مقاله مروری

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال نهم ● شماره ۴ ● صفحات ۲۷۵ تا ۲۸۴ ● زمستان ۱۳۹۰

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

مروری بر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب خونریزی دهنده کریمه-کنگو

کیوان مجید زاده [۱]، محمد سلیمانی [۱]، *آرش قلیان چی لنگرودی [۲]

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۰/۳/۱۰ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۰/۷/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: بیماری تب خونریزی دهنده کریمه و کنگو (CCHF)، یک بیماری ویروس خونریزی دهنده تب دار حاد مشترک بین انسان و دام می‌باشد.میزان مرگ و میر گزارش شده این بیماری بین ۵۰ –۲٪ است. تشخیص دقیق و سریع جهت کنترل، درمان و شناسایی بیماران و همچنین برای مطالعات همه گیرشناسی حیاتی است.

مواد وروش‌ها: در این مقاله، مروری جامع با استفاده از بررسی منابع و همچنین نتایج حاصل از مطالعات و تحقیقات نویسندگان در خارج و داخل کشور بر روی روش‌های تشخیص بیماری CCHF (شامل: امنیت زیستی، نمونه‌گیری و روش‌های آزمایشگاهی) گردیده است.

یافته‌ها: روش‌های آزمایشگاهی تشخیص بیماری CCHF بر سه راهکار جداسازی ویروس، روش‌های سرولوژیکی (الایزا، آزمون فلورست غیر مستقیم و مهارآگلوتیناسیون مهاری غیر فعال معکوس) و روش‌های تعیین آنتی ژن (الایزا، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و ریز آرایه) استوار است.

بحث و نتیجه‌گیری: تشخیص سریع برای درمان به موقع بیماران، جلوگیری از عفونت‌های بیمارستانی و حملات بیوتروریستی مفید است. همچنین تشخیص بین سویه‌های غیر نوترکیب شده و نوترکیب شده بسیار حیاتی است. با توجه به امکانات موجود در ایران و کمبود اطلاعات از عامل این بیماری، باید روش‌های بومی در هر سه جنبه تشخیصی ذکر شده، به ویژه با تاسیس امکانات آزمایشگاهی با امنیت زیستی چهار طراحی و عملیاتی شود.

کلمات کلیدی: تب خونریزی دهنده کریمه، کنگو، روش تشخیصی، تست آزمایشگاهی

مقدمه

بیماری تب خونریزی دهنده کریمه – کنگو (CCHF)، یک بیماری ویروس خونریزی دهنده تب دار حاد مشترک بین انسان و دام می‌باشد. ویروس تب خونریزی دهنده کریمه–کنگو (CCHFV) در اواسط دهه ۱۹۴۰در شبه جزیره کریمه (در جنوب اوکراین) برای اولین بار مشاهده شد.در سال ۱۹۵۶ این ویروس دوباره از یک بیمار با تب یک روزه دراستنلی ویل (که امروزه به کیسانگانیدرجمهوری دموکراتیک کنگوشهرت دارد) جدا شد، از آن به بعد دو نام کریمه ـ کنگو برای این ویروس به صورت ترکیبی به کار گرفته شد (۱).عامل ایجاد بیماری، ویروس CCHF از خانواده بونیا ویریده جنس نایرو ویروس است. ژنوم ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای با قطبیت منفی است که از سه قطعه L (Large) با اندازه ۱۴/۴ – ۶/۵ کیلو باز، قطعه M (Medium) با اندازه ۶/۳ – ۳/۲ کیلو باز و قطعه S (Small) با اندازه ۲ – ۰/۸ کیلو باز تشکیل شده است. ویروس

۱ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم
۲ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۶۱۱۱۷۰۰۰ –۰۲۱ آدرس الکترونیک: ghalyana@ut.ac.ir

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

CCHF در زیر میکروسکوپ الکترونی به شکل کروی با قطری در حدود ۱۰۰ نانومتر دیده می‌شود و دارای هسته فشرده احاطه شده با پوشش لیپیدی است که از درون آن برآمدگی‌های میله‌ای شکل با طول ۱۰– ۵ نانومتر بیرون زده است (۱، ۲). این ویروس بر اثر گزش کنه‌ها و یا تماس مستقیم با امعاو احشا دام‌های آلوده تازه کشتارشده و یا تماس با خون و ترشحات بدن بیمار و یا آئروسل‌های پراکنده در فضا، به خصوص در همه‌گیری‌ها و در مراکز بهداشتی و درمانی از فرد مبتلا به دوره ویرمی به شخص سالم انتقال می‌یابد. موارد تک‌گیر و همه‌گیر CCHF در انسان‌ها نیز اتفاق می‌افتد و میزان عفونت زایی ویروس ۱۰۰ – ۲۰٪ گزارش شده است. این بیماری مرگ و میر بالایی دارد و میزان مرگ و میر گزارش شده این بیماری بین ۵۰ – ۱۰٪ است و همه‌گیری‌های داخل بیمارستان آن نیز شایع می‌باشد. میزان مرگ و میر ناشی از بیماری در مناطق مختلف دنیا تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد و این تفاوت فقط مربوط به اختلاف سرویس تشخیصی و درمانی پزشکی مناطق مختلف نیست بلکه بیشتر به حدت و بیماری‌زایی گونه‌های متفاوت ویروس در مناطق مختلف دنیا بستگی دارد (۲، ۳). شروع علایم ناگهانی بوده و حدود ۱ تا ۷ روز طول می‌کشد. (متوسط ۳ روز) علایم اولیه بیماری شبیه آنفلوانزا می‌باشد.بیمار دچار سردرد شدید، تب، لرز، درد مفاصل، درد عضلات، گیجی، درد و سفتی گردن، درد چشم و ترس از نور می‌گردد. ممکن است حالت تهوع و استفراغ بدون ارتباط با غذا خوردن، گلودرد و احتقان ملتحمه در اوایل بیماری وجود داشته باشد که گاهی با اسهال، درد شکم و کاهش اشتها همراه می‌شود. تب اغلب بین ۳ تا ۱۶ روز طول می‌کشد. تورم و قرمزی صورت، گردن، قفسه سینه و پر خونی خفیف ناحیه حلق و ضایعات نقطه‌ای در کام نرم و سخت شایع است. لکوپنی و بخصوص ترومبوسیتوپنی شدید در این مرحله دیده می‌شود. حیوانات نشخوار کننده مانند گاو، گوسفند و بز تا یک هفته پس از کسب عفونت ویروس را در خون خود خواهند داشت و فاقد هر گونه علامتی در این مدت می‌باشند (۴، ۵). این بیماری از گذشته دور در کشور ما وجود داشته است و در بعضی مناطق ایران نام "حصبه قره میخ" را برای آن انتخاب نموده بودند. هر چند سابقه تاریخی وجود موارد مشترک تب هموراژیک کنگو – کریمه در ایران به صدها سال قبل و گزارش موارد محتمل به حدود سه دهه قبل برمی گردد ولی با توجه به اینکه وجود موارد قطعی بیماری در سال‌های اخیر به اثبات رسیده است، لذا تب هموراژیک کنگو – کریمه جزو بیماری‌های بازپدید درایران به حساب می‌آید (۶، ۷، ۸). جدول شماره یک خلاصه‌ای از تاریخچه CCHF را در ایران نشان می‌دهد. هم اکنون تشخیص این بیماری در آزمایشگاهی در انستیتو پاستور ایران زیر نظر کمیته کشوری صورت می‌گیرد. همچنین مرکز تحقیقات زیست

