
العدد/٢

هدى عبدالهادي النصراوي انطوان صبري البنا رمزية الخياط كلية الطب البيطري/جامعة بغداد كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

الخلاصة

دراسة عن الاصابة بفايروس الا نفلونزا في الانسان

تضمنت الدراسة عزل عزلتين لفايروس انفلونزا الإنسان ، وذلك من نموذجين مرضيين لمرضى يعانون من اعراض مشابهة لمرض الانفلونزا . استخدمت اجنة بيض الدجاج النامي بعمر (\cdot 1) ايام لعزل الفايروس وتنميته ، فقد استخدم الحقن في كيس الامنيون للتمرير الاولي، وكيس الالنتوي للتمريرات اللاحقة وذلك لعزل فايروس انفلونزا الانسان وقد تم التحري عن الفايروس في السائل الالنتوي المحصود من البيض المحقون وذلك بعد \cdot ٧ ساعة من الحقن باختبار الملازن الدموي لكريات الدم الحمر للدجاج كتشخيص اولي. وتم تحديد نوع ونمط الفايروسات المعزولة عن طريق التشخيص المصلي باستخدام اختبار اثباط التلازن الدموي واختبار تثبيت المتمم ، وقد شخصت عزلتا فايروس انفلونزا الإنسان فكان من نوع (\cdot 1) نمط \cdot 4 وذلك باستخدام مصل مصاد مرجعي لفايروس انفلونزا الإنسان في أجنة بيض مضادة مرجعية حاوية على اضداد فايروس الانفلونزا المموي اللانسان والمايروس انفلونزا الإنسان في أجنة بيض الدجاج النامي حيث وصل اعلى معيار للتلازن الدموي لفايروس انفلونزا الإنسان في امصال المرضى الذين عزل منهم فايروس الانفلونزا وذلك باستخدام اختبار الباط التلازن الدموي واختبار تثبيت المتمم واختبار الاليزا (المحضر محلياً). وقد تم التحري ايضاً عن وجود الاضداد لفايروس انفلونزا الإنسان (العزلة الأولى والثانية) في المحضر محلياً). وقد تم التحري ايضاً عن وجود الاضداد لفايروس انفلونزا الإنسان (العزلة الأولى والثانية) في المصابين بأعراض مشابهة لمرض الانفلونزا والتي بلغ عددها + نموذجاً مصلياً ، وذلك باستخدام فحص الأمصال الموجبة فيه نسبة الأمصال الموجبة فيه (+ 20 ما ماله وصلت نسبة الأمصال الموجبة فيه (+ 20 ما ماله وصلت نسبة الأمصال الموجبة فيه (+ 20 ماله و المرب) .

المقدمة

يعد مرض الأنفلونزا من الأمراض الفايروسية التنفسية المعدية التي تصيب الإنسان والحيوان ولاسيما الطيور و الخيول و الخنازير و كذلك حيوانات أخرى (Jawetz et al.,2001) ، ويظهر المرض على شكل وباء فايروسي شديد العدوي، و ينتشر عن طريق الهواء بصورة سريعة مسبباً حدوث إصابات تنفسية حادة في الإنسان ، وقد ينتج عنها حدوث مضاعفات مرضية شديدة الخطورة يمكن أن تؤدي الى الوفاة (Ray,1994) كما يعد من الأمراض الواسعة الانتشار التي تظهر على شكل وباء محلىEpidemic، وقد يجتاح المرض مناطق واسعة من العالم فيسبب وبأء armon and Kendal)Pandemic عالمياً 1989,). ويعد فايروس الأنفلونزا نوع A اكثر أنواع الأنفلونزا انتشاراً في الطبيعة حيث يصيب الإنسان و الحيوان ولاسيما الخيول و الخنازير ومختلف أنواع الطيور ، أما فايروسات الأنفلونزا نوع B و C فأنها تصيب الإنسان فقط(Jawetz et al.,2001) ويصيب المرض مختلف الأعمار في الإنسان و يسبب مشاكل صحية تتباين في خطورتها بين إصابة تنفسية بسيطة إلى التهاب رئوي حـاد (Ellis,etal;1997).وقد يؤدي الى حدوث مضاعفات مرضية شديدة الخطورة في الأطفال وكبار السن ولاسيما الأشخاص الذين يعانون من أمراض قلبية أو رئوية مزمنة او أمراض نقص

المناعة أو أمراض السكري Glezen and diabetes) (Cherry, 1992 . يعد الحقن في كيس الامنيون و كيس الالنتوي لاجنة الدجاج النامية بعمر ٩ –١١ يوم افضل طريقة لعزل و تنمية فايروس الأنفلونزا نوع A و B (White and Fenner , 1986) و يستخدم الحقن في كيس الامنيون للعزل الأولى لفايروس أنفلونزا الإنسان أما لتكثير الفايروس المعزول فيفضل استخدام الحقن في كيس الالنتوي(Grit et al., 1979) ويشخص الفايروس المعزول والملزن لكريات الدم الحمر باستخدام الأمصال المضادة لفايروس الأنفلونزا الخاص بالنوع و النمط حيث يعمل هذا المصل على تثبيط التلازن الدموي (Slemon et al., 1973) ويستعمل الاختبار تثبيت المتمم في تشخيص مستضدات فايروس الأنفلونزا نوع A و B وذلك باستخدام الأضداد لمستضدات البروتين النووي و بروتين المادة الخلالية Jawetz et) لفايروس الأنفلونزا Matrix Protein al., 2001) ويمكن استعمال فحص تثبيت المتمم في تشخيص أنماط فايروس الأنفلونزا نوع (A) ،وذلك مستضدات الفايروس السطحية باستخدام أضداد (Julkunnen et al., 1985) ونظراً للانتشار الواسعة لمرض أنفلونزا الانسان في قطرنا دفعنا هذا الى التخطيط لبحثنا

