

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

Atefeh Mohebbi^{1,2}, Abbas Jamali³, Fatemeh Fotouhi⁴, Ramin Yaghobi⁵

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

بررسی ایمنولوژیکی 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 زیست‌شناسی، 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 ایمنولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: ویروس‌های مورد بررسی از بین نمونه‌های توالی‌یابی شده براساس تنوع و فراوانی جانشینی‌ها، به روش هم‌مدیف‌سازی با نرم افزار بایوآدیت 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 آنتی‌بادی 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 ایمنولوژیکی کارایی واکسن برای ویروس‌های آنفلوانزا سالیانه ضروری است؛ لذا ارائه روش‌های مناسب و در دسترس آزمایشگاه‌ها لازم است.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا تیپ A زیرگونه H1N1 پاندمی ۲۰۰۹، پروتئین هم‌اگلوتینین، تست HI

مقدمه

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 آمریکا 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

ویروس‌های آنفلوانزا به ویژه نوع A یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های حاد تنفسی در انسان به شمار می‌روند. طبق آمار

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

آنتی ژنی و غیرآنتی ژنی HA رخ داده که بر اساس آنالیز درخت فیلوژنتیک، مشخص شد که سویه‌های در گردش ایران در ساب کلاد 6B.1 قرار دارند. در این ساب کلاد، جایگزینی اسیدهای آمینه S84N، S162N و I216T در سر هم‌گلویتینین در مقایسه با سال گذشته اتفاق افتاده بود (۱۱)، که جایگزینی S162N، اختصاص به ساب کلاد 6B.1، یک موتیف جدید بالقوه N-گلیکوزیلاسیون در سایت آنتی ژنی Sa ایجاد کرده است. این جایگزینی در ۹۷٪ نمونه‌های آنفلوانزا فصلی ۱۳۹۴ یافت شد که قبلاً در این منطقه گزارش نشده بود (۱۲، ۱۳). با مشاهده این جایگزینی‌ها، و مغایرت آن با سویه 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 پیش‌گویی ساختار سه بعدی تغییرات ایجاد شده در توالی پروتئین هم‌گلویتینین، ممانعت شکل فضایی از فعالیت آنتی بادی را نشان داد. از اینرو توانایی خنثی‌سازی آنتی‌بادی ضد آنفلوانزای سویه واکسن، با نمونه‌های سرمی خرگوش به منظور بررسی ایمنولوژیکی واکسن، مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روشها

الف- انتخاب نمونه ویروسی آنفلوانزا جهت تست HI: از ۱۸۳۶ نمونه ارسالی به انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۴، که با استفاده از روش Real-time PCR تیپ و تحت تیپ‌های آنها شناسایی شده بود، نمونه‌های بیمار با تحت تیپ A/H1N1/pdm09 بستری در بخش‌های مراقبت ویژه استان‌های مرکزی، زنجان و سمنان بر اساس سن بیمار (۶۰-۱۸ سال) و شرایط بدون بیماری زمینه‌ای (از جمله بیمارهای نقص ایمنی، قلبی-عروقی، ریوی و زنان باردار) مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد، نمونه‌هایی که دارای فراوان‌ترین تعداد و تنوع جانمایی در اسیدهای آمینه توالی HA1 ثبت شده در سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU>) بودند، با استفاده از روش هم‌دیف سازی با نرم افزار بابوایدیت [Bio Edit (<https://www.bioedit.com>)] ورژن ۷ انتخاب شدند (۱۱).

ب- آنالیز فیلوژنتیکی قطعه HA1: پس از هم‌دیف سازی توالی HA1 نمونه‌ها و انتخاب سویه‌های شاخص آنفلوانزای فصلی، جهت آنالیز فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تعیین فاصله سویه‌های در گردش با سویه‌های مرجع، توالی‌های مورد نیاز از پایگاه داده اطلاعاتی آنفلوانزا در NCBI و سایت GISAID (<http://platform.gisaid.org>) دریافت شدند و درخت فیلوژنتیکی به روش maximum likelihood بر پایه توالی اسیدآمینه توسط

