

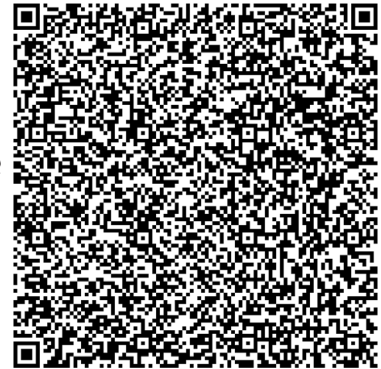
بررسی نقش آزمایشگاه و آنتی‌ژن در تکرارپذیری نتیجه آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون بیماری نیوکاسل

• آرش قلیان‌چی لنگرودی، زهرا ضیافتی کافی و ناصر صدری
گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

• لیلا آقاییان، امیرمدیری همدان و علی هژبر راجعونی
گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

• محمدحسین فلاح مهرآبادی
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• حسین حسینی (نویسنده مسئول)
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۷-۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۱۰-۰۸

Email: hosseini.ho@gmail.com

چکیده

آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) یک روش رایج در آزمایشگاه‌های دامپزشکی می‌باشد که دارای حساسیت پایین و ویژگی بالایی در تعیین سطح آنتی‌بادی می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی تکرارپذیری آزمون HI در بین آزمایشگاه‌های دامپزشکی و تعیین آنتی‌ژن مناسب برای آزمون HI بود. دو مطالعه در این تحقیق صورت پذیرفت. در مطالعه اول ۶۰ نمونه سرم در چهار گروه شامل سرم‌های تیتز منفی، تیتز پایین، تیتز متوسط و تیتز بالای نیوکاسل انتخاب شد. همچنین جهت ارزیابی تکرارپذیری نتایج آزمون HI هشت جفت سرم تکراری از هر چهار گروه سرمی انتخاب گردید. سرم‌ها به یازده آزمایشگاه مختلف دامپزشکی در کشور که سهم بالایی در انجام آزمون HI داشتند، ارسال گردید و از آنها درخواست شد با روش رایج آزمایشگاه تیتز HI نیوکاسل را تعیین کنند. در مطالعه دوم ۴۱ نمونه سرم با استفاده از پنج آنتی‌ژن (کلون لاسوتا، لاسوتا، B1، آنتی‌ژن تجاری، آنتی‌ژن آزمایشگاهی) برای آزمون HI مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج مطالعه اول نشان داد که اکثر آزمایشگاه‌ها توانایی شناسایی تیتزهای بالا را دارند ولی در تعیین تیتزهای صفر، پایین و متوسط تفاوت قابل توجهی دارند. همچنین براساس نتایج هر یک از آزمایشگاه‌ها مشخص شد که تکرارپذیری نتایج HI در داخل یک آزمایشگاه نیز پایین است. در مطالعه دوم بهترین آنتی‌ژن از لحاظ یکسان بودن پاسخ‌ها در آزمون HI آنتی‌ژن لاسوتا کلون می‌باشد. این اولین مطالعه کنترل کیفی آزمون HI در ایران می‌باشد. نتایج نشان داد که کیفیت انجام HI در سطح قابل قبولی نیست و سازمان دامپزشکی و مراکز تحقیقاتی برای استانداردسازی این آزمون برنامه‌ریزی نمایند.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن، آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون، سرم، کنترل کیفیت، نیوکاسل

- Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 201-208

Investigating the Role of Laboratory and Antigen in Repeatability of Results in Newcastle Virus Hemagglutination Inhibition

By: Ghalyanchi Langeroudi, A., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Ziafati Kafi, Z., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Sadri, N., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Aghaeian, L., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Modiri Hamedan, A., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Hojabr Rajeoni, A., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Fallah Mehrabadi, M. H., Department of Poultry Viral Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. and Hosseini, H., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received: 2020-10-08

