البحث العلمي الهادف دعامة أساسية للنهوض بالعراق

التقييم المناعي لبعض الأشخاص المصابين بفيروس كورونا باستخدام بعض المؤشرات المناعية

امير ناجي عبيد ، قناة محمود عطية

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

فيروس كورونا من الفيروسات التاجية التي تصيب الجهاز التنفسي ويشكل خطورة عالية على حياة المصاب احيانا قد يؤدي الى الوفاة وخاصة عند الاشخاص كبار السن والمضعفين مناعيا، ولأهمية الدراسات في هذا الجانب على المستوى المحلي وخاصة من الناحية المناعية والالتهابية ،لذا تم اقتراح هذه الدراسة التي اجريت من شهر اذار ولغاية شهر اب لعام 2022 في محافظة بغداد– مدينة الطب، على مجموع 150شخص انضموا لهذه الدراسة منهم 120 شخص مصاب بفيروس كورونا و 30 شخص كانوا مجموعة سيطرة (اصحاء) controls للمقارنة مع الاشخاص المصابين بفيروس كورونا حيث كانت نسبة الرجال 65% ونسبة النساء 35%. و كانت اعمارهم متقاربة من 16– 75 سنة تقريبا .وتم استخدام استمارة استبيان لكل شخص انضم لهذه الدراسة. تم جمع العينات samples بإشراف اطباء مختصين وفق موافقة وزارة الصحة العراقية. حيث كانت العينات التي تم اخذها هي عينات دم blood وقشع sputum من الاشخاص المصابين المنضمين لهذه الدراسة ، لا جراء فحوصات الدم Complete Blood Count (CBC) والمتغيرات المناعية والمؤشرات الالتهابية وهي على التوالي خلايا الدم البيض White Blood Cells (WBC)، كريات الدم الحمراء Red Blood Corpuscles (RBC) وحجم كريات الدم المضغوطة Packed Cell Volume (PCV) ونسبة الهيموغلوبين Hemoglobin (Hb)، الصفيحات الدموية (platelets (PLT . وانترليوكين – 1 بيتا Interleukin 1-beta (IL-1B)، انتر ليوكين 17 Interlukin-17 ، عامل النخر الورمي الفا Tumer Necrosis Factor –alpha(TNF)، بالإضافة الى C-Reactive Protein(CRP)، وكذلك Erythrocyte sedimentation rate(ESR) كمؤشرات التهابية عامة . اجريت فحوصات الدم على جهاز CBC-analyzer والمؤشرات المناعية اجريت على جهاز ELISA ، في النهاية اخلصت هذه الدراسة الى ارتفاع واضح في معدل كريات الدم البيضWBC نتيجة الاصابات الثانوية البكتيرية وارتفاع واضح في معدلات كل من IL-1B ، IL-17 ، TNF-a . بالإضافة الى ارتفاع كل من CRP ، ESR كمؤشرات التهابية عامة وانخفاض واضح في معدل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes، بالإضافة الى ارتفاع في معدلات RBCs وPLTs خاصة في المراحل المتأخرة من الاصابة الفيروسية، بالإضافة الى وجود علاقات احصائية طردية وعكسية بين هذه المتغيرات بالاعتماد على قيمة P-value حسب البرنامج الاحصائي Statistical Package for Social Sciences –SPSS المستخدم في هذه الدراسة.

المقدمة

ان فيروس كورونا هو من الفيروسات الكبيرة والمغلفة الحاوية على مادة وراثية من نوع RNA وهذا الفيروس المستجد الذي سمي COVID – 19 ، يعد من المسببات الرئيسية لنزلات البرد Common Cold ، واصابات الجهاز التنفسي الاسفل Lower Respiratory Tract Infections، بالإضافة الى Serve Acute & Respiratory Syndrome Middle East Respiratory Syndrome، من الجدير بالذكر ان هذا الفيروس ينتقل ايضا من الحيوان الى الانسان حيث يصيب الحيوانات وخاصة الجمال والخفافيش، ويسبب اضرارا اقتصادية وخاصة في الحيوانات الداجنة . هذا الفيروس يصيب كلا الجنسين وجميع الاعمار حيث يسبب امراض معوية Gastroenteritis وخاصة عند الاطفال بأعراض مشابهة لفيروس Rotavirus حسب ما ذكرته منظمة الصحة العالمية (WHO.,2020)، هذا الفيروس يصعب التعامل معه من الناحية الطبية والبحثية حيث يصعب زراعته على المزارع الخلوية (WHO.,2020). عادة هذا الفيروس يسلك سلوك بعض الفيروسات في طريقة الاصابة والاعراض المرضية حيث يكون مشابه للفيروسات التي تسبب نزلات البرد من حيث الاعراض والامراضية كما هو الحال في فيروس الانفلونزا، وكذلك يكون مشابه في طريقة الاصابة والخلايا الهدف Target Cells لفيروس الايدز HIV ، حيث يصيب الخلايا اللمفاوية وخاصة التائية منها T-Cells مما يؤدي الى ضعف واضح