جدول۱– تقویم بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو در ایران (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱)

ردیف	سال	شخص	فعالیت صورت گرفته
۱	۱۱۱۰ میلادی	جرجانی	شرح یک بیماری خونریزی دهنده در تاجیکستان فعلی
۲	۱۳۴۵ شمسی	دکتر امین الاشرافی	گزارش مواردی از بیماری دانشگاه تبریز
۳	۱۳۴۹شمسی	دکتر ولی ا... آصفی	۶۰ مورد بیمار مشکوک به تب خونریزی دهنده کریمه– کنگو در آذربایجان شرقی گزارش شد.
۴	۱۳۵۲ شمسی	دکتر آردوآن و دکتر یونس کریمی	مطالعه این بیماری درآذربایجان شرقی
۵	۱۳۵۴ شمسی	دکتر سعیدی و همکاران	آنتی بادی علیه ویروس تب هموراژیک کریمه– کنگو در خون انسان و حیوانات اهلی پستانداران کوچک مشکوک به این بیماری در مناطق اطراف دریای خزر و آذربایجان شرقی ردیابی گردید.
۶	۱۳۵۷ شمسی	پروفسور سورو	عامل این بیماری (ویروس CCHF) از کنه‌های آلوده جدا گردید.
۷	۱۳۷۸ شمسی	تشخیص بیماری در آفریقای جنوبی	در شهرکرد دو نفر از پزشکان شاغل در بیمارستان درگیر بیماری شدند و بیماری خود را به صورت جدی نشان داد– (شروع بازپدیدی بیماری)

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

فن‌آوری تسنیم نیز با توجه به تجربه‌های ارزشمند در زمینه تشخیص مولکولی می‌تواند به عنوان مرجعی جهت انجام آزمون‌های مولکولی به‌عنوان مرکز پشتیبان کشور مطرح گردد. وضعیت اپیدمیولوژیکی موارد محتمل گزارش شده و قطعی بیماری نشان می‌دهد که این بیماری در کشور اندمیک است (۹، ۱۰، ۱۱). در غیاب علایم بالینی مشخص، پزشکان نیاز به تشخیص سریع و قابل اعتمادی دارند تا بتوانند محافظت بیمارستانی مناسب و درمان ضدویروسی سریع را آغاز نمایند. همچنین تشخیص تفریقی با سایر عوامل ایجاد کننده تب‌های خونریزی دهنده باید صورت پذیرد. با توجه به موارد فوق و اهمیت تشخیص سریع بیماری در موارد حملات بیولوژیک و شیوع ناگهانی بیماری، در این مقاله مروری به بررسی روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بیماری CCHF می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مرور منابع و همچنین حاصل مطالعات و تحقیقات نویسندگان در کشور، نتایج تحقیقات ارزشمند در مرکز تحقیقات زیست فن آوری تسنیم، تحقیقات منتشر شده و اطلاعات جمع آوری شده از کتب، مقالات داخلی، خارجی و همچنین منابع معتبر اینترنتی در زمینه تشخیص آزمایشگاهی بیماری تب خونریزی دهنده کریمه – کنگو بوده که در بخش‌های امنیت زیستی، نمونه‌گیری، جداسازی ویروس، روش‌های تشخیص سرولوژیک – مولکولی و روش‌های نوین تشخیصی تهیه و تدوین گردیده است.

یافته‌ها

امنیت زیستی در تشخیص

عامل CCHF مانند سایر عوامل ایجاد کننده تب‌های خونریزی دهندهدر طبقه بندی زیستی سطح چهار (BSL۴)از سطوح جهار گانه طبقه بندی زیستی قرار می‌گیرد و علت آن نیز به علت انتقال انسان به انسان، خطر بالا جهت ایجاد عفونت بیمارستانی – آزمایشگاهی و همچنین عدم وجود واکسن برای این بیماری می‌باشد. همچنین این عامل یکی از عوامل طبقه شده جهت استفاده در بیوتروریسم بوده (۱) و قوانین مشخص در کشورهای مختلف جهت کار با آن وجود دارد. البته به‌علت عدم تولید در مقیاس بالا، این عامل به‌طور وسیعی نمی‌تواند جهت تولید سلاح بیولوژیک قرار گیرد.با توجه به وسعت میزبانان ویروسی CCHF (پرنده، انسان، جونده و حیوانات اهلی) و کنه‌های میزبان نوع نمونه جهت تشخیص متفاوت می‌باشد. در انسان تشخیص آزمایشگاهی به‌طور معمول بر روی خون، پلاسما، سرم و یا مایعات بدن و یا بیوپسی صورت می‌گیرد.انتقال نمونه‌های مشکوک به CCHF باید طبق پروتکل‌های ویژه (۱۲) که مرتبط با حمل نمونه‌های عفونی با خطر بالا است، صورت گیرد.به همراه نمونه باید برگه اطلاعات کلینکی و اطلاعات اپیدمیولوژی بیمار ارسال گردد. کشت ویروس CCHF نیاز به امکانات امنیت زیستی سطح ۴دارد. در آزمایشگاهی که فاقد امنیت زیستی فوق می‌باشند، باید با روش‌های معتبر، نمونه قبل از تشخیص غیر فعال کرد.دستورالعمل کنونی جهت تب‌های خونریزی دهنده جهت غیر فعال کردن نمونه شامل استفاده از حرارت، تباش گاما و تریتون X۱۰۰قبل از دستکاری نمونه می‌باشد (۱۰).ویروس به علت داشتن انولوپ به حلال‌های چربی و دترجنت‌های غیر یونی حساس و همچنین عامل CCHF مانند سایر خانواد بو نیاویریده، به هیپوکلریت سدیم، فرمالدهید، بتاپروبیولاکترن (٪۰/۱ در ۴ درجه سانتی‌گراد برای سه روز) و یا حلال‌های لیپدی حساس است.نمونه سرمی باید توسط حرارت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه غیر فعال شود. نمونه بافت باید در بافرفرمالین٪۱۰ و یا سایر ثابت کننده‌های بافتی که جهت تشخیص ویروس قابل استفاده می‌باشند، قرار گیرد. همچنین تیمار با استون (٪۱۰۰– ۸۵)، گلوترالدهید (٪۱ بیشتر) و با فرمالین٪۱۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه مناسب می‌باشد. کلیه واکنش‌گرهای تشخیصی که در آزمایشگاه BSL۴ مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید قبل از استفاده مورد تابش قرار گیرند (۱۰، ۱۱).

