

دستور العمل مربوط به نمونه گیری تب خونریزی دهنده کریمه- کنگو و نحوه ارسال آنها به آزمایشگاه

تهیه و تنظیم :

دکتر سید علیرضا ناجی

دکتر چینی کار

این راهنما به منظور آرایه اطلاعات علمی و
فنی لازم بر اساس اصول و استانداردهای بین
المللی در کمیته ویروس شناسی و بیولوژی
ملکولی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است.

اعضا کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی به ترتیب حروف الفبا عبارتند از:

-

-

تشخیص آزمایشگاهی تب خونریزی دهنده کریمه- کنگو

تب خونریزی دهنده کریمه- کنگو عفونت بالقوه مرگبار است که در آفریقا، آسیا، اروپای شرقی و خاورمیانه دیده میشود. عامل این عفونت ویروسی دارای ژنوم RNA به نام ویروس CCHF از اعضاء خانواده **بونیاویریده** میباشد. این ویروس از بز، گوسفند، گاو، خرگوش صحرائی، جوجه تیغی و تعدادی از کنه های مرتبط به این پستانداران جداسازی شده است. انسان بطور معمول با گزش کنه و یا در اثر تماس با خون، بافت، یا مایعات بدن حیوانات و انسان آلوده، با این ویروس آلوده میشود. بنابراین موارد انتقال عفونت در بیمارستان و یا داخل خانواده بارها گزارش شده است. بنظر میرسد انتقال از راه هوا واقعه بسیار نادر است اما نمیتوان بطور قطعی آن را رد کرد. طبق ابلاغ مرکز مدیریت بیماریها در سال ۱۳۷۹ هجری خورشیدی تعریف موارد مشکوک و موارد محتمل بیماری تب خونریزی دهنده کریمه - کنگو CCHF به شرح زیر می باشد:

• موارد مشکوک بیماری:

- شروع ناگهانی بیماری با تب
 - درد عضلات
 - خونریزی
 - یکی از علائم اپیدمیولوژیک
 - سابقه گزش با کنه یا له کردن کنه با دست
 - تماس مستقیم با خون تازه یا سایر بافتهای دام یا حیوانات بیمار
 - تماس مستقیم با خون، ترشحات یا مواد دفعی بیمار قطعی یا مشکوک به CCHF
 - اقامت یا مسافرت در یک محیط روستائی که احتمال تماس با دامهای یا کنه وجود داشته اما یک تماس خاص تصادفی را نمی توان مشخص نمود.
- **موارد محتمل بیماری:** موارد مشکوک + ترمبوسیتوپنی (کاهش پلاکت کمتر از ۱۵۰۰۰۰ در میلی لیتر) همراه با لکوپنی (گلبول سفید کمتر از ۳۰۰۰ در میلی لیتر) یا لکوسیتوز (گلبول سفید بیش از ۹۰۰۰ در میلی لیتر)

در ذیل اختصاراً" به تکنیکهای استفاده شده در تشخیص اشاره کرده و سپس جدول راهنمای روشهای آزمایشگاهی با اشاره به نمونه گیری، شرایط نگه داری و ارسال نمونه خدمتتان ارائه میگردد. لازم به تذکر است که انجام تمامی عملیات تشخیصی CCHF میبایستی در **آزمایشگاهی حداقل مجهز به هود کلاس ۳** صورت پذیرد.

۱. **کشت:** جداسازی ویروس CCHF بر روی کشت سلولی صورت میپذیرد، اما در نگاه کلی این روش از حساسیت پائین تری نسبت به روشهای امروزی و نوین برخوردار بوده و تنها غلظت های بالای ویروس را میتوان با این روش شناسائی کرد. در هر صورت ویروس CCHF را میتوان از خون و سوسپانسیون های بافتی در صیف وسیعی از رده های سلولی حساس مانند LC-MK2, Vero, BHK-21 و SW-13 در طی ۴ تا ۷ روز جداسازی کرد .
(**بعلت خطر آلودگی با ویروس ، جداسازی باید در آزمایشگاهی با سطح ایمنی 4 صورت گیرد.**)

۲. **سرولوژی :** آنتی بادیهای IgM و IgG با روش ELISA و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از حدود ۷ روز بعد از شروع بیماری قابل شناسائی هستند. IgM اختصاصی پس از گذشت ۴ ماه از عفونت به سطوح غیر قابل شناسائی کاهش یافته، اما IgG به مدت حداقل ۵ سال قابل شناسائی باقی میماند.

عفونت اخیر و فعال با نشان دادن تحول سرمی (sero-conversion)، یا افزایش ۴ برابر و یا بیشتر در تیتراژ آنتی بادی در یک جفت نمونی سرمی، یا شناسایی آنتی بادیهای IgM در یک نمونه سرمی تأیید می شود.

پاسخ آنتی بادی به ندرت در موارد مرگبار قابل شناسایی است و تشخیص معمولاً با شناسایی اجزای ویروسی (شناسایی آنتی ژن/ژنوم ویروس) در نمونه های سرم یا بیوپسی بافتی به خصوص کبد مورد تأیید قرار میگیرد.

روش ELISA کاملاً اختصاصی بوده و بسیار از روشهای ایمنوفلورسانس و آزمایش خنثی سازی حساس تر میباشد. اخیراً روش ELISA جهت شناسایی IgG بر اساس پروتئین نوترکیب نوکلئوپروتئین ویروسی جهت تشخیص سرولوژیک ویروس CCHF ابداع شده است که بسیار مفید و دقیق میباشد.

