

## ORIGINAL ARTICLE

# ***Identification of Neuraminidase Gene Mutations of Influenza A/H3N2 Isolates in Mazandaran Province, 2016-2018***

Mehdi Rabie Rudsari<sup>1</sup>,  
Mehdi Haghshenas<sup>2</sup>,  
Abdul Wahab Moradi<sup>3</sup>,  
Hadi Razavi Niko<sup>4</sup>,  
Mohammad Reza Haghshenas<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Virology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> Medical Student, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

<sup>4</sup> Assistant of Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

<sup>5</sup> Professor, Department of Virology and Microbiology, Drug Resistance Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>6</sup> Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 22, 2022 ; Accepted January 1, 2023)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Influenza is one of the viral infections of the respiratory system, which causes death in high-risk groups every year. The genomic changes of influenza virus make it susceptible to drug resistance, therefore, continuous monitoring of the influenza virus is highly important in order to recognize the efficacy of available drugs. The current study investigated the neuraminidase gene mutations of Influenza A/H3N2 in Mazandaran province between 2016 and 2018.

**Materials and methods:** Twenty Influenza A/H3N2 samples of patients hospitalized in Mazandaran province were included in the study. PCR and electrophoresis tests were performed using primers designed for the region of the neuraminidase gene that contained the desired mutations. Then, the PCR product was sequenced to determine the mutations.

**Results:** A total of 57 mutations were detected at the level of nucleotides, among which 19 were observed in all isolates, 13 were seen in most isolates, and 25 single mutations that were identified in some isolates. A total of 28 mutations were detected at the amino acid level, among which 13 mutations were observed in all isolates, 6 were detected in most isolates, and 9 single mutations seen in some isolates.

**Conclusion:** Although the sequence of the active site region is conserved in different subtypes of the neuraminidase gene, this region is still subject to mutation and genomic changes, which indicates changes in the active site region of the neuraminidase gene.

**Keywords:** Influenza A, drug resistance, A/H3N2, mutation

**J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (216): 141-150 (Persian).**

**Corresponding Author:** Mohammad Reza Haqshenas - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: haghshenas2001@yahoo.com) and **Abdul Wahab Moradi-** Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. (E-mail: abmoradi@yahoo.com)

# شناسایی جهش های موجود در ژن نورآمینیداز ویروس های آنفلوآنزا A/H3N2 در نمونه های استان مازندران طی سال های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸

مهدی ریبعی رودسری<sup>۱</sup>مهدی حق شناس<sup>۲</sup>عبدالوهاب مرادی<sup>۳</sup>هادی رضوی نیکو<sup>۴</sup>محمد رضا حق شناس<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری آنفلوآنزا یکی از عفونت های ویروسی دستگاه تنفسی است که هر ساله باعث مرگ در گروه های پر خطر می شود. تغییرات ژنومی ویروس آنفلوآنزا آن را مستعد مقاومت دارویی می کند، بنابراین ناظارت مداوم به منظور آگاهی از اثربخشی داروهای موجود بسیار احساس می شود. در مطالعه حاضر شناسایی جهش های موجود در ویروس آنفلوآنزا A/H3N2 در نمونه های استان مازندران از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ لغایت ۱۳۹۷ مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش ها:** از بین نمونه های بیماران مبتلا به آنفلوآنزا بستری در بیمارستان های استان مازندران، ۲۰ نمونه تایید شده H3N2 وارد مطالعه شدند. با استفاده از پرایمیر های طراحی شده، تست های PCR و الکتروفورز در ناحیه ای از ژن نورآمینیداز که حاوی موتاسیون های مورد نظر بوده است، انجام شد. سپس محصول PCR جهت مشخص شدن موتاسیون ها تعیین سکانس شد.

**یافته ها:** در مجموع ۵۷ جهش در سطح نوکلئوتیدها شناسایی گردید که در این میان ۱۹ جهش در تمام ایزو لمبه ها، ۱۳ جهش در اکثر ایزو لمبه ها و ۲۵ جهش بصورت انفرادی در برخی از ایزو لمبه ها مشاهده گردید. در مجموع ۲۸ جهش در سطح اسید آمینه شناسایی گردید که در این میان ۱۳ جهش در تمام ایزو لمبه ها، ۶ جهش در اکثر ایزو لمبه ها و ۹ جهش به صورت انفرادی در برخی از ایزو لمبه ها مشاهده گردید.

**استنتاج:** با وجود حفاظت شده بودن توالی ناحیه اکتیو سایت در ساب تایپ های مختلف از ژن نورآمینیداز این ناحیه همچنان دستخوش موتاسیون و تغییرات ژنومی قرار دارد که نشان دهنده تغییرات در ناحیه اکتیو سایت ژن نورآمینیداز می باشد.