في مناعة الشخص المصاب وكذلك يكون مشابها لأعراض Rota virus حيث يسبب الاسهال عند الاشخاص المصابين (Huz *et al* ., 2020). هذا الفيروس من الفيروسات التي لها القدرة على التحور واكتساب الجينات من فيروسات اخرى ويصيب الانسان والحيوان وله القدرة على مقاومة الظروف البيئية الصعبة، وعادة يصيب الاشخاص كبار السن والاشخاص مضعفي المناعة Immunocomprised ، والمصابين بأمراض مزمنة Chronic Disease (Wuc *et al*.,2020)، وقد اشار (Lu *et al* .,2021) & (AL-Ramli *et al*., 2009) الى ان نقص الخلايا المناعية وخاصة CD4,CD8 يعد من العلامات المميزة التي تظهر نتيجة لتطور المرض اضافة الى وجود مستويات عالية من السايتوكينات الخلوية المسببة للالتهابات مثل IL1 , IL18 والانترفيرونات. وفق الدراسات الحديثة فان شدة المرض تتوقف على مجموعة من العوامل اهمها عدد الخلايا اللمفاوية وعاصفة السايتوكينات المرتبطة بها(Stoy,2021) ، بالإضافة الى العوامل المرتبطة بالمناعة الطبيعية والمكتسبة Natural & Aquired Immunity . ومن الجدير بالذكران عملية الالتهاب تحصل نتيجة استجابة مناعية فطرية او وقائية لإزالة المسببات المرضية ،اما بالنسبة للأشخاص الذين يعانون من الضعف المناعي تظهر لديهم اعراض المرض وقد لا تظهر(Bonnelykke *et al* ., 2015) و(Ghazavi *et al* ., 2021). ويعتمد الالتهاب على ضراوة وشدة إمراضيه الكائن المجهري، والكفاءة المناعية للمضيف وتحدد من حلال علامات سريرية مثل ارتفاع درجة حرارة الجسم كاستجابة التهابية ، الالم pain ، القيح pus ، الاستسقاء odema ، الخ (Bray *et al* .,2016). اكثر طرق انتشار العدوى الفيروسية او البكتيرية هو التماس المباشر والتلوث وقلة الوعي الصحي المرتبط بالنظافة الشخصية وقلت التعقيم. في الآونة الاخيرة اصبحت اغلب الانواع البكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية ، نتيجة لاكتسابها السريع لبلازميدات مقاومة من سلالات اخرى مقاومة للمضادات الحيوية (Brenciani *et al*.,2007). وهناك العديد من العوامل لها دور رئيسي في احداث الاصابة كالعمر والجنس والعرق والتغيرات الفصلية والعوامل الفسلجية، وكذلك المستوى الاقتصادي والاجتماعي. في بعض الحالات المرضية المرافقة لالتهاب ذات الرئة ،على الرغم من تدفق السائل القيحي وخصوصاً في الحالات المزمنة فان الفحوصات الزرعية قد لا تعطي نتيجة ايجابية على وجود مسبب مرضي معين، لذلك تطورت بعض التقنيات للكشف عن المسبب المرضي وذلك باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية والتي تستخدم بشكل واسع وكبير في تشخيص المسببات المرضية المختلفة كاستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) أوضحت معظم الدراسات ان الاشخاص المصابين بالحساسية يكونوا اكثر عرضة للإصابة بالتهاب ذات الرئة من الاشخاص غير المصابين بالحساسية (Baker *et al*.,2016). أما أمراض المناعة الذاتية فقد وجد ان الاشخاص المصابين بها تكون قابليتهم للإصابة بالتهاب ذات الرئة عالية ،كما في الدراسة التي اجريت حول مرض التهاب البلعوم pharyngitis والتهاب الاذن الوسطى otitis media (Barnes, 2018). واكد البروفيسور ويلسون بان الاستجابة المناعية لدى الاشخاص الاصحاء حال وصول فيروس كورونا الى الشعب الهوائية يكون من خلال الاستجابة لتحطيم الفيروس والقضاء عليه، الا ان هناك اشخاص يعانون من امراض قلبية والمصابين بالسكري والربو asthma، بالإضافة الى كبار السن قد لا يستطيعون مقاومة الالتهابات الرئوية وقتل الفيروس مما يأزم الحالة وتزداد المشاكل بشكل كبير وخطير .استنادا الى ذلك باتت احتمالية الالتهاب الرئوي المرافق لفيروس كورونا يزداد مع تقدم العمر بغض النظر عن مدى لياقة الشخص، اذ ان الجهاز المناعي يضعف مع التقدم بالعمر مما تكون عملية تكوين الاضداد النوعية لمقاومة المسببات المرضية وانواع العدوى المختلفة امرا صعبا، وقد يتساءل البعض عن ما هو الفرق بين الالتهاب الرئوي الناتج عن كورونا فيروس من الالتهاب الرئوي الاعتيادي الناتج عن الاصابة البكتيرية في هذا السياق اكدت جنكيز رئيسة مؤسسة الرئة الاسترالية بان ذات الرئة المرافق لفيروس كورونا يختلف عن الالتهاب الرئوي الاعتيادي الشائع والمعروف لدى الكثيرين اذ ان معظم هذه الالتهابات الرئوية يمكن معالجتها بالمضادات الحيوية وتحسن حالة المريض، اما ذات الرئة المرافق للإصابة الفيروسية يؤدي الى التهاب الحويصلات والشعب الهوائية وافراز المادة الالتهابية في الرئتين ،بالتالي عدم حصول الرئتين على الاوكسجين الكافي لإيصاله لمجرى الدم، وزيادة نسبة ثنائي اوكسيد الكاربون وبالتالي عدم قدرة الاعضاء للقيام بالواجبات الموكلة لها وهذا ما يودي احيانا الى الوفاة في الحالات الحرجة التي يصل اليها مصابين كورونا فيروس (WHO.,2020) .اكد العالم الاسترالي ويلسون، بان المصابين بفيروس كورونا يمكن تقسيمهم الى اصناف منهم ، من يحملون الفيروس ولا تظهر لديهم اعراض المرض وهم الفئة الاقل ضررا، وقسم يحمل الفيروس مع ظهور اعراض طفيفة مثل الحمى والصداع .وقسم يعاني من اعراض مشابهة للإنفلونزا، وفئة يتطور لديهم المرض مسببا الالتهاب الرئوي قلة الدراسات المحلية التي لم تركز على الجانب المناعي فيما يخص اصابات فيروس كورونا والتحري عن اهم المتغيرات المناعية والالتهابية للأشخاص المصابين بفيروس كورونا تم اجراء هذه الدراسة.

