شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای A/H3N2 مقاوم به اسلتامیویر با تست Real-time RT- PCR

محمدهادی کربلایی‌نیا: کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mohamad.karbalai@yahoo.com
طلعت مختاری آزاد: استاد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mokhtari@tums.ac.ir
نازنین زهرا شفیعی جندقی: استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. nz-shafiei@tums.ac.ir
* **ژیلا یاوریان:** استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). yavarian@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر با افزایش اپیدمی‌های ویروس‌های آنفلوانزای A تحقیقات زیادی در مورد پیشگیری و درمان این ویروس‌ها انجام شده است. داروی اسلتامیویر یا تامی فلو (مهارکننده نورامینیداز (NA) ویروس) به عنوان یکی از داروهای مؤثر در پیشگیری و درمان این ویروس‌ها می‌باشد. جهش در چند سایت مختلف ژن NA باعث ایجاد مقاومت دارویی می‌گردد. جهش H274Y از مهم‌ترین تغییرات ایجادکننده مقاومت دارویی در ویروس‌های آنفلوانزای A می‌باشد. هدف این مطالعه شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای A/H3N2 مقاوم به اسلتامیویر با بررسی جایگاه ۲۷۴ با تست Real-time RT- PCR می‌باشد.

روش کار: در ابتدا پرایمر و پروب‌های اختصاصی جهت شناسایی ویروس‌هایA/H3N2 حساس و مقاوم طراحی شد، سپس تست Real-time RT-PCR جهت شناسایی جهش در جایگاه ۲۷۴ از ژن NA انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۵۰ نمونه مورد آزمایش تمامی آن‌ها فاقد جهش H274Y بوده و لذا هیچ ویروس مقاومی در این نمونه‌ها یافت نشد.

نتیجه‌گیری: شناسایی سریع و دقیق موتانت‌های مقاوم به دارو برای راهکارهای درمانی مؤثر امری ضروری بشمار می‌رود. تست Real-time RT-PCR به عنوان تستی سریع و با توان بالای عملیاتی می‌تواند در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به عنوان تست روتین برای شناسایی مقاومت ویروس‌های آنفلوانزا به داروهای مهارکننده نورامینیداز بکار رود.

کلیدواژه‌ها: ویروس آنفلوانزای A/H3N2، Real-time RT- PCR، مقاومت دارویی

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا ویروس‌های RNAدار از خانواده اورتومیکسوویریده می‌باشند. سالانه همه‌گیری‌ها و مرگ‌ومیر ویروس‌های آنفلوانزا برای انسان یک نگرانی مهم بشمار می‌رود (۲-۱). پیشگیری و درمان این ویروس‌ها در بسیاری از کشورها موردتوجه می‌باشد. هدف درمان‌های ضدویروسی، ژن نورامینیداز (NA) و کانال M2 ویروس آنفلوانزا می‌باشد. داروهای مهارکننده کانال M2 و داروهای مهارکننده نورامینیداز (NAI) دو کلاس اصلی از داروهای ضدویروسی معرفی شده برای پیشگیری و درمان آنفلوانزا می‌باشند. آدامانتان‌ها (آمانتادین و ریمانتادین) به عنوان مهارکننده‌های کانال M2 اولین داروهایی بودند که بر ضد آنفلوانزای A بکار رفتند (۱ و ۶-۳) ولی به‌سرعت موتانت‌های مقاوم به این داروها پدید آمدند (۲). شایع‌ترین موتاسیون‌ها در این ژن V27A و S31N می‌باشند. اوسلتامیویر (تامی فلو) و زانامیویر (رلنزا) داروهای مهارکننده نورامینیداز (NAI) ویروسی هستند که کارایی خوبی در درمان عفونت‌های گسترده آنفلوانزا دارند (۵). تا قبل از ظهور ویروس‌های آنفلوانزای A/H1N1 مقاوم به اوسلتامیویر در طی سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۷، ویروس‌های آنفلوانزای مقاوم به دارو غیر شایع بود (۷). این موتانت های مقاوم نه تنها در ویروس‌های آنفلوانزای A/H1N1 بلکه در تحت تیپ‌های دیگر مثل A/H5N1 و A/H3N2 نیز دیده شد (۸). موتاسیون H275Y (H274Y در N2) به عنوان شایع‌ترین موتاسیون مقاومت دارویی به اوسلتامیویر شناخته شد که در این ویروس‌ها