المواد وطرائق العمل

النماذج المرضاية والمصاية للبشر شملت نماذج مرضية لمسحات أنفية ، ونماذج دم أخذت من المرضى المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا حصل عليها من المصادر الآتية :- العدد/٢

عينات الدم

عزل وتنمية الفايروسات في أجنة بيض الدجاج النامية استخدمت طريقة ((1979) Grist et al. (1979) في الحقن في كيس الامنيون لاجنة الدجاج النامية لغرض العزل الاولي لفايروس أنفلونزا الإنسان من المسحات الأنفية المعاملة والحقن في كيس الالتوي لاجنة الدجاج النامية لتنمية فايروس أنفلونزا الإنسان المعزولة من السائل الامنيون و لاجل ذلك استخدم بيض جنين الدجاج بعمر (١٠) أيام .

الأشخاص العاملين في حقل تربية الدجاج البياض في

منطقة جرف النداف / محافظة بغداد

طرائق التشخيص Diagnosis Methods ١-أختبار التلازن الدموي: Hemagglutination test

استعمل هذا الاختبار لتعيين وجود الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر المعزول في السائل الامنيون و السائل الالنتوي لجنين بيض الدجاج النامي المحقون بالنماذج المرضية. و لتحديد معيار الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج استعملت طريقة المعايرة الدقيقة، وذلك باستخدام أطباق المعايرة الدقيقة التي تحتوي على ٩٦ حفرة ذات السطوح المقعرة (-U) كما وصفها (Sever, 1962).

۲-اختبار الباط الستلازن السدموي : Hemagglutination inhibition test

استخدمت طريقة المعايرة الدقيقة حسب ما وصفها (Sever , 1962) فقد استخدم هذا الاختبار في تشخيص مستضدات المتلازن الدموي للفايروسات المعزولة من الإنسان ، وذلك باستخدام مصل فائق المناعة لعتر لقاح VAXIGRIP ومصل مضاد مرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول H_3N_8

۳-اختبار تثبیت المتمم Complement fixation

استخدمت طريقة (Sever,1962) للمعايرة الدقيقة المعروفة بالطريقة الباردة وذلك بسبب تفاعل المستضد

نتائج عزل الفايروس في أجنة الدجاج النامي

عـزل فايروس أنقلونزا الإنسان من نموذجين للمسحات الأنفية من بين (٥٠) نموذجاً مرضياً ،أخذت من المرضى المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا واتسمت بارتفاع درجة الحرارة لمدة (٣-٥) أيام وحدوث ألم في المفاصل والظهر وجميع أنحاء الجسم وعطاس وزيادة الإفرازات الأنفية التي تكون في بدايتها مائية، ثم تتحول الى مخاطية فضلاً ، عن حدوث

والأضداد والمتمم بدرجة حرارة ٤ °م قبل إضافة النظام الكاشف وقد استخدم فحص المتمم لتشخيص الفاير وسات المعزولة من الإنسان باستخدام مصل مضادة مرجعية لفايروس الأنفلونزا نوع A ، إنتاج شركة VIRION الألمانية حصل علية من مختبر الفايروسات فرع الأحياء المجهرية / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .وكذلك مصل مضاد مرجعي لفايروس أنفلونزا الخيل H_3N_8 حصل علية على شكل عبوة سائلة ، من مختبر الفايروسات / فرع الأحياء المجهرية / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد. ومصل فائق المناعة لعتر لقاح VAXIGRIP الحاوي على أضداد مستضدات التلازن الدموي لعتر فايروس أنفلونزا الإنسان هي (H₃N₂) و A/sydney/5/97 و A/Beijing/262/95(H_1N_1)₅B/Beijing/184/93 ،حصل عليه من مختبر الفايروسات / فرع الأحياء المجهرية / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد واستخدم اختبار تثبيت المتمم في تشخيص الأضداد للفايروسات المعزولة محلياً من الإنسان في أمصال البشر المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا

٤-اختبار الأنزيم المناعي الممتاز الغير مباشر Indirect Enzyme Linked Immuno sorbent assay

استخدم اختبار الاليزا Elisa في تشخيص أضداد فايروس أنفلونزا الإنسان في أمصال المرضى الذين عزل منهم فايروس أنفلونزا الإنسان وكذلك في أمصال البشر المصابين بأعراض مشابهة لمرضى الأنفلونزا وذلك حسب طريقة فحص الاليزا التي استخدمها (-Al

النتائج

التهاب في الأنف والبلعوم وسعال جاف متقطع قد يستمر مدة أسبوع.

العزلة الفايروسية البشرية الاولى

عزلت من المسحة الأنفية المأخوذة من مريض راجع المركز الصحي في قضاء الشامية/محافظة القادسية ، فقد اظهر السائل الامنيون (المحصود من بيض الدجاج النامي ، وذلك بعد ٧٢ ساعة من حقن السائل المحضر للنموذج المرضى) نتيجة تفاعل سالبة

في اختبار التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج اما السائل الالنتوي للتمرير الثاني للنموذج المرضي في أجنة الدجاج النامي فقد اظهر بعد ٧٢ ساعة من الحقن نتيجة تفاعل إيجابية في اختبار التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج على شكل شبكة دموية وبمعيار مقداره (5Log2) كما هو موضح في الجدول

العزلة الفايروسية البشرية الثانية

رقم (۱) .