نمونه‌گیری

انسان

برای مراقبت بیماری سه تعریف طبقه بندی شده (مظنون – محتمل – قطعی) وجود دارد:

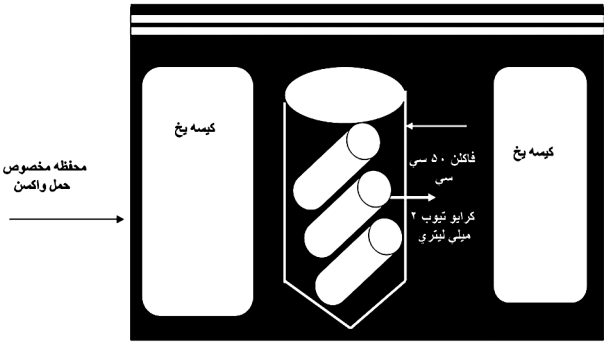
تعریف مظنون (Suspected): شروع ناگهانی بیماری با تب + درد عضلات + تظاهـرات خونریزی دهنده (شامل: راش پتشی، خونریزی از بینی و مخاط دهان، استفراغ خونی یا ملنا، هماتوری) + یکی از علایم اپیدمیولوژیک (سابقه گزش با کنه یا له کردن کنه با دست، تماس مستقیم با خون تازه یا سایر بافت‌های

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

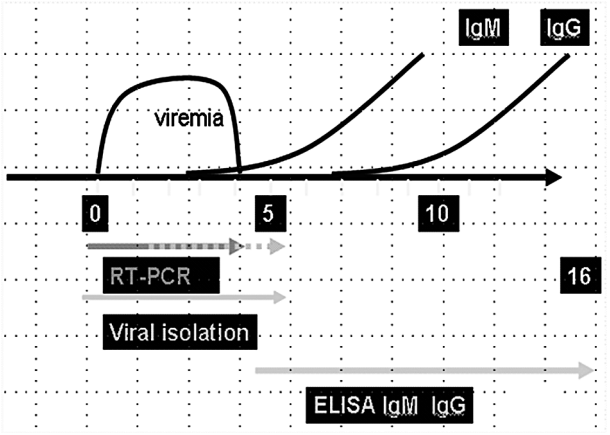
دام‌ها و حیوانات آلوده، تماس مستقیم یا ترشحات دفعی بیمار قطعی یا مشکوک به CCHF، اقامت یا مسافرت در یک محیط روستایی که احتمال تماس با دام‌ها وجود داشته اما یک تماس خاص تصادفی را نمی‌توان مشخص نمود.

تعریف محتمل (Probable): موارد مظنون + ترمبوسیتوپنی (کاهش پلاکت کمتر از ۱۵۰۰۰۰ در میلی مترمکعب) که می‌تواند با لکوپنی (گلبول سفید کمتر از ۳۰۰۰ در میلی مترمکعب) یا لکوسیتوز (گلبول سفید بیش از ۹۰۰۰ در میلی مترمکعب) همراه باشد. طبق جدول معیارهای تشخیص بالینی تب خونریزی دهنده کریمه- کنگو چنانچه جمع امتیازهای ۱۲ و یا بیشتر شود نیز به عنوان مورد محتمل تلقی شده و تحت درمان قرارمی گیرد.

تعریف قطعی (Confirmed): موارد محتمل + تست سرولوژیک مثبت یا جدا کردن ویروس براساس دستور العمل کشوری نمونه‌گیری سرم از موارد مشکوک به بیماری CCHF در سه نوبت انجام می‌گردد که شامل: روزهای صفر (بلافاصله پس از تشخیص بالینی بیمار)، روز پنجم (پنج روز پس از اولین نمونه‌گیری)، و روز دهم (ده روز پس از اولین نمونه‌گیری) است و در هر بار نمونه‌گیری ۱۰ سی سی از خون بیمار مشکوک را سانتریفوژ نموده و سرم جدا شده را در سه عدد لوله میکروتیوب دو میلی لیتری ریخته و در شرایط رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه مورد تایید وزارت بهداشت انتقال داده می‌شود.طرح شماتیک حمل نمونه در شکل ۱ آورده شده است. لازم به یادآوری است که کلیه مراحل نمونه‌گیری، انتقال و آزمایش باید تحت شرایط ایمنی خاص و با احتیاط کامل انجام گیرد. زمان ویرمی و پاسخ آنتی بادی (IgG و IgM) دربیماری تب خونریزی دهنده کریمه – کنگو و کاربرد



شکل ۱- تصویری شماتیک از حمل نمونه سرم محتمل جهت تشخیص آزمایشگاهی (برگرفته از دستور العمل کشوری وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی)



شکل ۲- زمان ویرمی و پاسخ آنتی بادی (IgG و IgM) در بیماری تب خونریزی دهنده کریمه – کنگو جهت استفاده در آزمون‌های تشخیصی سرولوژی و مولکولی (۱۰، ۱۱)

آزمون‌های سرولوژی و مولکولی در تشخیص آن در شکل ۲ آورده شده است [برگرفته از دستور العمل کشوری وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی] (۱۲، ۱۳).

دام

عفونت با این ویروس در دام بدون علامت بوده و زمان دقیق بروز ابتلا به ویروس در این حیوانات مشخص نمی‌باشد لذا در دام‌های مشکوک و یا در موارد تحقیقاتی از دام‌ها، یک بار نمونه خون تهیه شده و پس از تهیه سرم آن، از نظر وجود یا عدم آنتی بادی IgG مورد بررسی قرار می‌گیرند. در هر نمونه‌گیری پس از ثبت مشخصات دام و سایر اطلاعات لازم (جنس، سن، کد، نام صاحب دام، روستا، بخش، تاریخ) ۱۰ – ۵ میلی لیتر خون دام را با احتیاط کامل با استفاده از ونوجکت از ورید ژیگولار گردن دام تهیه و در داخل جعبه یخ دار قرار گیرد و مدت ۶۰ – ۳۰ دقیقه صبر نموده تا نمونه لخته بسته، سپس نمونه‌ها را در سریعترین زمان ممکن تحت شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی و درمانی جهت سانتریفوژ نمودن و تهیه سرم ارسال شود.در آزمایشگاه ابتدا با یک لوله مخصوص سطح لخته خون را از جداره شیشه نمونه خون جدا نموده و سپس نمونه‌ها را داخل دستگاه سانتریفوژ قرار داده و پس از تنظیم نمودن، نمونه‌ها را به مدت ۱۰ – ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ سانتریفوژ نموده و در مرحله بعدی سرم جدا شده از هر نمونه را با استفاده از سمپلر در ۳ میکروتیوب (۱/۵ – ۱ میلی لیتر) ریخته و پس از بستن درب میکروتیوب و

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

پوشاندن با پارافیلم و درج کد نمونه بر روی آن نمونه‌های سرم را به یخچال انتقال و تحت شرایط زنجیره سرد در مدت حداکثر ۳۶ساعت به آزمایشگاه مورد تایید سازمان دامپزشکی ارسال نموده یا در غیر این صورت نمونه‌ها را در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد قرار داده و در اولین فرصت ممکن آنها را به همان صورت منجمد به آزمایشگاه مورد تایید سازمان دامپزشکی جهت آزمایش‌های سرولوژی ارسال گردند (۱۰، ۱۲، ۱۳).