موتاسیون از نوع نقطه‌ای بوده و جایگزینی سیتوزین به جای تیمیدین در نوکلئوتید ۸۲۴ ژن NA وجود دارد (۹). اکنون اغلب ویروس‌های آنفلوانزای A/H3N2 در گردش، مقاوم به دارو شده‌اند و فقدان دستورالعمل مناسب در استفاده از داروها به گسترش این موتانت های مقاوم کمک زیادی می‌کند (۱۰). امروزه روش‌های فنوتایپینگ به عنوان استاندارد طلایی در غربالگری ویروس‌های مقاوم به دارو شناخته شده‌اند (۱۱). علی‌رغم این، آنالیز توالی ژن NA به روش سانگر می‌تواند برای شناسایی موتاسیون‌هایی مثل H274Y و دیگر موتاسیون های مقاومت دارویی بکار رود. هر دو روش فنوتایپینک و تعیین توالی، وقت‌گیر، نیازمند صرف نیروی کار زیاد، تجهیزات خاص و گران برای انجام آزمایش می‌باشند (۱۱ و ۱۲)؛ بنابراین نیاز به یک روش سریع، فراگیر و با صرف کمترین زمان برای شناسایی ویروس‌های مقاوم به داروهای مهارکننده نورامینیداز (NAI) امری ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون چندین مطالعه جهت شناسایی ویروس‌های A/H1N1 مقاوم به اسلتامیویر با روش Real-time RT-PCR صورت گرفته (۱۳ و ۱۴) ولی در حال حاضر هیچ مطالعه‌ای جهت شناسایی ویروس‌های A/H3N2 مقاوم با روش ذکر شده انجام نشده است. در این راستا مطالعه حاضر بر روی نمونه سواب گلوی بیماران مبتلا به ویروس آنفلوانزای A/H3N2 طراحی شد. هدف این مطالعه شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای A/H3N2 مقاوم به اسلتامیویر با بررسی جایگاه ۲۷۴ با تست Real-time RT- PCR و شناسایی موتاسیون C به T در جایگاه نوکلئوتید ۸۲۴ ژن NA ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 بود.

روش کار

در این مطالعه ۵۰ نمونه مثبت از لحاظ آنفلوانزا A/H3N2 که در طی سال ۱۳۹۰ به مرکز ملی آنفلوانزا واقع در گروه ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال شده بودند انجام گرفت. RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) با توجه به دستورالعمل کیت استخراج شد. ردیابی موتاسیون H274Y با انجام یک تست Real-time RT-PCR برای نوکلئوتید ۸۲۴ ژن NA ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 مورد نظر انجام گرفت.

جهت طراحی تست Real-time RT-PCR برای شناسایی موتاسیون H274Y با استفاده از سکانس‌های رفرانس برگرفته از سایت NCBI و با توجه به توالی‌های حفاظت شده در اطراف جایگاه ۸۲۴، پرایمرها و پروب های مربوطه طراحی شدند. در این روش از نرم‌افزارهای Bioedit version 7.1.3.0 (2011) و OLIGO5 استفاده شد. توالی پرایمرها و پروب های طراحی‌شده برای شناسایی موتاسیون H274Y در جدول ۱ نمایش داده‌شده است.