المواد و طرائق العمل

جمع العينات Samples Collection :

جمعت 150 عينة في هذه الدراسة ، بواقع 120 عينة دم Blood من الاشخاص المصابين بفيروس كورونا ومن ثم تشخيص اصاباتهم الرئوية بذات الرئة سريريا، اضافة الى 30 شخص كانوا مجموعة سيطرة (controls) ، ومن كلا الجنسين ،كانت اعمارهم متقاربة مع الاشخاص المصابين ،تراوحت من 16 –75 سنة ،تقريبا نسبة الرجال الى النساء المصابين 65%–35%. في حين كانت نسبة الرجال الاصحاء الى النساء 50% .تم جمع العينات من الاشخاص الراقدين

والمراجعين الى الردهات الوبائية في مدينة الطب – في محافظة بغداد للفترة من شهر اذار ولغاية شهراب 2022م . تحت اشراف اطباء مختصين، تم استخدام استمارة استبيان لكل مريض. تم جلب العينات الى المختبر في غضون ساعة لإجراء الفحوصات المناعية، فحوصات الدم، المؤشرات الالتهابية.

فحوصات الدم Hematological Tests :

*العد الكامل لمكونات الدم Complete Blood Count CBC:حسب ماجاء به (Langford *et al* .,2020)

1- تم سحب الدم الوريدي بطريقة معقمة بمقدار 5مل وضعت في انابيب مانعة للتخثر EDTA.

2- تم رج قناني جمع الدم بشكل جيد حتى يمتزج الدم بالمادة المانعة للتخثر بواسطة المازج الكهربائي .

3- وضعت القناني على Role mixture لمدة دقيقة –دقيقتين لكي يمتزج بشكل جيد وعدم حصول خثرة في الدم .

4- التأكد من وجود ورقة في الطابعة الخاصة بالجهاز ، المعرفة على جهاز CBC .

5- جعل ماصة الجهاز تصل الى نهاية القنينة حتى تمتص الدم بشكل كامل مع الضغط على المفتاح الخاص بالتشغيل خلف الماصة ،حتى نسمع صوت الجهاز الذي يخبرنا باكتمال جمع الدم بداخله ونسحب القنينة بسرعة .ثم يبدا الجهاز بحساب مكونات الدم لمدة دقيقة تقريبا حتى اكتمال القراءة وطباعة النتائج .

* تحديد نسبة البروتين C المتفاعل C-Reactive Protein- CRP تم استخدام العدة الخاصة Kits لتحديد معدل ال CRP للأشخاص المنضمين لهذه الدراسة حسب تعليمات الشركة المصنعة وحسب ماجاء به Al-Ramli واخرون و 2009 :

1- حضرت المحاليل والكواشف بدرجة حرارة الغرفة 18 -25 م

2- اضيفت 50 ما يكرون للعينات وقطرة من Positive & Negative controlsعلى صفيحة الاختبار .

3- مزج CRP –latex باليد او بالمازج قبل اضافة 50 ما يكرون للعينة .

4- مزج القطرات بواسطة مازجه مجهزة مع العدة تستخدم لمرة واحدة لكل عينة .

5- نضع الصفيحة على rotator الميكانيكي عند 80 -100 r.p.m لمدة دقيقتين ثم قراءة النتيجة ب mg/l ،القيمة الطبيعية له هي من 6-8 لكلا الجنسين

*اختبار معدل سرعة ترسيب كريات الدم الحمراء Erythrocyte Sedimentation Rate -ESR

ان الهدف من هذا الفحص هو المساعدة على التشخيص المبدئي واكتشاف الامراض عند وجودها ،لا يعتبر هذا الفحص نوعي في التشخيص، وانما مؤشر سريري عام ، قيمة ال ESR تعود إلى متابعة علاج بعض الحالات المرضية ووجود الامراض ،يتم اختبار فحص ال ESR بطريقة Westergreen. (Al-Ramli واخرون ،2009)

1- نضع قنينة جمع الدم في المازج وذلك لامتزاج الدم مع المادة مانعة التخثر EDTA وتجنب حصول خثرة دموية .

2- اخذت 0.8 مل من العينة وتوضع في انبوبة خاصة بفحص ESR حاوية على 0.2 مل من مادة صوديوم ستريت

3- ادخال ماصة Westergren سعة 150 مل في فوهة الانبوبة الحاوية على الدم مع الضغط على الماصة الى ان يصل الدم الى مستوى الصفر في انبوب ESR

4- توضع انبوبة فحص ESR في وضع عمودي .

5- يسجل معدل ترسيب الدم بعد الانتهاء من الساعة الاولى، علما ان المعدل الطبيعي للرجال هو 15 ملم /ساعة ، وللإناث اقل من 20 ملم /ساعة .

* تحديد الانترليوكينات باستخدام تقنية ELISA: حسب ما جاء به Conti) واخرون 2020)

* تحديد انترليوكين 1 بيتا Determination of (IL-1 B)

جدول1: مكونات العدة الخاصة ب IL-1 beta

Components	Quantity
Biotinylated Detection Ab Diluent	1 vial (14 mL)
Concentrated HRP Conjugate (100X)	1 vial (120 uL)
Concentrated Wash Buffer (25X)	1 vial (30 mL)
Contcentration Biotinylated Detection Ab (100X)	1 vials (120 µl)
HRP Conjugate Diluent	1 vial (14 mL)
Micro ELISA Plate	8 wells X 12 strips
Plate Sealer	5 pieces
Reference Standard	2 vials
Reference Standard and Sample Diluent	1 vial (20 mL)
Stop Solution (H2SO4)	1 vial (10 mL)

- **تحضير كواشف انترليوكين 1-بيتا IL-1 B Preparation of reagent for**

1- حضرت جميع الكواشف بدرجة حرارة الغرفة من18- 22 م قبل الاستعمال وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

2- حضرت ال Wash solution من مزج 30 مل من المخزون المؤقت للغسيل مع 720 مل من الماء المقطر الخالي من الايونات لتحضير 750 مل الWash buffer .

