Archive of SID

# بررسی مولکولی وتعیین توالی بخش RNA s ژنوم ویروس تب کریمه-کنگو(CCHF) در ایران

**انسیه قربانی*[۱]، صادق چینی کار[۲] و میرزاخلیل بهمنی[۳]**

[۱] بجنورد، دانشگاه پیام نور، بخش زیست شناسی

[۲] تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه آربو ویروس

[۳] تهران، دانشگاه امام حسین(ع)، پژوهشکده زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/٤/۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۵

## چکیده

تب هموراژیک کریمه – کنگو یک بیماری عفونی کشنده محسوب می‌شود که توسط ویروسهای خانواده *بونیاویریده* که عموماً توسط *کنه‌ها* انتقال می‌یابد، ایجاد می‌شود. این بیماری در بخشهایی از آفریقا، آسیا، اروپای مرکزی و شرقی دیده شده است. در سالهای اخیر موارد انسانی این بیماری در ایران نیز مشاهده شده است. اما اطلاعات اندکی از تنوع ژنتیکی و نحوه شیوع آن در ایران می‌باشد. در این پروژه، ویروس عامل بیماری تب هموراژیک کریمه – کنگو ( CCHF) از ۵ بیمار ایرانی که در فاصله سالهای ۸۲-۱۳۸۱ به این بیماری مبتلا شده بودند، جدا شده و مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ژنتیکی انجام شده بر روی بخش S این ویروس که پروتئین نوکلئوکپسید آن را کد می‌کند، نشان می‌دهد که توالی نوکلئوتیدی جدا شده از بیماران مختلف شباهت زیادی به یکدیگر دارند. بررسی شجره نامه نشان می‌دهد که قطعه‌ی S ویروس به دست آمده از بیماران ایرانی با سویه این ویروس از کشور پاکستان شباهت زیادی داشته (۹۹/٤ درصد) و احتمال دارد که این بیماری از کشور پاکستان به ایران منتقل شده باشد. البته با گسترش این بیماری در منطقه و کشورهای همسایه از جمله ترکیه، عراق، پاکستان، افغانستان و روسیه، احتمال ورود این بیماری از سایر کشورها به ایران نیز زیاد می‌باشد، که ورود این ویروس می‌تواند با جهشهای جدید نیز همراه باشد.

**واژه های کلیدی:** تب هموراژیک کریمه – کنگو، *ویروس* CCHF ، مقایسه توالی اسید نوکلئک، تعیین توالی DNA، ترسیم شجره نامه

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۵۱۸۷٤٤۳٤، پست الکترونیک:enciehghorbani@yahoo.com

## مقدمه

بیماری تب‌هموراژیک کریمه- کنگو یک تب خونریزی دهنده ویروسی از جنس *نایروویروس* و از خانواده *بونیاویریده* می‌باشد .تمام ۳۲ عنصر جنس *نایروویروس* به وسیله کنه‌های *آرگاسید* (*کنه نرم*) یا *ایکسودید* (*کنه سخت*) منتقل می‌شود، اما فقط ۳ نمونه از این ویروسها منجر به بیماریزایی در انسان می‌شود : ۱- ویروس گوسفندی *داگبی* ۲- ویروس *نایروبی*۳- ویروس *CCHF* که مهمترین بیماریهای انسانی ناشی از این ویروسها است (٤ و ۱۱).

ژنوم ویروس*CCHF* یک RNA تک رشته ای با قطبیت منفی می‌باشد که موجب بیماری بالقوه کشنده در انسان می‌شود. این بیماری اصولاً یک بیماری مشترک بین انسان و دام است، اما موارد انسانی آن نیز به صورت تک‌گیر رخ می‌دهد. متوسط مرگ و میر حاصل از این بیماری ۳۰ درصد و در برخی موارد که انتقال بین انسانی مطرح بوده،



www.SID.ir

Archive of SID

در حد بالاتری نیز گزارش شده است (۵۰ – ۳۰ درصد) مرگ ومیر در نتیجه ابتلا به بیماری در سال ۸۳-۱۳۸۲ در ایران ۲٤/۰۳ درصد بوده است ( ٦، ۷) .