طبق دستورالعمل کیت Qiagen Quantitect Probe RT-PCR kit، تست Real-time RT-PCR بدین صورت انجام شد: ۵ میکرولیتر مخلوط RNA همراه ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2x، به‌علاوه ۰/۲۵ میکرولیتر Enzyme Mix، ۲ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۱ میکرولیتر از هر یک از پروب‌های حساس و مقاوم و ۱/۲۵ میکرولیتر آب. برای انجام تست Real-time RT-PCR از دستگاه Rotorgene 6000 5-plex HRM استفاده گردید که بدین صورت برنامه آن تنظیم شد: ۱ سیکل با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ دقیقه، ۱ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه، و ۴۵ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه. این روش بر این اساس طراحی شد که در صورت وجود C در جایگاه ۸۲۴ از ژن NA پروب FAM در کانال Green ویروس را شناسایی نماید و در صورت وجود T در این جایگاه که نشانگر ویروس جهش‌یافته می‌باشد پروب Cy3 در کانال Orange ثبت شود.

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۰ نمونه مثبت از نظر ویروس آنفلوانزای A/H_3N_2 مورد بررسی قرار گرفتند. این

جدول ۱- توالی‌های پرایمرها و پروبهای بکاررفته جهت ردیابی موتاسیون H274Y

	Name	5' ⟶ 3'
1	Forward Primer(H3F678)	5'-GGA GTC AGA ATG CGT TTG TAT C-3'
2	Reverse Primer(H3R876)	5'-GAG CCT TTC CAG TTG TCT CTG-3'
3	Sensitive Probe	FAM-AAAATCGTTCATACTAGCACATTGTCAGGAA-BHQ1
4	Resistant Probe	Cy3-AAAATCGTTCATACTAGCATATTGTCAGGAA-BHQ2

جدول ۲- خلاصه نتایج جستجوی موتاسیون H274Y با تست Real-time RT-PCR

Samples	Sample type	H274	Y274	Interpretation	Nucleotide 824
50 (A/H3N2)	Throat swab	Positive	Negative	Wild type	C

نمونه‌ها از گلوی بیماران با بیماری تنفسی به‌وسیله سواب جمع آوری شده و از لحاظ وجود ویروس آنفلوانزا A/H3N2 (Ct>20) با تست Real-time RT-PCR مثبت گزارش شده بودند. جهت شناسایی ویروس‌های مقاوم به داروهای مهارکننده نورامینیداز در زمینه محل موتاسیون مورد نظر مطالعاتی انجام گرفت که دریافتیم ناحیه موتاسیون، جایگاه نوکلئوتید ۸۲۴ ژن N_2 می‌باشد که آن مورد هدف مطالعه قرار گرفت. موتاسیون مقاومت به داروهای مهارکننده نورامینیداز در ویروس آنفلوانزای A/H_3N_2 در نوکلئوتید ۸۲۴ ژن N_2 در نتیجه جابجایی تیمین (T) به جای سیتوزین (C) است که باعث تبدیل کد مولد هیستیدین (CAT) به تیروزین (TAT) در جایگاه اسید آمینه ۲۷۴ پروتئین تولیدی می‌شود. برای این ناحیه طراحی پرایمر و پروب انجام شد. طراحی پرایمرها به‌گونه‌ای بود که ناحیه موتاسیون مقاومت دارویی ژن نورامینیداز را دربرگیرند و پروب ها نیز به‌گونه‌ای که محدوده Mutation site را پوشش دهند (جدول ۱). نتایج تست Real-time RT-PCR با استفاده از ۲ پروب TaqMan که با گزارشگرهای فلورسنت FAM و Cy3 به ترتیب برای شناسایی سویه وحشی (H274) و موتانت (Y274) نشاندار شده بودند، بدست آمد. از تعداد ۵۰ نمونه کار شده، هیچ یک حاوی موتاسیون مقاومت دارویی H274Y نبودند(جدول ۲). سویه وحشی از طریق گزارشگر FAM در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر و واریانت مقاوم به اوسلتامیویر که واجد یک تغییر در نوکلئوتید ۸۲۴ ژن NA می‌باشد از طریق گزارشگر Cy3 در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری داشتند. سیگنال‌های متسع شده برای سویه وحشی و موتانت اختصاصی بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