Accepted: 2020-12-28

Email: hosseini.ho@gmail.com

Hemagglutination Inhibition (HI) test is a universal method in veterinary laboratories that has low sensitivity and high specificity in determining the level of antibody. This study aimed to evaluate the repeatability of HI test and to determine the suitable antigen for HI test. Two experiments were conducted in this study. In the first, 60 serum samples were divided into four groups, including negative, low, medium, and high titer serums for Newcastle virus. Also, to evaluate the repeatability of the HI test results, eight pairs of repeating serums were placed from all four serum groups. The sera were sent to 11 different veterinary laboratories, and asked to determine the Newcastle HI titers by standard protocols. In second experiment, 41 sera were used to determine the appropriate antigen using five antigens (Clone Lasota, Lasota, B1, commercial and laboratory antigen) for the HI test. The first experiment showed that most laboratories could identify high titers, but there is a significant difference in determining zero, low, and medium titers. Also, based on results obtained from each of laboratories, it was found that the reproducibility of HI results within a laboratory is low. In the second experiment, the best antigen was determined in terms of the same answers for use in the HI antigen test of Lasota Clone vaccine. This study is the first study on the quality control of the HI in Iran. The results showed that the quality of test is not satisfactory, and the IVO and research centers should standardize this test.

Keyword: Antigen, HI, Serum, Quality Control, Newcastle Disease

۱۰، ۱۱). اتصال پروتئین HN به اسیدهای سیالیک در سطح گلبول‌های قرمز سبب پدیده هم‌آگلوتیناسیون می‌شود. توانایی آگلوتیناسیون گلبول قرمز توسط ویروس نیوکاسل و مهار آن توسط آنتی‌سرم یعنی ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون (Haemagglutination Inhibition; HI) روش مناسبی جهت تشخیص بیماری می‌باشد. اگر سرم پرندۀ حاوی آنتی‌بادی‌های ضد HN باشد، اتصال ویروس به گیرنده RBC مهار می‌شود (۸). آزمون ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون یکی از مهم‌ترین آزمون‌های سرولوژیک مورد استفاده در صنعت طیور است که برای ردیابی سرمی علیه برخی از بیماری‌های ویروسی طیور مانند بیماری‌های نیوکاسل و آنفلوآنزا مورد استفاده قرار می‌گیرد و همواره یکی از معیارها برای

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های مهم در صنعت طیور می‌باشد که سالانه خسارت‌های زیادی را به صنعت طیور وارد می‌کند. این بیماری در بسیاری از کشورها منجمله ایران به صورت اندمیک در آمده است (۷، ۱۴). عامل این بیماری یک ویروس از خانواده پارامیکسوویریده و جنس ارتوآولوویروس می‌باشد که یک ویروس RNA دار با مفهوم منفی و پوشش‌دار می‌باشد (۶). ویروس نیوکاسل فقط یک سروتیپ دارد ولی دارای پاتوتیپ‌ها و تروپیسیم‌های مختلفی می‌باشد (۱، ۶). دو گلیکوپروتئین مهم در سطح پوشش ویروس وجود دارد که شامل هم‌آگلوتینین-نورامینیداز (Hemagglutinin-Neuraminidase; HN) و فیوژن (Fusion) می‌باشند (۵).

قرار گرفت. به منظور انتخاب و گروه بندی سرم‌ها علاوه بر سابقه ذکر شده در خصوص هر گروه، تیتراژ این نمونه‌ها با کیت الایزای نیوکاسل (Biocheck) بررسی گردید. نمونه‌ها بصورت تصادفی کدگذاری شد. سپس سرم‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه‌های مختلفی (یازده آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی در قسمت‌های شمال و نواحی مرکزی ایران، که سهم بالایی از آزمون‌های HI کشور را دارند) ارسال گردید. از آزمایشگاه‌ها درخواست گردید تا طبق روش و مواد متداول، عبار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل را به روش HI تعیین نمایند. همچنین از آزمایشگاه‌ها درخواست شد تا نتایج در برگه همراه سرم‌ها و طبق کد هر نمونه گزارش شود.