کنه

کنه‌ها را از بدن (لاله گوش، کشاله ران، قاعده دم، پشت و زیر گردن) با استفاده از پنس سر کج جدا نموده، طوری که به کنه آسیب نرسد، سپس کنه‌ها را داخل لوله یا قوطی مخصوص جمع‌آوری قرار داده و روی لوله یا قوطی، کلیه مشخصات، شامل: تاریخ صید، نام روستا، نام صاحب دام، کد دام و تعداد کنه جمع‌آوری شده از دام درج گردد و در شرایط مناسب از لحاظ رطوبت و دما، کنه‌ها را به آزمایشگاه جهت شناسایی و تعیین گونه ارسال گردد. پس از تعیین گونه، هر کنه را درون یک میکروتیوب قرار داده و با درج کد مربوطه، به آزمایشگاه مورد تایید سازمان دامپزشکی جهت آزمایش مولکولی ارسال شود. رعایت موارد ایمنی در حین نمونه‌گیری و سایر مراحل کار بسیار ضروری و لازم است (پوشیدن دستکش لاتکس، ماسک، لباس کار و غیره) (۱۰، ۱۲، ۱۳).

جداسازی ویروس

ویروس CCHF به‌طور معمول از تزریق داخل مغزی (IC) به موش‌های جوان شیرخوار مانند سایر عوامل آربو ویروسی تکثیر می‌یابند. ویروس سبب ایجاد بیماری و مرگ در موش‌های شیرخوار بروش داخل مغزی و یا داخل محوطه بطنی (IP) ظرف ۶-۴ روز می‌نماید. در داخل آزمایشگاه، رده‌های مختلف سلولی جهت کشت ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. این رده‌ها، عبارتند از: سلول اولیه جنین جوجه، جنین انسان، سلول کلیه میمون سبز و رده‌های سلولی سرطانی مانند: MK۲CER, LLC-SW۱۳,VeroE۶, Vero۶ می‌باشند. رده‌های سلولی با منشا کنه‌ای نیز مورد استفاده قرار گرفتند اما به علت شرایط خاص و پیچیده کشت این ویروس زیاد مورد توجه نمی‌باشند.بسیاری از سویه‌های CCHFV، اثرات ساتیوپاتیک ایجاد نمی‌نمایند و تکثیر ویروس ظرف ۶-۲ روز از کشت توسط آزمون ایمونو فلورسانت غیر مستقیم با استفاده از مایع آسیت فوق ایمن شده موش و مونوکلونال آنتی بادی علیه پروتئین نوکلئوکپسید صورت می‌پذیرد.در هر صورت واکنش متقاطع کمی با نایروویروس‌های مشابه مانند هازار و همچنین دگبی و ویروس بیماری گوسفند نایروبی ایجاد می‌نمایند.اغلب مونوکلونال آنتی بادی علیه نوکلئوکپسید واکنش متقاطعی را با سایر سویه‌های CCHFV ایجاد می‌کند. به علاوه اینکه واکنش متقاطع با دیگر نایروویروس، ویروس Qualyub، مشاهده شده است. تشخیص رشد ویروس با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) نیز صورت می‌گیرد. سایر روش های کلاسیک مانند ایمونودیفوژن، تثبیت کمپلمان و ممانعت از همگلوتیناسیون نیز برای تشخیص رشد ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد.رده سلولی SW-۱۳ به‌طور گسترده‌ای جهت جداسازی CCHFV در آسیا، روسیه و آفریقا مورد استفاده قرار می‌گیرد و ظرف چهار روز ویروس در این رده سلولی پلاک ایجاد می‌کند.اگرچه رده‌های سلولی در جداسازی ویروسی دارای حساسیت کمتری نسبت به تزریق داخل مغزی در موش شیرخوار برخوردار بوده اما آنها جواب سریع‌تری را در معرض محققین و واحدهای تشخیص قرار می‌دهند.در آفریقای جنوبی از ۲۶ نمونه جهت تشخیص CCHF، ۲۰ مورد آن از تزریق به موش شیرخوار و در ۱۱ مور از کشت سلولی جدا گردید. جدا سازی ویروس CCHF از کنه فقط با تزریق داخل مغزی به موش شیرخوار قابل انجام است. به هر حال، روش‌های داخل آزمایشگاهی ۱۰ تا ۱۰۰ برابر تیتر کمتری نسبت به تزریق داخل مغزی به موش شیرخوار ایجاد می‌نمایند. ویروس به محض مشاهده علایم بالینی قابل تعیین بوده و به مدت طولانی (تا ۱۲ روز) باقی می‌ماند. (حتی با حضور IgM بالا). بیمارانی که دچار CCHF بسیار حاد گردیده اند، ویروس تا $۱۰^{۶/۲}$ LD۵۰ در موش تیتر ایجاد نموده است.در عفونت آزمایشگاهی که در شترمرغ ایجاد گردیده، ویروس فقط ۴ روز بعد از ایجاد عفونت تعیین و آنتی بادی از روز ۵ تا ۱۳ قابل تشخیص گردید (۱، ۲، ۱۰).

تشخیص سرولوژیک

تشخیص سرولوژیک عفونت CCHF بر اساس تعیین آنتی‌بادی ویژه

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

IgM در IgG که توسط سیستم ایمنی میزبان به ویژه علیه نوکلئوکپسید ایجاد می‌گردد، استوار است.افزایش تیتر چهار برابری در IgM در دو نمونه خون نشان دهنده عفونت می‌باشد. تشخیص سرولوژیکی حتی چندین روز پس از بیماری قابل اعتماد است. اگرچه ممکن است در موارد کشنده پاسخ سرولوژیک مشاهده نگردد.آزمون‌های سرولوژیک مختلفی جهت تشخیص این بیماری وجود دارد.