در حالی که ویروس *CCHF* محدوده وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را بیمار می کند، بسیاری از پرندگان به ویروس مقاومند. اما شترمرغ مستعد این بیماری بوده و ممکن است شیوع بالایی از بیماری را در نواحی آندمیک نشان دهد. حیوانات اهلی همانند *گاو، گوسفند و بز*، از طریق نیش *کنه* ناقل ویروس، آلوده می‌شوند. تعدادی از کنه‌ها مستعد آلوده شدن به ویروس هستند، اما اغلب آنها وکتور اصلی و مهم این ویروس محسوب شده که معمولاً از جنس کنه *گونه هیالوما* می‌باشد (٤، ۵، ۷).

انسان نیز از طریق ارتباط مستقیم با خون یا بافتهای آلوده دامهای روستایی، مایعات بدن کنه آلوده و یا گزش توسط کنه، در این مرحله ویرمیک می‌شود، و یا از طریق شغلهای مرتبط با دام آلوده همانند کشاورزان، قصابان و دامپزشکان منتقل می‌شود (۱) .

از آنجایی که این بیماری روز به روز در منطقه و به خصوص کشور ما در حال پیشرفت می‌باشد ، و از طرفی چون این ویروس خطرناک در بسیاری از جنگها از جمله جنگ ایران و عراق به عنوان سلاح بیولوژیک استفاده شده است، لذا توجه به این بیماری واین ویروس خطرناک حائز اهمیت می‌باشد (٤) .

## مواد و روشها

**استخراج RNA ویروس CCHF از سرم خون بیماران:** چون منبع حاوی RNA ویروسی، سرم خون بیمار است، به ازای۰/۲۵ میلی لیتر از سرم بیمار۰/۷۵ میلی لیتر ، محلول ترایزول LS اضافه شد. برای مایعاتی همچون خون بهتراست که نمونه به نسبت ۱:۱ رقیق شود، به طوری که حجم نهایی محلول ترایزول LS نسبت به نمونه همیشه به میزان ۱ : ۳ باشد. سپس نمونه هموژنیزه شده را به مدت ۵ دقیقه در دمای۳۰- ۱۵ درجه سانتی گراد قرارداده تا کمپلکس نوکلئوپروتئینی به طور کامل جدا شود. سپس ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم به ازای ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول ترایزولLS اضافه شد. هر تیوب به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شده و در دمای ۳۵ – ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۲ تا ۱۵ دقیقه قرار داده شد(۸ ، ۹ و۱۰). نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۸-۲ درجه سانتی گراد و با سرعت g ۱۲۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ شد. بعد ازسانتریفوژ نمونه به ۳ فاز تقسیم شد. فاز پایینی که قرمز رنگ است وحاوی فنول-کلروفرم می‌باشد، فازمیانی شیری رنگ و فاز بالایی بی رنگ است. RNA در فاز آبی بالا قرار گرفته که معمولاً حجم آن ۱۰ درصد حجم ترایزول استفاده شده برای هموژنیزاسیون می‌باشد.

فاز آبی حاوی RNA به یک تیوپ جدید منتقل شد. به منظور ته نشین سازی RNA از فاز آبی از ایزوپروپیل الکل استفاده شد، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه دردمای اتاق ۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری شده و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۲۰۰۰ (دور دردقیقه) سانتریفوژ شد.

فاز آبی موجود بر روی رسوب RNA را برداشته و رسوب RNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. نمونه مخلوط شده و برای ۵ دقیقه در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد و با سرعت g ۷۵۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ شد. محلول روی رسوب RNA را دور ریخته و اجازه داده شد که رسوب RNA در دمای آزمایشگاه به مدت۲۰ دقیقه خشک شود. سپس RNA در ۵۰ میلی‌لیترآب فاقد RNase یا ۰/۵درصد SDS حل گردید (۹ و ۱۰) .