ارزیابی نتایج

نتایج HI گزارش شده از هر یازده آزمایشگاه جمع‌آوری گردید. به منظور ارزیابی و آنالیز نتایج برای هر گروه، محدوده مشخصی از تیتراژ بعنوان پاسخ صحیح و قابل انتظار در نظر گرفته شد. بدین ترتیب برای گروه اول یا تیتراژ صفر، تیتراژ صفر و یک، برای گروه دوم یا تیتراژ پایین، تیتراژ دو و سه، برای گروه سوم، تیتراژ چهار و پنج و برای گروه چهار محدوده تیتراژ هفت تا ۱۰ بعنوان پاسخ صحیح در نظر گرفته شد. برای هر پاسخ صحیح به ازای هر سرم امتیاز دو و برای پاسخ خارج از محدوده امتیاز صفر در نظر گرفته شد (جدول ۱). بنابراین حداکثر امتیاز قابل انتظار ۱۲۰ می‌باشد. جهت امتیازبندی آزمایشگاه‌ها در ارائه نتیجه قابل انتظار در آزمون HI نیوکاسل از پاسخ صحیح به هر کدام از گروه‌های چهارگانه سرمی استفاده شد و در صورت پاسخ صحیح به تمامی سرم‌های موجود در یک گروه امتیاز ۲۵ تعلق گرفت. در صورت پاسخ صحیح به تمامی سرم‌ها در هر چهار گروه سرمی امتیاز عالی (۱۰۰)، پاسخ صحیح به تمامی سرم‌ها در سه گروه سرمی امتیاز خوب (۷۵)، پاسخ صحیح به تمامی سرم‌ها در دو گروه سرمی امتیاز متوسط (۵۰) و پاسخ صحیح به تمامی سرم‌ها فقط در یک گروه سرمی امتیاز ضعیف (۲۵) و در صورت عدم پاسخ صحیح به تمامی گروه‌های سرمی امتیاز غیرقابل قبول (صفر) اختصاص یافت. جهت ارزیابی تکرارپذیری نتایج HI، امتیازدهی به دو روش انجام شد. در روش اول امتیاز دو به یکسان بودن پاسخ به جفت سرم تکراری و امتیاز صفر برای مغایرت پاسخ تعلق گرفت. در روش دوم، امتیاز دو به یکسان بودن پاسخ و یا تفاوت یک لوگ بین جفت سرم تکراری و امتیاز صفر برای تفاوت بیشتر از یک لوگ اختصاص یافت. جهت ارزیابی کلی نیز میانگین این دو روش نیز محاسبه گردید. انجام تجزیه و تحلیل و همچنین رسم نمودار با نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت.

مطالعه دوم

انتخاب آنتی‌ژن

پنج آنتی‌ژن مختلف شامل واکسن B1 (شرکت ایزو)، واکسن کلون لاسوتا (شرکت ایزو)، واکسن لاسوتا (شرکت ایزو)، آنتی‌ژن تجاری X و آنتی‌ژن شخص‌ساز (in-house) برای تعیین دقت و کیفیت آنتی‌ژن مورد ارزیابی قرار گرفتند تا آنتی‌ژن مناسب برای آزمون HI مشخص شود. از چهار گروه تیتراژ منفی، پایین، متوسط و بالا طبق تعریف مطالعه اول ۴۱ نمونه سرم تهیه گردید.