خوک (A/H1N1 (S-OIV: Swine-Origin Influenza A virus) و ویروس آنفلوانزای A پاندمی ۲۰۰۹ می‌نامند. در رابطه با این ویروس، واکسن نه تنها یکی از مؤثرترین ابزار برای پیشگیری از گسترش بیماری است، بلکه جهت کاهش شدت بیماری نیز کاربرد دارد (۲). در حال حاضر واکسن آنفلوانزا متشکل از سویه‌هایی از ویروس آنفلوانزای تیپ A، تحت تیپ‌های H1N1 و H3N2 و ویروس آنفلوانزای تیپ B هستند (۳، ۴). بروز پاندمی-های کشنده این ویروس که معمولاً حاصل تغییرات ژنتیکی آن می‌باشد یکی از دغدغه‌های اصلی سازمان بهداشت جهانی به 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 همان سال تولید می‌شوند (۵، ۶). هم‌گلویتینین عمده‌ترین گلیکوپروتئین سطحی پوشش و همچنین اصلی‌ترین آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا به شمار می‌رود که توسط آنتی‌بادی‌های خنثی کننده شناخته می‌شود؛ از این رو هم‌گلویتینین از جمله مهم‌ترین اهداف واکسن‌های ضد ویروس آنفلوانزا به حساب می‌آید (۷). هم‌گلویتینین از قطعه چهارم ژنوم ویروس، به صورت یک پروتئین پیش ساز HA0 سنتز شده که در طی سیکل عفونت‌زایی به کمک آنزیم پروتئاز سلول میزبان به دو زیر واحد HA1 (۳۲۷ اسید آمینه) و HA2 (۲۲۲ اسید آمینه) می‌شکند، این دو زیر واحد توسط یک باند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل باقی می‌مانند. برش HA برای عفونت‌زایی ذره ویروس و گسترش عفونت در میزبان ضروری است (۸). ناحیه HA1 در انتهای آمینی و ناحیه HA2 در انتهای کربوکسیلیک مولکول HA قرار گرفته‌اند. زیر واحد HA1 ناحیه کروی هم‌گلویتینین را تشکیل می‌دهد که محل اتصال به گیرنده سلول است و شامل پنج سایت آنتی‌ژنی به نام های Sa، Sb، Ca1، Ca2 و Cb است (۱۰-۸).

در بررسی سویه‌های در گردش A/H1N1 ایران، از زمان بروز آخرین اپیدمی در سال ۲۰۰۹ تا سال ۱۳۹۴، که مطالعه ما مورد نظر بود، آنالیز ژنتیکی ژن‌های HA و NA تغییراتی نشان نداد که منجر به انتخاب ویروسی شود که باعث افزایش پتانسیل اپیدمی یا مخصوصاً منجر به ویروانس بالا گردد. با این حال در زمستان و پاییز ۱۳۹۴ (۲۰۱۶-۲۰۱۵)، آنفلوانزا در ایران شیوع غافلگیرانه‌ای داشت، به طوری که در فاصله بهار ۹۲ تا بهار ۹۴ در میان 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 در حدود ۳۰٪ از ۱۸۰۰ نمونه آزمایش شده، سویه H1N1 بودند. در مطالعه‌ای که بر روی توالی این نمونه‌ها صورت گرفت، مشاهده شد که چندین جهش در مکان‌های مختلف