عزلت من النموذج المرضي للمسحة الأنفية المأخوذة من طالبة في كلية الطب البيطري/جامعة بغداد . فقد اظهر السائل الامنيون للتمرير الأول ، والسائل الالنتوي للتسمرير الثاني للنموذج المرضي (بعد ٧٢

ساعة من الحقن) نتيجة تفاعل سالبة في فحص التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج اما السائل الالنتوي للتمرير الثالث المحصود من بيض جنين الدجاج النامي بعد ٧٢ ساعة من الحقن ، فقد اظهر نتيجة تفاعل موجبة في اختبار التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج بمعيار مقداره (4Log2) كما هو موضح في جدول رقم (١) .اما بقية النماذج المرضية التي أخذت من المرضى المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا والتي بلغ عددها (٨) نموذجاً مرضياً ، فقد أظهرت نتيجة تفاعل سالبة في مرات في أجنة بيض الدجاج النامية .

العدد/٢

الجدول رقم (١): نتائج عزل فايروس أنفلونزا الإنسان في أجنة بيض الدجاج النامي مع نتائج اختبار التلازن الدموي

اختبار التلازن الدموي معيار /Log ₂ للتلازن الدموي**	تسلسل التمرير *	مصدر النموذج المرضي	العزلة الفايروسية البشرية
•	التمرير الأول	المركز الصحي في قضاء	العزلة الأولى
٥	التمرير الثاني	الشامية/محافظّة الّقادسية	العرب الأوتي
•	التمرير الأول		
•	التمرير الثاني	كلية الطب البيطري/جامعة بغداد	العزلة الثانية
٤	التمرير الثالث		

^{*} التمرير الأول هو الحقن في كيس الامنيون لجنين الدجاج النامي اما التمرير الثاني والثالث فهو الحقن في كيس الالنتوي لجنين الدجاج النامي .

نتائج تشخيص الفايروسات المعزولة من الإنسان باختباراثباط التلازن الدموي

اظهر تفاعل المصل فائق المناعة لعترة لقاح VAXIGRIP الحاوي على اضداد مستضدات التلازن الدموي لفايروس انفلونزا الإنسان نوع (A) نمط (H_1N_1,H_3N_2) واضداد فايروس الأنفلونزا نوع (B) مع العزلتين الفايروسيتين للبشر بمعيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي مقداره (٦٤) ، كما أعطى

تفاعل المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول نمط (H_3N_8) مع العزلة البشرية الأولى والثانية نتيجة تفاعل موجبة بمعيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي بمقدار (١٦) في اختبار اثباط التلازن الدموي. كما اظهر المصل المرجعي السالب لفايروس الأنفلونزا نوع (A) (المستخدم كضابط فحص سالب) نتيجة تفاعل سالبة في فحص اثباط التلازن الدموي كما موضح في جدول رقم(٢).

الجدول رقم (٢) :نتائج تشخيص عزلتي فايروس أنفلونزا الإنسان باختبار اثباط التلازن الدموي

معيار الأضداد المثبطة للتلازن الدموي/٢٥٠٠ مل		الأمصال المرجعية المستخدمة	
العزلة البشرية الثانية	العزلة البشرية الأولى	الأمصال المرجعية المستخدمة	
7 £	٦٤	مصل فائق المناعة لعترة لقاح (VAXIGRIP)*	
١٦	١٦	مصل مضاد مرجعي لفايروس انفلونزا الخيول H ₃ N ₈	
•	•	مصل مرجعي سالب لاضداد فايروس الانفلونزا	

*يحوي المصل على اضداد لمستضدات التلازن الدموي لعترة فايروس الانفلونزا:

A/Beijing/262/95 (H₁N₁) · B/Beijing/184/93 · A/sydney/5/97(H₃N₂)

نتائج تشخيص العزلات الفايروسية باختبار تثبيت المتمم

اظهرت العزلتين الفايروسيتين البشرية (الاولى والثانية) نتيجة تفاعل موجبة مع المصل المضاد المرجعي لفايروس الانفلونزا نوع (A) والمصل فائق المناعة لعتر لقاح (VAXIGRIP) وقد اظهرت (العزلة الفايروسية الاولى) معيار متماثل للمستضدات

الفايروسية المثبتة للمتمم مقداره (75) وذلك عند تفاعلها مع المصل المضاد المرجعي لفايروس الانفلونزا نوع (A) الذي اعطى معيار للاضداد المثبتة للمتمم مقداره (٣٢)، وكذلك مع المصل فائق المناعة لعتر لقاح (VAXIGRIP) والذي اظهر معياراً للاضداد المثبتة للمتمم مقداره (٣٢). كما اظهرت هذه العزلة لفايروس انفلونزا الانسان نتيجة تفاعل موجبة مع المصل المضاد

^{**} تركيز كريات الدم الحمر للدجاج المستخدم في الفحص ٥٠٠%

المرجعي لفايروس انفلونزا الخيول (H₃N₈) وبمعيار المستضدات الفايروسية المثبتة للمتمم مقداره (٣٦) ، وكان معيار الاضداد المثبتة للمتمم في ألمصل مقداره (١٦). وقد أعطت (العزلة الفايروسية الثانية) نتيجة تفاعل إيجابية مع المصل المضاد المرجعي لفايروس الأنفلونزا نوع (A) والمصل فائق المناعة لعترة لقاح الأنفلونزا نوع (A) والمصل فائق المناعة لعترة لقاح للمتمم مقداره (٧٨٨) ، اما عند تفاعل هذه العزلة مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول

لمستضدات الفايروس المثبتة للمتمم مقداره (٦٤). واظهرت ضوابط الفحص السالبة لتخافيف السائل الالنتوي الحاوي على الفايروس المعزول وضابط الفحص السالب لتخافيف الامصال المرجعية المستخدمة نتيجة تفاعل سالبة وذلك بتحلل كريات الدم الحمر للاغنام. كما اظهرت ضوابط فحص تثبيت المتمم السالبة لمحلول مخفف دارئ الفيرونال والمتمم والنظام الكاشف نتيجة تفاعل سالبة بترسيب كريات الدم الحمر للأغنام.