تشخیص بیماری و یا ارزیابی برنامه واکسیناسیون و بررسی سطح ایمنی گله بوده است (۳). آزمون HI دارای حساسیت پایین و ویژگی بالا می‌باشد و با توجه به هزینه پایین و در دسترس بودن آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس نیوکاسل و عدم نیاز به وسایل و تجهیزات خاص به طور معمول در آزمایشگاه‌های دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). دستورالعمل انجام آزمون به طور کلی در بیشتر آزمایشگاه‌ها کشور یکسان می‌باشد و توسط سازمان دامپزشکی به تمامی آزمایشگاه‌های سراسر کشور ابلاغ شده است. به هر حال مواردی نظیر نوع آنتی‌ژن، گلبول قرمز، ماده ضد انعقاد، آماده‌سازی سرم و شخص انجام دهنده متفاوت می‌باشد و احتمال می‌رود، این متغیرها در نتیجه نهایی تأثیر بگذارند. چنین تفاوتی بین آزمایشگاه‌ها در نتایج آزمون HI نیوکاسل شناخته شده است (۲). گستردگی پرورش طیور در کشور و اهمیت کنترل بیماری نیوکاسل در مزارع پرورش طیور منجر به اتکاء صنعت طیور به آزمون HI جهت پایش پاسخ سرولوژی متعاقب واکسیناسیون، ارزیابی محافظت در برابر چالش با ویروس بیماری نیوکاسل و تشخیص بیماری بدنال نشانه‌های بالینی مرتبط با نیوکاسل شده است. بهر حال تفاوت بین آزمایشگاه‌ها در نتایج آزمون HI نیوکاسل ممکن است تفسیر نتایج HI را با چالش بزرگی مواجه نماید. علی‌رغم شناخت تفاوت در نتایج آزمون HI بین آزمایشگاه‌های دامپزشکی کشور، گزارشی از میزان این تفاوت و نقش آن در تفسیر نتایج وجود ندارد. از طرف دیگر توصیه به استفاده از یک آزمایشگاه واحد، بعنوان راهکار اجتناب از این تفاوت، نیازمند ارزیابی تکرارپذیری نتایج HI در یک آزمایشگاه می‌باشد. به منظور شناسایی میزان تکرارپذیری نتایج HI بین آزمایشگاه‌های مختلف کشور و همچنین تکرارپذیری نتایج در یک آزمایشگاه واحد، مطالعه اول طراحی گردید و آزمایشگاه‌های مشهور در نواحی شمال و مرکز ایران که دارای حجم نمونه‌های زیادی بودند انتخاب شدند. همچنین عدم دسترسی به آنتی‌ژن یکسان در کشور و تنوع آنتی‌ژن‌های بکار رفته نیازمند انجام مطالعه جهت انتخاب آنتی‌ژن مناسب می‌باشد. بدین منظور مطالعه دوم طراحی شد تا براساس آن بهترین آنتی‌ژن که در آزمایشگاه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها

مطالعه اول

انتخاب سرم

۶۰ عدد نمونه سرم از بانک سرمی بخش ویروس‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتخاب شدند. این سرم‌ها بر اساس تیتراژ آنتی‌بادی شامل گروه‌های زیر بودند: گروه اول یا گروه تیتراژ منفی شامل ۱۵ نمونه سرم از جوجه‌های عاری از پاتوژن (SPF) بودند. گروه دوم یا گروه تیتراژ پایین شامل ۱۵ نمونه سرم از گله‌های گوشتی دو هفته بودند که سابقه دریافت واکسن زنده نیوکاسل یا چالش با ویروس مزرعه را نداشتند. گروه سوم یا گروه تیتراژ متوسط شامل ۱۵ نمونه سرم از گله‌های گوشتی با سابقه دریافت واکسن و بدون چالش با ویروس نیوکاسل بود. گروه چهارم یا گروه تیتراژ بالا شامل ۱۵ نمونه سرم از گله‌های مادر با سنین بالا بودند. جهت ارزیابی تکرارپذیری نتایج HI، هشت نمونه سرم در هر چهار گروه با دو تکرار (جفت سرم‌های تکراری) در بین نمونه‌های سرمی

آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)

برای انجام آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. در مرحله اول به تمامی گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی یا بافر فسفات نرمال سالیین اضافه شد. در مرحله دوم به گوده ردیف اول ۵۰ میکرولیتر سرم مجهول اضافه شد و در بقیه یازده گوده به صورت سریال رقیق گردید. سپس به تمام گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن هشت واحد HA اضافه شد. پس از نیم ساعت در دمای اتاق، ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز یک درصد به تمامی گوده‌ها اضافه گردید و بعد از نیم ساعت زمان جواب‌ها را قرائت گردید (۸). انجام آزمون HI در یک آزمایشگاه و در یک زمان و توسط یک تکنیسین انجام شد تا پارامترهای دخیل به حداقل برسد.

