(مقاله پژوهشی)

شناسایی جهش‌های H274Y و R292K ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 مقاوم به داروی مهارکننده نورامینیداز با روش تعیین توالی

محمد هادی کربلائی نیا[1]، طلعت مختاری آزاد[2]، ژیلا یاوریان[3*]، نازنین زهرا شفیعی جندقی[3]، مریم ناصری[4]

۱-دانشجوی دکترای گروه ویروس‌شناسی.
۲- استاد گروه ویروس‌شناسی.
۳- استادیار گروه ویروس‌شناسی.
۴-کارشناس‌ارشد ویروس‌شناسی.

۱-گروه ویروس‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲و۳و۴-گروه ویروس‌شناسی، دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
ژیلا یاوریان؛ گروه ویروس شناسی، دانشکدهٔ بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۲۸۹۶۴۸۴
Email: yavarian@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ویروس‌های آنفلوانزا A عامل ایجادکنندهٔ پاندمی و اپیدمی‌های مهمی در جهان هستند که برای مقابله با آنها تحقیقات گسترده‌ای در زمینهٔ پیش‌گیری و درمان انجام می‌شود. اخیراً اوسلتامیویر یا تامی‌فلو به‌عنوان داروی مهارکنندهٔ نورامینیداز (NAI) جهت پیش‌گیری و درمان این ویروس‌ها به‌کار می‌رود. ظهور ویروس‌های مقاوم از جمله مشکلات مصرف داروهای ضد ویروسی است. با تحقیقات مختلفی که بر روی جهش‌های مسئول مقاومت دارویی به NAI صورت گرفته در سایت فعال آنزیم نورامینیداز، جهش در جایگاه‌های ۱۱۹، ۲۷۴، ۲۹۲ دیده شده است. با توجه به اهمیت شناسایی ویروس‌های مقاوم در گردش بررسی جهش‌های H274Y و R292K مسئول مقاومت دارویی در ویروس‌های آنفلوانزای A/H3N2 با روش تعیین توالی به‌عنوان هدف این مطالعه قرار داده شد.

روش بررسی: برای تکثیر (Amplification) ناحیه مستعد جهش در ژن نورامینیداز، تست Conventional RT-PCR بر روی ۵۰ نمونهٔ آنفلوانزای A/H3N2 انجام شده، محصولات PCR تعیین توالی و نتایج تحلیل و آنالیز شدند.

یافته‌ها: با تحلیل و ارزیابی توالی‌های اسید نوکلئیکی دریافتیم که کلیهٔ نمونه‌ها فاقد جهش‌های H274Y و R292K بوده و هیچ مورد مقاومی یافت نشد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که برای نیل به اهداف درمانی مؤثر، شناسایی جهش‌های مقاومت دارویی با حساسیت و ویژگی بالا امری ضروری به شمار می‌رود، در این راستا می‌توان از روش تعیین توالی استفاده کرد و از مزایای آن همچون دقت و توان عملیاتی بالا و کارآمدی آن برای ردیابی پیدایش جهش‌های مقاومت دارویی ویروس‌های آنفلوانزا در جامعه به‌خوبی بهره جست و به‌عنوان تست انتخابی در آزمایشگاه‌های تشخیصی از آن استفاده کرد.

کلید واژگان: ویروس آنفلوانزا A/H3N2، تعیین توالی، مقاومت به داروی اوسلتامیویر.

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴ **دریافت مقاله اصلاح‌شده:** ۱۳۹۳/۱/۲۶ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۳/۴/۹