3- طرد مركزي لمدة دقيقة ب10000 rpm لمحلول القياسي standard ثم يترك 10 دقائق .

4- جهزت 7 انابيب مرقمة من 1 -7 لا جراء عملية التخفيف بإضافة 0.5 مل من المحلول القياسي وعينة مخففة لكل انبوب، ونقل 0.5 مل الى الاول فقط ، وبعد ذلك تنقل الى الانابيب الاخرى .

5- اضيفت 100 مايكرو ليتر من biotinylated Ab الى الانا بيب.

6- اضيفت 100 مايكرو ليتر من محلول الاقتران الى محلول العمل.

7- حساب النتائج ال IL-1 B بوحدة pg/ml باستحدام تقنية ايلايزا .

- **طريقة العمل ل IL -1 B بطريقة (Indirect ELISA)**

1- اضيفت 100 مايكرو ليتر من المحلول القياسي Standard الى الحفرة الاولى من الصفيحة الدقيقة micro plate ،واضيفت العينات الى بقية الحفر ،مع تغطية الصفيحة بغلاف ورقي مجهز مع ،عدة الفحص وتحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 37 م .

2- ازيل الغطاء من الصفيحة مع ازالة السائل دون الغسل واضيفت 100 مايكرو ليتر من محلول Abs Working dilution Biotin لكل حفرة ، وتغطية الصفيحة وتمزج، وتحضن لمدة ساعة ب37 م .

3- يتم شفط Aspirate للمحلول من كل الحفر ويضاف 250 مايكرو ليتر من ال Wash Buffer الى الحفر والانتظار لمدة 2 دقيقة.

4- شفط المحلول التخلص من المحلول وتجفف على ورق ترشيح وتكرر هذه العملية ثلاث مرات بعد كل عملية غسل Wash.

5- اضيفت 100 مايكرو ليتر من Conjugate Diluent لكل حفرة، وتحضنها لمدة نصف ساعة ب37م ،ثم تغسل وتكرر عملية الغسل 5 مرات.

6- اضيفت 90 مايكرو ليتر من محلول ايقاف التفاعل للصفيحة وتحضن لمدة ربع ساعة ب37 م وحمايتها من الضوء.

8- حددت الكثافة ال Optical Density عند ال450 نانوميتر باستخدام ال القارئ Reader في غضون 10 دقائق انتظار من اضافة محلول موقف التفاعل ال Stope solution .

***تحديد انتر ليوكين 17 (IL-17) Determination of**

جدول 2 : مكونات عدة الفحص الخاصة بIL17

Components	Quantity
Biotinylated Antibody	1 ml x1
Plate Sealer	2 pics
Micro ELISA Plate	12*8 well strips x1
Standard Diluent	3 ml x1
Standard Solution	0.5 ml x1
Stop Solution	6 ml x1
Streptavidin-HRP	6 ml x1
Substrate Solution A	6 ml x1
Substrate Solution B Substrate Solution A	6 ml x1
Wash Buffer Concentrate (25x)	20 ml x1

- **تحضير كواشف انتر ليوكين 17**

1- حضرت جميع الكواشف بدرجة حرارة الغرفة من18- 22 م قبل الاستعمال وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

2- اجراء عملية تخفيف بأخذ 6 انابيب ، يضاف لكل انبوب 120 مايكرو ليتر من المحلول القياسي المخفف Standard Diluent . و120 مايكرو ليتر من المحلول Standard Solution تضاف الى الانبوب الاول بعد ذلك نجري سلسلة التخافيف لكل انبوب .

3- 20 مايكرو ليتر من ال Wash buffer اضيفت الى 480 مايكرو ليتر من الماء المقطر الخالي من الايونات .

- **طريقة عمل ال IL -17**
- (sandwich method)

1- اضيفت 50 مايكرو ليتر من المحلول القياسي Standard Solution لكل حفرة من الصفيحة الخاصة بالايلايزا .

2- اضيفت 40 مايكرو ليتر من العينة لكل حفرة ،10 مايكرو ليتر من ال Biotinylated Antibody ايضا لكل حفرة مع مراعاة تغطية الصفيحة بعد كل اضافة تجنبا التلوث .

3- اضيفت50 مايكرو ليتر من محلول المقترن تضاف الى العينات ، وتحضن لمدة ساعة ب37 م .

4- تغسل الصفيحة 5 مرات بواسطة جهاز الغسل الخاص بتقنية ايلايزا .

5- اضيفت 50مايكرو ليتر من Substrate Solution A و50 مايكرو ليتر من Substrate Solution B وتحضن 10 دقائق ب37 م .

6- اضيفت 50مايكرو ليتر من من محلول ايقاف التفاعل Stop Solution اضيفت للحفر وتغيير اللون الازرق الى اللون الاصفر تدريجيا .

7- الامتصاصية ضبطت عند ال450 nm وتم حساب امتصاصية ال IL-17 بعد 10 دقائق من اضافة محلول ايقاف التفاعل Stop Solution .

*** – تحديد عامل النخر الورمي Determination of TNF-a**

ان عدة الفحص الخاصة ب TNF-a وطريقة العمل كما هو الحال بالنسبة الى IL-1 B وكما يلي :.

