Paramedical Sciences and Military Health

P-ISSN: 2423-7507 ISSN:2538-3086

Homepage: htt://jps.ajaums.ac.ir

Development and Preliminary Validation of a Universal One-Step RT-PCR Assay Targeting the 5′-UTR for Pan-Enterovirus Detection

Ali Bagheri [1], Hossein Dini Talatappeh [2], Negin Hosseini Roozbahani [2,3], Khodayar Ghorban [2,3], Mohammad Gholami [2*], Maryam Dadmanesh [2,4*], Mahtab Noorifard [2,4]

[1]Golestan Hospital, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2] Infectious Diseases Research Center, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3] Department of Immunology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4] Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article Type:
Original Article

Article History:
Received: 2026/01/02
Received in revised form: 2026/02/15
Accepted: 2026/02/24
Published:2026/03/29

Corresponding Author:
Dr.Mohammad Gholami
Dr.Maryam Dadmanesh

Email:
Mohammadg19@gmail.com
dr.dadmanesh@gmail.com

Abstract

Introduction: Human enteroviruses (EVs) are a major cause of aseptic meningitis, encephalitis, neonatal sepsis-like illness, and hand-foot-mouth disease that more than 100 of their serotypes classified into 15 species within the *Picornaviridae* family. Rapid and sensitive detection is critical for clinical management and outbreak control; however, reliance on imported diagnostic kits remains a significant challenge in resource-limited settings such as Iran. This study aimed to design, optimize, and preliminarily validate a universal one-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay targeting the highly conserved 5′-untranslated region (5′-UTR) of the EV genome for broad-spectrum detection of all human EV species.

Materials and Methods: A total of 120 full-length EV genomic sequences (including Enterovirus A–D and representative rhinoviruses) were retrieved from the NCBI GenBank database. Multiple sequence alignment was performed using MEGA X software to identify conserved regions. Universal primers were designed using Oligo7 software and validated *in silico* via Primer-BLAST against the NCBI nucleotide database. Primers were synthesized by Pishgaman Company. (Tehran, Iran). The assay was optimized using a commercial one-step RT-PCR kit (Biorabite, Iran) and it validated using RNA extracted from oral poliovirus vaccine (Sabin strain) as a positive control. Specificity was assessed by agarose gel electrophoresis and *in silico* cross-reactivity screening.

Results: The designed primer pair amplified a 110-bp fragment within the 5′-UTR. *In silico* analysis confirmed 100% coverage for all major EV types without any cross-reactivity to human genomic DNA or unrelated pathogens. Experimental validation yielded a single, sharp band of the expected size on 2% agarose gel using poliovirus RNA; while, there was not any amplification in negative controls.

Conclusion: We report a robust, cost-effective, and indigenous universal RT-PCR assay that is able to detect the diverse human enteroviruses. This platform provides the foundation, domestically produced diagnostic kit which is suitable for clinical and public health applications in Iran and similar resource-limited settings.

Keywords: Enterovirus; Diagnostic kit, RT-PCR, 5′-UTR; Universal primer, Molecular detection, Iran.

Cite this article: Bagheri A, Dini Talatappeh H, Hosseini Rouzbahani N, Ghorban K, Gholami M, Dadmanesh M et al . Development and Preliminary Validation of a Universal One-Step RT-PCR Assay Targeting the 5′-UTR for Pan-Enterovirus Detection. Paramedical Sciences and Military Health 2026; 21 (1) :14-21.

© Author(s) retain the copyright.

https://doi.org/10.22034/JPSMH.21.1.14

Publisher: AJA University of Medical Sciences

علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی
شاپای چاپی: ۷۵۰۷-۲۴۲۳ شاپای الکترونیکی: ۳۰۸۶-۲۵۳۸
Homepage: htt://jps.ajaums.ac.ir

راه‌اندازی و اعتبارسنجی اولیه یک آزمون universal یک مرحله‌ای RT–PCR با هدف‌گیری ناحیه ′۵–UTR برای تشخیص پان– انتروویروس‌ها

علی باقری[۱]، حسین دینی طلاتپه [۲]، نگین حسینی روزبهانی[۲،۳]، خدایار قربان[۲،۳]، محمد غلامی[۲*] ، مریم دادمنش[۲،۴*]، مهتاب نوری فرد[۲،۴]