**واژه های کلیدی:** آنفلوآنزا تایپ A، مقاومت داروئی، A/H3N2، موتاسیون

## مقدمه

ویروس آنفلوآنزا متعلق به خانواده ارتومیکسو ویریده می باشد که مجازی تنفسی فوقانی و تحتانی را در گیر می کند و توسط ویروس آنفلوآنزا ایجاد می شود(۱). بوده که ژنوم آن (طول ~ ۱۳ kb) حاوی ۷ تا ۸ قطعه RNA سنس منفی تک رشته ای می باشد(۲-۴).

E-mail: haghshenas2001@yahoo.com  
E-mail: abmoradi@yahoo.com

مولف مسئول: محمد رضا حق شناس - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی  
عبدالوهاب مرادی - گرگان: دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۲. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳. استاد، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۴. استادیار، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۵. استاد، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، مرکز تحقیقات مقاومت داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۱۴۰۱/۱۰/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵ تاریخ ارجاع بهت اصلاحات: ۱۴۰۱/۹/۱ تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۱

و قابل انتقال بودن بین حیوان و انسان و هم‌چنین غیر قابل پیش‌بینی بودن بیماری از دلایل اهمیت این ویروس می‌باشد<sup>(۱۳)</sup>. به طور کالی واکسیناسیون اولین روش برای پیشگیری از عفونت ویروس آنفلوآنزا می‌باشد<sup>(۱۶)</sup> اما به دلیل تغییرات مداوم آنتی‌ژنیک ویروسی آنفلوآنزا فصلی<sup>(۱۴)</sup> و عدم مطابقت بین واکسن آنفلوآنزا فصلی و ویروس آنفلوآنزا منتشر شده و ناتوانی میزان برای ایجاد پاسخ مناسب، سویه‌های واکسن باید سالیانه انتخاب شوند<sup>(۱۷،۱۶)</sup>. به علت همین کوتاهی عمر واکسن آنفلوآنزا و تزریق سالانه آن، و هم‌چنین صرف وقت و هزینه بالا برای تولید آن، داروهای ضدویروسی اولین خط دفاعی در مقابل ویروس‌های نوظهور می‌باشد<sup>(۱۸)</sup>. بنابراین در مطالعه حاضر شناسایی جهش‌های موجود در ژن نورامینیداز ویروس‌های آنفلوآنزا H3N2/A در استان مازندران بین سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ مورد بررسی، قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه یک مطالعه توصیفی- مقطعی بوده که از نمونه های بیماران مبتلا به آنفلوآنزا بستری در بیمارستان های استان مازندران بین سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ استفاده گردید. نمونه های مذکور پس از تایید از نظر ویروس آنفلوآنزا به روش Real-Time PCR و تعیین ساب تایپ در فریزر -۸۰- درجه نگهداری گردید. در این مطالعه از ۲۰ نمونه آنفلوآنزا A ساب تایپ H3N2 بین سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ استفاده گردید. (کد اخلاقة : IR.MAZUMS.REC.1397.1741).

استخراج RNA

استخراج RNA از نمونه‌های بیماران با استفاده از کیت PureLink™ Viral RNA/DNA Kits از شرکت Invitrogen انجام شد. در مرحله استخراج RNA، میکرولیتر پروتئیناز را به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اسنتریل اضافه کرده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بیمار و هم حجم آن محلول Lysis Buffer به آن اضافه