ارزیابی نتایج مطالعه دوم

در ارزیابی مطالعه دوم، نتیجه هر سرم با آنتی‌ژن‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. تیتري که بیشترین تکرار با آنتی‌ژن‌های مختلف را داشت بعنوان تیتري اصلی آن سرم تعیین شد. تیتريهای متفاوت با یک و دو لوگ اختلاف برای هر نمونه سرم تعیین شد. در پایان برای هر آنتی‌ژن، یکسان بودن تیتريهای بدست آمده مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

تیتري الايزا و پراکندگی آن

میانگین تیتري الايزا و پراکندگی آن در گروه‌های یک تا چهار به ترتیب $1139/24 \pm$ ، $8775/6 \pm$ ، $916/74$ ، $4903 \pm$ ، $567/78$ ، $101/13 \pm$ ، $30/41$ بود (جدول ۲) که با توجه به شاخص‌های شرکت سازنده کیت در چهار گروه مورد مطالعه دسته بندی شدند.

مطالعه اول

بررسی نتایج آزمون HI یازده آزمایشگاه دامپزشکی کشور براساس گروه‌بندی سرم‌ها نشان داد که بیشترین پاسخ صحیح و قابل انتظار در محدوده تیتري بالا و مربوط به گروه چهار بود. نتایج HI ده آزمایشگاه (۹۱ درصد) برای گروه سرمی چهار در محدوده هفت تا ۱۰ گزارش شده بود و تنها یک آزمایشگاه (۹ درصد) نتایج مغایر با محدوده قابل انتظار گزارش کرد. نتایج HI آزمایشگاه‌های دامپزشکی به سرم‌های سایر گروه‌ها هم‌خوانی کمتر نشان داد. بطوریکه کمتر از نیمی از آزمایشگاه‌ها (۴۵/۴۵ درصد) نتیجه قابل انتظار به گروه دوم یا تیتري پایین ارائه کردند. در پاسخ به گروه اول یا تیتري منفی نیز فقط سه آزمایشگاه (۳/۲۷ درصد) با نتیجه صحیح به همه سرم‌های توانستند امتیاز کامل کسب نمایند. نتایج

جدول ۱- جدول امتیازدهی به آزمایشگاه (*: در تیتريهای یک سرم بصورت مقایسه‌ای نیز اگر بالای دو لوگ اختلاف با تیتري غالب آن سرم بین آزمایشگاه‌های مختلف داشت، نمره صفر در نظر گرفته شد).

ردیف	موضوع	تیتري*	امتیاز	تیتري	امتیاز
۱	سرم منفی	۱۰۰	۲	۱<	۰
۲	سرم تیتري پایین	۳-۱	۲	۳<	۰
۳	سرم تیتري متوسط	۵-۳	۲	۵< / ۳>	۰
۴	سرم تیتري بالا	۱۰-۷<	۲	۷>	۰

جدول ۲- نتایج تیتري آنتی بادی با استفاده از کیت الايزای نیوکاسل شرکت بیوچک (Biocheck).

تعداد نمونه	گروه اول (تیتري منفی)	گروه دوم (تیتري پایین)	گروه سوم (تیتري متوسط)	گروه چهار (تیتري بالا)
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
میانگین تیتري	۱۰۱	۴۹۰۳	۸۷۷۵/۶	۱۵۸۷۹
پراکندگی	۳۰/۴۱	۵۶۷/۷۸	۹۱۶/۷۴	۱۱۳۹/۲۴
انحراف معیار	۲۹/۰۵	۱۱/۱۸	۱۱/۰۹	۶/۹۳
بیشترین تیتري	۱۵۸	۶۰۵۰	۱۰۸۵۱	۱۷۸۴۰
کمترین تیتري	۵۰	۳۳۷۴	۶۳۹۸	۱۳۲۴۰

روش در جدول ۴ و شکل ۳ ارائه شده است.