**واکنش PCR وRT-PCR** : پس از به دست آوردن RNA از سرم بیماران، این نمونه ها همراه با یک نمونه کنترل مثبت که حاوی RNA ویروسی نمونه کشور نیجریه (سویه ۱۰۲۰۰) می‌باشد، به منظور تولید وتکثیر cDNA مورد


www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قرار گرفت و در این راستا به طراحی پرایمرهای مورد نظر پرداخته شد.

به منظور سنتز و تکثیر cDNA از روی RNA استخراج شده از سرم بیماران، طراحی و سفارش پرایمر مناسب انجام شد. برای هر مرحله کارپرایمر مخصوص آن طراحی و از شر کت Genset oligo کشور سوئد تهیه شد. این پرایمرها قادر به سنتز یک رشته bp ٥٣٦ از DNA می‌باشند.

$F_2$: 5´TGG ACAC CTT CAC AAA CTC3´

$R_3$: 5´GAC AAA TTC CCT GCA CCA3´

برای تعیین توالی محصول PCR قطعه*bp* ٥٣٦ به دست آمده از ٥ نمونه سرم خون بیمار، هر یک از محصولات PCR به وکتور خاص Topo TA منتقل و به کشور سوئد فرستاده شد. پرایمرهای استفاده شده در این مرحله دارای توالی زیربود.

M13 پرایمر پائین دست : 5´ GTA AAA CGA CGG CCA G3´

M13 پرایمر بالا دست : 5´ CAG GAA ACA GCT ATG AC3´

به منظور سنتز cDNA، ۷ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۲ پیکو مول پرایمر $R_2$ و۱میکرولیتر آنزیم واکنش رونویسی معکوس (MMLV) مخلوط شده و به همراه ۱۰ میلی مولار داکسی ریبونوکلئوتیدتری فسفاتdNTP و۲۵۰میلی مولار بافر واکنش به مدت ٤٥-٦٠دقیقه در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد وسپس در دمای ۹٥ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت. سپس برای ۳ دقیقه بر روی یک کیسه یخ منتقل گردید.

به منظور تکثیر DNA به روش PCR ، ٥ میکرولیتراز محصول cDNA سنتز شده به همراه پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار Genset oligo بادمای اتصال ٥٠ درجه سانتی گراد به دستگاه ترموسایکلر برای ٤٠ سیکل متوالی منتقل گردید (۳، ۱۰) .

| Cycle | Time | Temperature |
|---|---|---|
| Denatuaration | 5 min | 95° C |
| Denatuaration | 30 s | 95° C |
| Primer annealing | 30 s 40 cycle | 47° C |
| Extension 30s | 30 s | 72° C |
| Extension | 15 min | 72° C |
| Extension | Hold | 4° C |

## نتایج

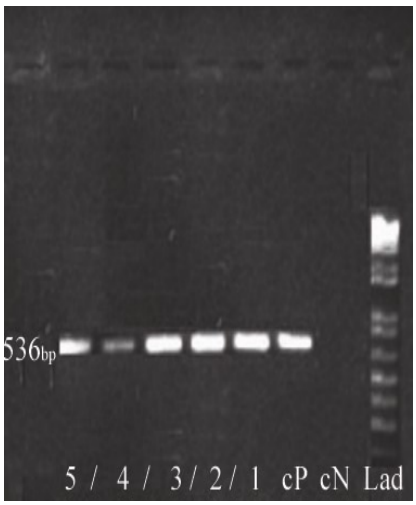
نمونه های انسانی استفاده شده در این پروژه از استانهای سیستان و بلوچستان، قم و مرکزی می‌باشند و پس از نمونه گیری از خون بیماران، که در نهایت دقت ورعایت نکات ایمنی انجام شد، (این عمل به علت خطر بسیار زیاد آن توسط کادر آموزش دیده بیمارستانی که بیمار در آن بستری بود، انجام‌شد.)، با رعایت نکات ایمنی ودر یک فلاسک مخصوص به آزمایشگاه آربوویروس آورده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه شماره‌گذاری و در دمای ۲۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شد.(تمام این مراحل در اتاقک حاوی هود بیولوژیک سطح ۳ و تحت شرایط خاص ایمنی، پوشیدن گان، دستکش و ماسک انجام شد.) سرم این بیماران عموماً در روزهای پنجم و ششم بیماری از بیمار جدا شد (۲ و ۳) .پس از استخراج RNA از سرم بیماران به منظور سنتز وتکثیر cDNA از RNA تخلیص شده، از تکنیک RT-PCR استفاده شد، ونتایج حاصل از این روشها به صورت عکس در صفحات بعدی مقاله آمده است (٥ و۱۰) .