آزمون فلورست غیر مستقیم (IFA): روش IFA یک روش مناسب و راحت جهت تشخیص سرولوژیکی بیماری‌ها می‌باشد. اسلایدهای سلول‌های عفونی شده با CCHF در BSL۴ آماده می‌گردند و قبل از استفاده فیکس می‌شوند. دقت‌های سرم نمون از ۲۵/۱ تا ۵۰/۱ آماده می‌گردد و در نهایت توسط FITC تشخیص گذاشته می‌شود. در این مورد جهت تشخیص IgM، تیمار سرم جهت حذف فاکتور روماتوئید با واکنش گرهای تجاری صورت می‌گیرد. IFA (پیوتین- استرپتوآویدین) آنتی بادی IgM را در ٪۲۵ بیماران زودتر تشخیص می‌دهد.روش IFA قابلیت تشخیص IgM از روز ۴ شروع بیماری را در افرادی که زنده می‌باشند دارا می‌باشد.آزمون IFA با آنتی ژن طبیعی جهت تفریق سرو لوژیکی تب‌های خونریزی دهنده ابولای سودان، ابولای زئیر، ماربورگ، تب دره ریفت، لاسا و CCHF صورت می‌گیرد. جهت غلبه بر مشکلات تهیه اسلاید در BSL۴، پروتئین نو ترکیب نوکلئو کپسید جهت تولید اسلاید مورد استفاده قرار گرفته است.سلولهای Hela، ژن نوکلئو کپسیدویروس CCHF را از سویه چینی ۴۸۰۲ بیان می‌کنند، جهت تولید آنتی ژن جهت IFA کشت داده می‌شوند.از سوی دیگر از سیستم Semliki Forest جهت بیان نوکلئو کپسیدسویه IbAr ۱۰۲۰۰ . به کار گرفته شده است (۱۰، ۱۴).بیشترین روشی که برای تشخیص IgG استفاده می‌شود، الایزای ساندویچ است که آنتی ژن ویروس در پلیت‌هایی که با آنتی بادی ضد ویروس CCHF پوشیده شده، تعیین می‌گردد. این روش‌ها به صورت گسترده جهت بررسی سرمی در حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد.الایزای رقابتی با استفاده از کونژوگه پروکسید از ضد ویروس خرگوشی جهت تست گونه‌های مختلفی از حیوانات اهلی و وحشی صورت می‌گیرد.۳ مورد از ۷۲ مورد تایید شده CCHF در بیماران آفریقای جنوبی دارای واکنش متقاطع با ویروس‌های هازارا، دگبر و گوسفند نایروبی با استفاده از آزمون الایزا بودند. در یک مطالعه دیگر یک عدد از ۱۶۲ مورد تایید شده توسط الایزا با آنتی ژن دیگر واکنش نشان داد. شرکت EuroImmnue نیز اسلایدهای تجاری جهت تشخیص IgM و IgG را نیز با آنتی ژن‌های نوترکیب تولید نموده است.در حال حاضر مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم قادر به انجام این آزمون می‌باشد (۱۵، ۱۶).

مهار آگلوتیناسیون مهاری غیر فعال معکوس (RPHA): مهار آگلوتیناسیون مهاری غیر فعال معکوس (RPHA) توسط آنتی بادی سنتتیک علیه ویروس CCHF، گلبول قرمز گوسفندی تثبیت شده با گلوترآلدهید و آنتی ژن غیر فعال شده با استون مغز موش شیرخوار عفونی شده صورت می‌گیرد. این روش جهت تشخیص آنتی بادی علیه ویروس CCHF در جانوران وحشی و انسان کاربرد دارد (۱۰).

آزمون الایزا (ELISA): الایزا رایج‌ترین روش تشخیص آنتی بادی علیه CCHFV می‌باشد که از ایمونو فلورسنت غیر مستقیم حساس‌تر می‌باشد.این روش ابتدا با استفاده از آنتی ژن طبیعی که در مغز موش شیرخوار و یا کشت سلول تهیه گردیده، انجام می‌شود.رایج‌ترین منشا آنتی ژن CCHFV از ساسپنسیون مغز موش شیرخوار عفونی شده و یا مغز موش شیرخوار عفونی شده با بتاپیرپیولاکتون یا حرارت (یک ساعت، ۶۰ سانتی گراد) به دست می‌آید. تولید کلیه آنتی ژن‌های طبیعی در آزمایشگاه‌های BSL۴ صورت می‌گیرد و قبل از استفاده اشعه تابانده می‌شود.عدم واکنش متقاطع یا واکنش ضعیف در سرم حیوانات در سنگال گزارش گردیده است (۱۰، ۱۳).استفاده از پروتئین نوترکیب نوکلئوپروتئین با منشا سویه‌های Nigeria IbAr۱۰۲۰۰ و China ۸۴۰۲, Greec AP۹۲ جهت استفاده در الایزا گزارش گردیده و الایزای انجام شده جهت اندازهگیری IgM, IgG بسیار حساس و اختصاصی بوده است. زمانی که آنتی ژن‌های فوق با گروه نایروویروس مورد بررسی قرار گرفت، فقط با CCHF و به طور ضعیف با ویروس هازار واکنش نشان داد.به طور معمول IgG و IgM، ۴ تا ۵ روز پس از شروع علایم شروع به افزایش می‌نمایند. در بیماران آفریقای جنوبی، آنتی بادی در ٪۱۰، ٪۶۵، ٪۸۳، ٪۹۴ و ٪۱۰۰ بیماران در روز ۴، ۶، ۷، ۸، ۹ به ترتیب تشخیص داده شده است. بیشترین میزان تیتر IgM، ۳-۲ هفته پس از شروع بیماری و میزان تیتر IgM چهار ماه بعد از بیماری غیر قابل تشخیص می‌باشد. اما میزان تیتر IgG به مدت چندین سال باقی می‌ماند.همچنین بقای فعالیت آنتی بادی IgM در نشخوار کنندگان از انسان کوتاه‌تر می‌باشد (۱۷، ۱۸).

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

تعیین آنتی ژن: تشخیص آنتی ژن یک روش بسیار مناسب جهت تشخیص عفونت‌های حاد این بیماری می‌باشد.آنتی ژن ویروس توسط روش Capture- ELISA یا آزمون هماگلوتیناسیون پسیو معکوس (RPIAA) تعیین می‌گردد که روش الایزا در مطالعات گوناگون حساس‌تر تشخیص داده شده است.به‌موازات جداسازی ویروس، حضور آنتی ژن در خون به طور رایج‌تری در موارد کشنده انسانی (۹/۱۱) نسبت به موارد غیر کشنده (۹/۱۷) تشخیص داده شد.در بیمارانی که زنده می‌مانند، اگر نمونه ۵ روز پس از شروع بیماری گرفته شود حضور آنتی ژن در خون با اعتماد بالاتری قابل تشخیص می‌شود و این احتمالا به علت تشکیل کمپکس ایمنی می‌باشد.ایمنوهستیو شیمی و تکنیک‌های هایبریداسیون جهت تشخیص آنتی ژن در بافت‌های تثبیت شده با فرمالین مورد استفاده قرار می‌گیرند. توزیع ویروس در ۱۲ مورد کشنده بیماری در آفریقای جنوبی مورد بررسی قرار گرفت. که در این مطالعه ۱۰ مورد بافت کبدی توسط ایمونوهستیو شیمی مثبت و ۵ مورد نیز توسط هایبریداسیون مثبت گردید (۱۰، ۱۴).