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا دارای ژنوم RNA با سنس منفی و قطعه قطعه (۸ قطعه‌ای) می‌باشند که به‌عنوان یکی از اعضای خانوادهٔ اورتومیکسوویریده طبقه‌بندی می‌شوند (۱و۲). بر اساس خصوصیات نوکلئوکپسید این ویروس‌ها را به ۳ تیپ A، B و C تقسیم می‌کنند.(۲) ویروسهای آنفلوانزا هر ساله به خاطر تغییرات خاص ژنومیک خود عامل بالقوهٔ خطر برای ایجاد اپیدمی با مرگ‌و میر متفاوت در جوامع انسانی شناخته شده‌اند (۲و۳). از این‌رو در بسیاری از کشورها پرداخت هزینه‌های کلان جهت مبارزه، پیش‌گیری و درمان با این ویروس‌ها از اولویت‌های سیستم بهداشتی قرار گرفته است (۳). برای درمان بیماری ایجاد شده با ویروس‌های آنفلوانزا ژنهای نورامینیداز (NA) و کانال یونی (M2) را مورد هدف قرار می‌دهند (۳و۴). لذا از مهار کننده‌های نورامینیداز (NAI) و مهار کننده‌های کانال یونی (Inhibitor M2) استفاده می‌کنند (۴). از مهار کننده‌های کانال یونی می‌توان به آدامانتان‌ها (آمانتادین و ریمانتادین) اشاره کرد که به عنوان اولین داروهای ضد ویروس‌های آنفلوانزا A شناخته می‌شوند (۱و۳). متأسفانه با استفاده از این داروها به‌سرعت ویروس‌های مقاوم پدیدار شدند (۲و۴). جهش‌های V27A و S31N از جملهٔ شایع‌ترین جهش‌های مقاومت دارویی شناخته شده در ژن M2 می‌باشند (۳). از داروهای مهار کننده نورامینیداز (NAI) که در کنترل آنفلوانزا به‌خوبی به‌کار می‌روند، می‌توان به اوسلتامیویر (تامی‌فلو) و زانامیویر (ریلنزا) اشاره کرد (۵و۶). پیدایش موتانت‌های مقاوم به این داروها در طی سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۷ به‌دنبال استفاده آنها علیه ویروس‌های آنفلوانزا A/H1N1 رفته رفته گسترش یافت (۶و۷) با مطالعات بیشتر، محققان دریافتند که تحت تیپ‌های دیگر ویروس‌های آنفلوانزا A مانند H5N1 و H3N2 علاوه بر تحت تیپ H1N1 با ایجاد جهش به این داروها مقاوم می‌شوند(۵، ۸). از جمله شایع‌ترین جهش‌های شناخته شده که باعث ایجاد مقاومت زیادی به داروی اوسلتامیویر می‌شود می‌توان به H275Y (H274Y در N2) اشاره کرد (۷، ۸) شایان ذکر است که این جهش از نوع Nonsynonymous بوده که به‌صورت یک جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۸۲۴ ژن نورامینیداز، باز C (سیتوزین) جایگزین باز T (تیمین) شده و در سطح ترجمه باعث تولید اسید آمینه هیستیدین (H) به‌جای تیروزین (Y) در جایگاه فعال آنزیم می‌شود (۶، ۷، ۹). جهش‌های دیگری نیز مانند E119V و R292K شناسایی شده‌اند، که عامل ایجاد موتانت‌های مقاوم به دارو در ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 می‌باشند (۱۰). در جهش R292K موتاسیون نقطه‌ای در جایگاه نوکلئوتید ۸۷۶ ژن نورامینیداز (N2) رخ می‌دهد که در سطح ترجمهٔ اسید آمینه آرژینین (R) به‌جای تیروزین (K) در سایت فعال آنزیم قرار می‌گیرد و مقاومت دارویی ایجاد می‌شود(۱۰). استفادهٔ بی‌رویه و تحت دستورالعمل‌های نامناسب از این داروها باعث گسترش موتانت‌های مقاوم به دارو در بسیاری از کشورها شده است (۱۰). امروزه برای شناسایی و غربالگری ویروس‌های مقاوم به دارو از روش‌های فنوتایپینگ به عنوان استاندارد طلایی، استفاده می‌کنند (۱۱،۳). برای شناسایی جهش‌هایی مانند H274Y، R292K روش‌های دیگری نیز به‌کار می‌روند، از جمله توالی‌یابی ژنوم به روش سانگر که یکی از کاربردهای آن به طور گسترده، شناسایی جهش‌های مقاوم به دارو می‌باشد (۱۱،۵). در نتیجه با توجه به اهمیت ردیابی ویروس‌های مقاوم به دارو معرفی یک روش دقیق، مناسب، فراگیر و با قابلیت پوشش جهش‌های متعدد لازم است. برای نیل به این اهداف در این مطالعه از روش تعیین توالی به منظور شناسایی جهش‌های H274Y و R292K در ژن نورامینیداز ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 استفاده شد.