العدد/٢

الجدول رقم (٣) : نتائج تشخيص عزلتي فايروس أنفلونزا الإنسان باختبار تثبيت المتمم

معيار المستضدات المثبتة لمتمم		
العزلة البشرية الثانية	العزلة البشرية الاولى	الامصال المرجعية المستخدمة
لفايروس أنفلونزا الإنسان	لفايروس أنفلونزا الانسان	
١٢٨	٦٤	مصل مضاد مرجعي لفايروس الأنفلونزا نوع (A)
١٢٨	٦٤	المصل فائق المناعة لعترة لقاح (VAXIGRIP)*
٦ ،	٣٢	مصل مضاد مرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول
12	1 1	(H_3N_8)

*مصل حاوي على أضداد مستضدات نتوءات التلازن الدموي لعتر لقاح فايروس الأنفلونزا الإنسان(VAXIGRIP) و هي A/sydney /5/97 (H₃N₂) , A/Beijing/262/95 (H₁N₁) ,B/Beijing/184/93

تنمية عزلات فايروس أنفلونزا الإنسان

أظهرت نتائج تنمية عزلات فايروس انفلونزا الانسان في أجنة بيض الدجاج النامي بواسطة الحقن في كيس الالنتوي ارتفاع تدريجي في المعيار الحجمي للفايروس الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج وذلك عند تكرار تمرير الفايروس في أجنة الدجاج النامية وقد أظهرت العزلة الاولى لفايروس انفلونزا الانسان ارتفاع في معيار التلازن الدموي للفايروس مع كريات الدم

الحمر حيث وصل الى ($8Log_7$) بعد التمرير السادس ، اما العزلة الثانية لفايروس انفلونزا الانسان فقد أظهرت ارتفاع في معيار التلازن الدموي من ($4Log_2$)في التمرير الثالث الى ($10Log_2$) بعد التمرير السادس للفايروس في أجنة الدجاج النامية وكما موضح في الجدول رقم (2).

الجدول رقم (٤) :نتائج تنمية عزلات فايروس أنفلونزا الإنسان والطيور في أجنة الدجاج النامية

Log ₂ للتلازن الدموي*	تسلسل التمرير في كيس	
العزلة الثانية لفايروس انفلونزا الانسان	العزلة الاول لفايروس انفلونزا الانسان	تستسل التمرير في كيس الالنتوي
ź	٦	التمرير الثالث
٥	٦	التمرير الرابع
٨	٧	التمرير الخامس
١.	٨	التمرير السادس

*تركيز كريات الدم الحمر للدجاج المستخدمة في الفحص: ٥.٠%

نتائج تشخيص اضداد فايروس أنفلونزا الإنسان المعزول محلياً في أمصال البشر تشخيص الأضداد في أمصال المرض الذين عزل منهم فايروس أنفلونزا الإنسان

تم تشخيص الأضداد بالاختبارات الآتية:

١-اختبار اثباط التلازن الدموي

اظهر تفاعل مصل السحبة الأولى للدم من المريض الذي عزل منه فايروس أنفلونزا الإنسان

(العزلة الاولى) (خلال الفترة الحادة للمرض) مع فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الاولى والثانية) في فحص اثباط التلازن الدموي نتيجة موجبة بمعيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي مقداره (١٦). علماً انه لم نتمكن من الحصول على سحبة ثانية للدم من المريض نفسه بعد (١٠٠٤) يوم من ظهور الأعراض المرضية). واعتمد في قراءة النتائج الموجبة للفحص على اساس ان المعيار الموجب للاضداد

المثبطة للتلازن الدموي ≥ 8 (Lang et al.,1981). المأبطة للتلازن الدموي ≥ 8 (المريض الذي عزل منه فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) فقد اظهر نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الاولى والثانية) وبمعيار متماثل للاضداد مقداره ((77)). واظهر مصل السحبة الثانية للدم من نفس المريض (بعدة ايوم من ظهور الأعراض المرضية) نتيجة تفاعل موجبة مع عزلتي فايروس الأنفلونزا الإنسان (الأولى والثانية) بمعيار للأضداد المثبطة للتلازن الدموي مقداره ((70)).