مطالعه دوم

پنج آنتی‌ژن مختلف در آزمایش دوم که برای شناسایی آنتی ژن مناسب برای انجام HI استفاده شد. نتایج مطالعه دوم به تفصیل در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که وقتی از واکسن کلون لاسوتا به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است نتایج بهتر و یکسانی تر داشتند. یکسانی نتایج حاصل از دو آنتی‌ژن مربوط به واکسن‌های B1 و لاسوتا در مرتبه بعدی قرار می‌گیرند. آنتی‌ژن تجاری و آنتی‌ژن تهیه شده در آزمایشگاه (in-house) جواب‌هایی با اختلاف دو لوگ با بیشترین تیتراهای تعیین شده برای هر سرم داشتند. یکسان بودن نتایج با آنتی‌ژن‌های مختلف در سرم‌های با تیترا پایین بیشتر است (جدول ۵).

بحث

آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون یک آزمون پرکاربرد جهت ردیابی آنتی‌بادی علیه ویروس‌های واجد پروتئین سطحی هماگلوتینین می‌باشد. در این میان با توجه به اهمیت بسیار زیاد بیماری نیوکاسل در کشور، آزمون HI برای بیماری نیوکاسل بطور گسترده‌ای جهت ارزیابی پاسخ واکسن، سطح محافظت و تشخیص بیماری در گله‌های طیور توسط دامپزشکان و مدیران بهداشتی بکار گرفته می‌شود (۱۳). نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های دامپزشکی، بعنوان معیار مهمی جهت تفسیر رخدادهای بالینی بکار گرفته می‌شود. بهرحال تطبیق رخدادهای بالینی با نتایج آزمایشگاهی بسادگی امکان پذیر نمی‌باشد و یک چالش بزرگ در میان کلینسین‌های طیور می‌باشد. یکی از عوامل چالش برانگیز در تفسیر رخدادهای بالینی نتایج متناقض آزمایشگاهی می‌باشد. تناقض و تفاوت در نتایج آزمون HI از دیرباز شناخته شده بوده است و تلاش زیادی برای استانداردسازی آن صورت گرفته است (۱۶). بهرحال ابعاد این تفاوت و تناقض در میان نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های دامپزشکی کشور ناشناخته نمی‌باشد. در این راستا تصمیم گرفته شد تا با بررسی نتایج آزمون HI تعدادی از آزمایشگاه‌های دامپزشکی کشور، تفاوت میان این

در گروه سوم یا تیترا متوسط همخوانی کمتری با تیترا قابل انتظار داشت بطوریکه تنها دو آزمایشگاه (۱۸/۲ درصد) به همه نمونه پاسخ صحیح دادند. (جدول ۳ و شکل ۲).

جهت درجه‌بندی آزمایشگاه‌ها از نتایج صحیح به تمامی سرم‌های موجود در یک گروه استفاده شد. بر این اساس هیچ آزمایشگاهی موفق ارائه پاسخ قابل انتظار به تمامی سرم‌ها در گروه‌های چهارگانه و دریافت امتیاز عالی (۱۰۰) نشد. در بین یازده آزمایشگاه فقط سه آزمایشگاه توانستند به تمامی سرم‌های موجود در سه گروه سرمی پاسخ صحیح ارائه دهند و امتیاز خوب (۷۵) دریافت کنند. چهار آزمایشگاه دیگر به تمامی سرم‌های موجود در دو گروه سرمی پاسخ صحیح دادند و امتیاز متوسط (۵۰) دریافت کردند. سه آزمایشگاه نیز فقط در یک گروه سرمی پاسخ‌های صحیح ارائه کردند و امتیاز ضعیف (۲۵) دریافت کردند. نهایتاً یک آزمایشگاه در هیچ گروه سرمی قادر به ارائه پاسخ سرمی صحیح نبودند و امتیاز غیرقابل قبول (صفر) دریافت کردند. (جدول ۳ و شکل ۳).