و بر حسب تغییرات آنتی زنی در قطعات نوکلکتوپروتئین و پروتئین ماتریکس، به سه تایپ آنفلوآنزای تایپ A، تایپ B، و تایپ C طبقه‌بندی می‌شوند که در این میان، تایپ A به عنوان شایع‌ترین و شدیدترین پاتوژن انسانی در بین این سه تایپ می‌باشد<sup>(۵)</sup>. ویروس آنفلوآنزای تایپ A بر اساس خصوصیات آنتی زنیک گلیکوپروتئین هماگلوتینین و نورآمینیداز به سه تایپ هایی دسته‌بندی می‌شود. تاکنون ۱۶ ساب تایپ از گلیکوپروتئین هماگلوتینین (H1-H16) و ۹ ساب تایپ از گلیکوپروتئین نورامینیداز (N1-N9) شناسایی شده است<sup>(۷,۸)</sup> که رایج ترین ساب تایپ‌های منتشر شده در جمعیت‌های انسانی H1N1 و H3N2 می‌باشد<sup>(۸,۹)</sup>. ویروس آنفلوآنزای RNA برای پایدار ماندن، به دو مکانیسم تکاملی، موتابسیون و نوترکیبی ژنومی وابسته است تا بطرور مداوم از سیستم ایمنی میزبان فرار کند و با شرایط جدید سازگار شود<sup>(۵)</sup>. فقدان توانایی پروف ریدینگ در RNA پلیمراز وابسته به RNA ویروس آنفلوآنزای تایپ A به این تغییرات کمک می‌کند<sup>(۱۰,۱۱)</sup>. به طور کلی مطالعات نشان‌دهنده وجود موتابسیون‌های N294S، I222V و H274Y در ساب تایپ H3N2 می‌باشد<sup>(۱۲,۱۳)</sup> که در نورآمینیداز ویروس انفلوآنزا ایجاد می‌گردد و بسته به نوع مهارکننده‌های نورآمینیداز (بسته به تایپ/ساب تایپ آنتی زنی نورآمینیداز) و نوع دارو متغیر است؛ به همین دلیل، مقاومت به مهارکننده‌های نورآمینیداز عمده‌تا بر اساس آزمایش ویروس ها از طریق سنجش مهار فعالیت نورآمینیداز در ارتباط با آنالیز توالی این قسمت می‌باشد<sup>(۱۴)</sup>. با توجه به این که شیوع موتانت‌های مقاوم از نظر جغرافیائی نیز متغیر می‌باشند، وجود این موتابسیون‌ها کنترل و همچنین درمان بیماری را پیچیده کرده است. عفونت‌های ویروس آنفلوآنزا به طور قابل توجهی موجب بیماری و مرگ و میر می‌شوند که گزارش گردیده سالیانه ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار مرگ مرتبط با آنفلوآنزا اتفاق می‌افتد<sup>(۱۵,۱۶)</sup>. سرعت انتشار بالای بیماری، بالا بودن میزان مرگ به ویژه در گروه‌های در معرض خطر

میکروتیوب حاوی مسٹر میکس اضافه و حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسید. نمونه‌ها در دستگاه ترمال سیکلر به منظور انجام واکنش رونویسی معکوس (Revers Transcription) مطابق برنامه دمایی: ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد انجام شد. در پایان میکروتیوب حاوی درجه نگهداری شد. پس از استخراج RNA ویروس و تبدیل آن به cDNA، فرآیند تکثیر ناحیه ژن نورآمینیداز که حاوی موتاسین‌ها بود به کمک پرایمرهای طراحی شده و به روش PCR انجام گرفت.

## جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده ناچیه A/H3N2 و بروس، انفلوآنزای Active Site

نام پرایمر	توالی	TM	Amplicon Size (bp)
FLU N2-F	5'-AGGATTGTGACCTTCTCTAAAGGAC-3'	58/8	948
FLU N2-R	5'-TTCTGGGTGTGTCCTCCAAACAG-3'	50/4	948

PCR تست

به منظور انجام تست PCR حجم نهایی واکنش برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر می باشد که شامل: ۲۰ میکرولیتر از مستر میکس مطابق جدول شماره ۲ به میکروتیوب های cDNA، ۵ میکرولیتر از ۰/۲ml انتقال داده شده، سپس ۵ سنتز شده نمونه مورد نظر را به میکروتیوب فوق اضافه کرده و پس از سانتریفیوژ مختصر به دستگاه ترمال سایکلر مدل Labcycler basic شرکت sensorequest با استفاده از پر تکل دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و ۳۵ سیکل شامل (۲۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲°C و ۱ دقیقه در دمای ۷۲°C) و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد تست PCR انجام شد.

## جدول شماره ۲: تهیه مستر میکس، به منظور انجام تست PCR

جزای واکنش (ظلت اولیه)	غلفت نهایی	حجم ( $\mu\text{l}$ )
	1 X	(with MgCl <sub>2</sub> 2 $\mu\text{M}$ ) 10x PCR Buffer
	2.5 $\mu\text{M}$ each	dNTPs Mix
	0.6 units	mi-Pfu DNA polymerase (2.5 U/ $\mu\text{l}$ )
	0.4 pmol/ $\mu\text{l}$	Primer F (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
	0.4 pmol/ $\mu\text{l}$	Primer R (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
	-	Distilled water
	-	Total volume

و به مدت ۱۵ ثانیه با ورتکس مخلوط گردید. محلول فوق در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۲-۳ ثانیه سانتریفیوژ انجام شد. به محلول به دست آمده ۲۵۰ میکرولیتر کل ۹۶-۱۰۰ درصد اضافه کرده و سپس به مدت ۱۵ ثانیه با ورتکس آن را مخلوط کرده و محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. محلول به دست آمده به تیوب های C Viral Spin که حاوی فیلتر مخصوص است اضافه شده و سپس با دور g ۶۸۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ستون حاوی فیلتر مخصوص را به میکروتیوب دیگر منتقل کرده و با استفاده از محلول Wash Buffer به میزان ۵۰۰ میکرولیتر دوبار عمل شستشو را انجام داده و در دور g ۶۸۰۰ به مدت ۱ دقیقه مجدد سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت محلول داخل تیوب دور ریخته و با استفاده از سانتریفیوژ دور بالا حذف اتانل از فیلتر انجام شد. فیلتر مخصوص دور Viral Spin C را به تیوب های ۱/۵ میلی لیتری موجود در کیت قرار داده و سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر اتاق انکوبه گردید. محلول حاصله که حاوی ژنوم بوده را با استفاده از اسپکتروفوتومتر مورد ارزیابی قرار داده و سپس در دمای -۸۰- درجه سانتی گراد جهت استفاده از تست نگهداری گردید.