تشخیص مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR) روشی حساس جهت تشخیص عوامل مختلف و همچنین سنجش کمی ویروس در نمونه در مدت زمان کوتاهی می‌باشد. سرعت بالا و تشخیص ظرف هشت ساعت از موارد ذکر شده مفید روش مولکولی بر روش کشت ویروس بوده است. PCR نمونه‌های بسیاری که کشت ویروس آن منفی گردیده، مثبت شده است.از دیگر مزایای PCR استفاده از آن به صورت مطالعه گذشته نگر بر روی نمونه سرم‌ها می‌باشد.روش مولکولی قابلیت بررسی مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و همچنین تشخیص از کنه را فراهم می‌کند. RNA ویروسی در سرم افراد تا چندمین روز پس از بیماری قابل تشخیص است. حداقل در بیماران مبتلا به HIV جمع کردن خوندر لوله‌های حاوی EDTA نشان داده است که عملکرد PCR افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای ویروس در دو نمونه‌ای که ۱ و ۱۳ روز پس از شروع بیماری گرفته شده بودند بر روی Vero۷۶ یا مغزی موش شیرخوار جدا گردید اما در ۱۲ نمونه ژنوم ویروس از ۱۶-۱۲ روز پس از بیماری تشخیص داده شد. در نمونه‌هایی که جهت تشخیص مولکولی مطرح می‌باشد، ویروس در ۶۰/۱۵ مورد از بزاق بیمارجدا گردید. اگرچه میزان ویروس نسبت به خون کمتر بود اما دارای همبستگی معنی‌داری بود. ژنوم ویروس می‌تواند با استفاده از دستورالعمل‌های بر مبنی استفاده از دترجنت، در آزمایشگاه BSL۲صورت گیرد.اغلب مرحله نسخه برداری معکوس (RT) در تکنیک‌ها، خطر آلوده شدن را کاهش می‌دهد (۱، ۱۰). جهت تشخیص مولکولی ویروس CCHF از نواحی ثابت ژن کوچک (S) ویروس که نوکلئوپروتئین را کد می‌کند، استفاده می‌نمایند.پرایمرهای معروف $F_۲,F_۳$ (که قطعه ۵۳۶ جفت باز را تکثیر می‌کنند) و $F_۳,R_۲$ (که در مرحله آشیانه‌ای (Nested) قطعه۲۵۹ جفت باز را تکثیر می‌کنند) بر اساس سویه مرجع IbAr ۱۰۲۰۰ که ازنوعی کنه هیالوما (H.exacavatum) در سال ۱۹۷۰ در نیجریه جدا گردید، طراحی شده است.توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ آورده شده است.RFLP جهت تجزیه و تحلیل سکانس‌ها قبل توالی یابی قابل استفاده می‌باشد. در نمونه‌های سرمی کم و یا کنهباید از روش آشیانه‌ای (Nested) جهت تشخیص دقیق استفاده نمود.کیت‌های استفاده شده جهت استخراج ژنوم از سرم و کنه در جدول شماره ۳ و ۴ آورده شده است.یک واکنش RT – PCR موفق به یک الگوی RNA سالم و با کیفیت بالا نیاز دارد. RNA استخراج شده بیش از ۲ تا ۳ ساعت قابل نگهداری نیست و سریع باید از روی آن cDNA تهیه شود. تمام مراحل استخراج RNA

جدول ۳- کیت قابل استفاده جهت استخراج RNA از کنه

	نام کیت	شرکت
۱	TRIzol	Invitrogen
۲	RNeasy Mini Kit	Qiagene
۳	High Pure RNA Isolation Kit	Roch

جدول۲- لیست پرایمر جهت استفاده در تشخیص ویروس بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو با استفاده از RT-PCR (۳۲)

افراد	سال	پرایمر جلوخوان	پرایمر عقب‌خوان
Burt et al	۱۹۹۸	TGG ACA CCT TCA CAA ACT C	GAC AAA TTC CCT GCA CCA

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

جدول ۴- کیت قابل استفاد جهت استخراج RNA از سرم

	نام کیت	شرکت
۱	TRIzol	Invitrogen
۲	QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagene
۳	High Pure RNA Isolation Kit	Roch
۴	AccuPrep Viral RNA Extraction	BioNeer

در زیر هود بیولوژیک مجهز به فیلتر سه مرحله‌ای که از قبل با نور UV استریل شده و با استفاده از سرسمپلرها و میکروتیوب‌های استریل شده و RNase Free انجام شود و همچنین از دستکش‌های لاتکس و ماسک حین کار کردن استفاده شود. همچنین سرسمپلر و میکروتیوب‌های آلوده، در محلول آب ژاول ۱۰ درصد نگهداری شده و پس از استریل کردن با استفاده از دستگاه اتوکلاو دور ریخته شود. برای کاهش فعالیت RNase که در حین لیز سلولی آزاد می‌شود، بهتر است در زمان لیز سلولی و استخراج RNA از بازدارنده‌های RNase استفاده نمود. در تجربه نویسندگان استفاده از RNase out در مرحله تشخیص، مفید واقع می‌شود. برنامه PCR جهت انجام واکنش طبق جدول شماره ۵ می‌باشد. (لازم بذکر است برنامه ذکر شده جهت

جدول ۵- جدول برنامه PCR جهت تکثیر cDNA ویروس تب خونریزی‌دهنده کریمه کنگو (۱۹، ۲۰، ۲۱)

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱ سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰	۴۰ سیکل
اتصال	۵۰	۳۰	
تکثیر	۷۲	۴۰	
تکثیر انتهایی	۷۲	۱۰	۱ سیکل

استفاده از کیت‌های دو مرحله ایمی باشد) ابتدا جهت مرحله، نسخه برداری معکوس cDNA (RT) را با استفاده از پرایمر R_3 و یا Random Hexamer ساخته و سپس PCR طبق برنامه اجرا می‌گردد. قلیان چی و همکاران سه نوع کیت تک مرحله‌ای شرکت‌های کیاژن (Qiagene)، بیونیر (Bioneer) و آمرشام (Amersham) را با یکدیگر جهت تشخیص ژنوم ویروس CCHF مقایسه نمودند. در این مطالعه هر یک از کیت قابلیت تشخیص ژنوم ویروس را داشته، اما کیت کیاژن باندهای واضح تری ایجاد نمود (۱۹، ۲۰، ۲۱).در One- Step Real- Time RT PCR با استفاده از پرایمرهایی که ژن S را هدف قرار می‌دهند، جهت تشخیص CCHF توسعه یافته است.

