

وضع انتشار ویروس‌های انفلوانزا در تهران

دکتر فخرالسادات محمدزاده کیانی * دکتر خسرو فرعی

مقدمه:

منتهی نمی‌گردد. با توجه بمشکلات بالا بهترین و ساده‌ترین راه برای کسب اطلاعات لازم در مورد چگونگی انتشار ویروس‌های انفلوانزا در یک اجتماع اینست که در خون افراد به جستجو و تعیین عیار آنتی کورهای انواع ویروس‌های انفلوانزا مبادرت گردد. این کار در عده‌ای از ممالک انجام گرفته و نتایج حاصله حتی وضع انتشار آن دسته از ویروس‌های انفلوانزا را که در زمانهای گذشته انتشار داشته و بر اثر تغییرات آنتی ژنی جای خود را به انواع کنونی سپرده‌اند روشن ساخته است [۱-۲-۳-۴-۵]. تا آنجا که ما اطلاع داریم تا کنون در ایران هیچگونه مطالعه سرواپیدمیولوژیک در مورد بیماری انفلوانزا صورت نگرفته است.

قدر مسلم اینست که اجتماع ما از اپیدمیهای بیماری انفلوانزا مصون نمانده است ولی معلوم نیست که اولاً عامل مولد این اپیدمی‌ها همیشه ویروس‌های انفلوانزای تیپ A بوده است یا اینکه اپیدمی‌های با ویروس تیپ B نیز اتفاق افتاده است؟ ثانیاً تا کنون چند درصد از مردم با ویروس‌های انفلوانزای تیپ A و B آلوده شده‌اند؟ آیا زمینه برای بروز اپیدمی بیماری انفلوانزا مساعد است یا نه؟ ثالثاً وضع انتشار زیر تیپ A_۱ ویروس انفلوانزا که از سال ۱۹۴۶ تا سال ۱۹۵۷ انتشار داشته در ایران چگونه بوده است؟

برای جواب دادن به سئوالات بالا در خون ۷۱۶ نفر از ساکنان شهر تهران با روش اینهیبیسیون هم‌گلو تیناسیون به جستجو و تعیین عیار آنتی کور ویروس‌های A_۱ ، A_۲ و B انفلوانزا اقدام گردید. نتایج بدست آمده در این مقاله از نظر می‌گذرد.

پی بردن به وضع انتشار ویروس‌های انفلوانزا در یک اجتماع مستلزم تهیه آمار دقیق مبتلایان میباشد. این امر تنها با توجه بعلائم کلینیکی بیماری مقدور نیست، زیرا اولاً این علائم بر حسب سن، سابقه ابتلاء قبلی، وضع فیزیولوژیکی بدن، شرایط بیولوژیکی و تغییرات درجه ویروانس عامل مولد بیماری (ویروس) فرق می‌کند. ثانیاً ویروس‌های دیگری از قبیل ویروس رسپراتوار سنسییتال، ویروس‌های پارانفلوانزا، رینو ویروس‌ها، آدنو ویروس‌ها، رتو ویروس‌ها، اکو ویروس‌ها و بالاخره ویروس‌های کوکساکسی اغلب آثار بالینی مشابه با انفلوانزا بوجود می‌آورند و با آن اشتباه میشوند. با توجه بمطالب بالا این فکر ایجاد می‌شود که راه مطمئن برای تشخیص صحیح بیماری جدا کردن ویروس مولد انفلوانزا از مبتلایان باشد، ولی اینکار هم بدلیل زیر عملاً غیر مقدور است:

الف - جدا کردن ویروس مستلزم اینست که ترشحات گلوی هر بیمار را پس از افزودن آنتی بیوتیک بداخل کیسه آمیوتیک چند عدد تخم مرغ جنین دار ۱۰ تا ۱۲ روزه تلقیح کنند و در صورت لزوم دوسه بار هم پاساژ بدهند تا عیار ویروس افزایش یابد و از طریق هم‌گلو تیناسیون پی بردن به وجود آن مقدور گردد. انجام اینکار بخصوص در مواقع بروز اپیدمی‌ها که در عرض هفته دهها هزار بیمار انفلوانزائی وجود دارد حتی برای بزرگترین مراکز تحقیقاتی انفلوانزا هم عملی نیست.

