Archive of SID.ir

Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 34, No. 1, Spring 2024 ORIGINAL ARTICLE

Immunological evaluation of influenza vaccine effectiveness against A/H1N1/pdm09 strains circulating in Iran

***Atefeh Mohebbi*[1,2], *Abbas Jamali*[3], *Fatemeh Fotouhi*[4], *Ramin Yaghobi*[5]**
[1] *Department of Microbiology, Fars Science and Research branch, Islamic Azad University, Fars, Iran*
[2]*Department of Microbiology, College of Science Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran*
[3]*Assistant Professor, Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[4]*Professor, Department of Influenza and other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[5]*Professor, Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Abstract

Background: In 2015-2016 flu season, the subtype A/H1N1/pdm09 was reported with a widespread of 92% in Iran. A phylogenetic study based on the HA protein located the viruses in the new subgroup 6B.1. Therefore, by observing this change, the effectiveness of the vaccine was investigated from an immunological point of view.
Materials and methods: The investigated viruses were selected from among the sequenced samples based on the diversity and abundance of substitutions, by aligning with the Bioedit software and drawing a phylogenetic tree by the maximum likelihood method in the Mega software, and were propagated by MDCK cells. Next, by injecting two doses of human influenza vaccine two weeks apart into the two rabbits, their serum on day (0) before immunization, 21 and 30 days after the injection, isolated and after treatment, the antibody produced was used for Hemagglutination inhibition (HI) test. The data were analyzed in the Excel chart.
Results: The mean HI titer in the positive control sample was 960, and in samples 831, 836, 807 and 808 were 40, 20, 180 and 120, respectively. The results showed that the antibody obtained from the vaccine had neutralizing properties against the circulating viruses, but it was significantly reduced compared to the reference strain ($P<0.001$). No titer was observed in the negative control sample.
Conclusion: The requirement of genetic and immunological evaluation of vaccine efficiency for influenza viruses is necessary every year; so it is essential to provide appropriate methods available to laboratories.
Keywords: *Influenza virus A/H1N1/pdm09, Hemagglutinin protein, HI test.*

Cited as: Mohebbi A, Jamali A, Fotouhi F, Yaghobi R. Immunological evaluation of influenza vaccine effectiveness against A/H1N1/pdm09 strains circulating in Iran. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(1): **1-11.**

Correspondence to: Abbas Jamali
Tel: *+98 (21)64112176*
E-mail: jamali@pasteur.ac.ir
ORCID ID: 0009-0006-4859-0988
Received: 22 Apr 2023; **Accepted:** 12 Aug 2023

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۱ تا ۱۱

Original Article

بررسی ایمونولوژیکی کارایی واکسن آنفلوانزا در برابر سویه‌های A/H1N1/pdm09 در گردش ایران

عاطفه محبی[۱،۲]، عباس جمالی[۳]، فاطمه فتوحی[۴]، رامین یعقوبی[۵]

[۱] گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین واحد شیراز ،دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۳] استادیار، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۴] استاد، بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۵] استاد، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *در آنفلوانزای فصلی سال ۱۳۹۴ زیرگونه A/H1N1/pdm09 ، با انتشار گسترده ۹۲ درصدی در ایران گزارش شد. مطالعه فیلوژنتیکی بر اساس پروتئین HA ، ویروس‌ها را در زیر گروه جدید 6B.1 قرار داد. بنابراین با مشاهده این تغییر، اثربخشی واکسن از دیدگاه ایمونولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *ویروس‌های مورد بررسی از بین نمونه‌های توالی‌یابی شده براساس تنوع و فراوانی جانشینی‌ها، به روش همردیف‌سازی با نرم افزار بایوادیت و ترسم درخت فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood انتخاب و توسط سلول‌های MDCK تکثیر شدند. در ادامه با تزریق دو دوز واکسن آنفلوانزا انسانی به فاصله دو هفته به دو سر خرگوش، سرم آنها در روز (۰) قبل از ایمنی‌زایی، ۲۱ و ۳۰ روز بعد از تزریق جداسازی و پس از تیمار، آنتی‌بادی تولید شده جهت انجام تست ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI) مورد استفاده قرار گرفت. میانگین داده‌ها در نمودار اکسل مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *میانگین عیار HI در نمونه کنترل مثبت تیتر ۹۶۰ و در نمونه‌های به شماره ۸۳۱، ۸۳۶، ۸۰۷ و ۸۰۸ به ترتیب تیتر ۴۰، ۲۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ را نشان دادند. نتایج نشان دادند که آنتی بادی حاصل از واکسن، واجد خاصیت خنثی‌کنندگی بر علیه ویروس‌های در گردش است، ولی نسبت به سویه مرجع، کاهش چشمگیری ($P< 0.001$) داشت. در نمونه کنترل منفی هم هیچ تیتری مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *لزوم بررسی ژنتیکی و ایمونولوژیکی کارایی واکسن برای ویروس‌های آنفلوانزا سالیانه ضروری است؛ لذا ارائه روش‌های مناسب و در دسترس آزمایشگاه‌ها لازم است.*

واژگان کلیدی: *ویروس آنفلوانزا تیپ A زیر گونه H1N1 پاندمی ۲۰۰۹، پروتئین هماگلوتینین، تست HI*

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا به ویژه نوع A یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های حاد تنفسی در انسان به شمار می‌روند. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، سالانه ۲۰ تا ۳۰ درصد از بچه‌ها و ۵ تا ۱۰ درصد از بزرگسالان به بیماری آنفلوانزا مبتلا می‌شوند (۱). در طی صد سال اخیر چهار پاندمی گسترده از ویروس آنفلوانزا در سراسر جهان به وقوع پیوست، که پاندمی اخیر در اوایل ماه آوریل ۲۰۰۹، توسط ویروس جدید آنفلوانزای A/H1N1 در میان مردم امریکا و مکزیک مشاهده شد و به سرعت در سراسر جهان گسترش یافت و اولین پاندمی آنفلوانزای قرن ۲۱ را رقم زد. با توجه به منشأ خوکی ویروس، آن را اغلب ویروس آنفلوانزا با منشأ

آدرس نویسنده مسئول: بخش آنفلوانزا و سایر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور، عباس جمالی
(email: jamali@pasteur.ac.ir)
ORCID ID: 0009-0006-4859-0988
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۱