٢-اختبار تثبيت المتمم

أظهرت نتائج فحص تثبيت المتمم تفاعل مصل السحبة الأولى للدم من المريض الذي عزل منه فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الأولى) مع عزلتي فايروس أنفلونزا الإنسان حيث أعطى هذا المصل معيار متماثل للاضداد المثبتة للمتمم مقداره (٣٢) . واعتمد في قراءة النتائج الموجبة للفحص على اساس ان المعيار الموجب Grist et al.,) $\xi \leq 1$ للاضداد المثبتة للمتمع 1979).واظهر مصل السحبة الاولى للدم من المريض الذي عَزل منه فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الثانية) نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الاولى)بمعيار قدره (٣٢) وعند تفاعل المصل نفسه مع فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الثانية) اظهر نتيجة تفاعل إيجابية ايضاً بمعيار قدره (٦٤) ، اما مصل السحبة الثانية للدم من نفس المريض بعد ١٤ يوم من ظهور الاعراض المرضية اظهر نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الاولى والثانية) بمعيار قدره (١٢٨٠) ، وقد اظهر ضابط الفحص السالب لاقل تخفيف للأمصال نتيجة تفاعل سالبة بتحليل كريات الدم الحمر للأغنام. اما المصل السالب لأضداد فايروس أنفلونزا نوع (A) فقد اظهر نتيجة تفاعل سالبة مع عزلتي فايروس أنفلونزا الإنسان كما اظهر ضوابط الفحص السالبة للمتمم ومحلول دارئ الفيرونال والنظام الكاشف نتيجة تفاعل سالبة بترسيب كريات الدم الحمر للأغنام.

٣-اختبار الاليزا Elisa

أظهرت نتائج فحص الاليزا تفاعل مصل سحبة الدم الاولى من المريض الذي عزله منه فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الاولى) مع فايروس انفلونزا الانسان العزلة الاولى في طبق الاليزا المكسوة بالفايروس، وكانت قراءة المصل في الفحص (٢٠٤٢). اما تفاعل المصل نفسة في طبق الاليزا المكسوة بفايروس انفلونزا الانسان (العزلة الثانية) اظهر قراءة في الفحص (٢٠٢١). وأظهر تفاعل مصل انفلونزا الانسان (العزلة الثانية) مع فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) مع فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) مع فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الأولى) في طبق الاليزا ، قراءة مقدار ها (٢٠٤٤) وأظهر تفاعل المصل نفسة في طبق الاليزا المكسوة بفايروس انفلونزا الانسان (العزلة الثانية قراءة في الفحص مقدار ها ٢٠٣٤). اما مصل

سحبة الدم الثانية من المريض نفسة بعد ١٤ يوماً من ظهور العلامات المرضية عند تفاعله مع فايروس انفلونزا الانسان (العزلة الاولى) في طبق الاليزا كان معدل قراءاته في الفحص بمقدار (٢.٧٢٣) اما معدل قراءات هذا المصل في طبق الاليزا المكسوة بفايروس انفلونزا الانسان العزلة الثانية فكانت بمقدار (٢.٦٣٣) وقد استخدم معدلات قراءات هذا المصل في حساب قيم الكثافة الضوئية للعينات المصلية البشرية في الفحص ،اما المصل السالب لشخص غير مصاب (والذي اظهر نتيجة تفاعل سالبة في فحص تثبيت المتمم مع فايروس انفلونزا الانسان العزلة الاولى والثانية) فقد اعطى نتيجة تفاعل سالبة في طبق الاليزا المكسوة بفايروس انفلونزا الانسان (العزلة الاولى) ، وكان معدل قراءات هذا المصل في الفحص بمقدار (٠٨٢) اما معدل قراءات هذا المصل في طبق الاليزا المكسوة بفايروس انفلونزا الانسان (العزلة الثانية) فقد اعطى نتيجة تفاعل سالبة وكان بمقدار (٠٠٠٢) وقد استخدمت معدلات قراءات هذا المصل في فحص حساب قيم الكثافة الضوئية للعينات المصلية التي تم تشخيص الاضداد فيها باستخدام فحص الاليزا. وقد اظهرت ضوابط الفحص السالبة (المتمثلة بحفر طبق الاليزا المكسوة بالفايروس والغير معاملة بالمصل) نتيجة تفاعل سالبة في فحص الاليزا .

تشخيص الاضداد في امصال البشر المصابين باعراض مشابهة لمرض الانفلونزا

تم تشخيص الاضداد بالاختبارات التالية:

١-اختبار تثبيت المتمم

تم فحص (٤٨) نموذجاً مصلياً لمرضى مصابين باعراض مشابهة لمرض الانفلونزا (اخذت خلال المدة المحادة للمرض) في اختبار تثبيت المتمم. فقد اعطى (٢٨) نموذج مصلي نتيجة تفاعل موجبة مع عزلتي فايروس انفلونزا الانسان وبنسبة مقدارها (٤٠٥%) واعتمد وكان المدى لمعيار هذه الامصال (٨-١٤) واعتمد في قراءة النتائج الموجبة للفحص على اساس ان المعيار الموجب للاضداد المثبتة للمتمم ≥ 3 (Grist).

۲- اختبار الاليزا Elisa

تم اجراء فحص الاليزا للتحري عن وجود الاضداد لفايروس انفلونزا الانسان H_3N_2 (العزلة الاولى والثانية) في امصال البشر المصابين باعراض مشابهة لمرض الانفلونزا و البالغ عددها (٤٨) نموذجاً مصلياً. فقد اعطى (٤٦) نموذج مصلي نتيجة تفاعل موجبة مع عزلتي فايروس انفلونزا الانسان الاولى والثانية في عربي فايروس انفلونزا الانسان الاولى والثانية في فحص الاليزا بنسبة (٨٠٩ %) من عدد المصول المفحوصة كما موضح في الجدول رقم (٥) واعتمد في قراءة نتائج فحص الاليزا على اساس ان المصل قراءة نتائج فحص الاليزا على اساس ان المصل الموجب هو الذي يعطي قيمة للكثافة الضوئية ≥ 1.0 (Masihi and Lang ,1980) وقد تم حساب (قيمة الكثافة الضوئية) حسب المعادلة الاتية:

قراءة المصل في الفحص - معدل قراءات المصل السالب

قيمة الكثافة الضوئية =

العدد/٢ ٥٠

معدل قراءات المصل الموجب - معدل قراءات المصل السالب

ولقد وجد هنالك فرق احصائي مهم على مستوى (P<0.01) في نسبة عدد الامصال الموجبة التي ظهر في اختبار الاليزا ونتائج اختبار تثبيت المتمم.