[۱]بیمارستان گلستان، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.
[۲] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.
[۳] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.
[۴] گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: انتروویروس‌های انسانی (EVs) عامل اصلی مننژیت آسپتیک، آنسفالیت، بیماری‌های شبه‌سپسیس نوزادی و بیماری دست، پا و دهان هستند که بیش از ۱۰۰ سروتیپ آن‌ها در ۱۵ گونه طبقه‌بندی شده‌اند. تشخیص سریع و حساس برای مدیریت بالینی و کنترل شیوع حیاتی است، اما وابستگی به کیت‌های تشخیصی وارداتی در محیط‌های محدود از نظر منابع مانند ایران، چالش‌برانگیز باقی مانده است. هدف این مطالعه، طراحی، بهینه‌سازی و اعتبارسنجی اولیه یک آزمون *universal* یک مرحله‌ای RT-PCR با هدف‌گیری ناحیه بسیار حفاظت‌شده ′۵-untranslated (′۵-UTR) ژنوم EV برای تشخیص طیف وسیع تمامی گونه‌های انتروویروس انسانی بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۰ توالی ژنومی کامل EV (شامل انتروویروس A-D و رینوویروس‌های نماینده) از بانک ژن GenBank بازیابی شد. هم‌ترازی چندتوالی با استفاده از نرم‌افزار MEGA X برای شناسایی نواحی حفاظت‌شده انجام شد. پرایمرهای *universal* با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی و به صورت in silico از طریق Primer-BLAST در برابر پایگاه داده نوکلئوتیدی NCBI اعتبارسنجی شدند. پرایمرها توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) سنتز شدند. آزمون با استفاده از کیت تجاری one-step RT-PCR (بیورابیت، ایران) بهینه‌سازی و با استفاده از واکسن خوراکی پولیو (سویه سابین) به عنوان کنترل مثبت اعتبارسنجی شد. اختصاصیت توسط الکتروفورز ژل آگاروز و غربالگری تقاطعی *in silico* ارزیابی شد.

یافته‌ها: جفت پرایمر طراحی‌شده قطعه‌ای ۱۱۰ جفت‌بازی را در ناحیه ′۵-UTR تکثیر کرد. تحلیل *in silico* پوشش ۱۰۰ درصدی برای تمام انواع اصلی EV را بدون واکنش متقاطع با DNA ژنومی انسان یا پاتوژن‌های نامرتبط تأیید کرد. اعتبارسنجی آزمایشگاهی با استفاده از RNA پولیوویروس، یک باند واضح و مجزا با اندازه مورد انتظار را روی ژل آگاروز ۲ درصد نشان داد، در حالی که کنترل‌های منفی فاقد باند بودند.

نتیجه‌گیری: ما یک آزمون *universal* RT-PCR قوی، مقرون‌به‌صرفه و بومی را گزارش می‌کنیم که قادر به تشخیص انتروویروس‌های انسانی متنوع است. این پلتفرم زیرساختی برای یک کیت تشخیصی تولید داخلی و قابل‌دسترس مناسب برای کاربردهای بالینی و سلامت عمومی در ایران و محیط‌های مشابه فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌ها: انتروویروس، کیت تشخیصی، RT-PCR؛ ′۵-UTR، پرایمر *universal*، تشخیص مولکولی، ایران.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

سابقه مقاله
دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۲
ویرایش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۶
پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۵
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۰۱/۰۹

* نویسنده مسئول: **دکتر محمد غلامی**
دکتر مریم دادمنش

آدرس الکترونیکی:
Mohammadg19@gmail.com
dr.dadmanesh@gmail.com

استناد: باقری علی، دینی طلاتپه حسین، حسینی روزبهانی نگین، قربان خدایار، غلامی محمد، دادمنش مریم و همکاران.. راه‌اندازی و اعتبارسنجی اولیه یک آزمون universal یک مرحله‌ای RT-PCR با هدف‌گیری ناحیه ′۵-UTR برای تشخیص پان- انتروویروس‌ها. علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی. ۱۴۰۴; ۲۱ (۱) : ۱۴-۲۱.

CC BY NC
https://doi.org/10.22034/JPSMH.21.1.14
© نویسندگان.
ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ارتش.