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

خـوک (S-OIV :Swine-Origin Influenza A virus) A/H1N1 یا ویروس انفلوانزای A پاندمی ۲۰۰۹ می‌نامند. در رابطه بـا ایـن ویروس، واکسن نه تنها یکی از مؤثرترین ابزار بـرای پیشـگیری از گسترش بیماری است، بلکه جهـت کـاهش شـدت بیمـاری نیـز کاربرد دارد (۲). در حال حاضر واکسن آنفلوانزا متشکل از سـویه هایی از ویروس آنفلوانزای تیـپ A، تحـت تیـپ‌هـای H1N1 و H3N2 و ویروس آنفلوانزای تیپ B هستند (۳, ۴). بروز پانـدمی-های کشنده این ویروس که معمولا حاصل تغییـرات ژنتیکـی آن می‌باشد یکی از دغدغه‌های اصلی سـازمان بهداشـت جهـانی بـه شمار می‌رود. از این رو واکسن‌های آنفلوانزای رایج به منظور ایجاد ایمنی قابل قبول و کارآمد به طور سالیانه و بر اساس سویه‌های در گردش در همـان سـال تولیـد مـی‌شـوند (۵, ۶). همـاگلوتینین عمده‌ترین گلیکوپروتئین سطحی پوشش و همچنین اصلی‌تـرین آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا به‌شمار می‌رود که توسط آنتی‌بادی‌هـای خنثی کننده شناخته می‌شود؛ از ایـن رو همـاگلوتینین از جملـه مهم‌ترین اهداف واکسن‌هـای ضـد ویـروس آنفلـوانزا بـه حسـاب می‌آید (۷). هماگلوتینین از قطعه چهارم ژنوم ویروس، به صـورت یک پروتئین پیش سـاز HA0 سـنتز شـده کـه در طـی سـیکل عفونت‌زایی به کمک آنزیم پروتئاز سلول میزبان به دو زیـر واحـد HA1 (۳۲۷ اسید آمینه) و HA2 (۲۲۲ اسید آمینه) مـی‌شـکند، این دو زیرواحد توسط یک باند دی‌سولفیدی به یکـدیگر متصـل باقی مـی‌ماننـد. بـرش HA بـرای عفونـت‌زایـی ذره‌ی ویـروس و گسترش عفونت در میزبـان ضـروری اسـت (۸). ناحیـه HA1 در انتهای آمینی و ناحیه HA2 در انتهای کربوکسیلیک مولکول HA قرار گرفته‌انـد. زیـر واحـد HA1 ناحیـه کـروی همـاگلوتینین را تشکیل می‌دهدکه محل اتصال به گیرنده‌ی سلول است و شـامل پنج سایت آنتی‌ژنی به نام های Sa ، Sb ،Ca1 ، Ca2 و Cb اسـت (۸-۱۰).

در بررسی سویه‌های در گـردش A/H1N1 ایـران، از زمـان بـروز آخرین اپیدمی در سال ۲۰۰۹ تا سال ۱۳۹۴، که مطالعه ما مورد نظر بود، آنالیز ژنتیکی ژن‌های HA وNA تغییراتی نشان نداد که منجر به انتخاب ویروسی شود که باعث افزایش پتانسیل اپیـدمی یا مخصوصا منجر به ویرولانس بالا گردد. با این‌حال در زمستان و پاییز ۱۳۹۴ (۲۰۱۶-۲۰۱۵)، آنفلوانزا در ایران شیوع غافلگیرانه‌ای داشت، به طوری که در فاصله بهار ۹۲ تا بهـار ۹۴ در میـان ۸۸۸ نمونه ارسالی به آزمایشگاه آنفلوانزا در انستیتو پاستور ایران، حدود ۱۲٪ واجد آنفلوانزای نوع A بودند و این در حالی است که از بهار ۹۴ تا بهار ۹۵ درحدود ۳۰٪ از ۱۸۰۰ نمونه آزمایش شده، سویه H1N1 بودند. در مطالعه‌ای که بر روی توالی این نمونه‌ها صـورت گرفت، مشاهده شد که چنـدین جهـش در مکـان‌هـای مختلـف آنتی‌ژنی و غیرآنتی‌ژنی HA رخ داده که بر اسـاس آنـالیز درخـت فیلوژنتیک، مشخص شد که سویه‌های درگردش ایـران در سـاب کلاد 6B.1 قرار دارند. در این ساب کـلاد، جـایگزینی اسـیدهای آمینه S84N، S162N و I216T در سر هماگلوتینین در مقایسـه با سال گذشته اتفاق افتـاده بـود (۱۱)، کـه جـایگزینی S162N، اختصاص به سـاب کـلاد 6B.1، یـک موتیـف جدیـد بـالقوه N-گلیکوزیلاسیون در سایت آنتی ژنی Sa ایجـاد کـرده اسـت. ایـن جایگزینی در ۹۷٪ نمونه‌های آنفلوانزا فصلی ۱۳۹۴ یافت شد که قبلا در این منطقه گزارش نشده بود(۱۲, ۱۳). بـا مشـاهده ایـن جـایگزینی‌هـا، و مغـایرت آن بـا سـویه A/California /07/2009 (H1N1) به عنوان سویه مرجع واکسن، کارایی واکسن موجود بر علیه سویه‌های در گردش ایران مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات insilico با پیش گویی ساختار سه بعدی تغییرات ایجاد شـده در توالی پروتئین هماگلوتینین، ممانعت شکل فضایی از فعالیت آنتی بادی را نشان داد. از اینرو توانایی خنثـی‌سـازی آنتـی‌بـادی ضـد آنفلوانزای سویه واکسن، با نمونه های سرمی خرگوش بـه منظـور بررسی ایمونولوژیکی واکسن، مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روشها

الف-انتخاب نمونه ویروسی آنفلوانزا جهـت تسـت HI: از ۱۸۳۶ نمونه ارسالی به انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۴، که با استفاده از روش Real-time PCR تیپ و تحت تیـپ‌هـای آنهـا شناسـایی شـده بـود، نمونـه‌هـای بیمـار بـا تحـت تیـپ A/H1N1/pdm09 بستری در بخش‌های مراقبت ویژه استان‌های مرکزی ، زنجان و سمنان بر اساس سـن بیمـار (۶۰-۱۸سـال) و شرایط بدون بیماری زمینه‌ای (از جمله بیمارهای نقـص ایمنـی، قلبی – عروقی، ریوی و زنان باردار) مورد بررسی قـرار گرفـت. از این تعداد، نمونه‌هایی که دارای فراوان‌ترین تعداد و تنوع جانشینی در اسیدهای آمینـه تـوالی HA1 ثبـت شـده در سـایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU) بودنـد، بـا استفاده از روش همردیف سازی با نرم افزار بایوادیـت [Bio Edit (https://www.bioedit.com)] ورژن ۷ انتخاب شدند (۱۱).

ب- آنالیز فیلوژنتیکی قطعه HA1: پس از همردیـف سـازی توالی HA1 نمونه‌ها و انتخاب سویه‌های شاخص آنفلوانزای فصلی، جهت آنالیز فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتنـد. بـرای تعیـین فاصله سویه‌های در گردش با سویه های مرجع، توالی های مورد نیاز از پایگاه داده اطلاعاتی آنفلوانزا در NCBI و بسایت GISAID (http://platform.gisaid.org) دریافت شدند و درخت فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood بر پایه توالی اسـیدآمینه توسـط

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نرم افزار مگا ورژن ۶ (http://www.megasoftware.net) رسم شد (۱۱).