الجدول رقم (٥) :نتائج تشخيص الاضداد لفايروس انفلونزا الانسان في امصال البشر باختبار تثبيت المتمم و اختبار الاليزا

زا Elisa	اختبار الالي	اختبار تثبيت المتمم			
النسبة المئوية للامصال الموجبة(%)	عدد الامصال الموجبة**	النسبة المئوية للامصال الموجبة (%)	عدد الامصال الموجبة*	العدد الكلي للامصال	الفايروس المستخدم
۸.۵۹	٤٦	٥٦.٤	۲۸	٤٨	فايروس انفونزا الانسان (العزلة الاولى)
۸.۵۹	٤٦	٥٦.٤	47	٤٨	فايروس انفونزا الانسان (العزلة الثانية)

^{*} المعيار الموجب للأضداد المثبتة للمتمم في المصل ٤ ٤

يوجد فرق إحصائي مهم (P<0.01) في نسبة عدد الأمصال الموجبة بين نتائج اختبار الاليزا و اختبار تثبيت المتمم.

المناقشة

تم التخطيط لهذه الدراسة وذلك لأهمية مرض الأنفلونز الذي يعد من الأمراض المشتركة المهمة التي تصيب الإنسان والحيوان ، والتي يمكن ان تسبب أوبئة مرضية شديدة الخطورة في الإنسان (٢٠٠٠, Oxfor) وقد تم جمع النماذج المرضية من البشر المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا ، اذ تم اخذ المسحات الأنفية من المرضى خلال الطور الحاد للمرض وهذا يتفق مع ما أستخدمه (باقر، ١٩٩٩ ;Baron et al.,1995) وأتبعت طريقة الحقن في كيس الامنيون لعزل فايروس أنفلونزا الإنسان من النماذج المرضية وهذا ما أشار اليه ;Grist et al., 1979 (1990, Potter وقد تم تشخيص الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج (باختبار التلازن الدموي) في السائل الالنتوي للتمرير الثاني للنموذج المرضي الذي عـزل منـه فـايروس أنفلـونزا الإنسـان (العزلـة الأولى) والسائل الالنتوي للتمرير الثالث لفايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) ولم نتمكن من تشخيص الفايروس الملزن في السائل الامنيون للتمريـر الأول او السائل الالنتوي للتمرير الثاني وذلك لعدم وصول الفايروس المعزول الى المعيار المطلوب لتلزين كريات الدم الحمر للدجاج ومن ثم إظهار عملية التلازن الدموي حسب ما أشار إليه -Mukhlis,1978;AL) (Dabbagh,1989,Ray,1994 وقد استخدم في دراستنا اختبار اثباط التلازن الدموي وذلك لتشخيص المستضدات الخاصة بنتوءات التلازن الدموي للفايروسات المعزولة، وذلك لانه يمتلك خصوصية عالية في تحديد النمط المصلى لفايروس الأنفلونزا، و هذا ما أكده(Potter,1990;Swayne et al, 1998) وقد أظهرت نتائج تشخيص الفايروسات المعزولة من الإنسان (باختبار اثباط التلازن الدموي) تفاعل العزلتان الفايروسيتان للبشر (الأولى والثّانية) مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول

الحاوي على اضداد نتوءات التلازن الدموي (H_3N_8) نمط (H₃) . كما أظهرت هاتان العزلتان نتيجة تفاعل موجبة مع مصل فائق المناعة لعتر لقاح (VAXIGRIP) الحاوية على أضداد لمستضدات التلازن الدموي نمط (H₃) لعتر فايروس أنفلونزا الإنسان (H_3N_2) كما موضح في الجدول رقم (3) و هذا يشير الى أن العزلتين الفايروسيتين تمتلكان نتوءات للتلازن الدموي نمط (H_3) . وقد أعطى تفاعل العزلتين الفايروسيتان مع الأمصال المرجعية المستخدمة ، معيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي وذلك لاستخدام العدد نفسه من وحدات التلازن الدموي (وهي ثماني وحدات تلازنية) للفايروس ، مما يشير الى انه تم اثباط تفاعل التلازن الدموي لكلتا العزلتين بالأضداد نفسها التي تمتلك معيار معين في المصل المستخدم. وهذا يتفق مع ما أشارت اليه (باقر،١٩٩٩) وقد استخدمنا اختبار تثبيت المتمم لتشخيص نوع المستضدات الداخلية للفايروس المعزول من البشر وذلك باستخدام المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا نوع (A) الحاوي على أضداد البروتين النووي لفايروس الأنفلونزا نوع (A) وهذا ما أشار اليه (Lief and Henle ,1959) . وقد أظهرت نتائج اختبار تثبيت المتمم تفاعل الفايروسات المعزولة من الإنسان (العزلة الأولى والثانية) مع المصل المضاد المرجعي لف ايروس الأنفلونزا نوع (A) ويشير هذا الى ان الفايروسات العزولة من الإنسان هي فايروسات الأنفلونزا نوع (A). كما أظهرت العزلتين الفايروسيتين للبشر نتيجة تفاعل موجبة مع المصل فائق المناعة (VAXIGRIP) وكذلك مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الخيول في اختبار تثبيت المتمم ويشير هذا الى تفاعل الأضداد لنتوءات التلازن الدموي (H₃) الموجودة في الأمصال المستخدمة مع مستضدات التلازن الدموي (H_3) التي يمتلكها الفايروس المعزول ،