ب - منفی ماندن نتیجه کشت ترشحات گلوی بیماران عدم ابتلاء آنها را به بیماری انفلوانزا ثابت نمی‌کند زیرا اقدامات لازم برای جدا کردن ویروس از برداشت‌ها همیشه به نتیجه مثبت

مواد و روشها

۱- نمونه‌های سرمی

در این مطالعه مجموعاً ۷۱۶ نمونه سرم مورد آزمایش قرار گرفت. از این تعداد ۳۶۴ نمونه متعلق با افرادی است که از آنها برای تشخیص پاراکلینیکی یک بیماری غیر از انفلوانزا خون گرفته شده بود. پس از انجام آزمایش‌های مورد نظر بقیه سرم خون این افراد برای جستجوی آنتی‌کوره‌های انفلوانزا جمع‌آوری گردید.

۳۵۲ نمونه دیگر مربوط به دهنندگان خون (Donneurs)

میباشد که توسط آقای دکتر شایسته اعلم از مرکز انتقال خون شیر و خورشید و آقای رستمیان از بخش خون مرکز پزشکی رازی در اختیار مقرر داده شد. سرم‌ها تا شروع کار جستجو و تعیین عیار آنتی‌کوره‌های انفلوانزا در حرارت منهای ۴۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲- آنتی‌ژن‌ها

از ویروس‌های انفلوانزا A₂/Hongkong/68، A₁/FM 1/47، B/lee/40 به عنوان آنتی‌ژن برای جستجو و تعیین عیار آنتی-کوره‌های مربوطه استفاده گردید. * از رقت‌های ۱۰-۳ و ویروس‌های نامبرده که هر میلی‌لیتر آن محتوی ۲۵۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۳۰۰۰ میکروگرم استرپتومیسین بود بمقدار ۰/۲ ml به حفره آلائتوئیدی تخم مرغ‌های جنین دار ۱۱ روزه تلقیح گردید. برای اینکه ویروس در سلول‌های آندودرمیک غشاء کریو آلائتوئیدی تکثیر نماید تخم مرغ‌های تلقیح شده بمدت ۷۲ ساعت در حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس یک‌شب در یخچال ۴ درجه قرار گرفتند.

پس از این مراحل مایع آلائتوئیدی تخم مرغ‌ها برداشت گردید. عیارها گلو تیناسیون دهنده این مایع که محتوی ویروس بود تعیین گردید و بعنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گرفت.

۳- زایل کردن اینهیبیتورهای غیر اختصاصی موجود در سرم‌ها

در سرم انسان و برخی از جانوران موادی وجود دارد که آنتی‌کور نیستند ولی می‌توانند مانند آنتی‌کورها قدرت هماگلوتیناسیون را از ویروس‌های انفلوانزا سلب کنند. این مواد را اینهیبیتورهای غیر اختصاصی می‌گویند. تاکنون سه نوع مختلف از این اینهیبیتورها شناخته شده است که عبارتند از: اینهیبیتورهای آلفا [۶]، بتا [۷] و گاما [۸]. برای اینکه جستجو و تعیین عیار صحیح آنتی‌کوره‌های حقیقی انفلوانزا مقدور

باشد، در وهله اول از بین بردن اینهیبیتورهای غیر اختصاصی در نمونه‌های سرمی الزامی است. برای اینکار روش‌های متعددی وجود دارد [۹]. در این بررسی زایل کردن اینهیبیتورهای غیر اختصاصی بکمک پریدات پتاسیم و به روش زیر انجام گرفت: دو حجم از محلول ۰/۵٪ در صد پریدات پتاسیم در سرم فیزیولوژیک که یک روز قبل از انجام آزمایش تهیه میشد با یک حجم از سرم بدون مکمل (دکمپلانت) و یک حجم سرم فیزیولوژیک مخلوط و بمدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد.

سپس ۴ حجم از محلول ۱۰ درصد گلوکز در سرم فیزیولوژیک، بآن اضافه گردید و مدت ۳۰ دقیقه بحال خود گذاشته شد تا گلوکز پریدات را خنثی کند.

۴- روش جستجو و تعیین عیار آنتی‌کوره‌های انفلوانزا بکمک آزمایش اینهیبیسیون هماگلوتیناسیون.