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

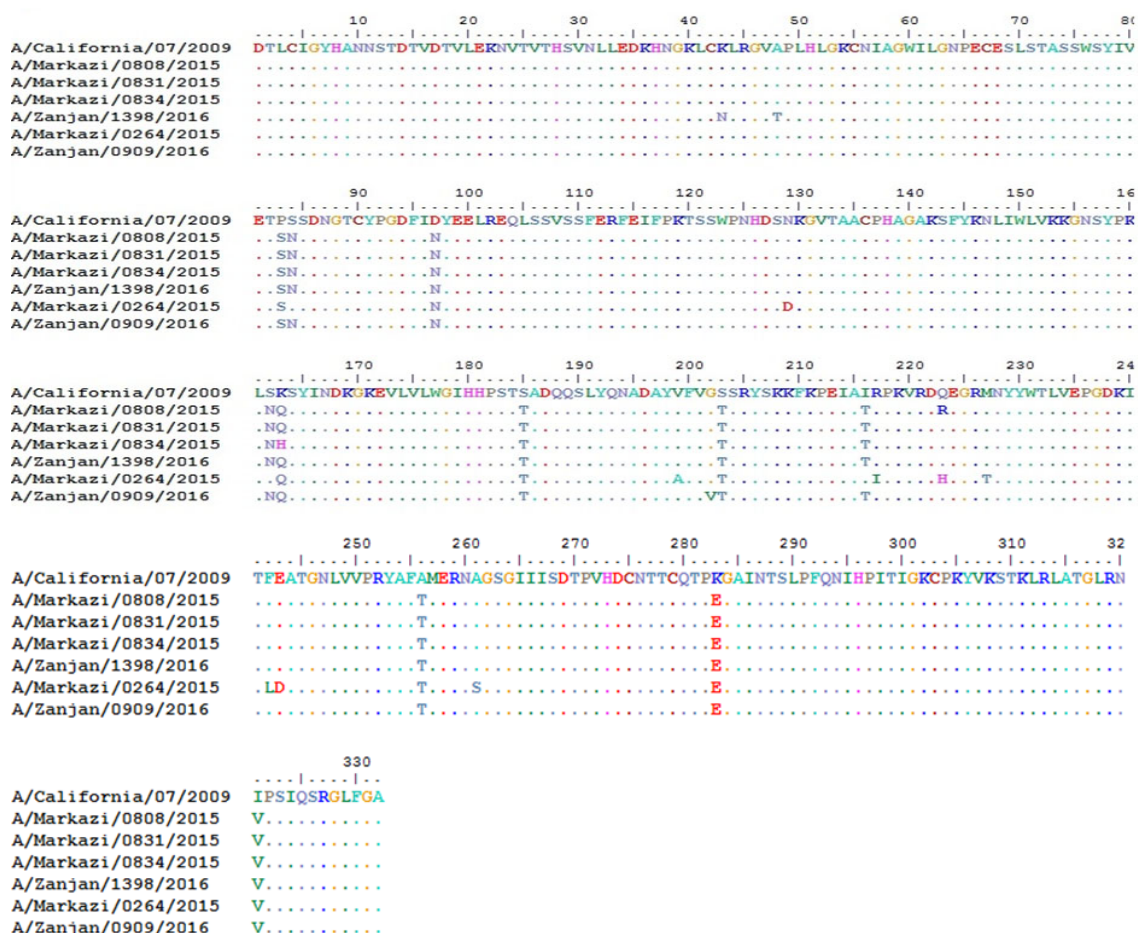
پ- تکثیر ویروس و تهیه آنتی ژن استاندارد: جهت انجام تست HI نیاز به تیترا بالای ویروس به عنوان آنتی ژن است، از این رو ویروس های آنفلوانزا انتخاب شده از نمونه بیماران مورد تکثیر قرار گرفتند. بدین منظور، سلول کلیه سگ MDCK (Madin-darby Canine kidney) به عنوان رده سلولی مناسب برای تکثیر ویروس آنفلوانزا مورد استفاده قرار گرفت. سلول های MDCK را در محیط کشت DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو FBS به پلیت ۲۴ خانه منتقل کرده و در انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از رشد و تکثیر سلول ها، 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 CO₂ دار و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به هر خانه پلیت، یک میلی لیتر محیط کشت ویروس حاوی محلول ذخیره تریپسین - TPCK (Trypsin L-1) اضافه گردید. پلیت در انکوباتور CO₂ دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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) می باشد 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 آنتی بادی، تزریق واکسن تجاری در ۲ سر خرگوش صورت گرفت و آنتی بادی تولید شده از سرم خرگوش ها 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. ایمنی زایی حیوانات و جمع آوری سرم بر اساس مصوبات کمیته ملی اخلاقی انستیتو پاستور ایران انجام می شود (IR.PIL.REC.1395.94). نمونه های سرم در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند و برای آنالیز آنتی بادی 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 کننده های 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 سانتی گراد انکوبه شد. سپس به منظور غیر فعال کردن آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد. جهت حذف آگلوتینین های 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 ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفوژ شده و نهایتاً سرم رویی به عنوان سرم تیمار شده به آرامی جدا شد. از سوسپانسیون آنتی ژنی استاندارد ویروس A/California/04/2009 به عنوان کنترل مثبت و از PR8 هم به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۶، ۱۷).

ج- تست مهار هماگلوتیناسیون (HI): این تست در پلیت های ۹۶ خانه U شکل انجام می شود. مراحل تست HI به این ترتیب است که ابتدا در تمامی چاهک های پلیت به غیر از ستون اول ۲۵ میکرولیتر PBS ریخته شد و در چاهک های 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 چاهک های انتهایی ادامه یافته و در نهایت ۲۵ میکرولیتر از ستون آخر خارج گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ویروسی استاندارد به تمامی چاهک ها 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 چاهک ها افزوده شد، پس از گذشت ۱ ساعت در دمای اتاق، تیترا آنتی بادی موجود در سرم خوانده شد. آخرین چاهکی که در آن مهار هماگلوتیناسیون صورت گرفته به عنوان تیترا آنتی بادی در نظر گرفته می شود (۱۶).