در این روش ، یک توالیbp ٥٣٦ از قطعه S ویروس CCHF به کمک ۲ پرایمر $F_2$ و$R_3$ تولید و تکثیر شد. این توالی bp ٥٣٦ که RNA آن از ٥ بیمار به دست آمده بود، همراه با یک نمونه کنترل مثبت (سویه ۱۰۲۰۰) و یک نمونه کنترل منفی که حاوی میلی‌لیترآب فاقد RNase بود،


www.SID.ir

Archive of SID

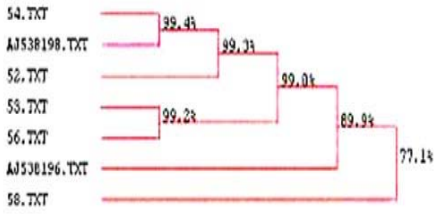
با روش RT – PCR تکثیر شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شد. مارکر مورد استفاده یک(100 bp) DNA ladder (شرکت فرمنتاز) بود. هر ۵ نمونه مورد نظر در ناحیه ۵۳٦ bp دارای یک باند مشخص بودند. که این نشان دهنده حضور RNA ویروس CCHF (به خصوص قطعه مورد نظر که توسط دو پرایمر $F_2$ و$R_3$ مشخص شده است ) در این نمونه‌ها می باشد. محصول PCR به دست آمده از روش بالا به منظور تعیین توالی به کشور سوئد فرستاده شد ( شکل۱) .



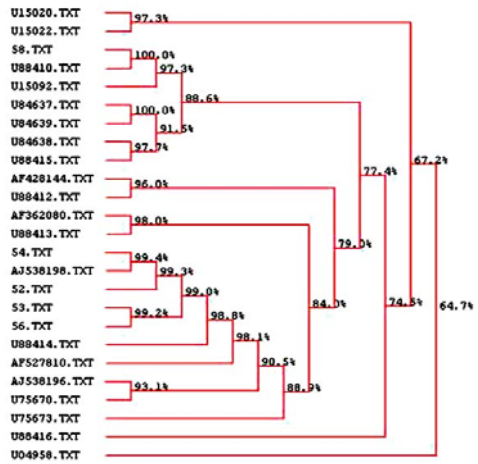

شکل۱- محصول PCR قطعه ۵۳٦ bp بخش S ژنوم ویروس CCHF – نمونه کنترل منفیN : حاوی RNase free water – نمونه کنترل مثبتP : حاوی RNA استخراج شده ویروس CCHF (سویه ۱۰۲۰۰) – نمونه های شماره ۵-۱: حاوی ۵ RNA استخراج شده از سرم بیماران

به منظور آنالیز مولکولی توالی به دست آمده از نرم افزار کامپیوتری Dnasis (آدرس اینترنتی: www.ncbi.nlm.nih.gov) استفاده شد.در این آنالیز ابتدا قطعه به دست آمده از ۵ نمونه ایرانی ، توسط برنامه n Blast با ۲۰ توالی موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی مقایسه شد و بعد از به دست آوردن شبیه‌ترین توالی با نمونه های ایرانی، هر یک از توالیها به طور جداگانه با این توالی مقایسه شدند. نتیجه این مقایسه با نرم افزار Dnasis به صورت شجره نامه ترسیم شد(شکل ۳).سپس ۵ نمونه ایرانی با توالیهای موجود از کشورهای همسایه عراق و پاکستان به طور جداگانه مقایسه و نتیجه به دست آمده به صورت شجره نامه ترسیم شد (شکل۲) .