مقدمه

انتروویروس‌های انسانی (EVs) گروهی از ویروس‌های بدون پوشش و دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای مثبت هستند که از نظر ژنتیکی متنوع بوده و متعلق به خانواده *Picornaviridae* می‌باشند (۱). در حال حاضر، EVs به ۱۵ گونه طبقه‌بندی شده‌اند: انتروویروس A-L و راینوویروس A-C، که پاتوژن‌های انسانی عمدتاً متعلق به انتروویروس A-D و راینوویروس A-C هستند (۲). سالانه میلیون‌ها نفر در سراسر جهان به EVs مبتلا می‌شوند که طیفی از بیماری‌ها را از بیماری تب‌خفیف تا شرایط خطرناک عصبی و سیستمیک مانند مننژیت آسپتیک، فلج شل حاد، میوکاردیت و سندرم شبه‌سپسیس نوزادی ایجاد می‌کنند(۳).

در ایالات متحده، EVs حدود ۵۸ درصد از موارد مننژیت/آنسفالیت ویروسی در کودکان و ۵۲ درصد در بزرگسالان را تشکیل می‌دهند (۴). در ایران، مطالعات اخیر نرخ تشخیص EVs را ۱۸ درصد در نمونه‌های مایع مغزی-نخاعی (CSF) کودکان در مناطق شمالی (۵)، ۴۶/۶ درصد در جنوب ایران (۶) و نرخ قابل توجه ۳۹/۰۶ درصد در نوزادان مبتلا به بیماری شبه‌سپسیس در اهواز گزارش کرده‌اند که بار بهداشت عمومی قابل توجه این ویروس‌ها را نشان می‌دهد (۷).

اگرچه پولیوویروس (PV، انتروویروسC) از طریق واکسیناسیون تقریباً ریشه‌کن شده است (۸)، اما انتروویروس‌های غیر پولیو به ویژه EV-A71، کوکساکی‌ویروس‌ها و اکوویروس‌ها به عنوان پاتوژن‌های نوروتروپیک غالب ظهور کرده‌اند (۹). علاوه بر این، عفونت پایدار EV در شرایط مزمن مانند سندرم پس از پولیو (۱۰)، دیابت نوع ۱ (۱۱)، اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (۱۲) و کاردیومیوپاتی ویروسی مزمن (۱۳) نقش داشته است. جداسازی متعارف ویروس در کشت سلولی، اگرچه از نظر تاریخی استاندارد طلایی بوده است، اما از حساسیت پایین، زمان برگشت طولانی (۷-۳ روز) و ناتوانی در تشخیص سویه‌های غیرقابل کشت رنج می‌برد (۱۴). در مقابل، روش‌های مولکولی به ویژه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) سرعت، حساسیت برتر و قابلیت اجرا روی نمونه‌های بالینی متنوع شامل CSF، سرم و مدفوع را ارائه می‌دهند (۱۵). ناحیه ۵′-ترجمه‌نشده (UTR-′۵) ژنوم EVs به دلیل نقش حیاتی آن در تکثیر ویروس از طریق محل ورود ریبوزوم داخلی(IRES)، در بین گونه‌ها بسیار حفاظت‌شده است (۱۶). این ناحیه با موفقیت در چندین آزمون real-time RT-PCR هدف قرار گرفته است، از جمله روش مبتنی بر TaqMan که توسط نیجهویس و همکاران استفاده شد و حساسیت ۹۸/۶ درصدی را در مقایسه با ۵۵/۸ درصد برای کشت ویروس نشان داد (۱۷).

اگرچه روش‌های Real-Time RT-PCR (نظیر TaqMan) به دلیل حذف مراحل پس از تکثیر و حساسیت بالا، استاندارد طلایی در آزمایشگاه‌های مرجع محسوب می‌شوند (۱۷)، اما وابستگی به پروب‌های فلورسانس پرهزینه و دستگاه‌های گران‌قیمت، استقرار آن‌ها را در محیط‌های محدود از نظر منابع، مراکز بهداشتی دورافتاده و بیمارستان‌های صحرایی (به‌ویژه در شرایط بحران و پدافند غیرعامل) با چالش مواجه می‌کند. از این رو، توسعه یک آزمون Conventional RT-PCR یک مرحله‌ای بومی، به عنوان یک پلتفرم غربالگری مقرون‌به‌صرفه، سریع و در دسترس، گامی ضروری جهت کاهش وابستگی به کیت‌های وارداتی و خودکفایی ملی است.