cDNA سنتر

در این مرحله به منظور ستر cDNA از کیت تجاری شرکت applied biosystem ساخت کشور آمریکا با نام high capacity cDNA reverse transcription kit استفاده گردید. برای ستر cDNA از مجموع ۱۰ میکرولیتر مستر میکس شامل: ۲ میکرولیتر از RT-Buffer و ۰/۸ میکرولیتر از dNTP MIX و ۲ میکرولیتر از Nuclease و ۴/۲ میکرولیتر از RT Random Primer و Free Water به میکروتیوب ۰/۲ میکرولیتر اضافه شده سپس ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده ویروس به

به منظور بررسی دقیق تر و شناسایی جایگاه دقیق تغییرات نوکلوتیدی و موتاسیون های ایجاد شده از نرم افزار BioEdit Sequence Alignment Editor ورژن ۷/۲/۵ استفاده گردید. به منظور بررسی موتاسیون های ایجاد شده توسط نرم افزار BIOEDIT توالي نوکلوتیدی براساس فریم خود به اسید آمینه ترجمه شد و سپس با سکانس اسید آمینه پروتئین N2 مقایسه و موتاسیون ها شناسایی شدند.

### یافته ها

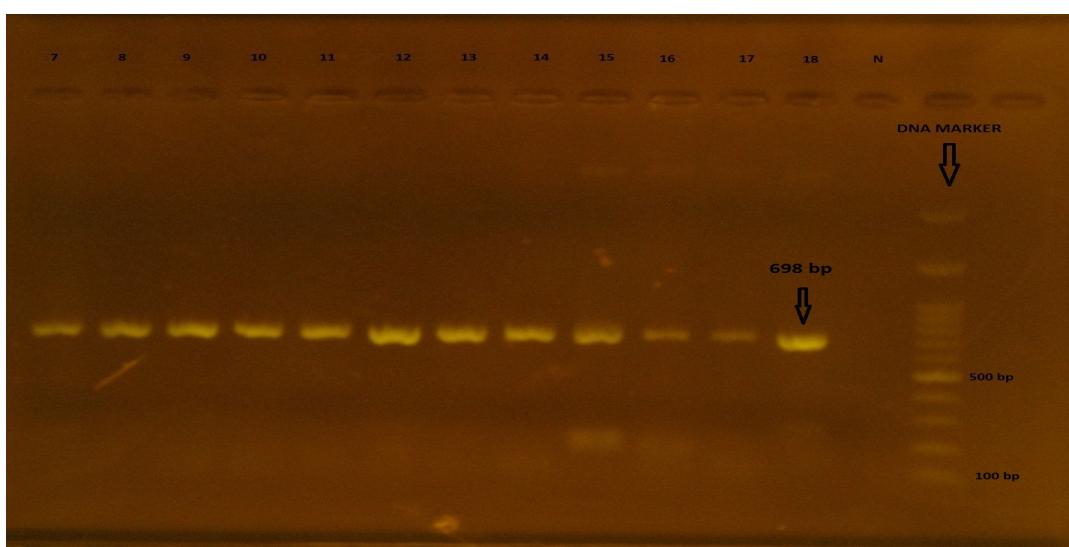
در این مطالعه از نمونه های بیماران با درگیری تنفسی در بیمارستان های استان مازندران که در بین سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران ارسال شدند و از نظر وجود ویروس آنفلوانزا به روشن PCR Real Time PCR مورد تایید قرار گرفتند استفاده گردید. در بین نمونه ها ۲۰ نمونه مربوط به آنفلوانزا A/H3N2 بودند. پس از سنتر cDNA تست PCR نمونه های مذکور با پرایمر ها و پروتکل خاص برای تکثیر ژن نورآمینیداز انجام گردید. به منظور شناسایی و تایید صحت قطعات ژنی تکثیر شده، الکتروفرز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد (تصویر شماره ۱).