پس از مقایسه توالی اسید نوکلئیکی نمونه‌ها با نمونه‌های موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی ، با استفاده از برنامه 6 frame translate هر نمونه به توالی اسیدآمینه ای آن ترجمه شد و توالی اسیدآمینه ای به دست آمده با استفاده از برنامه Blast X با سایر توالیهای پروتئینی موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی مقایسه شد و نتیجه آن به صورت شجره نامه آمده است (شکل٤).



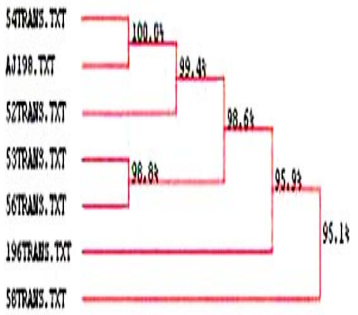

شکل ۲ – مقایسه ۵ توالی به دست آمده از بیماران ایرانی با توالی کشورهای عراق و پاکستان – بیشترین شباهت مربوط به نمونه ۳ با نمونه کشور پاکستان با شماره Genbank AJ 538198 بود و میزان شباهت ۹۹/٤ درصد می‌باشد. – شباهت نمونه ۱ با نمونه پاکستانی۹۹/۳ درصد می‌باشد. – شباهت نمونه ۲و٤ با نمونه پاکستانی ۹۹ درصد می‌باشد – کمترین شباهت مربوط به نمونه۵ با ۷۷/۱ درصد می‌باشد.




شکل۳- مقایسه توالی ۵ نمونه ایرانی با ۲۰ نمونه توالی موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی


www.SID.ir

Archive of SID




شکل ٤- مقایسه ٥ توالی پروتئینی ایران با توالی پروتئینی کشورهای عراق و پاکستان بیشترین شباهت نمونه ایرانی به نمونه پاکستان با ۱۰۰ درصد شباهت می‌باشد. شباهت نمونه عراقی با نمونه ایران ۹۵/۹ درصد می‌باشد

## بحث

هدف اصلی این پژوهش، تعیین توالی بخشی از قطعه‌ی S ویروس CCHF (یک قطعه ٥٣٦bp) و مقایسه آن با سایر توالیهای موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی بود. کارهای تحقیقاتی در مورد این بیماری در ایران، بر روی بخش S این ویروس محدود می‌شود که در آزمایشگاه آربوویروس انستیتو پاستور ایران انجام شده است (۳) . در این پروژه سعی شده تا قطعه S ژنوم ویروس، پس از تکثیر تعیین توالی شود، تا توالی قطعه ای از ویروس شایع در کشور مشخص شده و با سایر توالیهای موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی مقایسه شود .

نتایج به دست آمده از این پروژه حاکی از آن است که ٥ توالی مورد نظر که عموماً از استانهای مختلف کشور (خصوصاً استان سیستان و بلوچستان، قم و مرکزی) به دست آمده شباهت زیادی به یکدیگر داشته به طوری که درصد شباهت نمونه‌ها با یکدیگر بین ۹۹/٤ – ۸۷/۳ درصد متغیر می‌باشد. (شباهت نمونه ٥ به ٤، ۸۷/۳ درصد و شباهت نمونه ٤ به ۲، ۹۹/٤ درصد می‌باشد) و تفاوت نمونه‌ها با یکدیگر بین ۱۳/۳ – ۰/۲ درصد متغیر می‌باشد. (تفاوت نمونه ٤ با نمونه ۲، ۰/۲ درصد و تفاوت نمونه ٥ با نمونه ۱ و نمونه ٥ با نمونه ۳، ۱۳/۳ درصد می‌باشد).