1- اضيفت 100 مايكرو ليتر من المحلول القياسي Standard الى الحفرة الاولى من الصفيحة الدقيقة micro plate ،واضيفت العينات الى بقية الحفر، مع تغطية الصفيحة بغلاف ورقي مجهز مع ،عدة الفحص وتحضن لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 37 م .

2- ازيل الغطاء من الصفيحة مع ازالة السائل دون الغسل واضيفت 100 مايكرو ليتر من محلول Abs Working dilution Biotin لكل حفرة ، وتغطية الصفيحة وتمزج ، وتحضن لمدة ساعة ب37 م .

3- يتم شفط Aspirate للمحلول من كل الحفر ويضاف 250 مايكرو ليتر من ال Wash Buffer الى الحفر والانتظار لمدة 2 دقيقة.

4- شفط المحلول التخلص من المحلول وتجفف على ورق ترشيح وتكرر هذه العملية ثلاث مرات بعد كل عملية غسل Wash.

5- اضيفت 100 مايكرو ليتر من Conjugate Diluent لكل حفرة، وتحضنها لمدة نصف ساعة ب37م ،ثم تغسل وتكرر عملية الغسل 5 مرات .

6- اضيفت 90 مايكرو ليتر من محلول ايقاف التفاعل للصفيحة وتحضن لمدة ربع ساعة ب37 م وحمايتها من الضوء .

7- حددت الكثافة ال Optical Density عند ال450 نانوميتر باستخدام ال القارئ Reader في غضون 10 دقائق انتظار من اضافة محلول موقف التفاعل ال Stope solution .

النتائج والمناقشة

تم تحليل وتفسير النتائج احصائيا باستخدام برنامج Statistical Package for Social Sciences –SPSS اعتمادا على قيم ال p-value

1- التوزيع الديموغرافي للمرضى المصابين بفيروس كورونا

قلة الابحاث التي تتعلق بالإصابات الثانوية المرافقة لفيروس كورونا وما يحدثه من مشاكل في الجهاز التنفسي السفلي، والذي يصيب جميع فئات المجتمع ولكلا الجنسين ،وتشخيص هذه المسببات الثانوية المسببة لذات الرئة pneumonia تم اقتراح هذه الدراسة التي تناولت نبذة عن فيروس كورونا والاصابات الثانوية وتشخيص هذه المسببات وتقييم المتغيرات المناعية والالتهابية التي يسببها فيروس كورونا والبكتريا المسببة لذات الرئة pneumonia ، والتحري عنها باستخدام بادئات وراثية نوعية . تم توزيع المرضى المصابين بفيروس كورونا بالاعتماد على عاملين مهمين هما الجنس Gender والعمر Age كما موضح في جدول (1) من اصل 150 شخص انظموا الى هذه الدراسة ،منهم 120 شخص مصاب بالالتهاب الرئوي جراء الاصابة الفيروسية ، والاصابات البكتيرية المرافقة ، نسبة الرجال الى النساء كانت 56%-35% ، معدل اعمارهم كانت +_ 14.4 ، ضمنهم 30 شخصا اصحاء كمجموعة مقارنة controls نسبة الرجال الى النساء 50% ،معدل اعمارهم +_3.5 سنة، هذه الدراسة جاءت مقاربة نوعا ما لدراسة اجريت على اشخاص مصابين بذات الرئة (Moren *et al.*, 2008)، ومخالفة لنتائج التي توصل اليها (Morris *et al.*, 2017) ، وقد يكون السبب في ذلك باختلاف عدد العينات ، ومكان جمع العينات ، وطريقة اخذ العينات ، والموسم الذي تم جمع العينات فيه اضافة الى اختلاف الطريقة التي اخذت فيها العينة وغيرها من الاسباب الاخرى.

جدول 1 التوزيع الديموغرافي لمصابي كورونا فيروس وذات الرئة مقارنة بالأصحاء اعتمادا على العمر والجنس

		Case		Total	*P*. Value
		Control	Patient		
Sex	Female	15 (50.0%)	42 (35.0%)	57 (38.0%)	0.145
	Male	15 (50.0%)	78 (65.0%)	93 (62.0%)	
Total		30 (100%)	120 (100%)	150 (100%)	
Age(mean SD±)		39 (13.5±)	40.7 (14.4±)	39.7 (14.1±)	0.15

2- علاقة المتغيرات المناعية وبعض الفحوصات الالتهابية بين المرضى المصابين بفيروس كورونا والاشخاص الاصحاء اختيرت بعض المتغيرات المناعية IL-1B,IL-17,TNF وبعض الفحوصات الالتهابية CRP و ESR ، وقورنت هذه المتغيرات بين المرضى المصابين بفيروس كورونا والالتهابات الرئوية المرافقة للإصابة الفيروسية كإصابات ثانوية والاشخاص الاصحاء، حيث لوحظ ارتفاع واضح في معدل الانترليوكينات المناعية المذكورة والمبينة في الجدول (2). ولوحظ في هذه الدراسة ارتفاع في معدل IL-17 لدى المرضى المصابين حيث سجل 230 وبمعدل انحراف 23.6 SD، وسجل اعلى تركيز ضمن هذه الفئة هو pg./ml260 واقل تركيز هو 188 pg./ml وعند مقارنة هذه القيم مع الاشخاص الاصحاء لوحظ ان معدل IL-17 123.2 وبمعدل انحراف 18.9 SD وسجل اعلى تركيز ضمن هذه الفئة هو pg./ml155 واقل تركيز هو 99 pg./ml، وهذا الارتفاع في معدل الانترليوكين للأشخاص المصابين يعود الى الاستجابة المناعية تجاه المرض وهذا ما اشارت اليه اغلب الدراسات المحلية والعالمية وجاءت هذه النتائج مقاربة لدراسة اجريت على اشخاص مصابين ب كورونا فيروس والتهابات ذات الرئة (Conti *et al* ., 2020). ان ارتفاع معدل IL-1 Beta في المرضى المصابين 276.02 وبمعدل انحراف 21.3 SD، وسجل اعلى تركيز ضمن هذه الفئة هو 310 pg/ml واقل تركيز هو 242 pg./ml وعند مقارنة هذه القيم مع الاشخاص الاصحاء لوحظ ان معدل IL-1 Beta 182.4 وبمعدل انحراف 16.8 SD وسجل اعلى تركيز ضمن هذه الفئة هو 211 pg./ml واقل تركيز هو 159 pg./ml ، يعزى هذا الارتفاع المعنوي في هذا المؤشر المناعي كون IL-1 Beta من