### نتیجه الکتروفرز

به منظور مشاهده و تایید نتیجه تکثیر محدوده ژنی مورد نظر از روش الکتروفرز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. در این روش پس از آماده سازی ژل آگارز و الکتروفرز نمونه ها در میدان الکتریکی در مجاورت بافر TBE باندهای با طول ۶۹۸ bp برای نمونه های A/H3N2 توسط دستگاه Uv transilluminator مشاهده گردید.

توالی یابی، آنالیز سکانس ها و تعیین موتاسیون های ژن نورآمینیداز

پس از الکتروفرز محصول PCR و مشاهده باند اختصاصی موردنظر، محصولات PCR به همراه پرایمر های طراحی شده، جهت توالی یابی به شرکت ماکرژن کرده جنبی ارسال شد. نمونه ها به روشن Sanger و توسط دستگاه ABI 3730XL Capillary Sequencer تعیین توالی شدند. سکانس های دریافتی پس از دریافت توسط نرم افزار chromas ورژن ۲/۶/۴ آنالیز و کیفیت گراف ها مورد ارزیابی قرار گرفت. فرمت FASTA سکانس های دریافتی به صورت آنلاین در سایت NCBI با سکانس کامل ژن نورآمینیداز در ساب تایپ N2 بلاست گردید و از نظر مطابقت با سکانس رفانس بررسی و تایید شدند.



تصویر شماره ۱: تصویر باند الکتروفرز محصول PCR ژن نورآمینیداز آنفلوانزا A ساب تایپ H3N2. طول باند حاصل از این واکنش ۶۹۸ جفت باز می باشد

سال ۱۳۹۶ شامل ۱۰ جهش و در سال ۱۳۹۷ شامل ۱۰ جهش می‌باشد که در جدول شماره ۳ بیان شده است.

**جدول شماره ۳:** موتابیون‌های نوکلتوتیدی ایجاد شده در آنفلوآنزای A/H3N2

موتابیون های انفرادی در همه سال ها	موتابیون های گروهی نکارشونده در یک سال (درصد فراوانی)	موتابیون های گروهی نکارشونده در همه سال ها (درصد فراوانی)	سال
A351G	G384A 50%		۱۳۹۵
C413A	C418A 50%		
G477A	T465C 10%		
C537A	G477A 15%		
G588A	G627A 40 %		
A660C 10%			
G681A 10%	T333G		
G787A 10%	G334T		
C870A 30%	A338G		
A420G	A660C 100%	C471T	۱۳۹۶
A424G		A489G	
C426A		T501C	
T532C		A643G	
A874G		A663T	
A880G		C666T	
A888C		G773A	
C901G		G735A	
T579C		T739A	
G819T/A		C800A	
G486A	C376T 100%	G828A	
A544G	A411G 40%	G849A	۱۳۹۷
G819T/A	T465C 100%	C890A	
C825T	G477A 10%	T897C	
A827G	A660C 100%	A898C	
A916G	G681A 70%		
G456A	T771C 30%		
T719C	G787A 80%		
A700G	A913T 20%		
G691A	T908A 20%		

## بحث

بیماری آنفلوآنزا سالانه عامل حدود ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار مرگ در جهان است که آنفلوآنزای A رایج‌ترین و شدیدترین پاتوژن انسانی در بین تایپ‌های آنفلوآنزا می‌باشد.<sup>(۱۴, ۱۵)</sup>

تاكنون ساب تایپ‌های متفاوتی از آنفلوآنزای A شناسایی شده‌اند که در بین آن‌ها، ساب تایپ H3N2 عامل اپیدمی فصلی سالانه در سراسر جهان می‌باشد.<sup>(۸-۱۰)</sup> دو کلاس از داروهای ضد ویروسی در پیشگیری و درمان آنفلوآنزا مورد تایید می‌باشد. دسته اول داروهای آدامانتین و دسته دوم مهارکننده‌های نورآمینیداز می‌باشند. داروی اسلاتامیوویر با نام تجاری Tamiflu رایج‌ترین داروی درمانی آنفلوآنزا، جزو دسته دوم قرار دارد. دارو به قسمت کاتالیتیک نورآمینیداز متصل می‌شوند و به عنوان ممانع کننده‌های فعالیت نورآمینیداز عمل می‌کند. اتصال این داروها به حفره ناحیه فعال (ACTIVE SITE)