^{**} المصل الموجب هو الذي يعطى قيمة للكثافة الضوئية > ١٠٠

المرحلة الحادة للمرض) للمريض الذي عزل منه فايروس أنفلونزا الإنسان (H_3N_2) (العزلة الأولى) وكذلك في مصل المريض الذي عزل منه فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) ، وذلك باستخدام فحص اثباط التلازن الدموى وفحص تثبيت المتمم وفحص الاليزا وقد لوحظ ارتفاع معيار الأضداد في مصل سحبة ألدم الثانية (خلال مدة النقاهة) للمريض الثاني الذي عزل منة فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الثانية) بمقدار اكثر من أربعة أمثال معيار الأضداد في مصل سحبة الدم الأولى من المريض نفسه في فحص اثباط التلازن الدموى وفحص تثبيت المتمم وهذا يؤكد ويدعم نتيجته التعرض والإصابة المرضية بفايروس الأنفلونــزا ، ويتفــق هــذا مـع مــا أشـــار اليـــه (بــاقر وقد استخدمنا (AL-Hamdani, 1989; ۱۹۹۹، فحص تثبيت المتمم وفحص الاليزا للتحري عن وجود أضداد فايروس أنفلونزا الإنسان (العزلة الأولى والثانية) في أمصال البشر المصابين بأعراض مشابهة لمرض الأنفلونزا باعتبارها اكثر الطرائق شيوعاً في تشخيص أضداد فايروس أنفلونزا الإنسان في أمصال البشر وهذا ما أكده (potter, 1990) . وبلغت نسبة الأمصال الموجبة التي أظهرها فحص الاليزا (٨٥٩٠%) وهي أعلى من نسبة الأمصال الموجبة التي أظهر ها فحص تثبيت المتمم والتي بلغت (٢٠٤٥) وبينت نتائج التحليل الإحصائي الى وجود فرق إحصائي مهم في نسبة عدد الأمصال الموجبة التي أظهرها فحص الاليزا وفحص تثبيت المتمم ويعود ذلك الى حساسية كل اختبار ، حيث يعد فحص الاليزا اكثر حساسية من فحص تثبيت المتمم في تشخيص المعيار الواطئ للأضداد في الأمصال وهذا ما أكده (Madore et al., 1983) .

7..0

كما موضح في جدول رقم ($^{\circ}$). وهذا يؤكد النتيجة التي تم الحصول عليها باختبار اثباط التلازن الدموي في تشخيص نمط نتوءات التلازن الدموي الموجود على سطح الفايروس المعزول من البشر . وهذا يتفق مع النتائج التي توصلت أليها (باقر، ١٩٩٩) في أن العترة السائدة في قطرنا لفايروس أنفلونزا الإنسان هي نوع ($^{\circ}$) نمط ($^{\circ}$) . وهذا يؤكد النتيجة التي تم الحصول عليها في اختبار اثباط التلازن الدموي وتثبيت المتمم استطعنا اختباري اثباط التلازن الدموي وتثبيت المتمم استطعنا المعزولة محلياً من الإنسان وكما يأتي :

A- الفايروس المعزول من الإنسان (العزل الأول) :
هو فايروس أنفلونزا الإنسان نوع (A) نمط
(H₃) اما فيما يخص تحديد نمط نتوءات
النيورامنديز فتعذر علينا تشخيصها وذلك
لعدم توفر مصل مضاد مرجعي لنتوءات
النيورامنديز وقد سميت هذه العزلة كما
يأتي:- (A/ Iraq /1/2001 (H3N?).

- الفايروس المعزول من الإنسان (العرلة الثانية) :- هو فايروس أنفلونزا الإنسان نوع(A) نمط A/Iraq -: وسميت العرلة كما يأتي :- (H_3)

لقد لوحظ خلال تنمية فاير وسات أنفلونزا الإنسان المعزولة محلياً في الكيس الالنتوي لاجنة بيض الدجاج النامي حدوث ارتفاع في معيار الـتلازن الـدموي للفايروس باستخدام كريات الدم الحمر للدجاج وذلك عند تكرار تمرير الفايروس في أجنة بيض الدجاج النامي كما موضح في جدول رقم (٤) و هذا يتفق مع النتائج الني توصلت أليها (باقر ، ١٩٩٩) فقد شخصت الأضداد لفايروس أنفلونزا الإنسان H_3N_2 (العزلة الأولى والثانية) في مصل سحبة الدم الأولى (خلال

المصادر

- 4. Al-Khayatt, R.M.H.(1985).Incidence of some infectious diseases in Iraq:Estimated by serological survey. Thesis, University of Sheffield, Medical School, England.
- 5. Baron, J.E.; Peterson, L.; Finegold, M.S. (1995). Laboratory methods in Basic virology. In: Diagnostic Microbiology. Bailed and Scottes (ed.), 9th ed., Pp.:634-652.
- 6. Ellis, J.S.; Fleming, D.M. and Zombon, M.C.(1997).Multiplex Reverse transcription PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. J. Clin. Microbiol., 35(8): 2076-2082.

- باقر ، سرى محمد حسن (١٩٩٩). عزل وتشخيص فايروس الانفلونزا من الانسان و الخيول و دراسة العلاقة المناعية بينهما- رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.
- Al-Dabbagh, A.S.(1989). A study of influenza virus isolated from an outbreak in Baghdad during 1987-1988. Thesis , College of Medicine, University of Al-Mustansiriya, Iraq.
- 3. Al-Hamdani, A.H. (1989). Antibodies to influenza viruses in Iraqi population with different blood groups. Thesis, College of Medicine, University of Al-Mustansiriya, Iraq.