پ- تکثیر ویروس و تهیه آنتی‌ژن استاندارد: جهت انجام تست HI نیاز به تیتر بالای ویروس به عنوان آنتی‌ژن است، از این رو ویروس‌های آنفلوانزا انتخاب شده از نمونه بیماران مورد تکثیر قرار گرفتند. بدین منظور، سلول کلیه سگ MDCK (Madin-darby Canine kidney) به عنوان رده سلولی مناسب برای تکثیر ویروس آنفلونزا مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های MDCK را در محیط کشت DMEM (Dulbeco Minimum Essential Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو FBS به پلیت ۲۴ خانه منتقل کرده و در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رشد و تکثیر سلول‌ها، محلول رویی خارج شده و در هر خانه نمونه بیمار تلقیح گردید. جهت اتصال ویروس به گیرنده های سطح سلول، پلیت به مدت ۱ ساعت در انکوباتور CO_2 دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به هر خانهٔ پلیت، یک میلی لیتر محیط کشت ویروس حاوی محلول ذخیره تریپسین- TPCK (Trypsin L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone) اضافه گردید. پلیت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری و هر روز جهت مشاهده اثر آسیب سلولی (CPE: Cytopathic effect) در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت آزمون مهار هماگلوتیناسیون (HI) نیاز به آنتی ژن استاندارد با ۸ واحد HA (8 HA units/50µl) می‌باشد که برای تایید غلظت نمونه های ویروسی تکثیر شده، تست HA به صورت جداگانه گذاشته شد و در نهایت تست عیارسنجی وارونه (Back Titration) انجام شد (۱۴, ۱۵).

ت- تزریق واکسن آنفلوانزا به خرگوش: برای بررسی پاسخ آنتی‌بادی، تزریق واکسن تجاری در ۲ سر خرگوش صورت گرفت و آنتی بادی تولید شده از سرم خرگوش‌ها جداسازی و مورد آزمون قرار گرفت. هر یک از حیوانات دو دوز واکسن انسانی(۳،۷۵ mg HA در آدجوانت) به فواصل دو هفته برای ایمنی زایی دریافت کردند. نمونه سرم از خرگوش در روز (۰) قبل از ایمنی زایی، ۲۱ و ۳۰ روز پس از تزریق واکسن، جمع آوری شد. ایمنی‌زایی حیوانات و جمع آوری سرم بر اساس مصوبات کمیته ملی اخلاقی انستیتو پاستور ایران انجام می‌شود (IR.PII.REC.1395.94). نمونه‌های سرم در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند و برای آنالیز آنتی‌بادی اختصاصی ویروس آنفلوانزا تیپ A، به وسیله تست HI مورد استفاده قرار گرفتند (۱۶).

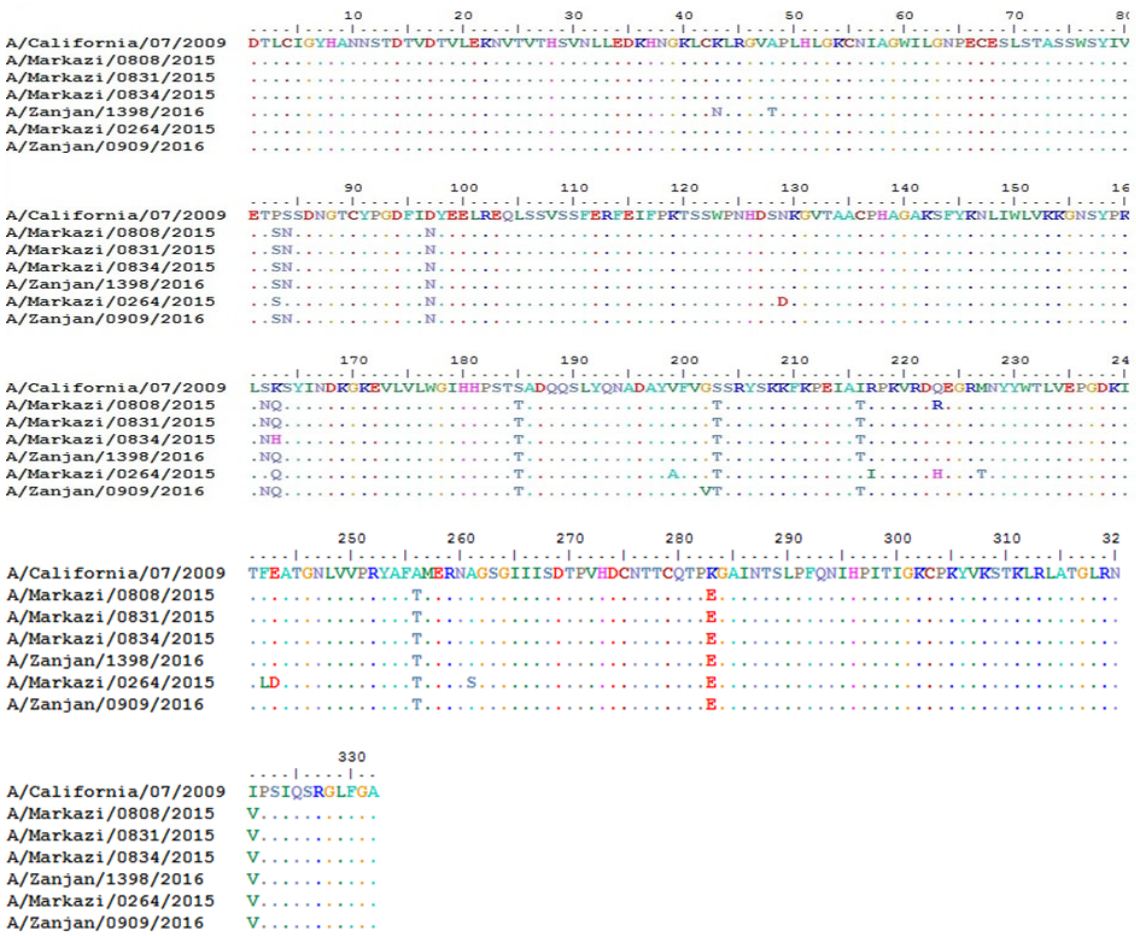
ث- آماده سازی سرم: برای استفاده از سرم تولید شده توسط خرگوش، ابتدا تیمارهایی بر روی آن انجام شد تا ممانعت کننده‌های غیر اختصاصی آن حذف شود. به این ترتیب که یک حجم از سرم با سه حجم از RDE (Receptor Destroying Enzyme) یا عصاره کشت باکتری ویبریوکلرا مخلوط شده و به مدت ۱۴ تا ۱۶ ساعت (Overnight) در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به منظور غیر فعال کردن آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت حذف آگلوتینین‌های غیر اختصاصی، به ۲۰ حجم از سرم تیمار شده با RDE، یک حجم گلبول قرمز ۰/۵ درصد اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰دقیقه با دورg ۸۰۰ سانتریفوژ شده و نهایتا سرم رویی به عنوان سرم تیمار شده به آرامی جدا شد. از سوسپانسیون آنتی ژنی استاندارد ویروس A/California/o4/2009 به عنوان کنترل مثبت و از PR8 هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۶, ۱۷).