جدول ۶- لیست پرایمر و پروب جهت استفاده در تشخیص ویروس بیماری تب خونریزی دهنده کریمه کنگو با استفاده از Real Time RT-PCR (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹)

افراد	سال	پرایمر جلوخوان	پرایمر عقب‌خوان	پروب
Dorsten et al	۲۰۰۲	ATGCAGGAACCATTAARTC TTGGGA	CTAATCTAATCATATCTGACAACA TTT	FAM-CTAATCATGTCTGAC AGCATCTC-TAMRA
Yapar et al	۲۰۰۵	TCTTYGCHGATYTCHTTYC	GGGATKGTYCCRAAGCA	FAM-ACASRATCTAYATGCAYCC TGCAYCCTGC- TAMRA
Simon et al	۲۰۰۶	GGC TGG CGTGACTCCTGA	TGGCTGTTTCCCTAGCTCAAA	FAM ACC TTC CCG ACG GTG TCA CAG TTC C TAMRA
Duh et al	۲۰۰۶	GCTTGGGTCAGCTCTACTG G	GCATTGACACGGAAACCTA	FAM- AGAAGGGGCTTGAGTG- DABCYL
Garrison et al	۲۰۰۷	GGA GTG GTG CAG GGA ATT TG	CAG GGC GGG TTG AAA GC	FAM-CAA GGC AAG TAC ATC A T-MGBNFQ
Wolf et al	۲۰۰۷	CAAGGGGTACCAAGAAAAT GAAGAAGGC	GCCACAGGGATTGTTCCAAAGCA GAC	FAM-ATCTACATGCACCCTG CTGTGTTGACA-TAMRA
Kondiah et al	۲۰۱۰	G(C/T)TGCTGG(C/T)TAGAG TCAG	CTCAAAGATATAGTGGCTGC	FAM-GCTCCTTTTATCCTGTTAAX ITACTTTTCTT-TAMRA

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

در روش‌های اولیه روش سایبرگرین (SyberGreen) مورد استفاده قرار گرفته و هم اکنون بر اساس روش TaqMan استوار گردیده است. کلیه پرایمرها و پروب مورد استفاده در مطالعات محققین در زمینه تشخیص بیماری CCHF در جدول شماره ۶ ذکر گردیده است. این روش نسبت به روش سنتی دارای حساسیت بالاتری بوده و علاوه بر داشتن خطر آلودگی کمتر، قابلیت تعیین میزان ویروسی را نیز دارد.حساسیت با استفاده از پلاسیمد استاندارد از $۱۰^{۲}$ تا $۱۰^{۷}$کپی در هر میلی لیتر گزارش گردیده است و می‌توان حدت بیماری را با این تعیین غلظت ویروسی در سرم بیمار پیش بینی نمود (۲۳-۲۹). شرکت Prime Design (UK)، دو نوع کیت Real-Timeاستاندارد و پیشرفته جهت تعیین میزان ویروس بر اساس نوکلئوکپسید ویروسی ژن طراحی کرده است که از ویروسهای متفاوت با توزیع جغرافیایی متنوع جهت طراحی آن استفاده شده است.این کیت تجاری دارای کنترل‌های مثبت، کنترل مثبت داخلی، کنترل استخراج و سایر موارد کنترل کیفی مناسب می‌باشد. مطالعات شخصی نویسندگان نشان می‌دهد بسیاری از سویه‌های ایران با این کیت جواب مناسب نمی‌دهد (۱۹).

روش‌های نوین

یک روش ماکرواری (MacroArray) با دانسیته پایین جهت تشخیص بیماری در کشورهای در حال توسعه و انجام عملیات تشخیص در فیلد ابداع گردیده که توانایی تشخیص ۶/۳ کپی ازژنوم را در هر واکنش دارد و با سویه‌های پاکستان، ایران و آفریقا اعتبار سنجی گردیده است. از مزایای روش فوق علاوه بر ویژگی و حساسیت، سرعت بالای تشخیص می‌باشد.درحال حاضر کیت تشخیص جدیدی جهت پایش سرمی بر اساس تکنیک پلی مریک میکروسفر تشخیص جهت آگلوتیناسیون حجمی در روسیه طراحی گردیده است. هم اکنون این جهت در کنار الایزا و PCR در سطوح مختلف همه‌گیر شناسی بیماری در روسیه در حال استفاده می‌باشد. یکی دیگر از راهکارهای تشخیص این بیماری استفاده از میکروسکوپ الکترونی در مقاطع اندام‌های بدن بیمار مانند کبد می‌باشد که با توسعه میکروسکوپ الکترونی در دنیا در حال رایج شدن است. همچنین تراشه‌های (Chip) تشخیصی ریز آرایه (MicroArray) با همکاری شرکت کیاژن تولید گردیده است (۱۰، ۳۰، ۳۱).

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص سریع برای درمان به موقع بیماران، جلوگیری از عفونت‌های بیمارستانی و حملات بیوتروریستی ناشی از CCHF مفید و همچنین تشخیص بین سویه‌های غیر نوترکیب شده و نوترکیب شده بسیار حیاتی است با توجه به موارد عنوان شده و تجربیات شخصی نویسندگان و هچنین امکانات موجو در کشور و کمبود اطلاعات از عامل این بیماری، باید روش‌های بومی در هر سه جنبه تشخیصی ذکر شده، بویژه با تاسیس امکانات آزمایشگاهی با امنیت زیستی چهار طراحی و عملیاتی شود.همچنین با توجه به وضعیت اپیدمیولوژی بیماری، ساختار ژنتیکی ویروس و بحث بیوتروریستی بودن عامل بیماری توصیه می‌شود پایش دقیق و منظمی از این ویروس در مناطق مرزی کشور صورت گیرد.

References

1- Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever.Antiviral Res. Dec 2004;64 (3): 145-160.
2- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 5th ed. Philadelphia; London: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
3- Morrill JC. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. Vector Borne Zoonotic Dis. Feb 9 2008.
4- Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. Apr 2008;78 (1): 125-131.
5- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever.Rev Infect Dis. May-Jun 1989;11 Suppl 4: S794-800.
6- Naficy K, Saidi S. Serological survey on viral antibodies in Iran. Trop Geogr Med. Jun 1970;22 (2): 183-188.
7- Saidi S, Casals J, Faghih MA. Crimean hemorrhagic fever-Congo (CHF-C) virus antibodies in man, and in domestic and small mammals, in Iran.Am J Trop Med Hyg.Mar 1975;24 (2): 353-357.
8- Sureau P, Klein JM. [Arboviruses in Iran (author's transl)].Med Trop (Mars).Sep-Oct 1980;40 (5): 549-554.
9- Chinikar S, Ghiasi S, Ghalyanchi-Langeroudi A, et al. An overview of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. Iranian Journal of Microbiology.2009;1 (1): 7-12.
10- Ergonul O, Whitehouse CA. Crimean-congo hemorrhagic fever: a global perspective. Berlin: Springer; 2007.