به منظور بررسی جهش‌های ژن نورآمینیداز و مقایسه تغییرات ایجاد شده، توالی‌های نوکلتوتیدی ایزوله‌های H3N2 مازندران طی ۳ سال گذشته (بین سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۷) به صورت هم زمان با یکدیگر و یک توالی حساس به اولتامیویر کشور همسایه عراق مربوط به سال ۲۰۰۹ با نام گذاری A/IRAQ/WRAIR1157P/2009(H3N2) (به دلیل فقدان توالی H3N2 در سال ۲۰۰۹ در ایران از توالی کشور همسایه عراق استفاده گردید). توالی‌های نوکلتوتیدی مورد مطالعه به منظور بررسی بیشتر و کاهش خطای ناشی از فرآیند حین آزمایش و همچنین مقایسه در سطح جهانی با ایزوله رفratns و حساس به دارو WHO مربوط به کشور آمریکا در سال ۲۰۰۹ با نام‌گذاری (A/NEW YORK/1190/2009(H3N2)) مقایسه گردید و نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار BioEdit مورد مقایسه قرار گرفت. در ساب تایپ H3N2 به منظور شناسایی جهش‌ها و بررسی تغییرات ژن نورآمینیداز در نمونه‌های مورد مطالعه در سال‌های ۱۳۹۵، ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ که اپیدمی H3N2 غالب بوده است جهش‌های شناسایی شده در ساب تایپ H3N2 در سه گروه دسته‌بندی شده‌اند. گروه اول مربوط به جهش‌هایی می‌شوند که تمام ایزوله‌های مورد مطالعه در سال‌های ۱۳۹۵، ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ آن‌ها را کسب کرده‌اند.<sup>۱۹</sup> جهش شامل T333G، T501C، A489G، C471T، A338G، G334T، T739A، G735A، G773A، C666T، A663T، A643G، A898C و T897C، C890A، G849A، G828A، C800A در این گروه قرار دارند. گروه دوم مربوط به جهش‌هایی می‌باشد که در برخی از سال‌ها مشاهده شده‌اند و برخلاف گروه قبلی در همه سال‌ها در ژنوم ویروس حضور نداشتند. دسته دیگر از جهش‌ها مربوط به مواردی می‌باشد که تنها در یک ایزوله مشاهده شده‌اند. این جهش‌ها در سال ۱۳۹۵ شامل ۵ جهش، در

A411G و T771C اشاره کرد. جهش‌های A913T و T908A نیز با فراوانی حدود ۲۰ درصد در این سال مشاهده شدند. نکته قابل توجه در این سال مربوط به جهش‌هایی می‌باشد که در دو سال گذشته از فراوانی حدود ۱۰ درصد به فراوانی حدود ۷۰ تا ۱۰۰ درصد در ایزووله‌ها رسیده‌اند که این امر نشان‌دهنده ثبیت شدن این جهش‌ها در ژنوم ویروس آنفلوآنزا H3N2 می‌باشد که از جمله این جهش‌ها می‌توان به T465C و A660C با فراوانی ۱۰۰ درصد و G681A و G787A با فراوانی ۷۰ تا ۸۰ درصدی اشاره کرد. دسته دیگر از جهش‌ها مربوط به مواردی می‌باشد که تنها در یک ایزووله مشاهده شده‌اند. این جهش‌ها در سال ۱۳۹۵ شامل ۵ جهش و در سال ۱۳۹۶ و سال ۱۳۹۷ شامل ۱۰ جهش در هر کدام از سال‌ها می‌باشد.

در مطالعه‌ای که بین سال‌های ۲۰۰۷-۲۰۱۱ در چین بر روی ساب تایپ H3N2 صورت گرفت موتاسیون‌های Y310H، K221D، I215V، V194I، H150R، D147N مشاهده گردید<sup>(۲۴)</sup> هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگری که بین سال‌های ۲۰۱۷-۲۰۱۴ در چین انجام شد موتاسیون‌های E221D، T267K، S245N و S247T مشاهده گردید که با موتاسیون‌های مازندران مطابقت دارد<sup>(۲۵)</sup>. در مطالعه‌ای که در افریقای جنوبی بین H3N2-۲۰۱۳-۲۰۰۹ بر روی ساب تایپ I215V و D147N صورت گرفت موتاسیون‌های E221D مشاهده گردید گه با موتاسیون‌های شناسایی شده در مازندران مطابقت دارد<sup>(۲۶)</sup>. در مطالعه‌ای که در مازندران در کره بین سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۱۱ بر روی A/H3N2 صورت گرفت، موتاسیون E221D با جایگزین شدن اسید امینه آسپارتیک اسید (D) در جایگاه ۲۲۱ در سال ۲۰۱۲ شناسایی گردید که تا ۲۰۱۶ در همه سویه‌های در گردش مشاهده گردید. از آن‌جایی که این موتاسیون در سویه‌های مازندران از سال ۲۰۱۶ تا ۲۰۱۸ مشاهده گردیده است نشان‌دهنده ثبیت این موتاسیون در سویه‌های در گردش دنیا در سال‌های