تکامل سریع ژنوم ویروس‌های آنفلوانزا نیازها را برای بکار گیری روش‌های متعدد در غربالگری و شناسایی موتانت های مقاوم به دارو خاطر نشان می‌کند (۱۵). امروزه NAI به عنوان کارآمدترین داروها بر ضد ویروس‌های آنفلوانزا می‌باشند (۱). گزارشات اخیر حاکی از افزایش نگرانی‌ها در مورد پیدایش مقاومت به NAI می‌باشد(۱). ویروس‌های مقاوم به دارو با موتاسیون در جایگاه فعال آنزیم در ژن NA به وجود می‌آیند ازجمله مهم‌ترین این موتاسیون ها می‌توان به جهش نقطه‌ای از نوع جایگزینی اسید آمینه در جایگاه ۱۱۹، ۲۷۴ و ۲۹۲ اشاره کرد (۳). در موتاسیون H274Y یک تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه ۸۲۴ ژن NA رخ داده که منجر به تغییر اسیدآمینه هیستیدین به تیروزین در جایگاه ۲۷۴ گلیکوپروتئین NA شده و متعاقب آن موتانت های مقاوم به داروی اوسلتامیویر ایجاد می‌شوند (۳). بنابراین برای شروع درمان ابتدا ویروس‌های در گردش باید از لحاظ تغییرات مربوط به مقاومت دارویی بررسی شوند و اگر موتاسیون شناسایی شد استراتژی درمانی متفاوتی اتخاذ گردد، برای مثال زانامیویر به عنوان داروی جایگزین بکار رود(۱).

روش‌های ژنوتایپینگ و تست‌های متعددی در بحث نظارت بر آنفلوانزا وجود دارد (۱۸-۱۶). رایج‌ترین روش‌های ژنوتایپینگ برای شناسایی موتانت های مقاوم به NAI تست RT-PCR، توالی یابی به روش سانگر و Pyrosequencing می‌باشند

(۱۹و ۲۰). تعیین توالی کامل ویروس (Whole genome) روش دقیقی است و می‌تواند تغییرات کلی ژنوم ویروس را مشخص کند اما معایب آن وقت‌گیر بودن، نیاز به انجام کارهای اضافی متعدد، گرانی و امکان تعیین توالی جمعیت مخلوط ویروسی را دارد . علیرغم این اخیراً روش انتخابی شناسایی تغییرات ژنومی که منجر به ایجاد موتانت‌های مقاوم به دارو می‌شود توالی یابی به روش سانگر معرفی شده است (۱۵و۱۸).

در این مطالعه ۵۰ نمونه آنفلوانزا A/H3N2 انتخاب شدند. تست Real-time RT-PCR برای ژن NA ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 به صورتی تنظیم شد که قادر به شناسایی موتانت های مقاوم (Y274) و ویروس‌های وحشی (H274) باشد. درنهایت دریافتیم که تمامی نمونه‌ها سویه وحشی (H274) بوده و هیچ‌گونه موتانت مقاومی در نمونه‌ها وجود نداشت.

در مطالعه انجام شده توسط Smith و همکارانش در سال ۲۰۱۱ میزان مقاومت دارویی در ویروس آنفلوانزا A/H3N2 ۲/۹ درصد گزارش شده ونشان داده‌شده که بیش از ۹۵ درصد عفونت‌های ویروس آنفلوانزا A/H3N2 در اروپا حساس به اوسلتامیویر می‌باشد (۹). بررسی فنوتایپی و ژنوتایپی بیش از ۲۰۰۰ نمونه در ژاپن از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۷ نشان می‌دهد که مقاومت به اوسلتامیویر با وجود استفاده از این دارو برای بهبودی بیماران کمتر از ۱ درصد بوده است(۱۰) که در مقایسه با مطالعه ما هیچ‌گونه موتاسیون مقاومت دارویی در این نمونه‌ها یافت نشد و تمامی نمونه‌ها حساس به اوسلتامیویر گزارش شدند.