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

11- Morshed MG, Lee MK, Jorgensen D, Isaac-Renton JL. Molecular methods used in clinical laboratory: prospects and pitfalls. FEMS Immunol Med Microbiol.Mar 2007;49 (2): 184-191.

12- Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, et al. Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran. Transbound Emerg Dis. Aug 2008;55 (5-6): 200-204.

13- Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Arch Iran Med. Apr 2007;10 (2): 204-214.

14- Emmerich P, Avsic-Zupanc T, Chinikar S, Saksida A, Thome-Bolduan C, Parczany-Hartmann A, Langroudi AG, Moradi M, Ahmeti S, Gunther S and others. Early serodiagnosis of acute human Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections by novel capture assays. J Clin Virol 48 (4): 294-5.

15- Qing T, Saijo M, Lei H, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S. 2003. Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. J Virol Methods 108 (1): 111-6.

16- Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S. 2002. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol 40 (2): 372-5.

17- Larichev VF, Manzeniuk IN, Naidenova EV, Karan LS, Sharova IN, Shcherbakova SA, Khutoretskaia NV, Skorokhod MA, Kulichenko AN, Vorob'eva MS and others. 2007. [ELISA and PCR test systems used to detect Crimean-Congo hemorrhagic fever virus]. Vopr Virusol 52 (4): 43-6.

18- Onishchenko GG, Tumanova I, Vyshemirskii OI, Kuhn J, Seregin SV, Tiunnikov GI, Petrova ID, Tishkova F, Ospanov KS, Kazakov SV and others. 2005. [ELISA and RT-PCR-based research of viruses in the ticks collected in the foci of Crimean-Congo fever in Kazakhstan and Tajikistan in 2001-2002]. Vopr Virusol 50 (1): 23-6.

19- Ghalyanchi Langeroudi AaRM, T. Jalali, M. Moradi, S.M. Ghiasi, N. Afzali, M.Rahpeyma, M. Markaryan, S. Chinikar,. Comparison Of Three One-Step Rt-Pcr Commercial Kits For Molecular Diagnosis Of Crimean-Congo Hemorrhages Fever Virus (CCHFV); 2008; University of Tehran, Tehran,Iran.

20- Ghalyanchi Langeroudi, A., Comparison Of Three One-Step Rt-Pcr Commercial Kits For Molecular Diagnosis Of Crimean-Congo Hemorrhages Fever Virus (CCHFV), in 6th European Meeting on Molecular Diagnostics. 2009: Netherlands.

21- Majidzadeh, K. Soleimani,M.,, Ghalyanchi Langeroudi, A,Edalat,R., Jamshidian,E.,Morovvatti,A., Design of multiplex PCR for Molecular diagnosis of RVF and CCHF Diseases, In The 19th Iranian Congress on Infectious disease and tropical medicine. 2010. Tehran - Iran.

22- Duh D, Saksida A, Petrovec M, Dedushaj I, Avsic-Zupanc T. 2006. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. J Virol Methods 133 (2): 175-9.

23- apar M, Aydogan H, Pahsa A, Besirbellioglu BA, Bodur H, Basustaoglu AC, Guney C, Avci IY, Sener K, Setteh MH and others. 2005. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. Jpn J Infect Dis 58 (6): 358-62.

24- Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 40 (7): 2323-30.

25- Kondiah K, Swanepoel R, Paweska JT, Burt FJ. A Simple-Probe real-time PCR assay for genotyping reassorted and non-reassorted isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in southern Africa. J Virol Methods 169 (1): 34-8.

26- Ibrahim SM, Aitichou M, Hardick J, Blow J, O'Guinn ML, Schmaljohn C. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever, Hanta, and sandfly fever viruses by real-time RT-PCR. Methods Mol Biol 665: 357-68.

27- Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, Georges-Courbot MC, Papa A, Gunther S, Drosten C. 2007. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. Emerg Infect Dis 13 (7): 1097-100.

28- Garrison AR, Alakbarova S, Kulesh DA, Shezmukhamedova D, Khodjaev S, Endy TP, Paragas J. 2007. Development of a TaqMan minor groove binding protein assay for the detection and quantification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Am J Trop Med Hyg 77 (3): 514-20.

29- Simon M, Falk KI, Lundkvist A, Mirazimi A. 2006. Exogenous nitric oxide inhibits Crimean Congo hemorrhagic fever virus. Virus Res 120 (1-2): 184-90.

30- Verkina LM, Pichurina NL, Lomov Iu M, Narkevich AN, Terent'eva AN, Karbyshev GL, Vodianitskaia S, Moskvitina EA. 2009. [Novel diagnostic kit on the basis of stained polymeric carriers for epidemiologic surveillance in natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol (5): 70-4.

31- Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, Georges-Courbot MC, Papa A, Heiser V, Panning M and others. 2009. Low-density macroarray for rapid detection and identification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol 47 (4): 1025-30.

32- Burt FJ, Leman PA, Smith JF, Swanepoel R. 1998. The use of a reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. J Virol Methods 70 (2): 129-37.

J Army Univ Med Sci. 2011 Dec; 9(4): 275-284

Downloaded from journals.ajaums.ac.ir at 18:09 +0330 on Friday October 20th 2017

Review on the Laboratory Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever

Majidzadeh Ardabili K; PhD[1], Soleimani M; PhD[1], *Gheilanchi Langrodi A; DVM, DVSc[2]

Received: 31 May 2011 Accepted: 2 Oct 2011

Abstract

Background: Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a potentially fatal zeonosis disease caused by a tick-borne virus from the Bunyaviridae family. The CCHF virus is transmitted to humans through the bite of the Ixodid ticks or contact with the blood or tissues of CCHF patients or infected livestock. Human infections begin with the nonspecific febrile symptoms, but progress to a serious hemorrhagic syndrome with a case fatality rate of 2-50%. As Rapid and precise diagnosis approach is critical for control, treatment and detection of patients and is useful for epidemiological studies.

Materials and Methods: We conducted a review study on the different research works on diagnosis field in the world and Iran scientific databases, according to laboratory diagnosis of CCHFin bio safety, sampling and diagnosis assays aspects.

Results: Laboratory Diagnosis of CCHF is based on three approaches: Virus Isolation, Serological assays (IIF, RPHA, and ELISA) and antigen detect assays (ELISA, RT-PCR, Real Time RT-PCR and Microarray)

Conclusion: Early diagnosis is critical for patient therapy, prevention of potential nosocomial infections and in biological attacks. Also, the ability to distinguish between an infection with a reassortant and a non-reassortant variant may have prognostic value. According to Iranian health center facilities, we should design and established domestic methods in each three approaches especially in BSL4 facilities in Iran.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF), Laboratory Tests, Diagnosis.

1- AJA University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Tasnim Biotechnology Research Center, Tehran, Iran.
2- (*Corresponding Author) University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Tehran, Iran.
Tel: +982161117000 E-mail: ghalyana@ut.ac.ir