با استفاده از میکروسیستم تاکاتسی [۱۰] ۵ صدم میلی‌لیتر از سرم‌ها را که در جریان از بین بردن اینهیبیتورهای غیر اختصاصی هشت بار رقیق شده بودند به نسبت‌های $\frac{1}{16}$ ، $\frac{1}{32}$ ، $\frac{1}{64}$ ، $\frac{1}{128}$ ، $\frac{1}{256}$ ، $\frac{1}{512}$ ، $\frac{1}{1024}$ ، $\frac{1}{2048}$ رقیق نمودیم. از هر سرم سه سری رقت‌های هشت تایی به ترتیب بالاتر تهیه شد به هر کدام از رقت‌های سرمی سری اول باندازه هم حجمش (پنج صدم میلی‌لیتر) سوسپانسیون ویروس A₁، به سری دوم ویروس A₂ و به سری سوم ویروس نوع B اضافه گردید (هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های ویروسی محتوی چهار دز هماگلوتیناسیون دهنده بود). مخلوط سرم ویروس مدت یک ساعت در حرارت آزمایشگاه نگهداری شد تا چنانچه در سرم آنتی‌کور وجود داشته باشد قدرت هماگلوتیناسیون کننده ویروس را خنثی نماید. در مرحله آخر به همه مخلوط‌های سرم ویروس پنج صدم میلی‌لیتر از سوسپانسیون نیم درصد گلبول قرمز مرغ اضافه گردید و بعد از گذشت یک ساعت نتیجه آزمایش قرائت شد و بالاترین رقت سرم که قدرت هماگلوتیناسیون کننده ویروس را خنثی کرده بود بعنوان عیار آنتی‌کور انفلوانزا در سرم مورد آزمایش یادداشت گردید. چون ممکن است گلبول‌های قرمز - مرغ اتواگلوتینا بل و یا نون آگلوتینا بل باشند لذا قبلاً از این نظر مورد آزمایش قرار گرفتند. ضمناً در آزمایش‌ها، هر آنتی‌ژن بایک ایمونوسرم معلوم العیار نیز عمل گردید (شاهده مثبت).

* انواع ویروس‌های پروتوتیپ انفلوانزا از آزمایشگاه فرانس و ویروس شهر لندن دریافت شده است

نتایج

در خون ۷۱۶ نفر از ساکنان شهر تهران به سنین یک تا هشتاد سال، باروش اینهیبیسیون هم‌گلو تیناسیون به جستجو و تعیین عیار آنتی کور ویروسهای انفلوانزای A_1 ، A_2 ، هنگ کنگ و B مبادرت گردید و نتایج زیر بدست آمد:

الف- آنتی کورهای ویروس انفلوانزای A_2 هنگ کنگ

در خون ۷۴ درصد از ساکنان تهران برای ویروس A_2 هنگ کنگ آنتی کور وجود دارد که عیار آن در پیش افراد مختلف متفاوت بوده و بین ۱۶ تا ۱۰۲۴ متغیر است. در سرمهای حاوی آنتی کور برای ویروس A_2 هنگ کنگ، تعداد و نسبت درصد تیتراهای مختلف محاسبه و در جدول زیر نشان داده شده است:

عیار آنتی کور ویروس A_2 هنگ کنگ	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۵۱۲	۱۰۲۴
تعداد سرمهای هم عیار	۴۲	۸۸	۱۲۵	۱۹۰	۵۰	۲۸	۷
نسبت درصد عیارهای مختلف در بین سرمهای مثبت	۷/۹	۱۶/۶	۲۳/۶	۳۶	۹/۴	۵/۳	۱/۳۲

جدول شماره ۱

همانطور که جدول نشان میدهد متوسط آنتی کور در پیش افرادی که با ویروس هنگ کنگ آلوده شده اند ۱۲۸ است بعبارت دیگر سرم ۱۲۸ بار رقیق شده این افراد میتواند قدرت هم‌گلو تیناسیون را از ویروس A_2 سلب کند. نسبت درصد سرمهای مثبت در گروههای سنی مختلف (۱ تا ۱۰، ۱۱ تا ۲۰...) تقریباً در یک حدود است.