تکرارپذیری آزمون در یک آزمایشگاه

در روش اول، یکسان بودن نتیجه جفت سرم تکراری شاخص تکرارپذیری قرار گرفت و تنها یک آزمایشگاه توانست به هر هشت جفت سرم تکراری (۱۰۰ درصد) متعلق به چهار گروه سرمی پاسخ یکسان دهد و امتیاز ۱۶ (بالاترین امتیاز ممکن) کسب نماید. یک آزمایشگاه به شش جفت سرم (۷۵ درصد)، دو آزمایشگاه به چهار جفت سرم (۵۰ درصد) و دو آزمایشگاه به دو جفت سرم (۲۵ درصد) از هشت جفت سرم پاسخ یکسان داده بودند و به ترتیب امتیازهای ۸، ۴ و ۰ کسب کردند. بهرحال پنج آزمایشگاه نتوانستند به هیچ کدام از جفت سرم‌های تکراری پاسخ یکسان بدهند و امتیاز صفر کسب نمودند.

در روش دوم امکان خطا تا یک لوگ بین پاسخ به جفت سرم‌های تکراری در نظر گرفته شد بر این اساس چهار آزمایشگاه توانستند به هشت جفت سرم‌های تکراری با حداکثر یک لوگ تفاوت پاسخ یکسان بدهند. تفاوت بین پاسخ به جفت سرم تکراری در هفت آزمایشگاه بیش از یک لوگ بود. نتایج بصورت درصد پاسخ‌های مشابه در دو روش و میانگین دو

جدول ۳- امتیاز کسب شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف در توانایی به پاسخ به گروه‌های مختلف سرمی تیترا پایین، متوسط، بالا و منفی (۳۰ بیشترین امتیاز و صفر: کمترین امتیاز).

درصد پاسخ درست در هر معیار	تعداد آزمایشگاه پاسخ درست در هر معیار	کد آزمایشگاه											
		M	L	K	H	G	F	E	D	C	B	A	
۲۷/۷	۳	۰	۰	۲۵	۲۵	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۰	امتیاز تعیین درست سرم‌های تیترا منفی
۳۶/۳۶	۴	۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۵	۲۵	۰	۲۵	امتیاز تعیین درست سرم‌های تیترا پایین
۹۰/۱	۱۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۰	۲۵	امتیاز تعیین درست سرم‌های تیترا بالا
۹/۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۵	۰	۰	امتیاز تکرار پذیری درست تست
		۵۰	۲۵	۵۰	۵۰	۲۵	۲۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۰	۵۰	جمع امتیاز

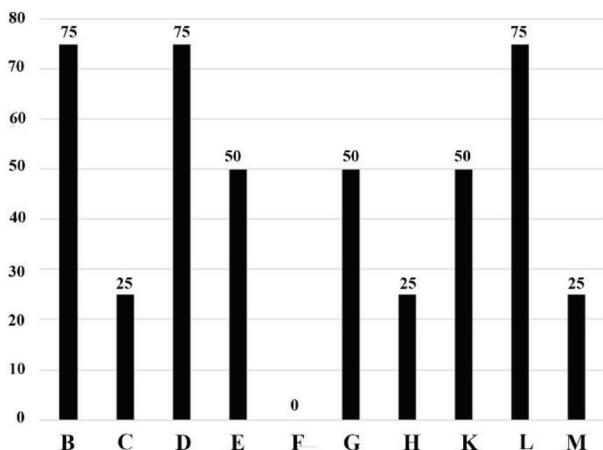
شده از آزمایشگاه‌های مختلف از عدم پاسخ مناسب واکسن (گزارش تیتراژ پایین‌تر از تیتراژ واقعی) تا چالش با سویه مزرعه (گزارش تیتراژ بالاتر از تیتراژ واقعی) متغیر خواهد بود. بدیهی است چنین تفسیرهای می‌تواند منجر به تصمیم‌گیری اشتباه در مدیریت بهداشتی گله شود.