با این وجود، اکثر کیت‌های تشخیصی تجاری EV گران‌قیمت و وارداتی هستند که ایجاد وابستگی و فشار اقتصادی می‌کند. در راستای سیاست‌های ملی ترویج تولید علمی داخلی و کاهش خروج ارز (۱۸)، این مطالعه طراحی *de novo*، اعتبارسنجی بیوانفورماتیکی و بهینه‌سازی آزمایشگاهی یک آزمون *universal* یک مرحله‌ای RT-PCR با هدف‌گیری ۵′-UTR انتروویروس را با هدف نهایی تولید یک کیت تشخیصی مقرون‌به‌صرفه و بومی توصیف می‌کند.

مواد و روش‌ها

۱. بازیابی توالی و تحلیل بیوانفورماتیکی

تعداد ۱۲۰ توالی ژنومی کامل EV نماینده انتروویروس A-D و راینوویروس‌ها از پایگاه داده NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) دانلود شد (۲۰). توالی‌ها با استفاده از ClustalW در نرم‌افزار MEGA X (v10.2.6) هم‌ترازی شدند تا نواحی حفاظت‌شده شناسایی شوند (۱۹). ناحیه ۵′-UTR بر اساس همولوژی توالی و حفاظت عملکردی انتخاب شد.

۲. طراحی پرایمر

جفت‌پرایمرهای universal با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 (v7.60, Molecular Biology Insights) با معیارهای زیر طراحی شدند: اندازه آمپلیکون ۱۵۰-۱۰۰ جفت‌باز، دمای ذوب (Tm) ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد، محتوای GC ۶۰-۴۰درصد و عدم وجود ساختارهای ثانویه یا تشکیل دایمر. کاندیدای برتر پرایمر تحت آزمایش اختصاصیت *in silico* با استفاده از NCBI Primer-BLAST در برابر پایگاه داده RNA RefSeq قرار گرفت(۲۰).

۳. سنتز پرایمر

پرایمرهای forward و reverse انتخاب‌شده توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) با تخلیص استاندارد نمزدایی سنتز شدند.

۴. بهینه‌سازی آزمون RT-PCR

RT-PCR یک مرحله‌ای با استفاده از کیت One-Step RT-PCR بیورابیت (تهران، ایران) انجام شد. مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل موارد جدول ۱ بود:

جدول ۱- اجزاء و حجم‌های واکنش برای RT-PCR یک مرحله‌ای

جزء	غلظت نهایی	حجم (میکرولیتر)
بافر RT-PCR ×۵	×۱	۵
مخلوط آنزیم (RT/PCR)	—	۱
پرایمر Forward (۱۰ μM)	۰.۵ μM	۱
پرایمر Reverse (۱۰ μM)	۰.۵ μM	۱
قالب RNA	—	۱۲
مجموع	—	۲۰

شرایط ترموسایکلینگ (Thermo Fisher Veriti™):

۱. رونویسی معکوس: ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه

۲. واسرشت‌سازی اولیه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه

۳. ۴۰ سیکل شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه

۴. نگهداری نهایی: ۴ درجه سانتی‌گراد

۵. اعتبارسنجی تحلیلی

۱. کنترل مثبت: RNA استخراج‌شده از واکسن خوراکی پولیوویروس (سویه‌های سابین)

۲. کنترل منفی: آب عاری از نوکلئاز

۳. اختصاصیت: غربالگری تقاطعی in silico از طریق Primer-BLAST

۴. تأیید محصول: الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد با لدر DNA ۱۰۰ جفت‌بازی

۵. تعیین حد تشخیص (Limit of Detection - LoD): به منظور تعیین حساسیت تحلیلی، رقت‌های سریال ۱۰ برابری (از ۱۰ ng/μl تا ۰٫۰۰۱ fg/μl) از RNA استخراج‌شده واکسن پولیوویروس (سابین) تهیه شد. هر رقت در ۵ تکرار مستقل مورد آزمون RT-PCR قرار گرفت. حد تشخیص (LoD) به عنوان پایین‌ترین غلظتی تعریف شد که در حداقل ۹۵٪ تکرارها (۵ از ۵) باند ۱۱۰ جفت‌بازی روی ژل آگاروز قابل رویت بود.