ب- آنتی کورهای ویروس انفلوانزای A_1 در بیش ۲۵ درصد از افرادی که خونشان مورد آزمایش قرار گرفت برای ویروس انفلوانزای A_1 آنتی کور جلوگیری کننده از هم‌گلو تیناسیون وجود دارد. عیار آنتی کورهای ویروس A_1 نیز مانند ویروس A_2 در خون اشخاص بیک اندازه نیست بلکه بین ۱۶ تا ۲۵۶ تغییر میکند. تعداد و نسبت درصد عیارهای مختلف در بین سرمهای مثبت محاسبه و در جدول شماره ۲ درج شده است.

عیار آنتی کور ویروس A_1 انفلوانزا	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶
تعداد سرمهای هم عیار	۶۸	۹۱	۱۴	۵	۱
نسبت درصد عیارهای مختلف در بین سرمهای مثبت	۳۷/۴	۵۰/۸	۷/۸	۲/۷	۰/۵

جدول شماره ۲

ج- آنتی کور ویروس انفلوانزای تیپ B

برای ویروس تیپ B انفلوانزا در خون ۳۲ درصد از افرادی که در شهر تهران زندگی میکنند آنتی کور وجود است و نشان میدهد که ویروس انفلوانزای تیپ B نیز در اجتماع ما انتشار دارد و مردم را به بیماری انفلوانزا مبتلا میسازد. عیار این نوع آنتی کور در سرمهای مثبت بین ۱۶ تا ۱۰۲۴ متغیر است. در سرمهایی که برای ویروس B انفلوانزا محتوی آنتی کور هستند تعداد و نسبت درصد عیارهای مختلف محاسبه و در جدول شماره ۳ نشان داده شده است:

در جستجو و تعیین عیار آنتی کور ویروس انفلوانزای A_1 بدونکنه جالب توجه برخورد می کنیم، یکی اینکه عیار آنتی کور در خونهای آزمایش شده پائین است، دیگر اینکه در خون افرادی که سن آنها کمتر از ۱۵ سال است برای ویروس A_1 آنتی کور دیده نمیشود (این دو موضوع مورد بحث قرار خواهد گرفت). در پیش افرادی که سن آنها بیش از ۲۰ سال است نسبت درصد سرمهای مثبت در گروههای مختلف تقریباً مشابه است.

عبار آنتی کورتیپ B و وروس انفلوانزا	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۵۱۲	۱۰۲۴
تعداد سرمهای هم عیار	۲۲	۴۸	۸۳	۴۱	۲۲	۱۰	۳ جمع ۲۲۹
نسبت درصد عیارهای مختلف در بین سرمهای مثبت	۹/۶	۲۰/۹	۳۶/۲	۱۷/۹	۹/۶	۴/۳	۱/۳

جدول شماره ۳

سن ۳۰ به بعد نسبت درصد سرمهای مثبت در گروههای سنی مختلف تقریباً ثابت میماند. تعداد افراد هر گروه، و تعداد و نسبت درصد سرمهای مثبت گروههای سنی مختلف در جدول شماره ۴ خلاصه شده است.

از نظر آنتی کورو وروس تیپ B انفلوانزا، نسبت درصد سرمهای مثبت در گروههای سنی مختلف شایان توجه است: در خون افرادی که سن آنها یک تا سی سال میباشد نسبت درصد سرمهای مثبت با افزایش سن رابطه مستقیم دارد ولی از

سن	۱ تا ۱۰	۱۱ تا ۲۰	۲۱ تا ۳۰	۳۱ تا ۴۰	۴۱ تا ۵۰	۵۱ تا ۶۰	۶۱ تا ۷۰	۷۱ تا ۸۰
تعداد نفرات هر گروه سنی	۶۴	۵۸	۲۲۰	۲۵۰	۴۵	۳۷	۲۴	۱۶
تعداد سرمهای مثبت	۴	۱۲	۵۹	۱۰۳	۱۹	۱۵	۱۰	۷
نسبت درصد سرمهای مثبت	۶	۱۹/۵	۲۶/۸	۴۱/۲	۴۲/۲	۴۰/۵	۴۱/۶	۴۳/۷