ج- تست مهار هماگلوتیناسیون(HI): این تست در پلیت‌های ۹۶ خانه U شکل انجام می‌شود. مراحل تست HI به این ترتیب است که ابتدا در تمامی چاهک‌های پلیت به غیر از ستون اول ۲۵ میکرولیتر PBS ریخته شد و در چاهک‌های ستون اول ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰ سرم اضافه گردید. با انتقال ۲۵ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم رقت سازی انجام شد، این رقت سازی تا چاهک‌های انتهایی ادامه یافته و در نهایت ۲۵ میکرولیتر از ستون آخر خارج گردید. سپس۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ویروسی استاندارد به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و پلیت به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز ۰/۵ درصد به تمامی چاهک‌ها افزوده شد، پس از گذشت ۱ ساعت در دمای اتاق، تیتر آنتی بادی موجود در سرم خوانده شد. آخرین چاهکی که در آن مهار هماگلوتیناسیون صورت گرفته به عنوان تیتر آنتی بادی در نظر گرفته می‌شود (۱۶).

چ-تحلیل آماری: مقادیر متغیرهای ۸۳۱، ۸۳۶، ۸۰۷، ۸۰۸ و H1N1 (control+) با استفاده از شاخص میانه و میانگین توصیف شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت نمودار ستونی نشان داده شد. نتایج تست‌های آماری در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۱. توالی قطعه HA1 در سویه های انتخاب شده (با استفاده نرم افزار Bio edit)

یافته‌ها

در زمان شیوع آنفلوانزای فصلی سال ۱۳۹۴ از ماه‌های آبان تا اواخر سال، معادل آنفلوانزای فصلی از ماه اکتبر ۲۰۱۵ تا ژانویه ۲۰۱۶ سال میلادی، تعداد ۱۸۳۶ نمونه بالینی از بیماران بستری با علائم حاد عفونت تنفسی، از سه استان (مرکزی، سمنان و زنجان) به آزمایشگاه آنفلوانزا، انستیتو پاستور تهران منتقل شد. از نمونه‌هایی که مورد بررسی قرار گرفته و با استفاده از روش Real-time PCR تیپ و تحت تیپ آنها تشخیص داده شده بود، به عنوان نمونه‌های مورد آزمون در این مطالعه استفاده شد. بر اساس این نتایج، اولین نمونه‌های مثبت مربوط به اواخر آبان ماه بود و سپس در ماه‌های آذر و دی به بالاترین حد شیوع خود رسید. از تعدادکل نمونه‌ها، تعداد ۵۶۶ نمونه برای ویروس آنفلوانزا مثبت گزارش شد که این تعداد برابر ۳۰/۸ درصد از کل نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه بودند. که پس از تعیین تیپ و تحت تیپ تعداد ۵۰۴ نمونه (۸۹ ٪) برای A/H1N1/pdm09 مثبت شناسایی شد و تنها ۳ مورد (۰/۵ ٪) به تحت‌تیپ H3N2 مبتلا بودند. در اواخر دی ماه سال ۱۳۹۴، برابر با اوایل سال ۲۰۱۶ میلادی، شیوع ویروس آنفلوانزا A/ H1N1/pdm09 کاهش یافت و ویروس آنفلوانزا تیپ B در بهمن و اسفند ماه با شیوع کم ظاهر شد (نمودار ۱).

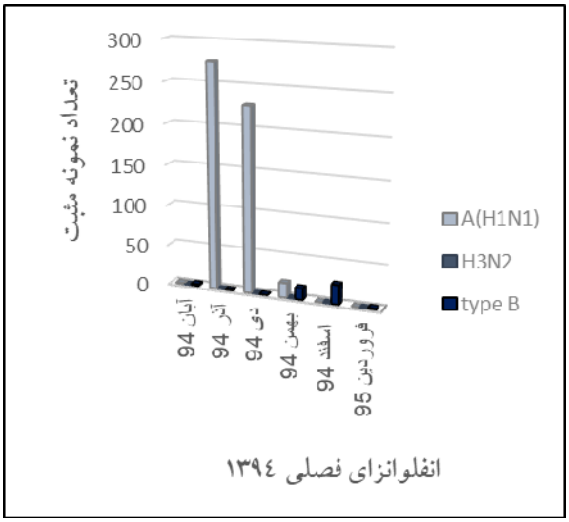
بررسی قطعه ژن HA1 نمونه‌های جدا شده نشان داد که آنها در ۱۱ جایگاه اسیدآمینه با سویه مرجع A/California/07/2009 متفاوت هستند که این جایگاها شامل P83N، S84N، D97N ، S162N، K163Q، S185T، S203T، I216T، A256T، K283E و I321V بودند (شکل ۱). به طور کلی جهش‌های اسید آمینه اغلب در قسمت گرزی شکل دمین هماگلوتینین اتفاق افتادند که ناحیه آنتی ژنی و ناحیه اتصالی گیرنده در این قسمت قرار دارند.

بر اساس گزارش‌های ECDC و WHO سویه مرجع A/California/07/2009 در رده بندی فیلوژنی در کلاد ۱ قرار دارد و تغییرات اسیدآمینه در HA بیان کننده تغییرات رده-