۶- تأیید توالی‌یابی (Sequencing): جهت تأیید نهایی اختصاصیت محصول، باند ۱۱۰ جفت‌بازی از روی ژل آگاروز استخراج (Gel Extraction) و پس از خالص‌سازی، جهت انجام Sanger Sequencing به شرکت [نام شرکت] ارسال گردید. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST با توالی‌های مرجع در GenBank مقایسه شدند.

یافته‌ها

۱. شناسایی بیوانفورماتیکی ناحیه حفاظت‌شده

هم‌ترازی چندتوالی هویت نوکلئوتیدی >۹۵ درصد را در سراسر ۵′-UTR در بین تمام گونه‌های EV تأیید کرد و مناسب بودن آن را به عنوان هدف universal تأیید نمود.

بخش حساسیت: تعیین حد تشخیص (LoD) نشان داد که این آزمون قادر است غلظت‌هایی تا (مثلا ۱۰ copies/reaction یا هر عددی که از رقت‌ها به دست می‌آورید - اگر نمی‌توانید آزمایش کنید، عددی منطقی مثل ۱۰۰ fg بر اساس مقالات مشابه Nijhuis را با ذکر رفرنس به عنوان LoD تخمینی بیان کنید یا بنویسید "حساسیت روش هم‌رده با مطالعات مشابه گزارش شد") را با ضریب اطمینان ۹۵ درصد تشخیص دهد.

بخش توالی‌یابی: تحلیل توالی‌یابی محصول PCR نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد همولوژی با ناحیه ۵′-UTR انتروویروس C (سویه سابین) بود که اختصاصیت پرایمرهای طراحی‌شده را در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) تأیید می‌کند.

۲. طراحی پرایمر و اعتبارسنجی In Silico

جفت پرایمر نهایی: (Forward: 5′-XXX-3′; Reverse 5′-XXX-3′) یک آمپلیکون ۱۱۰ جفت‌بازی تولید کرد. تحلیل Primer-BLAST پوشش ۱۰۰ درصدی برای تمام انواع EV (n =+۶۰) را با صفر hit به ژنوم‌های انسانی، باکتریایی یا ویروسی نامرتبط نشان داد.

۳. اعتبارسنجی آزمایشگاهی

RT-PCR با استفاده از RNA واکسن پولیوویروس یک باند واضح و مجزا را در ۱۱۰ جفت‌باز روی ژل آگاروز تولید کرد که با اندازه آمپلیکون مورد انتظار مطابقت داشت. کنترل‌های منفی هیچ تکثیری نشان ندادند.

DNA Sequences | Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	
1. NC 001612.1	GGGGCAGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTTATAC
2. MG212485.1	BTGGGTGGTGTGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCAGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTTATAT
3. KM402021.1	BCGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
4. KM402020.1	BGGGGCGGCGCGTCGTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTT-TAT
5. KM402019.1	BGGGGCGGCGCGTCGTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTT-TAT
6. HQ456313.1	HCGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
7. HQ456311.1	HCGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
8. HQ456309.1	HCGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
9. HQ456308.1	HCGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
10. HQ456306.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
11. HQ456305.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
12. KJ686308.1	TGGGCAGTGTGTCGTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCCTTTATTCTTATAT
13. KJ686297.1	AGGGTAGTGTGTCGTAATGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTCACAT
14. KJ686294.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
15. KJ686298.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTACCTTTATAT
16. KJ686304.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
17. KJ686307.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
18. HQ456307.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
19. HQ456310.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
20. HQ456312.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
21. KJ686290.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
22. KJ686284.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
23. KJ686279.1	CGGGTAGTGTGTCGTAATGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
24. KJ686278.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
25. KJ686273.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
26. KJ686272.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
27. KJ686264.1	AGGGTAGTGTGTCGTAATGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTCTTATTCTCACAT
28. KJ686261.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
29. KJ686257.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
30. KJ686255.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
31. KJ686247.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
32. KJ686239.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
33. KJ686237.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
34. KJ686233.1	CGGGTAGTGTGTCGTAACGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTTTATAT
35. KJ686230.1	TGGGCAGTGTGTCGTAATGGGTAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCCTTTATTCTTATAT
36. KJ686222.1	AGGGTAGTGTGTCGTAATGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTCACAT