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



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

یافته‌ها

شد و تنها ۳ مورد (۰/۵٪) به تحت تیپ 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).

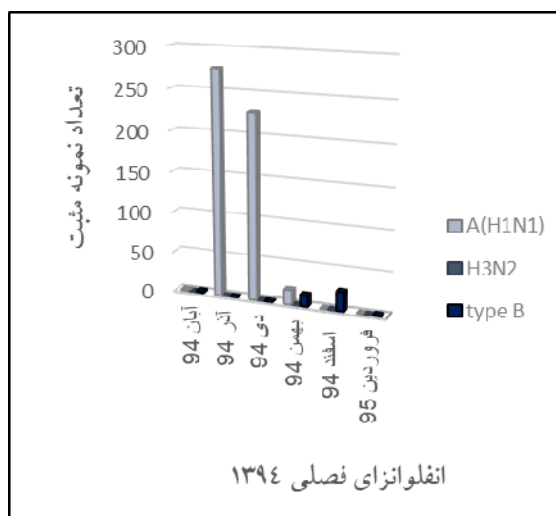
بررسی قطعه ژن HA1 نمونه‌های جدا شده نشان داد که آنها در ۱۱ جایگاه اسیدآمین با سویه مرجع A/California/07/2009 متفاوت هستند که این جایگاهها شامل S203T, S185T, K163Q, S162N, D97N, S84N, P83N, I321V و K283E, A256T, I216T بودند (شکل ۱). به طور کلی جهش‌های اسید آمینه اغلب در قسمت گزری شکل دمین هم‌گلویتینین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

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

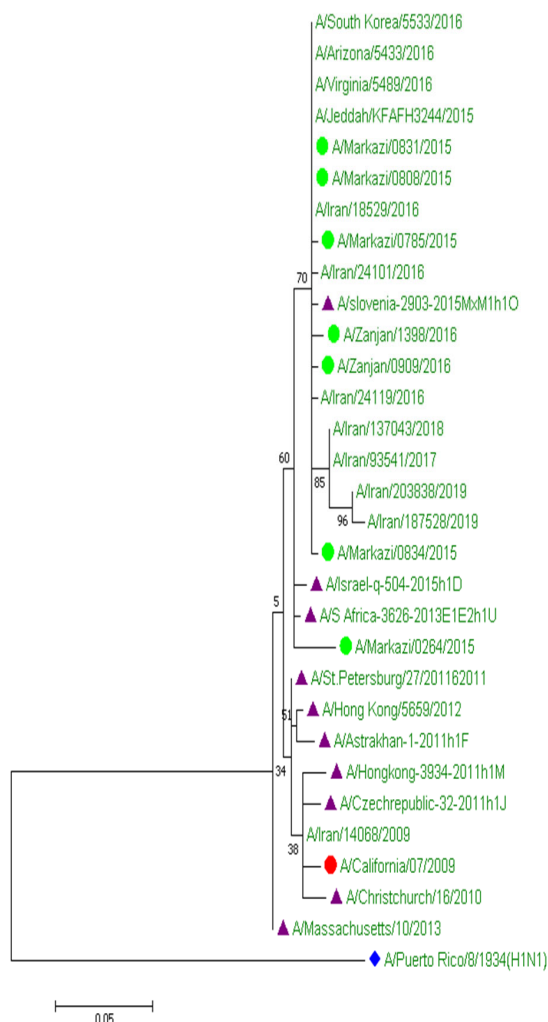
در زمان شیوع آنفلوانزای فصلی سال ۱۳۹۴ از ماه‌های آبان تا اواخر سال، معادل آنفلوانزای فصلی از ماه اکتبر ۲۰۱۵ تا ژانویه ۲۰۱۶ سال میلادی، تعداد ۱۸۳۶ نمونه بالینی از بیماران بستری با علائم حاد عفونت تنفسی، از سه استان (مرکزی، سمنان و زنجان) به آزمایشگاه آنفلوانزا، انستیتو پاستور تهران منتقل شد. از نمونه‌هایی 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 تعداد کل 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

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 محافظت‌کنندگی کمتری دارد. از این رو تیتراژ HI در ایزوله‌هایی که جهش‌هایی در نقاط مختلف آنتی‌ژنی داشتند عدد پایین‌تری نسبت به سویه مرجع نشان دادند.