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

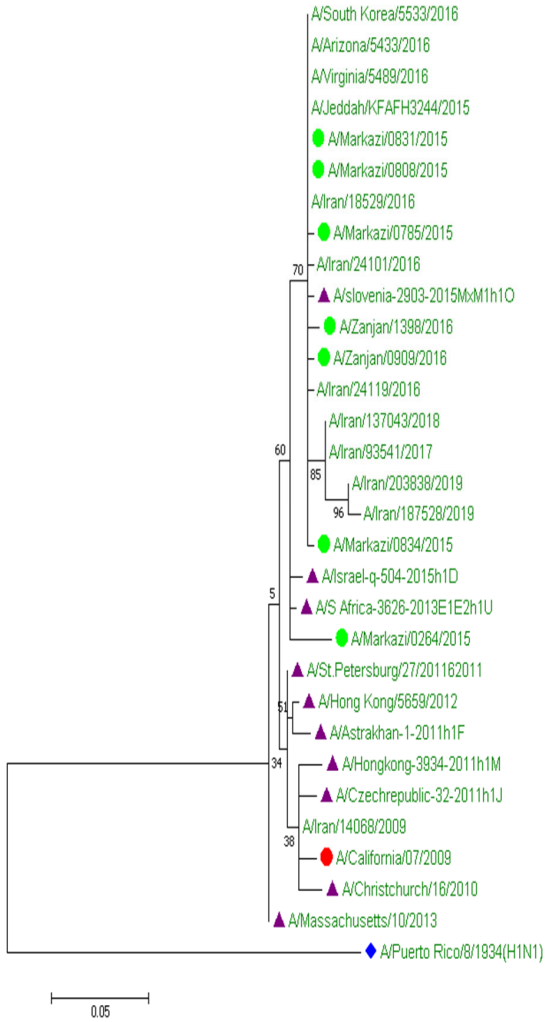
بندی کلاسترها از پاندمی سال ۲۰۰۹ شدند. تغییرات اسیدهای آمینه در HA1 ویروس‌ها را در آنفلوانزای فصلی ۲۰۱۶-۲۰۱۵ در رده بندی جهانی، ساب کلاد 6B.1 با معرفی A/Slovenia-2903-2015 قرار داده است (شکل۲).



نمودار ۱. شیوع آنفلوانزا در زمستان ۱۳۹۴به تفکیک ماه

در این مطالعه، برای نشان دادن سطح ایمنی ایجاد شده توسط واکسن آنفلوانزای توصیه شده توسط WHO، بر علیه ویروس‌های در گردش ایران، تست HI انجام شد. جهت تهیه آنتی‌بادی خنثی کننده از واکسن آنفلوانزا که حاوی سویه‌های مرجع است، استفاده شد. قبل از اینکه تزریق واکسن و ایمنی زایی صورت گیرد، خونگیری از خرگوش‌ها انجام شد. همچنین ۴ نمونه از ویروس‌های جدا شده از بیماران، به عنوان آنتی ژن مورد استفاده در تست HI، به کمک سلول‌های MDCK با تیتر مناسب تکثیر یافتند. این ویروس‌ها از نظر توالی اسیدهای امینه ۹۷ درصد با دیگر سویه‌ها شباهت داشتند. تست HI نمونه‌های فوق با دو تکرار انجام شد و میانگین نتایج بدست آمده در نمودار ۲ نمایش داده شده است.

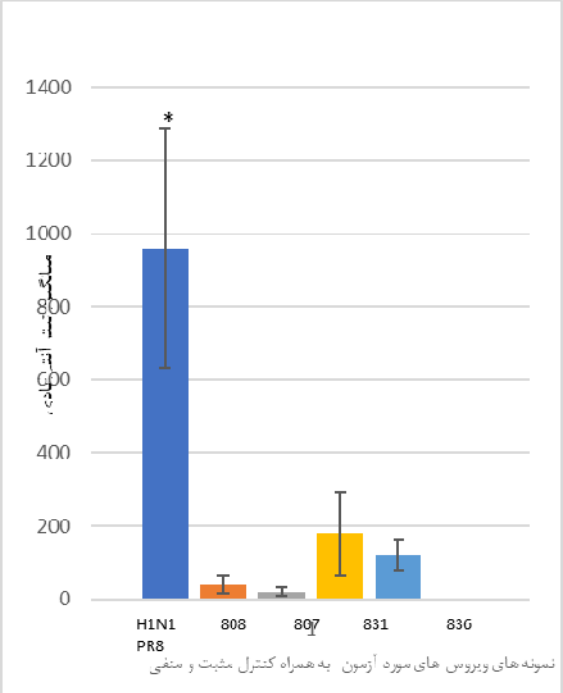
همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود عیار تیتر HI در نمونه کنترل مثبت (H1N1) با تیتر ۹۶۰ نسبت به ایزوله های مورد مطالعه بیشترین عیار را دارد و میانگین تیتر HI نمونه‌های ویروس در گردش با شماره‌های ۸۰۷،808 ۸۳۱ و۸۳۶به ترتیب عیار تیتر ۴۰ ، ۲۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ را نشان دادند. که در مقایسه با سویه مرجع که به صورت نمونه مثبت است کاهش چشمگیری ($P< 0.001$) داشت. در نمونه کنترل منفی هم هیچ تیتری مشاهده نشد. نتایج بدست آمده بیانگر این مطلب است که ایمنی ایجاد شده توسط واکسن، برای ویروس‌های در گردش نقش محافظت کنندگی کمتری دارد. از این رو تیتر HI در ایزوله‌هایی که جهش‌هایی در نقاط مختلف آنتی‌ژنی داشتند عدد پایین‌تری نسبت به سویه مرجع نشان دادند.



شکل ۲. درخت فیلوژنی بر اساس قطعه پروتئینی HA1 با استفاده از نرم‌افزار مگا (MEGA, version 6.0). درخت به روش Maximum likelihood (ML) با تکرار ۱۰۰۰ برای آنالیز bootstrap رسم شد. نمونه‌های ویروسی جدا شده از بیماران، با نشانگر دایره سبز مشخص شدند. سویه های شاخص کلادها با نشانگر مثلث بنفش، سویه مرجع پاندمی ۰۹ /A/H1N1 با نشانگر دایره قرمز و A/Puerto Rico/8/1934 به عنوان outgroup با نشانگر لوزی آبی درنظر گرفته شده‌اند.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



نمودار ۲. نتایج میانگین تیتر آنتی بادی هر نمونه ویروس حاصل از هر آزمایش ۵ چاهک مواجه شده با سرم و دو بار تکرار آزمایش برای تست HI ؛ نمونه‌های بیماران با کد ۸۰۷، ۸۰۸، ۸۳۱ و ۸۳۶ نشان داده شد. ویروس H1N1 پاندمی ۲۰۰۹ به عنوان کنترل ویروس مثبت و ویروس PR8 (A/Puerto Rico/8/1934) به عنوان کنترل ویروس منفی به کار رفت. نتایج نشان داد که هر ۴ سویه ۸۰۸، ۸۰۷، ۸۳۱ و ۸۳۶ به طور معنی‌داری ($P<0/001$) نسبت به سویه منطبق با سویه واکسینال تیتر آنتی بادی کمتری را نشان دادند.

بحث

اپیدمیولوژی مولکولی به مطالعه تغییرات آنتی‌ژنی HA میان سویه‌های در گردش ویروس آنفلوانزا با سویه مرجع می‌پردازد که می‌تواند برای بهبود واکسن مورد استفاده قرار گیرد. میزان شیوع و آمار ابتلا به ویروس آنفلوانزا سالانه درکشور مورد نظارت قرار می‌گیرد. براین اساس آزمایشگاه همکار آنفلوانزا و دیگر ویروس‌های تنفسی، انستیتو پاستور ایران، نیز در این راستا هر سال به بررسی فراوانی تیپ و تحت تیپ ویروس‌های آنفلوانزا در سه استان مرکزی، زنجان و سمنان می‌پردازد.