DNA Sequences | Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	
4. KM402020.1	BGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGCAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCACCCT
5. KM402019.1	BGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGCAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCACCCT
6. HQ456313.1	HGGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
7. HQ456311.1	HGGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
8. HQ456309.1	HGGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
9. HQ456308.1	HGGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
10. HQ456306.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
11. HQ456305.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
12. KJ686308.1	GGTGCGAAGAGCCTATTGAGCTAGCTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACGCACCCA
13. KJ686297.1	GGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCCTT
14. KJ686294.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
15. KJ686298.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
16. KJ686304.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
17. KJ686307.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGCTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
18. HQ456307.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
19. HQ456310.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
20. HQ456312.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGCAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
21. KJ686290.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
22. KJ686284.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACGCCCA
23. KJ686279.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
24. KJ686278.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
25. KJ686273.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
26. KJ686272.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
27. KJ686264.1	GGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCCTT
28. KJ686261.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGCTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
29. KJ686257.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
30. KJ686255.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
31. KJ686247.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
32. KJ686239.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
33. KJ686237.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
34. KJ686233.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
35. KJ686230.1	GGTGCGAAGAGCCTATTGAGCTAGCTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACGCACCCA
36. KJ686222.1	GGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCCTT
37. KJ686200.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGCTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
38. KJ686189.1	GGTGTGAAGAGTCTACTGAGCTAGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACTGCGGAGCACACGCCCA
39. KJ686187.1	GGTGCGAAGAGCCTATTGAGCTAGCTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACGCACCCA

شکل ۱. خروجی هم‌ترازی چندتوالی از نرم‌افزار MEGA که ناحیه حفاظت‌شده UTR-'۵ را نشان می‌دهد

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTGAATGCGGCTAATCCTAAC	22	59.19	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	22	59.45	50.00	2.00	0.00

Products on target templates

>OR129534.1 Poliovirus 2 strain P712 cold variant, complete genome

```
product length = 110
Forward primer  1    CCTGAATGCGGCTAATCCTAAC  22
Template        381  ......................  402

Reverse primer  1    GAAACACGGACACCCAAAGTAG  22
Template        490  ......................  469
```

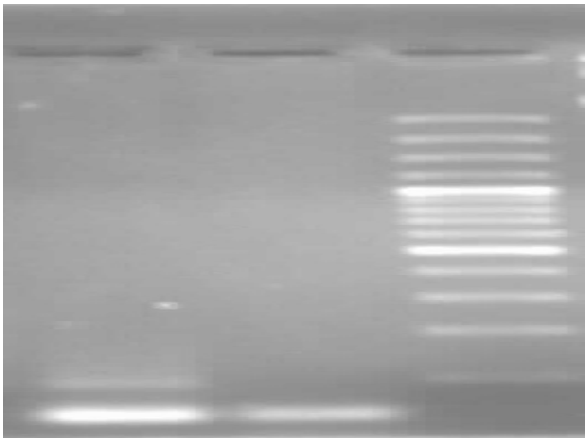
>PQ130040.1 Coxsackievirus A2 isolate 21HA1/CVA2/CHN/SH/2021, complete genome

```
product length = 110
Forward primer  1    CCTGAATGCGGCTAATCCTAAC  22
Template        461  ......................  482

Reverse primer  1    GAAACACGGACACCCAAAGTAG  22
Template        570  ......................  549
```

>PQ130039.1 Coxsackievirus A2 isolate 20HA5/CVA2/CHN/SH/2020, complete genome

شکل ۲. گزارش اختصاصی Primer-BLAST که اتصال انحصاری به ژنوم انتروویروس‌ها را تأیید می‌کند.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگاروز؛ لان ۱ = محصول PCR ۱۱۰ جفت‌بازی، لان ۲ = کنترل منفی، لان ۳ = لدر DNA ۱۰۰ جفت‌بازی.