جدول شماره ۴

ویروس نوع C اغلب بطور تک گیر ایجاد بیماری می کند و تا کنون اپیدمی قابل ملاحظه ای از آن گزارش داده نشده است. سر تیپ A و ویروس انفلوانزا شامل سه زیر تیپ یا اریانت میباشد که عبارتند از A_۱، A_۲ و A_۳. زیر تیپ A_۱ در سال ۱۹۴۶ بر اثر تغییر ساختمان آنتی ژنی تبدیل به زیر تیپ A_۲ شد. ویروس اخیر پس از ده سال انتشار، خود دستخوش تغییرات نسبتاً شدید آنتی ژنی قرار گرفت و در سال ۱۹۵۷ به ویروس A_۲ تبدیل گردید و انفلوانزا عالمگیر سال ۱۹۵۷ را بوجود آورد که مبداء آن شهر سنگاپور بود. اولین سویه ویروس A_۲ که از این شهر بدست آمده بنام ویروس A_۲ سنگاپور خوانده میشود. خواص آنتی ژنی ویروس A_۲ سنگاپور بار دیگر در سال ۱۹۶۸ تغییر نمود [۱۵] و موجب اپیدمیهای گسترده ای در اقصی نقاط گیتی شد. چون این ویروس تغییر یافته برای اولین بار در هنگ کنگ بدست آمد لذا به ویروس A_۲ هنگ کنگ معروف گردید. چون سویه های متعدد ویروس هنگ کنگ که از سال ۱۹۶۸ تا کنون در نقاط مختلف جهان ایزوله شده اند از نظر کمیت

بحث

ویروسهایی که در پیش انسان تولید بیماری انفلوانزا مینمایند از سه نوع مختلف هستند که با حرف A، B و C مشخص میشوند. ویروس انفلوانزای نوع A در سال ۱۹۳۳ [۱۱]، نوع B در سال ۱۹۴۰ [۱۲] و نوع C در سال ۱۹۴۷ [۱۳] شناخته شده اند. بر اثر پاساژهای طبیعی (انتقال ویروس از فردی به فرد دیگر) تغییراتی در آنتی ژنهای ویروس انفلوانزا بوجود می آید که در اپیدمیولوژی بیماری نقش اساسی دارد [۱۴]. این تغییرات در ویروسهای نوع A زیاد، در ویروسهای نوع B کمتر ولی در ویروسهای نوع C تا کنون قابل ملاحظه نبوده است. به همین جهت مسئول تمام عالمگیریها و همه گیریهای بزرگ بیماری انفلوانزا همیشه ویروسهای نوع A بوده هستند. چون ویروس نوع B ساختمان آنتی ژنیکی ثابت تری نشان میدهد لذا اپیدمیهای آن محدودتر و بفواصل زمانی بیشتری بروز مینماید.

استرالیا بوقوع پیوست از تغییر ویروس A_2 هنگ کنگ بوجود آمده و با نام ویروس A_1 سال ۱۹۷۲ انگلستان (A₂/England/42/72) مشخص شده است. [۱۶]

وجود آنتی کور ویروس A_1 انفلوانزا در خون ۲۵ درصد از مردم تهران سابقه انتشار این ویروس را در ایران به ثبوت می‌رساند. بطوریکه قبلاً نیز اشاره شد از سال ۱۹۵۷ ویروس A_1 جای خود را به ویروس A_2 انفلوانزا سپرده است. چون در خون هیچک از افرادیکه بعد از سال ۱۹۵۷ در ایران متولد شده‌اند برای ویروس A_1 آنتی کور وجود ندارد، لذا چنین نتیجه گرفته میشود که در عرض ۱۵ سال گذشته اپیدمی بیماری انفلوانزا که عامل مولد آن ویروس A_1 باشد، در ایران اتفاق نیافتاده است. بنابراین آنتی کور موجود در خون افراد مربوط به عفونت‌های سال ۱۹۴۶ تا ۱۹۵۷ (دوران انتشار ویروس A_1) است. به همین دلیل عیار متوسط آنتی کور ویروس A_1 در سرم‌های مثبت، بطور قابل ملاحظه پائین‌تر از عیار متوسط آنتی کورهای ویروس A_2 انفلوانزا میباشد.