در آوریل ۲۰۰۹، ویروس جدید آنفلوانزا A/H1N1 در مکزیک مشاهده شد که به سرعت در دنیا گسترش پیدا کرد (۱۸). اولین گزارش‌های رسیده از این پاندمی در ایران در ماه ژوئن ۲۰۰۹ مشاهده شد که پس از آن به صورت آنفلوانزای فصلی شیوع پیدا کرد. معمولا فصل آنفلوانزا از ماه شهریور هر سال، شروع و تا اواخر ماه‌های بهمن و اسفند ادامه پیدا می‌کند که برابر با ماه سپتامبر سال میلادی تا فوریه سال بعد آن است (۱۲).

در طی مطالعه اپیدمیولوژیکی ویروس آنفلوانزا A/H1N1/pdm09 بین سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۱ ایران، نشان داده شد که با آغاز فصل مدارس یعنی ماه‌های مهر و آبان (اکتبر و نوامبر ۲۰۰۹) میزان شیوع این ویروس به بالاترین حد خود رسیده است؛ به همین منظور در آن سال مدارس بیشتر استان‌های مرکزی و شمال شرقی کشور تعطیل شدند تا از انتشار ویروس توسط دانش آموزان جلوگیری گردد. از زمان افزایش شیوع بیماری در آنفلوانزای فصلی ۲۰۱۰-۲۰۰۹، از ۴۰۱۶۹ نمونه بیمار با علائم حاد تنفسی، تعداد ۲۱۳ مورد مرگ و میر گزارش شد که ۱۵۶ مورد آن با ابتلا به بیماری آنفلوانزا A/H1N1/pdm09 مورد تایید قرار گرفتند. در آنفلوانزای فصلی ۲۰۱۱- ۲۰۱۰ یکسال پس از پیدایش ویروس پاندمی، میزان ابتلا به ویروس نسبت به سال قبل کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت (۱۹).

در سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۱۱ بیشتر کشورهای دنیا درگیر سه تیپ آنفلوانزا بودند که ایران نیز با این تیپ‌های ویروس از ماه-های اکتبر و نوامبر مواجه بود (۲۰). در سال ۲۰۱۳-۲۰۱۲ مطالعه‌ای که در شیراز انجام شد، شیوع ۳۸/۵ درصدی A /H1N1/pdm09 را گزارش کردند (۲۱). از نظر تیپ و تحت تیپ ویروس‌های در گردش، طی آنفلوانزا فصلی۲۰۱۵-۲۰۱۴ حدود ۸۷ درصد آنفلوانزای نوع A بود که در آن تحت تیپ A/H3N2 با در صد بالایی سویه غالب در جامعه گزارش شد (۱۳, ۲۲). طبق یافته‌های آماری در این مطالعه، میزان شیوع ویروس آنفلوانزا در ایران طی آنفلوانزای فصلی سال ۱۳۹۴ (معادل ۲۰۱۶-۲۰۱۵) در ماه‌های آذر و دی (نوامبر و دسامبر) نسبت به سال‌های قبل، به طور قابل توجهی افزایش نشان داد. همان طور که در بلغارستان نیز نتایجی مشابه به کار ما به دست آوردند (۲۳). همچنین داده‌های به دست آمده توسط WHO برای مناطق اروپایی نیز حاکی از این است که تحت تیپ A/H1N1/pdm09 با شیوع ۸۹ درصدی تیپ غالب گزارش شده در فصل ۲۰۱۶-۲۰۱۵ بود (۲۴).

افزایش ناگهانی ۸۹ درصدی در گسترش ویروس A/H1N1 فصل ۲۰۱۶-۲۰۱۵ ، علیرغم پوشش مناسب واکسن مشابه در سال‌های اخیر، احتمالا ناشی از کاهش اثربخشی واکسن بود. وجود چند جهش در سایت‌های آنتی ژنیک HA نشان داد که می‌تواند منجر به کاهش سریع اثر واکسن گردد (۲۵).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

بر اساس نتایج مطالعه‌ای در این زمینه، در توالی آمینواسیدی سویه‌های در گردش ایران در فصل ۲۰۱۵-۲۰۱۶، تغییرات واضحی مشاهده شد (۱۱, ۲۶, ۲۷).

پروتئین HA، نقش اصلی خصوصیات آنتی ژنی را در ویروس آنفلوانزا دارد و تغییرات ژنتیکی قابل توجهی را تجربه کرده است. از سال ۲۰۰۹ تاکنون، مطالعه مولکولی توالی‌های ژن HA که از سویه‌ها A / H1N1 / pdm09 به دست آمد، نشان داد که حداقل ۹ گروه ژنتیکی (کلاد: clades) و چندین زیرگروه (ساب کلاد: subclades) در جهان منتشر شده است (۱۲, ۲۴).

ویروس‌های این مناطق در سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵، در ساب کلاد 6C قرار داشتند، که توسط A/Massachusetts/10/2013 در ۲۰۱۳ شناسایی شدند و درتوالی‌های آمینواسیدی آنها جایگزینی‌های V234I و K283E در HA1 و E172K در HA2، نسبت به ویروس کلاد ۶ قرار دارد (۲۳, ۲۴). با این حال، پس از پاندمی سال ۲۰۰۹، ناحیه سر کروی HA به صورت کامل حفاظت شده باقی بود تا اینکه در آنفولانزای فصلی سال ۲۰۱۵-۲۰۱۶ موقعیت ۱۶۲ به ناحیه گلیکوزیله تبدیل شد (۲۳،۲۸). نتایج دیگر نیز نشان داد که تمام نمونه-های مورد مطالعه این فصل ایران، دارای ناحیه اضافه در موقعیت ۱۶۲ بودند، جایگاه ۱۶۲ در ناحیه آنتی ژنی Sa قرار دارد. علاوه بر این نقاط، در ایزوله‌های ما جایگاه‌های ۸۴، ۹۷، ۱۶۲ و ۴۵۱ نیز شناسایی شدند. این در حالی است که جایگاه ۸۴ و ۹۷ در نواحی آنتی‌ژنی قرار ندارند (۱۱). گلیکوزیلاسیون تغییرات پس از ترجمه در نواحی N –گلیکوزیله است که با اضافه کردن برخی از الیگوساکاریدها به زیرواحد آسپارژین (Asn)، در موتیف Asn-X-Ser/Thr، انجام می‌شود. با این توصیف که X هر اسیدآمینه‌ای بجز پرولین می‌تواند باشد (۲۹, ۳۰).