روش بررسی

در مطالعهٔ مقطعی حاضر از سواب گلوی ۵۰ بیمار مبتلا به ویروس آنفلوانزا A/H3N2 که به مرکز ملی آنفلوانزا واقع در گروه ویروس‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۰ ارسال شده بودند، استفاده شد. با به‌کارگیری از کیت High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) تخلیص ژنوم نمونه‌ها انجام شد.

برای ردیابی جهش‌های H274Y و R292K با روش تعیین توالی با انجام یک تست Conventional RT-PCR منطقه حدود ۲۰۰ نوکلئوتیدی اطراف ناحیهٔ جهش‌های مورد نظر تکثیر یافت. برای این کار یک جفت پرایمر Forward و Reverse با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده از Genebank طراحی شده و با برنامهٔ Bioedit version 7.1.3.0 (2011) و OLIGO5 از لحاظ دمای ذوب (Tm) و ساختارهای ثانویه مورد بررسی قرار گرفتند. توالی پرایمرهای طراحی شده برای در بر گرفتن محدودهٔ جهش‌های H274Y و R292K در جدول ۱ نمایش داده شده است.

تست RT-PCR با استفاده از کیت One Step RT-PCR (Qiagen) انجام شد. طبق دستورالعمل کیت ۱۰ میکرولیتر بافر ۲،5x میکرولیتر dNTP Mix، ۲ میکرولیتر One Step RT-PCR Enzyme Mix ، ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse و ۲۶ میکرولیتر ddH2O مخلوط و ۵ میکرولیتر RNA اضافه شد. نسخه‌برداری معکوس و تکثیر ژنوم با استفاده از دستگاه PeqLab termocycler طبق برنامهٔ مقابل تنظیم شد: ۱ سیکل با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۱ سیکل با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد ۳۰ دقیقه، ۱ سیکل با دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل تکثیر با دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱درصد Run شده و برای انجام تعیین توالی ارسال شدند. شکل ۱ نمایش‌دهندهٔ عکس ژل الکتروفورز چند نمونهٔ تأیید شده برای تعیین توالی می‌باشد. نتایج تعیین توالی با برنامهٔ Bioedit version 7.1.3.0 (2011) و OLIGO5 تحلیل شدند.

یافته‌ها

از تعداد ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده در سال ۱۳۹۰ که از بیماران بستری و یا غیر بستری گرفته شده بود، تمامی آنها از لحاظ جهش‌های H274Y و R292K منفی بوده و هیچ‌گونه جهش نقطه‌ای در جایگاه‌های مورد نظر یافت نشد. لذا تمامی سویه‌ها از نوع سویهٔ وحشی بوده و موتانت‌های مقاوم به دارو در این نمونه‌ها وجود نداشت.

جدول ۱: توالی‌های پرایمرهای Forward و Reverse برای تکثیر محدودهٔ جهش H274Y و R292K

	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'

شکل۱: عکس ژل الکتروفورز چند محصول تأیید شده برای انجام Nucleotide Sequencing

بحث

نسل جدید داروهای موجود برای مقابله با ویروس‌های آنفلوانزا، داروهای مهارکنندهٔ نورامینیداز هستند که کارایی مناسبی در این‌باره دارند (۱۲). با استفادهٔ بیشتر از این داروها نگرانی‌ها برای پیدایش موتانت‌های مقاوم به دارو افزایش یافته است (۱۱). با ایجاد یک تغییر در سطح نوکلئوتید در ژنوم ویروس آنفلوانزا که موجب تغییر اسید آمینه موجود در جایگاه فعال آنزیم نورامینیداز ویروس می‌شود، موتانت‌های مقاوم به دارو به وجود می‌آیند (۱۱). شایع‌ترین جهش‌های شناخته شده در این جایگاه E119V، R292K و H274Y می‌باشند که به میزان زیادی با مقاومت در برابر اوسلتامیویر در ارتباط هستند (۳، ۵). موتانت‌های H274Y ویروس‌های آنفلوانزا A دارای یک جهش نقطه‌ای جایگزینی در نوکلئوتید ۸۲۴ ژن نورامینیداز (N2) خود می‌باشند که باعث تغییر اسید آمینه در جایگاه ۲۷۴ پروتئین تولید شده از تیروزین به هیستیدین شده و متعاقب آن تغییر سایت فعال آنزیمی و مقاومت ویروس به داروی اوسلتامیویر ایجاد می‌شود (۶، ۱۰، ۱۲).