وجود آنتی کور برای تیپ B ویروس انفلوانزا در خون ۳۲ درصد از ساکنان تهران نشان میدهد که در اجتماع ما علاوه بر ویروس نوع A انفلوانزا ویروس نوع B نیز در گردش است و در تولید بیماری انفلوانزا شرکت مینماید بطوریکه در شرح نتایج ملاحظه میشود اولاً تعداد کسانی که برای این ویروس آنتی کور ندارند زیاد است ثانیاً در بیش افرادی که سن آنها یک تا سی سال میباشد نسبت در سرم‌های مثبت با افزایش سن رابطه مستقیم دارد. وجود چنین وضعی گویای اینست که در کشور ما شدت انتشار تیپ B ویروس انفلوانزا بمراتب کمتر از ویروس نوع A بوده و اپیدمیهای آن محدودتر و بفواصل زمانی بیشتر اتفاق می‌افتد.

جزءهای آنتی ژنی کاملاً مشابه نیستند، لذا میتوان نتیجه گرفت که ویروس A_2 هنگ کنگ نیز دائماً در حال تغییرات جزئی است. وجود آنتی کور ویروس A_2 هنگ کنگ در خون ۷۴ درصد از مردم تهران با عیار متوسط ۱۲۸ مبین شدت انتشار این ویروس در شهر تهران میباشد.

اگر در خون ساکنان شهرهای کوچک و روستاها بجهتجو و تعیین عیار آنتی کور ویروس A_2 مبادرت گردد با احتمال قوی نسبت درصد سرم‌های مثبت کمتر از رقم دست‌آمده از تهران خواهد بود. زیرا شرایط برای انتشار ویروس‌های انفلوانزا در تهران خیلی مساعدتر و مناسبتر میباشد (تراکم جمعیت، کثرت اماکن عمومی، اجتماعات و از همه مهمتر ارتباط روزمره این شهر با ممالک مختلف بوسیله پل‌های هوایی) چون نسبت درصد سرم‌های مثبت در گروه‌های سنی مختلف تقریباً مشابه و عیار آنتی کورهای بالا است میتوان نتیجه گرفت که اپیدمی‌های ویروس انفلوانزای A_2 بفواصل زمانی کوتاه در شهر تهران تکرار میشود. چون در پایان این بررسی (تابستان ۱۳۵۱) در خون ۷۴ درصد از مردم برای ویروس A_2 آنتی کور وجود داشت لذا چنین بنظر میرسد که لااقل در پائیز و زمستان سال ۱۳۵۱ و حتی در سال ۱۳۵۲ ویروس انفلوانزای A_2 هنگ کنگ در تهران تولید اپیدمی نخواهد کرد ولی این پیش‌بینی بعلت پیدایش ویروس تغییر یافته دیگری از نوع A_2 تحقق پیدا نکرد :

«عامل مولد اپیدمی‌های گسترده‌ای که در پائیز و زمستان سال ۱۳۵۱ در ایران و ممالک مختلف آسیا، اروپا، امریکا و

REFERENCES

- 1- Grobunoua, A S. and Pysina, T.V, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 39: 271, 1968.
- 2- Mulder, J. and Masurel, N., *Lancet*, 1958, Apr. 19; 810, 1958.
- 3- Fazekas, S., Webster, R.G. and Davenport, F.M., *J. Immunol.*, 103, 1969.
- 4- Zalan, E. and Labzoffsky, N A., *Canad. Med. Ass. J.*, 100: 901. 1969.
- 5- Ivan, I.M, Busuico, C. and Ionesco, V., *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 28: 712, 1969.
- 6- Francis, T. Jr., *J. Exp. Med*, 85: 1, 1947.

- 7- Chu, C M., *J. Gen Microbiol.*, 5: 739, 1951.
- 8- Beliavin, G. and Cohen, A , *Virology*, 18: 144, 1962.
- 9- Sohier. R , Diagnostic des maladies a virus., Flamm. edit , 266, 1964.
- 10- Takatsy, G.Y., *Acta microbiol* , 3: 191, 1955.
- 11- Andrewes, P., Laidlawe, P. and Smith, W , *Lancet*, 2:859, 1934.
- 12- Francis, T., *Scienece*, 29: 405, 1940.
- 13- Taylor, R.M , *Amet. J. Publ. Hlth.* 39: 171, 1949.
- 14- Pereira, M.S., Chakraverty, P., Pane, A P. and Fletcher, W.B., *J. Hyg. Cambridge.* 67: 551, 1969.
- 15- Coleman, M.T. and Dowdle, W.R., *Lancet*. 28: 1384, 1968
- 16- New Influenza , *Brit. Mea. J.*, 4: 251, 1972.