السايتوكينات الاساسية لتكوين الاجسام الالتهابية وهذا ما اشارت اليه اغلب الدراسات العالمية وجاءت هذه النتائج مختلفة نوعا ما لما ذكره (Zhang *et al* ., 2020). كما لوحظ ارتفاع واضح في عامل النخر الورمي TNF-a للأشخاص المصابين مقارنة بالأشخاص الاصحاء وجاءت النتائج مقاربة الى ما جاء به (Sun *et al* ., 2020). عند دراستهم لهذا العامل لأشخاص مصابين بالالتهاب الرئوي المزمن ومن المعروف ان هذا العامل من المؤشرات الالتهابية الرئيسية وخاصة عند المصابين بالإصابات البكتيرية، سجل معدل 408.23، ومعدل انحراف 46.2 SD وسجل اعلى تركيز للمصابين كان 545 pg./ml واقل تركيز 300 pg./ml، وعند مقارنة هذه القيم مع الاشخاص الاصحاء لوحظ فرق واضح حيث كان معدل هذا العامل 202.6 ومعدل انحراف 21.3 SD وسجل اعلى تركيز 235 pg./ml واقل تركيز 175 pg./ml . اما المؤشرات او الفحوصات الالتهابية المتخصصة وغير المتخصصة عندما قورنت بين المرضى والمصابين وجد ارتفاع واضح بمعدلات CRP سجل معدل 46.77 ومعدل انحراف 18.01 SD واعلى تركيز كان 81 mg/dl واقل تركيز كان 18 mg/dl الارتفاع في قيم الCRP كون هذا المؤشر متخصص بالإصابات البكتيرية حيث يرتفع عند وجود اصابة بكتيرية وهذا ما اكدته نتائج هذه الدراسة والدراسات الاخرى عند مقارنة هذه القيم بالأشخاص الاصحاء (Langford *et al* ., 2020). خلال هذه الدراسة لوحظ انخفاض في قيمة CRP حيث سجل معدل 3.35 ومعدل انحراف 1.4 واعلى قيمة كانت 6.1 mg/dl واقل قيمة 0.4 mg/dl. هذه النتائج جاءت مختلفة لما توصل اليه (Sun *et al* ., 2020). اما قيم ESR للمرضى المصابين كانت عالية مقارنة بالأشخاص الاصحاء ويعزى هذا الارتفاع الى سرعة ترسيب كريات الدم الحمراء في الساعة الواحدة باعتبار هذا الفحص مؤشر عام للالتهابات والامراض حيث سجل معدل 85 ومعدل انحراف SD 14.5 وسجل اعلى قيمة 85 mm/hr. واقل قيمة 20 mm/hr اما بالنسبة للأشخاص الاصحاء سجل معدل 20 ومعدل انحراف 3.8 واعلى قيمة كانت 20 mm/hr واقل قيمة 5 mm/hr من خلال هذه النتائج تبين هنالك علاقة احصائية قوية جدا بين هذه المتغيرات من خلال قيمة P-value اصغر من 0.05 لذلك هناك فرق معنوي واضح.

جدول 2: يوضح علاقة المتغيرات المناعية وبعض الفحوصات الالتهابية بين المرضى المصابين بفيروس كورونا والاشخاص الاصحاء

		Mean	Std. D	Min	Max	P. Value
IL-17 (pg/ml)	Control	123.27	18.9	99	155	0.01
	Patient	230.08	23.6	188	260	
	Total	208.71	48.5	99	260	
IL-1 Beta (pg/ml)	Control	182.43	16.8	159	211	0.01
	Patient	276.02	21.3	242	310	
	Total	257.30	42.7	159	310	
TNF Alpha (pg/ml)	Control	202.60	21.3	175	235	0.01
	Patient	408.23	46.2	300	545	
	Total	367.11	92.7	175	545	
ESR (mm/hr)	Control	8.03	3.8	5	20	0.01
	Patient	43.02	14.5	20	85	
	Total	36.02	19.1	5	85	
CRP (mg/l)	Control	3.35	1.4	0.4	6.1	0.01
	Patient	46.77	18.01	18.0	81.0	
	Total	38.09	23.73	0.4	81.0	