بندی کلاسترها از پاندمی سال ۲۰۰۹ شدند. تغییرات اسیدهای آمینه در HA1 ویروس‌ها را در آنفلوانزای فصلی ۲۰۱۵-۲۰۱۶ در رده بندی جهانی، ساب کلاد 6B.1 با معرفی A/Slovenia-2903-2015 قرار داده است (شکل ۲).



نمودار ۱. شیوع آنفلوانزا در زمستان ۱۳۹۴ به تفکیک ماه



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 در نظر گرفته شده‌اند.

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 تیتراژ مناسب تکثیر یافتند. این ویروس‌ها از نظر توالی اسیدهای آمینه 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.

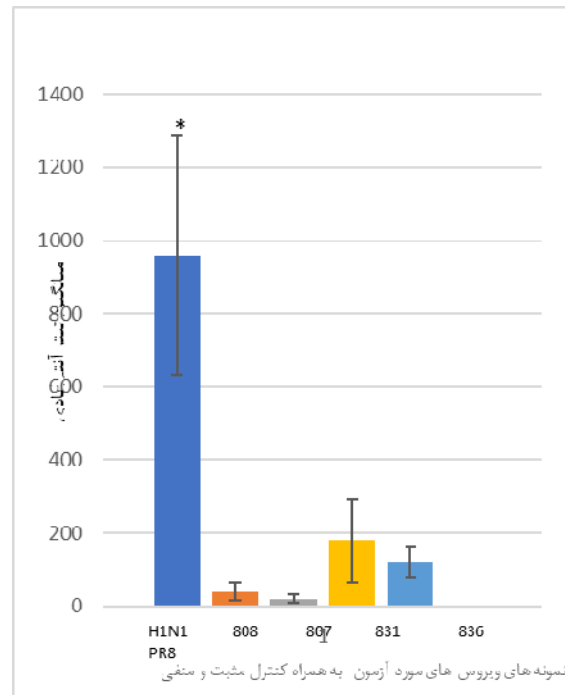
همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود عیار تیتراژ HI در نمونه کنترل مثبت (H1N1) با تیتراژ ۹۶۰ نسبت به ایزوله های مورد مطالعه بیشترین عیار را دارد و میانگین تیتراژ HI نمونه‌های ویروس در گردش با شماره‌های ۸۰۷، ۸۰۸، ۸۳۱ و ۸۳۶ به ترتیب عیار تیتراژ ۴۰، ۲۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ را نشان دادند. که در مقایسه با سویه مرجع که به صورت نمونه مثبت است کاهش چشمگیری ($P < 0.001$) داشت. در نمونه

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 دانش‌آموزان 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 ۲۰۱۱-۲۰۱۲ بیشتر کشورهای دنیا درگیر سه تیپ آنفلوانزا بودند که ایران نیز با این تیپ‌های ویروس از ماه‌های 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 آنفلوانزای فصلی ۲۰۱۵-۲۰۱۴ 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، احتمالاً 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).



نمودار ۲. نتایج میانگین تیتراژ آنتی بادی هر نمونه ویروس حاصل از هر آزمایش ۵ چاهک مواجه شده با سرم و دو بار تکرار آزمایش برای تست HI؛ نمونه‌های بیمارانی 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 ۸۰۷، ۸۰۸، ۸۳۱ و ۸۳۶ به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) نسبت به سویه منطبق با سویه واکسینال تیتراژ آنتی بادی کمتری را نشان دادند.

بحث

اپیدمیولوژی مولکولی به مطالعه تغییرات آنتی ژنی 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 در کشور 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. معمولاً فصل آنفلوانزا از ماه شهریور هر سال، شروع و تا اواخر ماه‌های بهمن و اسفند ادامه پیدا می‌کند که