در جایگاه R292K نیز به همین شکل، جهش جایگزینی در سطح نوکلئوتید به گونه‌ای ایجاد می‌شود که بعد از ترجمه، اسیدآمینه آرژینین به جای لیزین در جایگاه ۲۹۲ پروتئین نورامینیداز ویروس رخ داده و باعث ایجاد موتانت‌های مقاوم به دارو می‌شود. بنابراین برای شروع درمان در مواقع بحرانی، ابتدا ویروس‌های در گردش بهتر است که از لحاظ جهش در جایگاه فعال ژن NA بررسی شوند و اگر جهشی شناسایی شد، استراتژی درمانی متفاوتی

اتخاذ گردد، برای مثال به جای اوسلتامیویر از زانامیویر برای نجات جان بیمار استفاده شود (۱۰،۳).

از جمله روش‌های ژنوتایپینگ رایج برای شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای مقاوم به NAI می‌توان به Pyrosequencing و Nucleotide Sequencing به روش سانگر اشاره کرد که هریک دارای مزایا و معایبی برای انجام این کار هستند (۷، ۱۱، ۱۳). با انجام روش Nucleotide Sequencing سانگر می‌توان توالی کامل ژنوم ویروس را به‌طور دقیق، با حساسیت و ویژگی بالا شناسایی کرده و برای شناسایی جهش‌های مورد نظر و یا جهش‌های دیگر در ژنوم ویروس به خوبی مورد استفاده قرار داد، اما از معایب آن می‌توان به صرف زمان زیاد، نیاز به افراد متخصص و هزینه‌بر بودن آن اشاره کرد (۱۱، ۱۴، ۱۵). با این وجود امروزه از روش سانگر به عنوان روش انتخابی در شناسایی ویروس‌های مقاوم به دارو یاد می‌شود (۱۲، ۱۴، ۱۵).

اسمیت (Smith) و همکارانش در سال ۲۰۱۱، مقاومت به اوسلتامیویر را در ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2 به میزان ۲/۹ درصد (۱/۳۴) بیان کردند و گزارش دادند که در اروپا این ویروس‌های حساس به دارو بیش از ۹۵ درصد تخمین زده می‌شوند (۹). زامبون (Zambon) گزارش کرد که با بررسی بیش از ۲۰۰۰ نمونهٔ جمع‌آوری شده در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۷ در ژاپن با وجود استفاده از اوسلتامیویر برای درمان بیماران، پیدایش مقاومت در این ویروس‌ها کمتر از ۱ درصد بوده است (۱۰). این مطالعات نشان‌دهندهٔ پیدایش ویروس‌های مقاوم به دارو در برخی کشورها می‌باشد، اما علی‌رغم این در مطالعهٔ حاضر که بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده در سال۱۳۹۰ (۲۰۱۱) در مرکز ملی آنفلوانزا واقع در گروه ویروس‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد، هیچ‌گونه جهش مقاومت دارویی در این نمونه‌ها یافت نشد و تمامی نمونه‌ها حساس به اوسلتامیویر گزارش شدند. البته شایان ذکر است که تعداد کم نمونه از محدودیت‌های مهم این مطالعه می‌باشد، لذا انجام تحقیقات وسیع‌تر با تعداد نمونهٔ بیشتر توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان گفت که مطالعهٔ حاضر روش Nucleotide Sequencing را به عنوان روشی کارا، دقیق و با حساسیت و ویژگی بالا برای جستجوی جهش‌های مقاوم به دارو نه تنها در ویروس‌های آنفلوانزا A/H3N2، بلکه برای دیگر تحت تیپ‌ها معرفی می‌نماید.