گلیکوزیلاسیون پروتئین HA یک فرآیند پس از ترجمه است که بر تکامل ویروس‌های انفلوانزا تأثیر می‌گذارد (۳۱). N-گلیکوزیلاسیون HA به عنوان یک مکانیزم مهمی برای پوشاندن و پایداری پروتئین است و در بعضی موارد بر عملکرد بیولوژیکی HA، از جمله فعالیت اتصال به گیرنده و برش پروتئین HA0 تأثیر می‌گذارد که در ویرولانس و خاصیت آنتی ژنیسیته ویروس موثر است. علاوه بر این، حضور گلیکان در سایت آنتی‌ژنی در مکانیسم فرار ویروس از سیستم ایمنی کمک می‌کند به این ترتیب که با پرکردن یا پوشش دادن مناطق آنتی‌ژنی پروتئین و همچنین با فرار از مکانیسم خنثی-سازی توسط آنتی‌بادی‌ها، از خودش محافظت می‌کند. از این رو باعث افزایش بقای ویروس در برابر واکسیناسیون گسترده و یا عفونت می‌شود. بنابراین، نقش مهمی در سازگاری میزبان با ویروس‌ها ایفا می‌کند (۲۹, ۳۲).

از تکنیک‌های سرولوژیک که اغلب برای بررسی آنتی‌بادی‌های موثر اختصاصی علیه آنفلوانزا است تست HI یا ممانعت از هماگلوتیناسیون است، که به عنوان یک تست ساده از نظر دسترسی و دستورالعمل است. هر واکسنی نیاز به تست‌های تکمیلی برای تائید توسط کمیته بهداشت جهانی است. تست HI بر اساس توانایی آنتی‌بادی‌ها، در صورت وجود در سرم، برای جلوگیری از آگلوتیناسیون بین اریتروسیت‌ها و هماگلوتینین ویروسی است. تیتر آنتی‌بادی در بالاترین رقت سرمی که باعث مهار شدن کامل هماگلوتینین ۴ واحد / HAU 25 میکرولیتر یا ۸ واحد / 50 HAU میکرولیتر از ویروس باشد تیتر HI در نظر گرفته می‌شود. تیتر HI برابر با ۴۰ یا بیشتر از آن به عنوان یک سطح ایمنی محافظت شده مناسبی برای استفاده می‌باشد و طبق دستورالعمل FDA برای واکسن های پاندمی آنفلوانزا، بهترین پارامتر در حال حاضر برای پیش بینی حفاظت از عفونت طبیعی محسوب می‌شود (۱۵). از نتایج نمودار۲ این‌گونه استنباط شد که میانگین تیتر HI در بیشتر نمونه‌ها به جز نمونه ۸۰۷ بالای ۴۰ است که می‌تواند خاصیت خنثی‌کنندگی واکسن برای ویروس را نشان دهد، ولی نسبت به سویه کنترل مثبت که سویه مرجع A/California /07/2009 (H1N1) است، کاهش قابل ملاحظه‌ای داشتند. بر اساس نتایج توالی‌یابی، شاید یکی از دلایل کاهش تیتر آنتی بادی، ممانعت فضایی ناحیه گلیکوزیله ۱۶۲در بخش آنتی‌ژنی ویروس‌های در گردش باشد که توسط ترکیبات قندی به ویروس کمک می‌کند که از مکانیسم‌های دفاعی سیستم ایمنی فرار کند.

ویروس‌های آنفلوانزا از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های حاد تنفسی در انسان هستند که بروز پاندمی‌های کشنده این ویروس ها معمولا بر اثر تغییرات ژنتیکی آن است. در نتیجه گیری کلی، نتایج آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون نشان داد که آنتی بادی حاصل از واکسن واجد خاصیت خنثی کنندگی برای ویروس‌های در گردش است، ولی نسبت به سویه مرجع A/California /07/2009 (H1N1)، کاهش چشمگیری داشتند. بنابر گزارش‌های رسیده از بررسی ویروس‌های A/H1N1/pdm09 در گردش در برخی از کشورها و همچنین شواهدی از عدم کارایی مناسب واکسن در پیشگیری از ویروس 6B.1، سازمان بهداشت جهانی ویروس A /Michigan/45/2015 را برای ساخت واکسن آنفلوانزا سال

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۲۰۱۸-۲۰۱۷ توصیه کرد که تا سال ۲۰۱۹ نیز این واکسن مورد تایید بود. اما با جایگزینی‌های S74R ، S164T و I295V در اسیدهای آمینه HA ویروس‌های A/H1N1، زیر گروه 6B.1a تعریف شد. ویروس‌های زیر گروه 6B.1a به اضافه جایگزینی S183P در اسیدهای آمینه HA1 اخیرا به صورت جهانی شیوع پیدا کرده‌اند. از اینرو سویه A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like virus که معرف زیر گروه 6B.1a به اضافه جایگزینی S183P است برای سال ۲۰۲۰- ۲۰۱۹ جایگزین گردید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که بررسی‌های دقیق و زمان بندی‌شده ساختارمولکولی و مطالعه جهش‌های احتمالی ویروس‌های آنفلوانزای در گردش لازم و ضروری است.

این مطالعه دارای محدودیت‌هایی به شرح زیر بود. بر خلاف روش‌های مولکولی، روش‌های سرولوژی سریع، آسان و کم هزینه‌تر هستند و امکان پایش تعداد زیاد نمونه در مدت زمان کوتاه فراهم است، اما این روش‌ها نیز معایبی دارند. آنتی بادی اختصاصی مورد استفاده در این تست، از تزریق ویروس زنده یا غیرفعال شده به دست می‌آید. در این روش چون از کل پیکره ویروس استفاده می‌شود، ممکن است آلودگی آنتی بادی مورد استفاده در آزمایش HI با پروتئین های ناخواسته ویروس در واکنش اصلی بین پروتئین HA ویروس آنفلوانزا و آنتی بادی اثر نامطلوب داشته و موجب کاهش حساسیت آزمایش شوند.

هر چند در این تست سعی بر این است که با تیمار آنزیم RDE بازدارنده های غیر اختصاصی حذف شوند اما بهره گیری از فناوری تولید پروتئین نوترکیب پتانسیل خوبی برای تهیه و دست‌یابی به منبع واقعی آنتی ژن خالص و آنتی بادی اختصاصی گردد. همچنین با وجود اینکه تخم مرغ جنین‌دار میزبان انتخابی برای جداسازی ویروس‌های آنفلوانزا از نمونه بیمار است، برخی از آزمایشگاه‌ها ترجیح می‌دهند از کشت MDCK و یا کلیه میمون رزوس برای جداسازی ویروس استفاده کنند. اما کاهش عیار HA جدایه ویروس رشد یافته بر روی کشت سلول در مقایسه با تخم مرغ، استفاده ازآن را محدود می‌کند. بنابراین در آزمایشگاه‌های تشخیصی باید ذخیره سلول به گونه‌ای تهیه و نگهداری شود که کشت سلول از حساسیت مطلوب برخوردار باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری و دفاع شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز استخراج شده است. بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از همکاری و حمایت‌های مسئولان و همکاران آزمایشگاه آنفلوانزا و دیگر ویروس‌های تنفسی، انستیتو پاستور ایران را به عمل آورند.