3- علاقة فحوصات الدم CBC بين المرضى المصابين بفيروس كورونا والاشخاص الاصحاء عند الاصابة بفيروس كورونا تؤدي الى نقص الاوكسجين بالدم وانسجة الجسم والتهاب الرئة وارتفاع عاصفة المحركات الخلوية Cytokines وزيادة افرازات الرئة مما يؤدي الى غلق الحويصلات الهوائية والشعب الهوائية بالإفرازات الرئوية المخاطية (Dhar *et al* .,2021) مما يسبب الاختناق وفشل عملية التنفس مما يتطلب اللجوء الى التنفس الاصطناعي (WHO.,2020) ويتزامن ذلك مع حدوث تسرب في الأوعية الدموية وتجلط للدم نفسه، كما ينخفض ضغط الدم، وتبدأ أجهزة الجسم في الفشل في أداء وظائفها، وفي كل هذه الحالات، يعتقد الجسم أن أنسجته تشكل أجساما دخيلة وغازية، وهو ما يُطلق عليه بوجه عام مصطلح "عاصفة السيتوكين"، وذلك نسبة إلى بروتينات سُكرية توجد بالعشرات، وتُستخدم في التواصل ونقل الإشارات بين خلايا الجهاز المناعي"، ويحمل الواحد منها اسم "محرك مناعي، وعند قياس فحوصات الدم المتمثلة CBC للأشخاص المصابين بفيروس كورونا كما مبين في جدول (3) حيث تبين ارتفاع معدل خلايا الدم البيضاء 8.16 وكان اعلى عدد لها هو 21.52 10^3/ul واقل عدد سجل 3.58 10^3/ul وعند مقارنة هذه القيم بالأشخاص الاصحاء الذي كان معدل الخلايا البيضاء لديهم 5.95 وان اعلى عدد ضمن هذه الفئة هو 7.4 10^3/ul ويعزى الارتفاع الواضح في الخلايا البيضاء مؤشر للإصابات البكتيرية وكانت قيمة ال P-value اقل من 0.01 وهذا يدل على وجود دلالة احصائية قوية وجاءت هذه النتائج مختلفة لما توصل اليه (Sun *et al* ., 2020). لدراسة كانت على الالتهابات الجسمية. اما الخلايا اللمفاوية التي تعتبر خلايا هدف لفيروس كورونا حيث لوحظ انخفاض واضح في عدد هذه الخلايا خلال هذه الدراسة حيث تبين ان نسبة اعداد الخلايا اللمفاوية للأشخاص المصابين

بفيروس كورونا 12.55 ومعدل انحراف +− 3.8 واعلى نسبة سجلت 19.07 % واقل نسبة 4.09% وهذا اقل بكثير من النسب التي سجلت في الاشخاص الاصحاء بمعدل 23.8 ومعدل انحراف 12.8 واعلى قيمة سجلت 38.9 واقل قيمة كانت 2.6 قد تعود هذه النتيجة لشخص مصاب دون تظهر عليه اعراض مرضية ودرج ضمن الاشخاص الاصحاء في هذه الدراسة وكانت قيمة ال P-value اقل من 0.01 % وهذا يدل على وجود دلالة احصائية قوية من خلال انخفاض نسبة الخلايا اللمفية في الاشخاص المصابين بفيروس كورونا (Lansbury *et al* ., 2020). اما في حالة كريات الدم الحمراء تبين ان معدل عدد الخلايا كان 5.12 ومعدل انحراف 0.5 SD واعلى قيمة سجلت 6.73 10^6/ul واقل قيمة 3.8 10^6/ul ضمن الاشخاص المصابين بفيروس كورونا عند مقارنتها بالأشخاص الاصحاء حيث كان معدل عدد الكريات الحمراء 4.58 وبمعدل انحراف 0.5 واعلى قيمة سجلت 5.8 10^6/ul واقل قيمة 3.4 10^6/ul وان قيمة ال P-value اقل من 0.01 والتي تدل على وجود دلالة احصائية قوية والتي توضح ارتفاع كريات الدم الحمراء في الاشخاص المصابين بفيروس كورونا بسبب قلة نسبة الاوكسجين في الدم والانسجة واحتياج المرضى لناقلات الاوكسجين المتمثلة بالصبغة الحمراء الموجودة في كريات الدم الحمراء ، وجاءت هذه النتائج نوعا ما مشابه لما جاء به (Dhar *et al* .,2021) لدراسة فيروسية اجريت على فيروس كورونا وفيروس الانفلونزا ومضاعفاتهما والمقارنة بين اعراض المصابين من خلال متغيرات التهابية . اما بالنسبة الى حجم كريات الدم المضغوط PCV للأشخاص المصابين ،سجلت النسب 43.72 كمعدل و معامل انحراف 4.7 SD واعلى قيمة كانت 65.5% واقل قيمة كانت 29.5%. اما الاشخاص الاصحاء فكانت نسب ال PCV هي 39.06كمعدل، و 5.2 كمعامل انحراف SD ، واعلى قيمة كانت 48% واقل قيمة سجلت 25.7 % لو حظ انخفاض نسبي في نسبة ال PCV وخاصة في المراحل المتقدمة من الاصابة وقد يعزى سبب ذلك الى اصابة الشخص بالأنيميا او فقر الدم Anemia وخاصة عند الأشخاص المصابين بالأمراض حيث تقل لديهم الشهية للطعام وخاصة في ذروة المرض حيث نلاحظ هبوط واضح في نسبة الدم لديهم (Gain *et al* ., 2019).هذه الدراسة اوضحت نسب الصفيحات الدموية وهي عوامل مهمة للتخثر وكان لها دور واضح في تكوين خثر الدم للمصابين بفيروس كورونا ، مما يضطر المريض الى اخذ مانعات التخثر تجنبا للخثرة الدموية جراء هذا الفيروس اللعين سجل المصابين معدل (PLT 292.27 ومعمل انحراف 141.382SD واعلى نسبة كانت 841 10^3/µL، واقل نسبة كانت 54 (10^3/µL ، اما الاشخاص الاصحاء فان نسبة الصفيحات الدموية ضمن المعدلات الطبيعية .، حيث سجلت 292.27 كمعدل ،وكمعدل انحراف 41.382 SD واقل قيمة كانت 10^3/µL54 واعلى قيمة سجلت 841 10^3/µL. وبينت هذه الدراسة ان هناك علاقة احصائية قوية جدا بين هذه المتغيرات اعتمادا على قيمة ال-P Value حيث كانت اصغر من 0.05 بمعنى وجود فرق معنوي واضح .