قدردانی

تشکر و قدردانی ما از زحمات کلیهٔ پرسنل مرکز ملی آنفلوانزا واقع در گروه ویروس‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد. این مطالعه با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

منابع

1-Yavarian J, Mokhtari Azad T, Nadji SA, Zeraati H, M.Naseri. 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 Jan;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 Nov; 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 Jul; 31(7): 1593-601.
6-McKimm-Breschkin JL. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza Other Respir Viruses 2013 Jan;7 Suppl 1: 25-36.
7-Chidlow GR, Harnett GB, Williams SH, Tempone SS, Speers DJ, Hut 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 Oct; 169(1): 47-51.
8-Anton A, Lopez-Iglesias AA, Tortola T, Ruiz-Camps I, '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 MICR INFEC DIS 2010 Nov; 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 Nov; 28(11): 927-59.
10-Zambon MC. Surveillance for antiviral resistance. Influenza Other Respir Viruses 2013 Jan; 7 Supp l 1: 37-43.
11- Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, Gubareva LV. Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. Influenza Other Respir Viruses. 2013 Jan; 7 Suppl 1: 44–49.
12- Van der Vries E, Anber J, van der Linden A, Wu Y, Maaskant J, Stadhouders R, 'et al'. Molecular Assays for Quantitative and Qualitative Detection of Influenza Virus and Oseltamivir Resistance Mutations. J Mol Diagn 2013 May; 15(3): 347–354.
13-Cheng TJ, Wang SY, Wen WH, Su CY, Lin M, Wu HS, 'et al'. Chemical probes for drug-resistance assessment by binding competition (RABC): oseltamivir susceptibility evaluation. Angewandte Chemie 2013 Jan; 52(1): 366-70.
14- Hurt A C, Chotpitayasunondh T, Cox N I, Daniels R, Fry A M, Gubareva V L, 'et al'. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. Lancet Infect Dis 2012 Mar; 12(3): 240-248.
15- Rameix-Welti M A, Munier S, Lee Gal S, Cuvelier F, Agou F, Enouf V, '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.

Detection of Neuraminidase Inhibitor Resistant Influenza A/H3N2 Viruses by Nucleotide Sequencing Method

Mohammad Hadi Karbalaie Niya[1], Talat Mokhtari Azad[2], Jila Yavarian[3*], Nazanin Zahra Shafiei Jandaghi[3], Maryam Naseri[4]

1-PhD. Student in Medical Virology.
2-Professor of Virology.
3-Assistant Professor of Virology.
4-M.Sc.of Virology.

1-Department of Virology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2,3,4-Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Jila Yavarian; Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel:+989122896484
Email: yavarian@tums.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Influenza A viruses are the major cause of epidemics and pandemics worldwide. Many researches are underway in order to prevent and treat. Recently Oseltamivir (Tamiflu), a neuraminidase inhibitor (NAI), has been used for their treatment and prevention. The pitfall of using antiviral drugs is emergence of resistant mutants. Different researches in enzyme active site mutation analysis of NAI resistant mutants revealed that common mutation sites are located at 119, 274, 292 residues. The aim of this study was detection of R292K and H274Y mutations in circulating influenza A/H3N2 viruses by using nucleotide sequencing method.

Subjects and Methods: In order to amplify NA gene mutation sites, we used conventional RT-PCR assay on 50 influenza A/H3N2 isolates and then PCR products were sequenced. Evaluation and analysis of raw data by Bioedit version 7.1.3.0 (2011) software was performed.

Results: Evaluation of nucleotide sequences did not show any isolates with R292K and or H274Y mutations and all the examined viruses were sensitive to NAI.

Conclusion: The findings of this study demonstrate that circulating A/H3N2 viruses are sensitive to NAI and lack resistant mutation sites. As detection of drug resistant mutants with high sensitivity and specificity is very important for efficient treatment strategies, we suggest nucleotide sequencing as a choice method in laboratories protocol because of its accuracy, capability and high efficiency for monitoring of influenza drug resistant mutants in population.

Keywords: Influenza A/H3N2 virus, Nucleotide Sequencing, Oseltamivir Drug Resistant.

►*Please cite this paper as:*
Karbalaie Niya MH, Mokhtari Azad T, Yavarian J, Shafiei Jandaghi NZ, Naseri M. Detection of Neuraminidase Inhibitor Resistant Influenza A/H3N2 viruses by Nucleotide Sequencing Method. Jundishapur Sci Med J 2014;13(4):457-463

Received: Jun 4, 2014 **Revised: Apr 15, 2014** **Accepted: June 30, 2014**