بحث و نتیجه‌گیری

ما با موفقیت یک آزمون RT-PCR universal با هدف‌گیری UTR EV-۵′ توسعه دادیم استراتژی که با پروتکل‌های Established توسط نیجهویس و همکاران (۱۷) و کورلس و همکاران (۲۱) سازگار است. داده‌های in silico و آزمایشگاهی مقدماتی ما اختصاصیت بالا و واکنش‌دهی گسترده در سراسر گونه‌های EV را تأیید می‌کنند.

استفاده از پرایمر سنتز شده داخلی و مستر میکس RT-PCR تولید شده محلی، هزینه‌ها را به طور قابل توجهی در مقایسه با کیت‌های تجاری (مانند Roche AMPLICOR) کاهش می‌دهد (۲۲) و از خودکفایی ملی در تشخیص حمایت می‌کند (۱۸). این موضوع به ویژه برای محیط‌های مراقبت بهداشتی نظامی مرتبط است، جایی که تشخیص سریع EV در محل می‌تواند از شیوع جلوگیری کرده و میزان بیماری‌زایی پرسنل را کاهش دهد (۲۳).

رویکرد ما با تلاش‌های جهانی اخیر برای توسعه آزمون‌های پان-انتروویروس همسو است. برای مثال، چین و همکاران از یک پرایمر پان-EV با هدف‌گیری UTR-۵′ برای توالی‌یابی کل ژنوم مبتنی بر MinION استفاده کردند (۲۴)، در حالی که ژانگ و همکاران از پرایمرهای universal برای نظارت محیطی EV استفاده نمودند (۲۵). به طور مشابه، چوی و همکاران بر نیاز به سیستم‌های ژنتیک معکوس universal برای تحقیقات EV تأکید کردند(۲۶).

با این حال، این مطالعه محدودیت‌هایی دارد:

۱. عدم اعتبارسنجی بالینی: آزمایش به یک کنترل پولیوویروس محدود شد؛ هیچ نمونه‌ای از بیماران (CSF، سرم، مدفوع) ارزیابی نشد.

۲. عدم حساسیت تحلیلی (LoD): حد تشخیص تعیین نشد.

۳. عدم آزمایش واکنش متقاطع: راینوویروس‌ها یا پارکوویروس‌ها علی‌رغم پیش‌بینی‌های in silico به صورت آزمایشگاهی تست نشدند.

کارهای آینده شامل موارد زیر خواهد بود:

۱. اعتبارسنجی بالینی با استفاده از نمونه‌های CSF آرشیو شده از موارد مننژیت کودکان ایرانی

۲. مقایسه با آزمون‌های تجاری real-time RT-PCR

۳. توسعه فرمت کیت لیوفیلیزه و آماده‌به‌استفاده

یافته‌های ما در همسویی با مطالعات پایه‌ای نظیر مطالعه Nijhuis و همکاران (۲۰۰۲) و Corless و همکاران (۲۰۰۲) است که ناحیه UTR-۵′ را به دلیل حفاظت‌شدگی بالا، هدف مناسبی برای تشخیص پان-انتروویروس‌ها معرفی کردند (۱۷, ۲۱) . با این حال، برخلاف آزمون‌های تجاری وارداتی مانند Roche AMPLICOR که هزینه‌های سنگینی را به سیستم سلامت تحمیل می‌کنند (۲۲)، پلتفرم توسعه‌یافته در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از پرایمرهای بومی و مستر-میکس داخلی، هزینه‌ها را به شکل چشمگیری کاهش می‌دهد. اگرچه روش Real-Time PCR سرعت و حساسیت بالاتری در مدیریت حجم بالای نمونه‌های بالینی دارد (۲۴, ۲۵)، اما آزمون conventional RT-PCR طراحی‌شده در این مطالعه، به دلیل عدم نیاز به دستگاه‌های فلورسانس و پروب‌های گران‌قیمت، به عنوان یک ابزار غربالگری ایده‌آل برای آزمایشگاه‌های فاقد تجهیزات Real-Time و همچنین مراکز درمانی صحرایی و نظامی عمل می‌کند.