گلیکوپروتئین نورآمینیداز ویروس باعث مهار فعالیت سیالیدازی ناحیه فعال می‌شود و با مهار برش اسیدسیالیک سطح سلول مانع رها شدن ویروس از سطح سلول می‌گردد. هر گونه موتاسیون در ناحیه اکتیو سایت ویروس می‌تواند با تغییر شکل فضایی در این ناحیه مانع اتصال دارو و یا کاهش سطح اتصال به دارو در این جایگاه و در نتیجه مقاوم شدن ویروس و یا کاهش میزان حساسیت دارو گردد<sup>(۲۳، ۲۲)</sup>. جهش‌های شناسایی شده در آنفلوآنزای A ساب تایپ H3N2 در سه گروه دسته بندی شده‌اند. گروه اول مربوط به جهش‌هایی می‌شوند که تمام ایزووله‌های مورد مطالعه در سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۷ و آن‌ها را کسب کرده‌اند. ۱۹ جهش شامل A489G، C471T، T443C، A338G، G334T، T333G، G735A، G773A، C666T، A663T، A643G، T501C، T897C، C890A، G849A، G828A، C800A، T739A و A898C در این گروه قرار دارند. مشاهده این جهش‌های گروهی در هر سه سال و در تمام ایزووله‌ها نشان‌دهنده تغییر ژنوم ویروس و پایدار شدن آن در سال‌های بعد می‌باشد. گروه دوم مربوط به جهش‌هایی می‌باشد که در برخی از سال‌ها مشاهده شده‌اند. از جمله این جهش‌ها که در سال ۱۳۹۵ در بین هشت ایزووله مورد مطالعه شامل جهش‌های G384A و C418A با فراوانی ۵۰ درصد می‌باشد و جهش‌های G627A و C870A و G627A با فراوانی کمتر از ۳۰ تا ۴۰ درصد می‌توان اشاره کرد. از جمله جهش‌های با فراوانی بسیار پایین حدود ۱۰ درصد شامل جهش‌های A477A، G681A، A660C و G477A و G787A را می‌توان اشاره کرد. در سال ۱۳۹۶ از بین ۲ ایزووله مورد مطالعه قرار گرفته بدليل حجم پایین نمونه‌گیری تنها جهش A660C در هر دو ایزووله شناسایی گردید در حالی که این جهش در سال گذشته با فراوانی فقط ۱۰ درصد مشاهده گردید. در سال ۱۳۹۷ از بین ده ایزووله مورد مطالعه جهش C376T در همه ایزووله‌ها مشاهده گردید. از جمله جهش‌ها با فراوانی پایین تر حدود ۴۰ درصد می‌توان به جهش‌های

از موتاسیون‌های شدید مقاومت به اولسلتامیویر مشاهده نشد که این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده تاثیرگذار بودن داروی اولسلتامیویر در پیشگیری و درمان عفونت ناشی از ساب تایپ H3N2 باشد. با توجه به میزان پایین فراوانی مقاومت به داروی اولسلتامیویر در سال‌های اخیر پیشنهاد می‌گردد پایش سالانه و مداوم این موتاسیون‌ها در حجم نمونه بالاتری صورت گیرد تا میزان شیوع مقاومت در صورت مشاهده گزارش گردد.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مازندران و گلستان به خاطر حمایت‌های مالی و همکاران محترم آزمایشگاه و همه عزیزانی که در انجام این پروژه همکاری لازم را داشته‌اند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید (کد طرح ۱۷۴۱). این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مشترک دانشگاه علوم پزشکی مازندران با دانشگاه علوم پزشکی گلستان می‌باشد.

قبل‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد. از طرفی موتاسیون‌های T267K و S245N در سال ۲۰۱۴ در کره شناسایی شده که در هر سه سال مطالعه در مازندران در سال‌های بین ۲۰۱۶-۲۰۱۸ در همه سویه‌ها مشاهده گردید(۲۷). در مطالعه‌ی که در ایران صورت گرفت از بین ۵۰ ایزوله H3N2 بررسی شده موتاسیون مقاومت دارویی به اولسلتامیویر مشاهده نگردید. البته در مطالعه مذکور فقط موتاسیون H274Y به روش Real Time PCR بررسی گردید و سایر موتاسیون‌های مقاومت دارویی بررسی نشد(۲۸).