جدول رقم 3 : علاقة بعض فحوصات الدم بين المرضى المصابين والاشخاص الاصحاء .

		Mean	Std. D	Min	Max	P. Value
WBC (10^3/µL)	Control	5.95	1.8	4.20	7.44	0.001
	Patient	8.16	2.7	3.58	21.52	
	Total	7.72	2.6	3.58	21.52	
Lym%	Control	23.84	12.8	2.61	38.90	0.002
	Patient	12.55	3.8	4.90	19.70	
	Total	14.80	8.02	2.61	38.90	
RBC (10^6/µL)	Control	4.58	0.5	3.47	5.81	0.001
	Patient	5.12	0.5	3.81	6.73	
	Total	5.01	0.6	3.47	6.73	
HB g/dl	Control	12.58	1.9	7.8	15.8	30.00
	Patient	14.41	1.7	9.5	19.0	
	Total	14.05	1.9	7.8	19.0	
PCV %	Control	39.06	5.2	25.7	48.0	20.00
	Patient	43.72	4.7	29.5	56.5	
	Total	42.79	5.1	25.7	56.5	
PLT (10^3/µL)	Control	292.27	41.38	54	841	0.001
	Patient	265.52	75.13	89	445	
	Total	270.87	92.27	54	841	

المصادر

- Al-Ramli, W; Préfontaine, D; Chouiali, F; Martin, J; Olivenstein, R; Lemière, C and Hamid, Q. (2009). TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J of Allergy and Clin Immunol*, 123(5): 1185-1187.
- Baker, A; Empson, M and Fitzharris, P. (2015). Skin testing for immediate hypersensitivity to corticosteroids: a case series and literature review. *Clin and Experi Allergy: Clin Allergy*, 45 (3): 669-676.
- Barnes, P. (2018). Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunol*, 18 (7): 454-466.

- Bonnelykke, K; Vissing, N; Sevelsted, A; Johnston, S and Bisgaard, H. (2015). Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type. *J of Allergy Clin Immunol*, 136 (1): 81-86.
- Bray, C; Bell, L; Liang, H; Haykal, R; Kaiksow, F;Mazza, J and Yale, S. (2016). Erythrocyte Sedimentation Rate and C- Reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clin Med. *WMJ*, 115 (6): 31-21.
- Brenciani, A., Bacciaglia, A., Vecchi, M., Vitali, L.A., Varaldo, P.E. and Giovanetti, E.(2007). Genetic elements carrying erm (B) in Streptococcus pyogenes and association with tet (M) tetracycline resistance gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(4), pp.1209-1216.
- Conti, G. Ronconi, A. Caraffa, C. Gallenga, R. Ross, I. Frydas, et al.(2020). Induction ofpro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies, J. Biol. Regul. Homeost.Agents. 34 (2) (2020) 1.
- Dhar, S. K., Vishnupriyan, K., Damodar, S., Gujar, S., & Das, M. (2021). IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. Heliyon, 7(2), e06155.
- Ghazavi, A., Ganji, A., Keshavarzian, N., Rabiemajd, S., & Mosayebi, G. (2021). Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. *Cytokine*, *137*, 155323.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al.(2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. N Engl J Med. Feb, 54 (4): 18-34 .
- Hu Z, Song C, Xu C, Jin G, Chen Y, Xu X, et al.(2020). Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. China Life Sci doi: 324(9811): 520–18.
- Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Westwood, D., MacFadden, D. R., ... & Daneman, N. (2020). Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection*, *26*(12), 1622-1629.
- Lansbury, L., Lim, B., Baskaran, V. & Lim, W. S.(2020). Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S.(2020). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: . New Egypt. J. of Med. 23 (9) : 1673 –1667 .
- Morris, D. E., Cleary, D. W. & Clarke.(2017). S. C. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. *Front. Microbiol.* 8, 1041–1041. https:// doi. org/ 10. 3389/ fmicb. 01041 .
- Stoy, N. (2021). Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and interferon regulatory factor 5 in the immunopathogenesis of SARS-CoV-2 infection: implications for the treatment of COVID-19. Frontiers in Immunology, 12, 738.
- Sun, T. Wang, D. Cai, Z. Hu, H. Liao, L. Zhi, et al.(2020). Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia, Cytokine Growth Factor Rev.
- World Health Organization. (2020). Novel coronavirus situation report -2. January 22, 2020. Available from: URL: https://www.who.int/docs/ default-source/coronaviruse/situation-reports/20200122-sitrep-2- 2019-ncov.pdf. Accessed.
- Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al.(2020). Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. JAMA Intern Meddoi :34(173):123-46.
- Zhang, Z. Wu, J.-W. Li, H. Zhao, G.-Q. Wang,(2020). The cytokine release syndrome(CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonistTocilizumab may be the key to reduce the mortality, Int. J. Antimicrobial Agents105954 .

Abstract

Corona virus from crown viruses family ,formed series for persons have been dead. because significance studies of, immunology therefore suggested this study. At period from may to octoper 2022 m. involved 150 persons (120 infected with corona virus &30 controls) in Baghdad (medical city). the samples involved blood & sputum.the heamatology tests involved CBC, Inflamatory tests involved this markers (IL-1 beta ,IL-17 , TNF alfa, ESR, CRP). In this study concluded a observe increase in the mean of WBC as a result of bacterial infections and a observe increase in the mean of (IL-1B), (IL-17) and (TNF-a). In addition to (CRP) and (ESR) as general inflammatory indicators and a observe decrease in the mean of lymphocytes, in addition to an increase in the mean of (RBC) and (PLT) especially in the late stages of viral infection. in addition, there is statistical significant between these Variables depending on P-value ,according to the SPSS statistical program used in this study.