REFERENCES

1. Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov IA, Logunov DB, Shmarov MM, et al. Recombinant Influenza Vaccines. Acta Naturae 2012;4:17-27.

2.Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. Vaccine 2010;28:4895-902.

3.Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. Virus Res 2011;162:19-30.

4.Caspard H, Mallory RM, Yu J, Ambrose CS. Live-Attenuated Influenza Vaccine Effectiveness in Children From 2009 to 2015-2016: A Systematic Review and Meta-Analysis. Open Forum Infect Dis 2017;4:ofx111.

5. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023-2024 northern hemisphere influenza season [Internet]. Geneva: WHO. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season.

6.Belongia EA, Skowronski DM, McLean HQ, Chambers C, Sundaram ME, De Serres G. Repeated annual influenza vaccination and vaccine effectiveness: review of evidence. Expert Rev Vaccines 2017;16:1-14.

7.Staneková Z, Varečková E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. Virol J 2010;7:351.

8.Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2012;88:226-49.

9.Mallajosyula VVA, Citron M, Ferrara F, Lu X, Callahan C, Heidecker GJ, et al. Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E2514-23.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

10.Lee AJ, Das SR, Wang W, Fitzgerald T, Pickett BE, Aevermann BD, et al. Diversifying Selection Analysis Predicts Antigenic Evolution of 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus in Humans. J Virol. 2015 ;89:5427-40.

11.Mohebbi A, Fotouhi F, Jamali A, Yaghobi R, Farahmand B, Mohebbi R. Molecular epidemiology of the hemagglutinin gene of prevalent influenza virus A/H1N1/pdm09 among patient in Iran. Virus Res. 2019;259:38-45.

12.World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season [Internet]. Geneva: WHO. 2015. Available from: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2015-2016/201502_recommendation.pdf?sfvrsn=6d83789f_15&download=true

13.Moasser E, Behzadian F, Moattari A, Fotouhi F, Rahimi A, Zaraket H, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of human influenza A viruses isolated in Iran during the 2014-2015 season. Arch Virol 2017;162:1975-84.

14.Arunorat J, Charoenvisal N, Woonwong Y, Kedkovid R, Thanawongnuwech R. Determination of current reference viruses for serological study of swine influenza viruses after the introduction of pandemic 2009 H1N1 (pdmH1N1) in Thailand. J Virol Methods 2016;236:5-9.

15.Trombetta CM, Perini D, Mather S, Temperton N, Montomoli E. Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future. Vaccines (Basel) 2014;2:707-34.

16.Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. PLoS One 2011;6:e25848.

17.Zacour M, Ward BJ, Brewer A, Tang P, Boivin G, Li Y, et al; Public Health Agency of Canada and Canadian Institutes of Health Influenza Research Network (PCIRN). Standardization of Hemagglutination Inhibition Assay for Influenza Serology Allows for High Reproducibility between Laboratories. Clin Vaccine Immunol 2016;23:236-42.

18.Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 2009;325:197-201.

19.Yavarian J, Naseri M, Shadab A, Shafiei Jandaghi NZ, Mokhtari Azad T. Epidemiological aspects of pandemic influenza A(H1N1) virus from 2009 to 2011 in Iran. Influenza and other Respiratory Viruses 2012;6:e74-6.

20. Center for Diseases Control and Prevention. Summary of the 2011-2012 Influenza Season [Internet]. USA: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD); 2012. Available from: https://www.cdc.gov/flu/pastseasons/1112season.htm#print.

21.Tavakoli F, Moattari A, Shamsi Shahr Abadi M, Kadivar MR, Khodadad N, Pirbonyeh N, et al. Antigenic Variation of the Haemagglutinin Gene of the Influenza A (H1N1) pdm09 Virus Circulating in Shiraz, February-April 2013. Iran J Immunol 2015;12:198-208.

22.Gaglani M, Pruszynski J, Murthy K, Clipper L, Robertson A, Reis M, et al. Influenza Vaccine Effectiveness Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Differed by Vaccine Type During 2013-2014 in the United States. J Infect Dis 2016 ;213:1546-56.

23. Korsun N, Angelova S, Gregory V, Daniels R, Georgieva I, McCauley J. Antigenic and genetic characterization of influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2015/2016 season. Infect Genet Evol 2017 ;49:241-250.

24.Summary of the influenza 2015–2016 season in Europe [Internet]. European Union: European Centre for Disease Prevention and Control; 2016. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-influenza-2015-2016-season-europe.

25. Castelán-Vega JA, Magaña-Hernández A, Jiménez-Alberto A, Ribas-Aparicio RM. The hemagglutinin of the influenza A(H1N1)pdm09 is mutating towards stability. Adv Appl Bioinform Chem 2014;7:37-44.

26.Wedde M, Biere B, Wolff T, Schweiger B. Evolution of the hemagglutinin expressed by human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses circulating between 2008-2009 and 2013-2014 in Germany. Int J Med Microbiol 2015;305:762-75.

27.Mukherjee A, Nayak MK, Dutta S, Panda S, Satpathi BR, Chawla-Sarkar M. Genetic Characterization of Circulating 2015 A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses from Eastern India. PLOS One 2016;11:e0168464.

28.Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Prediction of Biological Functions on Glycosylation Site Migrations in Human Influenza H1N1 Viruses. PLOS One 2012;7:e32119.

29.Kim P, Jang YH, Kwon SB, Lee CM, Han G, Seong BL. Glycosylation of Hemagglutinin and Neuraminidase of Influenza A Virus as Signature for Ecological Spillover and Adaptation among Influenza Reservoirs. Viruses 2018;10:183.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

30.Tate MD, Job ER, Deng Y-M, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing Hide and Seek: How Glycosylation of the Influenza Virus Hemagglutinin Can Modulate the Immune Response to Infection. Viruses 2014;6:1294-316.

31.Kosik I, Ince WL, Gentles LE, Oler AJ, Kosikova M, Angel M, et al. Influenza A virus hemagglutinin glycosylation compensates for antibody escape fitness costs. PLoS Pathog 2018;14:e1006796.

32.She YM, Farnsworth A, Li X, Cyr TD. Topological N-glycosylation and site-specific N-glycan sulfation of influenza proteins in the highly expressed H1N1 candidate vaccines. Sci Rep 2017;7:10232.

Archive of SID.ir