR از نظر ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 ویروس آنفولانزا تیپ A مثبت شده بودند، توانستیم بعد از تلقیح به کشت سلولی MDCK، ویروس را جدا نماییم. چهار جدایه از هر ساب‌تایپ به‌طور 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 موردمطالعه 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.

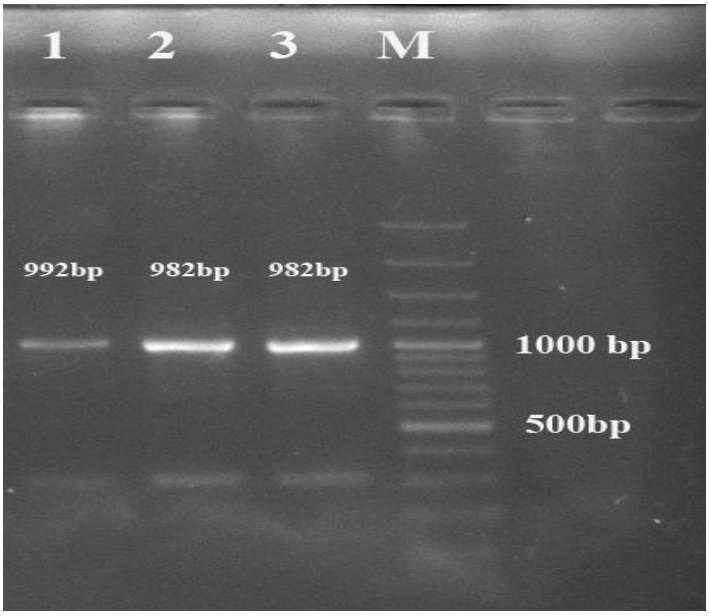
شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن M ویروس‌های آنفولانزای A ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 موردمطالعه که در سال ۱۳۹۳ جدا شده بودند با سویه واکسن همان سال، به‌ترتیب ۹۹/۰۸-۹۸/٤۷ درصد و ۹۹/۲۸-۹۸/۷۷ درصد بود. شباهت توالی اسید آمینه‌ای پیش‌بینی‌شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی برای پروتئین‌های M1 ویروس‌های آنفولانزای A ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 موردمطالعه به‌ترتیب ۹۸/۸۱ درصد و ۹۹/۹ درصد و برای پروتئین‌های M2 به‌ترتیب ۹۸/۹٦-۹٦/۹ درصد و ۹۹/۹-۹۸/۹٦ درصد به‌دست آمد.

همهٔ هشت جدایهٔ موردبررسی ویروس‌های آنفولانزای A ساب‌تایپ‌های H1N1 و H3N2 دارای شایع‌ترین جهش مقاومت به آدامانتان بودند که این جهش سبب جانشینی اسید آمینه آسپاراژین به‌جای سرین در اسید آمینه ۳۱ پروتئین M2 می‌شود. سایر جهش‌های گزارش‌شده در مطالعات خارجی در قسمت بین غشائی پروتئین‌های M2 در اسید آمینه‌های ۲٦، ۲۷، ۳۰، ۳٤، ۳۸ یا ٤۱ که منجر به مقاومت به این داروها می‌شود، در جدایه‌های موردمطالعه مشاهده نگردید. اسید آمینه‌های موجود در این محل‌ها در این جدایه‌ها مشابه سویه واکسن و به‌ترتیب لوسین، والین، آلانین، گلایسین، لوسین، تریپتوفان و آسپارتیک اسید بودند.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر قطعه M ژنوم هر ساب‌تایپ ویروس آنفولانزا و اندازهٔ قطعهٔ تکثیرداده‌شده

ساب‌تایپ ویروس	توالی پرایمر (5'→3')		اندازهٔ قطعه (bp)
H1N1	Forward	GATGAGTCTTCTAACCGAGG	۹۸۲
	Reverse	TTTACTCTAGCTCTATGTTGACA	
H3N2	Forward	TATTGAAAGATGAGCCTTCTAA	۹۹۲
	Reverse	TTTACTCCAACTCTATGCTGACA	



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز یک سویه جداشده از بیماران در این مطالعه (چاهک ۳). کنترل‌های مثبت H3N2، H1N1 و مارکر وزن نردبانی ۱۰۰ جفت بازی به‌ترتیب در چاهک‌های ۱ و ۲ و ٤ قرار داده شده‌اند.