در نتیجه شناسایی سریع و دقیق موتانت های مقاوم به دارو برای اتخاذ راهکارهای درمانی مؤثر امری ضروری به نظر می‌رسد که در این راستا با توجه به نتایج مطالعه دریافتیم تست Real-time RT-PCR به عنوان روشی سریع، دقیق و با توان عملیاتی بالا می‌تواند ما را در این امر یاری رساند. علیرغم اینکه ازجمله معایب تست Real-time RT-PCR ناتوانی در شناسایی موتاسیون های مقاومت دارویی جدید و حساسیت کمتر نسبت به روش‌های فنوتایپینگ می‌باشد اما در آزمایشگاه‌های تشخیصی با حداقل دارا بودن یک دستگاه Real-time PCR می‌توان از این تکنیک برای شناسایی موتاسیون های شناخته شده در ایجاد حساسیت و مقاومت ویروس‌های آنفلوانزا به اوسلتامیویر و دیگر داروهای ضدویروسی بهره جست. محدودیت این تحقیق تعداد نمونه کم بود که امید است با راه‌اندازی این روش بتوان تعداد نمونه بیشتری را بررسی نمود.

بنابراین ما تست Real-time RT-PCR را به عنوان روشی سریع و با کارایی بالا در غربالگری موتاسیون های مقاومت دارویی و به عنوان روشی کارآمد در شناسایی موتاسیون های نقطه‌ای پیشنهاد می‌کنیم.

تقدیر و تشکر

تشکر و قدردانی ما از زحمات کلیه پرسنل مرکز ملی آنفلوانزا واقع در گروه ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد. این مطالعه با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران تحت طرح شماره ۱۳۰/۲۰۲۸/ص/۹۱ انجام شد.

منابع

1. Yavarian J, Mokhtari Azad T, Nadji SA, Zeraati H, Naseri M. Analysis of the hemagglutinin and neuramindiase genes of human influenza A/H3N2 viruses circulating in Iran between 2005 and 2007: antigenic and phylogenetic relationships to vaccine strains. Intervirol.2010; 53:133-140.

2. Yavarian J, Mokhtari Azad T, Shafiei Jandaghi NZ, Nategh R. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in Iran. Acta Virologica. 2009; 53:135-138.

3. Chutinimitkul S, Suwannakarn K, Chieochansin T, Mai le Q, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, et al. H5N1 Oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TaqMan probes. J Virol Methods. 2007;139(1):44-9.

4. Carr MJ, Sayre N, Duffy M, Connell J, Hall WW. Rapid molecular detection of the H275Y oseltamivir resistance gene mutation in circulating influenza A (H1N1) viruses. J Virol Methods. 2008;153(2):257-62.

5. Redlberger-Fritz M, Aberle SW, Strassl R, Popow-Kraupp T. Rapid identification of neuraminidase inhibitor resistance mutations in seasonal influenza virus A(H1N1), A(H1N1) 2009,

and A (H3N2) subtypes by melting point analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(7):1593-601.

6. McKimm-Breschkin JL. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza Other Respi Viruses.2013;7 Suppl 1:25-36.

7. Chidlow GR, Harnett GB, Williams SH, Tempone SS, Speers DJ, Hurt AC, et al. The detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay. J Virol Methods. 2010;169(1):47-51.

8. Anton A, Lopez-Iglesias AA, Tortola T, Ruiz-Camps I, Abrisqueta P, Llopart L, et al. Selection and viral load kinetics of an oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus in an immunocompromised patient during treatment with neuraminidase inhibitors. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;68(3):214-9.

9. Smith JR, Rayner CR, Donner B, Wollenhaupt M, Klumpp K, Dutkowski R. Oseltamivir in seasonal, pandemic, and avian influenza: a comprehensive review of 10-years clinical experience. Adv Ther. 2011;28(11):927-59.