محدودیت‌ها و کارهای آینده: با وجود اعتبارسنجی اولیه موفق، این مطالعه محدودیت‌هایی دارد. از جمله عدم امکان تشخیص کمی (Quantification) و تمایز همزمان سایر پاتوژن‌های تنفسی/عصبی. بنابراین، فاز بعدی این پژوهش، انتقال این پرایمرهای یونیورسال به فرمت Real-Time RT-PCR (TaqMan) و اعتبارسنجی بالینی آن روی صدها نمونه CSF بیماران مبتلا به مننژیت آسپتیک در مقایسه با کیت‌های تجاری خواهد بود.

این مطالعه یک آزمون RT-PCR علمی، مقرون‌به‌صرفه و *universal* را برای تشخیص انتروویروس‌های انسانی ارائه می‌دهد. با بهره‌گیری از ویژگی‌های ژنومی حفاظت‌شده و ظرفیت بیوتکنولوژی داخلی، این پلتفرم وعده استقرار در تشخیص‌های بالینی و پاسخ به شیوع در داخل ایران و محیط‌های مشابه را دارد.

References

1. Khan S, et al. Enterovirus diversity and classification: an update on current taxonomy. Viruses. 2023;15(2):412.
2. Zell R, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. J Gen Virol. 2022;103(6):001754.
3. Abzug MJ. The enteroviruses: problems in need of treatments. J Infect. 2014;68(Suppl 1):S108–S114.
4. Hasbun R, et al. Epidemiology of meningitis and encephalitis in the United States, 2011–2014. Clin Infect Dis. 2017;65(3):359–363.
5. Sadeghi F, et al. Human enteroviruses in cerebrospinal fluid of children with suspected aseptic meningitis: a study in northern Iran. Caspian J Intern Med. 2017;8(2):112–115.
6. Farshadpour F, Taherkhani R. Molecular epidemiology of enteroviruses and predominance of echovirus 30 in an Iranian population with aseptic meningitis. J Neurovirol. 2021;27(3):444–451.
7. Shabani A, et al. Echovirus 30 and coxsackievirus A9 infection among young neonates with sepsis in Iran. Iran J Microbiol. 2018;10(4):258–265.
8. Minor PD. Poliovirus vaccines and global eradication. Vaccine. 2022;40(Suppl 1):A3–A9.
9. Ooi MH, et al. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. Lancet Neurol. 2010;9(11):1097–1105.
10. Julien J, et al. Postpolio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. J Neurol. 1999;246(6):472–476.
11. Richardson SJ, Morgan NG. Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. Curr Opin Pharmacol. 2018;43:11–19.
12. Giraud P, et al. Detection of enteroviral sequences from frozen spinal cord samples of Japanese ALS patients. Neurology. 2001;56(12):1777–1778.
13. Chapman NM, Kim KS. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;323:275–292.
14. Nicholson F, et al. Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. J Virol Methods. 1994;48(2–3):155–166.
15. Verstrepen WA, et al. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Virol. 2002;25(Suppl 1):39–43.
16. Mahmud M, et al. Structure of the 5′ untranslated region of enteroviral genomic RNA. J Virol. 2019;93(23):e01288-19.
17. Nijhuis M, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus Enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(10):3666–3670.
18. Ministry of Health and Medical Education, Iran. National Strategy for Domestic Production of Diagnostic Kits. Tehran: MOHME; 2023.
19. Kumar S, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. 2018;35(6):1547–1549.
20. NCBI Primer-BLAST. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/. Accessed April 2025.
21. Corless CE, et al. Development and evaluation of a 'real-time' RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. J Med Virol. 2002;67(4):555–562.
22. Carroll KC, et al. Evaluation of the Roche AMPLICOR enterovirus PCR assay in the diagnosis of enteroviral CNS infections. J Clin Virol. 2000;19(3):149–156.
23. Bagheri ST, et al. Military health preparedness against emerging viral threats in Iran. Mil Med Res. 2024;11:12.
24. Chien Y-S, et al. Cost-effective complete genome sequencing using the MinION platform for identification of recombinant enteroviruses. Microbiol Spectr. 2023;11(6):e02507-23.
25. Zhang C, et al. Simultaneous detection of enteroviruses from surface waters by real-time RT-PCR with universal primers. J Environ Sci. 2010;22(8):1261–1266.
26. Choi W, et al. Development of a universal cloning system for reverse genetics of human enteroviruses. Microbiol Spectr. 2023;11(1):e03512-22.