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 هم‌آگلوتیناسیون است، که به عنوان یک تست ساده از نظر دسترسی و دستورالعمل است. هر واکسنی نیاز به تست‌های تکمیلی برای تأیید توسط کمیته بهداشت جهانی است. تست HI بر اساس توانایی آنتی‌بادی‌ها، در صورت وجود در سرم، برای جلوگیری از آگلوتیناسیون بین اریتروسیت‌ها و هم‌آگلوتینین ویروسی است. تیترا آنتی‌بادی در بالاترین رقت سرمی که باعث مهار شدن کامل هم‌آگلوتینین ۴ واحد HAU / 25 میکرولیتر یا ۸ واحد HAU / 50 میکرولیتر از ویروس باشد تیترا HI در نظر گرفته می‌شود. تیترا HI برابر با ۴۰ یا بیشتر از آن به عنوان یک سطح ایمنی محافظت شده مناسبی برای استفاده می‌باشد و طبق دستورالعمل FDA برای واکسن‌های پاندمی آنفلوانزا، بهترین پارامتر در حال حاضر برای پیش بینی حفاظت از عفونت طبیعی محسوب می‌شود (۱۵). از نتایج نمودار ۲ این‌گونه استنباط شد که میانگین تیترا 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 (H1N1) /07/2009 است، کاهش قابل ملاحظه‌ای داشتند. بر اساس نتایج توالی‌یابی، شاید یکی از دلایل کاهش تیترا آنتی‌بادی، ممانعت فضایی ناحیه گلیکوزیله ۱۶۲ 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 ویروس‌ها معمولاً بر اثر تغییرات ژنتیکی آن است. در نتیجه گیری کلی، نتایج آزمایش ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون نشان داد که آنتی‌بادی حاصل از واکسن واجد خاصیت خنثی‌کنندگی برای ویروس‌های در گردش است، ولی نسبت به سویه مرجع A/California (H1N1) /07/2009، 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

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 آنتی‌ژنی 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 در توالی‌های 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 سرکروی HA به صورت کامل حفاظت شده باقی بود تا اینکه در آنفلوانزای فصلی سال ۲۰۱۵-۲۰۱۶ موقعیت ۱۶۲ به ناحیه گلیکوزیله تبدیل شد (۲۸، ۲۳). نتایج دیگر نیز نشان داد که تمام نمونه‌های مورد مطالعه این فصل ایران، دارای ناحیه اضافه در موقعیت ۱۶۲ بودند، جایگاه ۱۶۲ در ناحیه آنتی‌ژنی 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 اسید آمینه‌ای بجز پرولین می‌تواند باشد (۲۹، ۳۰).

گلیکوزیلاسیون پروتئین HA یک فرآیند پس از ترجمه است که بر تکامل ویروس‌های آنفلوانزا 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 ویرولاز و خاصیت آنتی‌ژنیست 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 خنثی‌سازی توسط آنتی‌بادی‌ها، از خودش محافظت می‌کند. از این

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 نو ترکیب پتانسیل خوبی برای تهیه و دستیابی به منبع واقعی آنتی ژن خالص و آنتی بادی اختصاصی گردد. همچنین با وجود اینکه تخم مرغ جنین دار میزبان انتخابی برای جداسازی ویروس های آنفلوانزا از نمونه بیمار است، برخی از آزمایشگاه ها ترجیح می دهند 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 از آن را محدود می کند. بنابراین در آزمایشگاه های تشخیصی باید ذخیره سلول به گونه ای تهیه و نگهداری شود که کشت سلول از حساسیت مطلوب برخوردار باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره دکتری و دفاع شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز استخراج شده است. بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از همکاری و حمایت های مسئولان و همکاران آزمایشگاه آنفلوانزا و دیگر ویروس های تنفسی، انستیتو پاستور ایران را به عمل آورند.

۲۰۱۷-۲۰۱۸ توصیه کرد که تا سال ۲۰۱۹ نیز این واکسن مورد تایید بود. اما با جایگزینی های S164T، S74R و I295V در اسیدهای آمینه HA ویروس های A/H1N1، زیر گروه 6B.1a تعریف شد. ویروس های زیر گروه 6B.1a به اضافه جایگزینی S183P در اسیدهای آمینه HA1 اخیرا به صورت جهانی شیوع پیدا کرده اند. 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 یافته ها نشان می دهد که بررسی های دقیق و زمان بندی شده ساختارمولکولی و مطالعه جهش های احتمالی ویروس های آنفلوانزا در گردش لازم و ضروری است.

این مطالعه دارای محدودیت هایی به شرح زیر بود. بر خلاف روش های مولکولی، روش های سرولوژی سریع، آسان و کم هزینه تر هستند و امکان پایش تعداد زیاد نمونه در مدت زمان کوتاه فراهم است، اما این روش ها نیز معایبی دارند. آنتی بادی اختصاصی مورد استفاده در این تست، از تزریق ویروس زنده یا غیرفعال شده به دست می آید. در این روش چون از کل پیکره ویروس استفاده می شود، 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.

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. *Virology* 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.

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.

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.