10. Zambon MC. Surveillance for antiviral resistance. Influenza Other Respi Viruses. 2013;7 Suppl 1:37-43.

11. Bolotin S, Robertson AV, Eshaghi A, De Lima C, Lombos E, Chong-King E, et al. Development of a novel real-time reverse-transcriptase PCR method for the detection of H275Y positive influenza A H1N1 isolates. J Virol Methods. 2009;158(1-2):190-4.

12. Hindiyeh M, Ram D, Mandelboim M, Meningher T, Hirsh S, Robinov J, et al. Rapid detection of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus neuraminidase resistance mutation H275Y by real-time reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol. 2010 ;48(5):1884-7.

13. Chidlow GR, Harnett GB, Williams SH, Tempone SS, Speers DJ, Hurt AC, et al. The detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay. J Virol Methods. 2010; 169(1): 47-51.

14. Wong S, Pabbaraju K, Wong A, Fonseca K, Drews SJ. Development of a real-time RT-PCR assay for detection of resistance to oseltamivir in influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus using single nucleotide polymorphism probes. J Virol Methods. 2011 ;173(2):259-265.

15. Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, Gubareva LV. Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. Influenza Other Respi Viruses. 2013;7 Suppl 1:44-9.

16. Cheng TJ, Wang SY, Wen WH, Su CY, Lin M, Huang WI, et al. Chemical probes for drug-resistance assessment by binding competition (RABC): oseltamivir susceptibility evaluation. Angew Chem Int Ed Engl. 2013;52(1):366-70.

17. Hurt AC, Chotpitayasunondh T, Cox NJ, Daniels R, Fry AM, Gubareva LV, et al. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. Lancet Infect Dis. 2012 ;12(3):240-8.

18. Rameix-Welti MA, Munier S, Le Gal S, Cuvelier F, Agou F, Enouf V, Naffakh N,et al. Neuraminidase of 2007-2008 influenza A(H1N1) viruses shows increased affinity for sialic acids due to the D344N substitution. Antivir Ther. 2011; 16(4): 597-603.

19. Mahony JB, Chong S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M. Development of a novel bead-based multiplex PCR assay for combined subtyping and oseltamivir resistance genotyping (H275Y) of seasonal and pandemic H1N1 influenza A viruses. J Clin Virol. 2010; 49(4): 277-282.

20. Gubareva LV, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Mishin VP, Deyde VM, Sleeman K, et al. Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus drug susceptibility in vitro. Antivir Ther. 2010; 15(8): 1151-1159.

Detection of Oseltamivir Resistant Influenza A/H3N2 viruses by Real-time RT-PCR

Mohammad-Hadi Karbalaie-Niya, MSc, Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mohamad.karbalai@yahoo.com
Tal'at Mokhtari-Azad, DVM, PhD., Full Professor, Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mokhtari@tums.ac.ir
Nazanin-Zahra Shafiei Jondoghi, PhD, Assistant Professor, Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. nz-shafiei@tums.ac.ir
***Jila Yavarian**, MD. PhD, Assistant Professor, Virology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. yavarian@tums.ac.ir (*Corresponding author)

Abstract

Background: Currently, with increasing risk of influenza A virus epidemics, a lot of studies have been performed. Oseltamivir or Tamiflu (the neuraminidase (NA) inhibitor) is one of the effective drugs for preventing and treatment of these viruses. The H274Y mutation is from the most important drug resistant factors in influenza A viruses. The aim of this study was detection of Oseltamivir resistant influenza A/H3N2 viruses by 274 position inspection using Real-time RT-PCR.

Methods: Initially, specific primers and probs for detection of sensitive and resistant A/H3N2 viruses were designed. The Real-time RT-PCR assay was performed to detect mutation in 274 position of NA gene.

Results: Of 50 A/H3N2 specimens, all were negative for H274Y mutation and no resistant viruses were selected.

Conclusion: Quick and accurate recognition of drug resistant mutants is necessary for effective treatment strategies. Real-time RT-PCR assay is a rapid operational test which could be performed in the laboratories for detection of influenza viruses resistant to NA inhibitor.

Keywords: Influenza A/H3N2 virus, Real-time RT-PCR, Drug resistance