15. Masihi, K.N. and Longe, W. (1980). Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of influenza type-specific antibodies. J. Immunol. Method. 36:173-179.

العدد/٢

- 16. Mukhlis, F.A. (1978). Studies on recombinants of influenza virus type (A): with reference to vaccine preparation. Thesis College of Medicine, University of Baghdad, Iraq.
- 17. Oxford, J.S. (2000). Influenza A pandemic of the 20th century with special references to 1918: Virology, Pathology and Epidemiology . Rev. Med. Virol., 10:119-133.
- 18. Potter, C.W. (1990). Influenza. In:
 Principles and practice of clinical
 virology. Zuckerman, A.J.;
 Banatvala, J.E. and Pattisom, J.R.
 (eds.).
- 19. Ray,C.G.(1994). Influenza, respiratory syncytial virus adenovirus and other respiratory viruses. In: Medical Microbiology :an introduction of infectious diseases , 3rd ed. Sherris and Rayan, K.J. (eds.). printed in Great Britain. Pp.:45-465.
- 20. Sever, J.L. (1962). Application of microtechnique to viral serological investigation. J. Immunol., 88:320-329.
- 21. Slemons, D.R.; Cooper, S.R.; Orsborn, S.J. (1973). Isolation of type A influenza viruses from imported exotic birds, Avian Disease., 17(4):746-751.
- 22. Swayne, D.E.; Senne, D.A. and Beard, C.W. (1998). Avian Influenza. In: Isolation and identification of avian pathogen. Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; Jackwood, M.W.; Pearson, J.E. and Reed, W.M (eds)4th ed American Association of Avian pathologiists us A.PP:150-155.
- 23. White, D.O. and Fenner, F.J. (1986).
 Orthomyxoviruses. In: Medical
 Virology. 3rd ed. Academic Press
 Inc. London, Ltd.Pp.:509-519.

- 7. Glezen, W.P. and Cherry, D.J.(1992).Influenza viruses.In: **Pediatric** infectious disease. Feigin, R.O. and Cherry, D.J. (eds.).WB Saunders Philadelphia .Pp.:1688-1704. (Cited by Atmar et al., 1996).
- 8. Grist, N.R.;Ross, C.A. and Bell, E.J.(1979).Diagnostic method in clinical virology. 7th ed. Kamp Hall Bindery. Oxford.
- 9. Harmon, M.H. and Kendal, A.P. (1989).
 Influenza viruses.In: Diagnostic procedures for viral, ricketsial and chlamydial infection, Schmidt, N.J. and Emmons, R.W. (eds.),6th ed. American Publications Health Association, Washington D.C.
- 10. Jawetz, E.M.D.; Melnick, J.L. and Adelberg's, E.A.(2001). Orthomyxo viruses (Influenza viruses). In: Medical Microbilogy. 20th ed, Lange Medical Book, McGraw-Hill, Pp.: 459-469.
- 11. Julkunnen, I.; Pyhala, R.; Hovi, T. (1985). Enzyme immunosorbent assay, complement fixation test and Haemagglutination inhibition test in the diagnosis of influenza A and B viruses infection in purified Haemagglutination in subtype specific diagnosis. J. Virol. Methods. Jan., 10(1):75-84.
- 12. Lang, G; Gagnon, A. and Geraci, J.R. (1981). Isolation of an influenza A virus from seals. Arch. Virol., 68:189-195.
- 13. Lief, F.S. and Henle, W. (1959).

 Methods and procedures for use of complement fixation technique in type and strain specific diagnosis of influenza. WHO Bull., 20:411.
- 14. Madore, H.P.; Reichman, R.C. and Dolin, P. (1983). Serum Antibody response in naturally occurring influenza a virus infection determined by enzyme-linked immunosorbent assay, Haema-gglutination inhibition and complement fixation. J. Clin. Microbiol., 18(6)

Study on infection with influenza virus in human

H.A.Al-Nasrawei Coll . of Vet. Med, Univ. of AL- Qadisiya

العدد/٢

A.S.Al-Bana R.M.Al-Khayatt
Coll. of Vet. Med./ Unive of Baghdad

Abstract

This study include isolation of two isolates of human influenza virus fromtwo clinical samples collected from two patients suffering from influenza like disease beside that. Embryonated chicken egg 10 days old were used for virus isolation and propagation with amniotic sac inoculation was used for primary passage and allantoic sac route was used for successive passages for isolation of human influenza virus. The virus was detected in the harvested allantoic fluid after 72 hours of inoculation by haemagglutination of chicken red blood cells as a primary diagnostic method, but viral type and subtype was determined serologically in haemagglutination inhibition (HI) and Complement fixation (CF) tests.Both human viral isolates were diagnosed as type (A) and subtype (H₃) by using reference antiserum to type (A) virus and reference antisera contain antibodies to influenza virus subtype (H₃). Human influenza viral isolates were propagated in embryonated chicken eggs as highest titer by haemagglutination for both viruses were 10 Log2 after (6) serial passages. Antibodies to both human viral isolates were detected in patients sera whom these viruses were isolated by using HI, CF and locally prepared ELISA kit. Beside that antibodies to these viruses (human influenza virus) were detected in 48 serum samples belong to patients having influenza like disease by using (CF) test with positive sera 56.4 %, also by using ELISA which were 95.8 %.