در ساب تایپ H3N2 موتاسیون‌های E119V، R292K، R224K و N294S شایع‌ترین و شدیدترین عامل مقاومت دارویی به اولسلتامیویر می‌باشند؛ هرچند موتاسیون‌های دیگری با میزان شدت کم‌تر عامل مقاومت این ویروس‌ها به داروی اولسلتامیویر شناخته شده‌اند. از بین ۲۰ ایزوله مورد مطالعه در استان مازندران در سال‌های ۱۳۹۵، ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ هیچ کدام

### References

1. Glezen WP. Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev* 1996;18(1):64-76.
2. Xu J, Davis CT, Christman MC, Rivailler P, Zhong H, et al. Evolutionary History and Phylodynamics of Influenza A and B Neuraminidase (NA) Genes Inferred from Large-Scale Sequence Analyses. *PLoS One* 2012; 7(7): e38665.
3. Nelson MI, Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews* 2007; 8(3): 196-205
4. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP, Timbury MC. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933; (225): 66-68.
5. Webster RG, Bean WJ. Genetics of Influenza Virus. *Annu Rev Genet* 1978; 12(1): 415-431.
6. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56(1):152-179.
7. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, Kitaoka S, Mizuta K, Nishimura H. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis* 2006; 193(9): 1229-1235.
8. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Reports* 2010; 3(Suppl3) 125: 16-26.
9. Haghshenas MR, Jafarian E, Babamahmoodi F, Tabrizi A, Nandoost S, Alizadeh Navaei R. Prevalence of influenza A/H3N2 virus in northern Iran from 2011 to 2013. *Caspian J Intern Med* 2015; 6(2): 116-119.
10. Duan S, Boltz DA, Seiler P, Li J, Bragstad K, et al. (2010) Oseltamivir-Resistant Pandemic H1N1/2009 Influenza Virus Possesses Lower

- Transmissibility and Fitness in Ferrets. PLoS Pathog 2012; 6(7): e1001022.
11. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(9): 4171-4175.
  12. Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(24): 13910-13913.
  13. WHO. Influenza Pandemic Plan. The Role of WHO and Guidelines for National and Regional Planning. Geneva: WHO; 1999 .
  14. Khazeni N, Bravata DM, Holty JC, Uyeki TM, Stave CD, Gould MK: Systematic Review: Safety and Efficacy of Extended-Duration Antiviral Chemoprophylaxis Against Pandemic and Seasonal Influenza. Ann Intern Med 2009; 151(7): 464-473.
  15. Lade Ks, Sawant Sd, Singh Mc. Review On Influenza With Special Emphasis On Swine Flu. Int J Curr Pharm Res 2011; 3(1): 97-107.
  16. Sheu TG, Deyde VM, Adhiambo MO, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(9): 3284-3292.
  17. Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. BMC Infect Dis 2011; 11(134):1471-2334.
  18. Neumann G, Kawaoka Y. The First Influenza Pandemic of the New Millennium. Influenza Other Respi Viruses 2011; 5(3): 157-166.
  19. Morlighem JE, Aoki S, Kishima M, Hanami M, Ogawa C, Jalloh A, et al. Mutation Analysis of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses Collected in Japan during the Peak Phase of the Pandemic. PLoS One 2011; 6(4): e18956.
  20. Baz M, Abed Y, McDonald J, Boivin G. Characterization of multidrug-resistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. Clin Infect Dis 2006; 43(12): 1555-1561.
  21. Santistevé PC, Ciancio BC, Nicoll A, Lopalco PL. The importance of influenza prevention for public health. Hum Vaccin Immunother 2012; 8(1): 89-95.
  22. Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. Ann N Y Acad Sci 2014; 1323(1): 115-139.
  23. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. Infect Drug Resist 2017; 10: 121-134.
  24. Huang P, Liang Lj, Hou Nm, Zhang X, Su Wz, Yu Sy, et al. Phylogenetic, molecular and drug-sensitivity analysis of HA and NA genes of human H3N2 influenza A viruses in Guangdong, China, 2007–2011. Epidemiol Infect 2013; 141(5): 1061-1069.
  25. Liu J, Gong LF, Sun ZL, Gao Q, Dong ZJ. Genetic characterization of influenza A (H3N2) viruses from 2014 to 2017 in Yantai, east of China. J Lab Med 2018; 42(3): 89-97.
  26. Treurnicht FK, Buys A, Tempia S, Seleka M, Cohen AL, Walaza S, Glass AJ, Rossouw I, McAnerney J, Blumberg L, Cohen C. Replacement of neuraminidase inhibitor-susceptible influenza A (H1N1) with resistant phenotype in 2008 and circulation of susceptible influenza A and B viruses during 2009-2013, South Africa. Influenza Other Respir Viruses 2019; 13(1): 54-63.
  27. Lee HS, Noh JY, Song JY, Cheong HJ, Choi WS, Jeong HW, et al. Molecular genetic characteristics of influenza A virus clinically isolated during 2011-2016 influenza seasons

- in Korea. Influenza Other Respir Viruses 2018; 12(4): 497-507.
28. Khodadad N, Moattari A, Abadi MS, Kadivar MR, Sarvari J, Tavakoli F, et al. Prevalence of influenza A (H1N1) pdm09 virus resistant to oseltamivir in Shiraz, Iran, during 2012-2013. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(8): e23690.