۳. روشهای تشخیص ملکولی: این تکنیکها، همانند RT-PCR روشهای تکمیلی تشخیصی در کنار تکنیکهای سرولوژیک میباشد و در حال حاضر به عنوان ابزار خط مقدم تشخیص CCHF و همچنین سایر تبهای خونریزی دهنده ویروسی در نظر گرفته میشوند.

مزایای این روشها بسیار بوده که میتوان به اختصار به اختصاصیت و حساسیت بالا، سرعت بالا در جواب دهی و استفاده در مطالعات بازنگرانه با استفاده از نمونه های سرم و یا سایر نمونه های بالینی نگه داری شده اشاره کرد.

در زیر راهنمای مربوط به روشهای آزمایشگاهی بیماری تب خونریزی دهنده کریمه - کنگو و اطلاعات مربوط به نمونه گیری و نحوه ارسال آنها به آزمایشگاه به صورت جدول آورده شده است.

لازم به ذکر است که استفاده از لباسها و لوازم حفاظتی در زمان نمونه گیری توسط شخص نمونه گیر الزامی است. الزامات مربوطه شامل پوشیدن دو جفت دستکش لاتکس، استفاده از ماسک و عینک محافظ میباشد. میبایستی دقت شود تا در زمان نمونه برداری و انتقال نمونه به لوله های مخصوص احتیاطات لازم جهت عدم آلودگی سطوح خارجی لوله به سرم / پلاسما/خون آلوده صورت پذیرد. در صورت آلودگی، ضدعفونی سطوح لوله ها الزامیست.

ارسال	آماده سازی و نگهداری	نمونه مورد نیاز	آزمایش تشخیصی
در شرایط منجمد بروی یخ خشک یا بسته های یخ یا هر دو ****	منجمد یا شرایط یخچالی ****	سرم * فاز حاد یا نقاهت **	الایژ / (سرولوژی) شناسایی: - آنتی ژن ویروسی - آنتی بادی های IgG, IgM
در شرایط منجمد بروی یخ خشک یا بسته های یخ یا هر دو ****	شرایط یخچالی یا منجمد منجمد	سرم *** بافتها (تازه-منجمد) سرم / پلاسما	PCR شناسایی: RNA

* در مورد تشخیص سرولوژیک به روش الایزا ، نمونه مناسب سرم می باشد. سانتریفیوژ کردن نمونه ها با رعایت کلیه مسائل ایمنی نظیر استفاده از دو جفت دستکش لاتکس ، عینک محافظ ، ماسک و گان های محافظ صورت می پذیرد.

. نمونه خون برای آزمایشهای سرولوژی و ملکولی از موارد محتمل در ۳ نوبت گرفته میشود؛

۱. نمونه اول بلافاصله پس از تشخیص بالینی

۲. نمونه دوم به فاصله پنج روز پس از نمونه اول

۳. نمونه سوم به فاصله ده روز پس از نمونه اول

در هر نوبت نمونه گیری مقدار کافی از خون (۱۰ میلی لیتر) از فرد محتمل گرفته شود. نمونه های خون بلافاصله به دقت سانتریفیوژ شده و سرم / پلاسما آن به کرایوتیوپ انتقال می یابد. باید توجه داشت مقدار سرم/پلاسما می بایستی به اندازه کافی (حداقل ۱/۵ میلی لیتر) باشد. درب کرایوتیوپ ها با پارافیلیم پوشانده شده و مشخصات و تاریخ نمونه گیری بروی تیوپ با ماژیک ضد آب نوشته شود. تیوپ حاوی نمونه در داخل لوله فالکن ۵۰ میلی لیتری قرار داده و در ظرف حمل نمونه از نوع ظرف حمل واکسن در حاوی کیسه یخ در شرایط زنجیره سرد به همراه فرم خلاصه بیمار و شرح و حال بیماری به آزمایشگاهی که توسط آزمایشگاه مرجع سلامت معرفی میگردد ارسال گردد.

** نمونه فاز حاد را در هنگام بستری شدن بیمار در مرکز درمانی یا از موارد مشکوک جمع آوری کنید. نمونه فاز نقاهت در هنگام ترخیص بیمار از مرکز درمانی و یا مرگ بیمار گرفته میشود.

*** در زمینه تشخیص ملکولی نمونه مناسب سرم می باشد.

**** ارسال نمونه از ۶ ساعت تا حداکثر ۲۴ ساعت پس از نمونه گیری میبایستی صورت پذیرد و در این مدت نمونه میبایستی در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود.

***** استفاده توام بسته های یخ و یخ خشک نتیجه بهتری می دهد. چنانچه یخ خشک یا بسته های یخ در دسترس نبود، نمونه ممکن است در دمای محیط سریعاً حمل شود که در اکثر موارد نیز جوابهای قابل قبول دریافت میشود.

منابع مطالعاتی:

- Peters C. J. Infection Control for Viral Haemorrhagic Fevers. WHO. Sep 1998.
مرکز پیشگیری و کنترل بیماریها، نامه شماره ۴/۱۷۴۸۱/ب مورخ ۱۳۷۹/۱۰/۲۴.
- Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 2004; 64(3): 145 - 160.
- Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. Lancet Infect Dis. 2006; 6(4): 203 - 214.
- Chinikar S. , Gooya M.M. , Shirzadi, M.R. et al. Surveillance and laboratory detection system of Crimean Congo Haemorrhagic Fever in Iran. Transbound Emerg Dis.2008;55(5-6).200-204.