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که نمونه‌های مورد آزمایش وابستگی زیادی با یکدیگر داشته و هر ٥ سویه مورد مطالعه شباهت فراوانی به سویه های به دست آمده از پاکستان دارند. از طرفی شباهت هر یک از نمونه ها با قطعه S ، نمونه ویروسی کنترل مثبت (سویه ۱۰۲۰۰) که نمونه های مورد نظر با آن مقایسه شده‌اند، به صورت زیر می‌باشد: نمونه ٥، ۱۰۰ درصد به سویه ۱۰۲۰۰ (با شماره‌ی Genbank، U۸۸٤۱۰ از کشور نیجریه) شبیه می‌باشد و نمونه ۱، ۸۷/٦ درصد ، نمونه ۲، ۸۸/۳ درصد، نمونه ۳، ۸۷/۹ درصد و نمونه ٤ ،۸٤/٦ درصد به این ویروس شبیه می‌باشد.

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که نمونه‌های مورد نظر، شباهت زیادی با نمونه ویروسی به دست آمده از کشور پاکستان دارد. به طوری که شباهت هریک ازنمونه‌ها با نمونه پاکستانی (با شماره Genbank , AJ٥۳۸۱۹۸) بین ۹۹/۳ – ۹۹/٤ درصد می‌باشد.

نتایج حاصل از BlastX، به مقایسه‌ی ٥ توالی ترجمه شده با چندین توالی ترجمه شده بانک اطلاعات ژنتیکی می‌پردازد. در این مقایسه مشخص شده که توالی ٥٤ کمترین جهش را نسبت به توالی کشور پاکستان نشان می‌دهد. (شباهت دو توالی پروتئینی ۱۰۰ درصد است.)

با بررسی نتایج به دست آمده می‌توان چنین بیان کرد که احتمال ورود این بیماری از کشور پاکستان و از طریق قاچاق دامهای آلوده بسیار زیاد است . اما با توجه به نتایج به دست آمده از یکی از نمونه‌ها (نمونه ٥) که ۱۰۰ درصد شبیه نمونه نیجریه می‌باشد، وبا وجود این که کشور ما در یک منطقه پرخطر از لحاظ این بیماری قرار گرفته است، و بر اساس جدیدترین اطلاعات به دست آمده از کلیه کشورهای همسایه، روسیه، ترکیه، افغانستان، پاکستان، کوزوو، آذربایجان و... با این بیماری درگیر بوده و مواردی از این بیماری از این کشورها گزارش شده است، لذا احتمال ورود این بیماری از سایر کشورها به کشور ما زیاد


www.SID.ir

Archive of SID

است، که ورود این ویروس می‌تواند همراه با جهشهای جدید باشد، به طوری که نمونه‌های ویروسی تازه وارد شده با نمونه‌های مورد بحث در این پروژه کاملا متفاوت باشند، که این امر هم اکنون در آزمایشگاه آربوویروس پاستور در حال تحقیق و بررسی می‌باشد. با توجه به افزایش تعداد بیماران در کشور، جلوگیری از ورود و انتقال این بیماری که اساساً از طریق قاچاق دامهای آلوده به کشور که با گزش نیش پشه آلوده شده‌اند و یا با انتقال مستقیم از طریق کنه‌های آلوده به ویروس CCHF، الزامی است. و این امر یک کوشش فراگیر درسطح کشور و منطقه را طلب می‌کند.

## منابع


۱- ایزدی، ش.، هلاکویی، ک.، مجدزاده، س.ر.، چینی‌کار، ص.، رخشانی، ف.، ندیم، الف.، هوشمند، ب. شیوع عفونت تب خونریزی‌دهنده کنگو – کریمه در استان سیستان و بلوچستان یک مطالعه سرولوژیک فصلنامه پایش (۱۳۸۲). سال دوم، ش. دوم، ص. ۹۳-۸۵.