بحث

ویروس‌های آنفولانزای A مقاوم به آدامانتان‌ها از ساب‌تایپ H3N2 از سال ۲۰۰۳ در سرتاسر دنیا در حال گردش می‌باشند؛ ولی اولین افزایش در بروز ویروس‌های آنفولانزای A ساب‌تایپ H1N1 مقاوم به آدامانتان در سال‌های ۲۰۰٦ تا ۲۰۰۷ میلادی گزارش گردید (٦، 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 عدم‌حضور این فشار دارویی نیز ایجاد و منتشر می‌گردند. این ویروس‌های مقاوم از نظر ژنتیکی پایدار بوده و قابلیت انتقال زیادی دارند و بیماری‌زا می‌باشند (۸). همین امر منجر به مطالعه جهتِ یافتن داروهائی شده است که بر مراحل دیگر چرخهٔ تکثیر ویروس آنفولانزا مؤثر باشند که از آن جمله می‌توان به اوسلتامیویر و زانامیویر که ممانعت‌کنندهٔ نورآمینیداز ویروس آنفولانزا هستند اشاره نمود (۱، ٤).

در جدایه‌های مقاوم به آدامانتان در کشورهای مختلف، جهش‌های نقطه‌ای منفرد در نوکلئوتیدهای ژن M2 دیده شده که سبب جانشینی اسید آمینه‌های ۲٦، ۲۷، ۳۰، ۳۱، ۳٤، ۳۸ یا ٤۱ می‌شوند و فراوان‌ترین آن در اسید آمینه ۳۱ است که سبب جانشینی آسپاراژین به‌جای

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

سرین (S31N) می‌گردد (۱۰، ۱۷). مطالعات نسبتاً زیادی در زمینهٔ ویروس‌های آنفولانزای A مقاوم به آدامانتان‌ها در کشورهای مختلف دنیا صورت گرفته است، از جمله در همهٔ جدایه‌های ویروس آنفولانزا A/H3N2 فصلی جداشده از انسان در سال‌های ۲۰۰۸تا۲۰۰۹ میلادی در کشور اوگاندا جهش S31N دیده شده است (۱۸). در مطالعهٔ انجام‌گرفته در سال ۲۰۰۹ میلادی در ژاپن نیز بیش از ۵۰۰۰ توالی ویروسی موردبررسی قرار گرفت که نشان داد همهٔ کلاسترهای مقاوم، دارای جهش S31N بودند، یعنی فقط ژن‌های M دارای موتاسیون S31N باقی‌مانده و سویه‌های دارای این جهش می‌توانند به‌شکل مؤثری آن را به نسل بعد انتقال دهند (۱۹). در یک مطالعهٔ دیگر جدایه‌های H3N2 از ۳٤ بیمار در سال‌های ۲۰۰٤ تا ۲۰۰۸ میلادی در یونان میزان جهش S31N از صفر درصد به ۲۵درصد رسید که به استفادهٔ گسترده از داروهای آدامانتان نسبت داده شد (۲۰). مطالعات محدودی در زمینهٔ مقاومت به آدامانتان‌ها در ویروس‌های آنفولانزای A ایران در سایت‌های معتبر اینترنتی منتشر شده است. در بررسی صورت‌گرفته در دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه تهران و مرکز ملی آنفولانزا همهٔ سویه‌های ویروس آنفولانزای A ساب‌تایپ‌های H3N2 جداشده در طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ میلادی دارای جهش S31N بودند (۱۳-۱۵). از محدودیت‌های این مطالعه، تعداد کم جدایه‌های موردبررسی به‌علت هزینهٔ بالای روش‌های مورداستفاده از جمله تعیین توالی بود؛ اما در هر دو ساب‌تایپ H1N1 و H3N2 ویروس‌های آنفولانزای A جداشده از بیماران ایرانی در سال ۱۳۹۳، مقاومت به داروهای آدامانتان (آمانتادین و ریمانتادین) را نشان داد که مشابه نتایج به‌دست‌آمده در سایر مطالعات داخل و خارج کشور است. به‌نظر 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 کلیهٔ افرادی که در تهیهٔ نمونه‌های موردبررسی ما را یاری نمودند، قدردانی می‌شود. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات میکرب‌شناسی 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, Rychlowska M, Szewczyk B. Antivirals-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.
7. Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. The origin and global emergence of adamantine 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-Oronoz 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

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/swineflu/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, Mworozi 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.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:56 IRST on Monday October 23rd 2017

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
24th Year, No.130
August- September 2017

Daneshvar(medicine) shahed University/ 24th year/2017 /NO.130

Received: 24/06/2017
Last revised: 08/08/2017
Accepted: 18/08/2017

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

Horieh Saderi[1], Farida Behzadian[2,*], Elham Moasser[2], Parviz Owlia[1]

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.

Materiasl 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