۲- ایزدی، ش.، هلاکویی، ک.، مجدزاده، س.ر.، چینی‌کار، ص.، رخشانی، ف.، ندیم، الف.، هوشمند، ب. تب خونریزی‌دهنده کنگو – کریمه در استان سیستان و بلوچستان، مطالعه مورد شاهدی خصوصیات اپیدمیولوژیک، مجله دامپزشکی تهران. (۱۳۸۱). دوره ۵۷، ش ٤. ۳۲-۲۷.

۳-چینی‌کار، ص.، فیاض، الف.، میراحمدی، ر.، مظاهری، و...،C. Saron, F..M ,.Mathiot بررسی سرولوژیک انسان و دام‌های مشکوک به بیماری‌های تب هموراژیک کریمه – کنگو به روش الیزای اختصاصی در نقاط مختلف ایران، مجله پژوهشی حکیم. (۱۳۸۰) . ٤، ٤، صفحه ۳۰۰-۲۹٤.

4. Borio, L., Peters, J. C., Schmaljohn, A., Tonat, K. & Nabel, T. M. (2002) Hemorrhagic fever viruses as biological weapons American medical association. vol (287) 118: 2391-2405.

5. Burt , F. J., Lemon. P.A., Smith, J. F.& Swanepoel, R. (1998) The use of reverse transcription – polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean – congo hemorrhagic fever. Journal of virological methods.vol (70); 129-137.

6. European commission. (1999) Diagnostic tests for crimean – congo haemorrhagic fever (CCHF) in ratites.

7. Nichol, T. S. (2001) Bunyaviruses in Fields Virology. *Lippincott williams & wilkins*. Philadelphia. Knipe. M.D., Howley. M.P., 1603-1534

8. Papa, A., Bozovi, B., Pavlido, V., Papadimitrion, E., Pelemis, M. & Antoniadis, A. (2002) Genetic detection and isolation of Criman – congo haemorrhagic fever. Virus. Kosovo. Yugoslavia. Emerging infections diseases. vol: 8(8) 852-854.

9. Sambrook, J., Russell, W. D. (2001) Molecular cloning (a laboratory manual). CSHL press.. vol (1). 7.4., 7.9

10. Sewall, A. & Mcras, S. (1998) RNA isolalation with trizol reagent. Focus. Vol (20): 2.

11. Shope, E. R. .(2002) Bunyaviruses. Medmicro. Chapter 56.




www.SID.ir

Archive of SID

# Molecular analysis and sequence of the small RNA segment of the Crimean– Congo hemorrhagic fever virus(CCHFv) in Iran

**Ghorbani E.[1], Chinikar S.[2], and bahmani Kh[3]**

[1] **Biology Dept., Payam Nor University, Bojnord.I.R.of IRAN**

[2] **Arbovirus Dep. , An istitute of Pastour of Iran,Tehran,I.R of Iran.**

[3] **Biology Dep.,Emam Hossain University,Tehran,I,R of Iran**

## Abstract

Crimean– Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a potentially fatal disease caused by a tick– borne virus in the family Bunyavirdae. The disease occurs in parts of Africa, Asia, Middle East, and Eastern Europe. During recent years, an increasing number of human CCHF cases have been diagnosed in Iran, but very little in formation is available on the prevalence and genetic diversity of CCHF in Iran. In the present study, CCHF virus (CCHFv) isolate from five Iranian patients infected during 2002 were examined genetically. Nucleotede sequencing of the S-segment encoding the nucleocapsid protein (NP), respectively, revealed that the different isolates were related closely to one another. Phylogenetic analysis of partial S-segment nucleotide sequences showed that the viruses clustered along with strain from Pakistan in one distinct lineage. (99.4%) and this viruses probably is transmitted from Pakistan to Iran. However due to the spread of the disease in a broad territory around Iran and nieghbouring countries like, Turkey, Iraq, Pakistan, Afghanistan, Russia the possibility of transmission of the disease from these countries cannot be excluded.

**Keywords:** Crimean– congo hemorrhagic fever virus (CCHFv), RNA extraction, PCR and RT-PCR reaction, DNA sequencing.



www.SID.ir