در راستای غلبه بر مشکل تفاوت نتایج آزمون HI در میان آزمایشگاه‌های دامپزشکی، توصیه به انجام آزمون HI در یک آزمایشگاه واحد شده است تا تکرارپذیری آزمون افزایش پیدا کند. بهرحال نتایج این مطالعه نشان داد که تکرارپذیری نتایج در آزمایشگاه‌های دامپزشکی کشور علیرغم انجام آزمون در یک زمان و با یک اپراتور بسیار پایین است و پیش‌بینی می‌شود که تکرارپذیری نتایج در روزهای متفاوت و احتمالاً تغییرات بیشتر در مواد (نظیر آنتی‌ژن، خون و...)، زمان انکوباسیون پلت‌ها و اپراتور حتی در یک آزمایشگاه بیشتر باشد (۱۵). تکرار پذیری آزمون HI فقط در یک آزمایشگاه قابل قبول بود. در شش آزمایشگاه تفاوت تیتراژ در جفت سرم تکراری بیش از دو لوگ می‌باشد که بیانگر خطاهای قابل توجه در انجام آزمون می‌باشد.

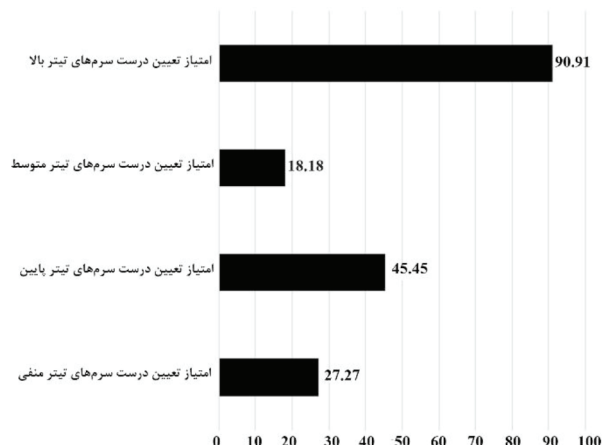
بر اساس نتایج تیتراژ آنتی‌بادی که از آزمایشگاه‌ها مختلف بدست آمده است تفاوت قابل توجهی در نتایج تیتراژ بیماری و ویروس نیوکاسل در بین آزمایشگاه‌ها وجود دارد. این نتایج می‌تواند باعث ایجاد سردرگمی در صنعت طیور شود که چرا سرم‌های یکسان در آزمایشگاه‌های

نتایج بررسی شود. برای تایید مقایسه نتایج آزمایشگاه‌های مختلف که در این مطالعه از آنها استفاده شده بود از کیت الایزای نیوکاسل شرکت بیوچک (Biocheck) به عنوان شاخص استفاده شد بر اساس پروتکل‌های منتشر شده توسط این شرکت تیتراژ الایزا با تیتراژ نیوکاسل تطبیق داده شد. نتایج بدست آمده از آزمایشگاه‌های مختلف در تعیین دقیق تیتراژ HI و مطابقت آن با نتایج الایزای نیوکاسل بسیار متغیر بود و بر اساس دقت آزمایشگاه‌ها امتیازبندی شدند.

مقایسه نتایج آزمون HI یازده آزمایشگاه دامپزشکی نشان داد که تنها سه آزمایشگاه (۲۷/۳ درصد) توانستند با اخذ امتیاز خوب، جواب درست و قابل اطمینان بدهد و در مقابل چهار آزمایشگاه (۳۶/۴ درصد) با اخذ امتیاز ضعیف و یا غیرقابل قبول پاسخ مناسبی ارائه نکردند. اگرچه اکثر آزمایشگاه‌ها نتایج قابل قبولی برای گروه سرمی بالا ارائه کردند و تیتراژهای بالا را بدرستی ردیابی و تعیین تیتراژ کردند ولی نتایج در گروه سرمی منفی و متوسط بسیار متناقص و متفاوت است. در شرایط پرورش طیور کشور، گله‌های گوشتی عمدتاً در محدوده تیتراژ گروه سرمی متوسط این مطالعه قرار دارند (۹). با توجه به شیوع بیشتر بیماری‌های تنفسی در گله‌های گوشتی کشور و انجام متداول آزمون HI برای تشخیص بیماری نیوکاسل، تفسیرهای رایج بر اساس نتایج سرولوژی با چالش بزرگی مواجه می‌شود. زیرا تفسیر رخداد بالینی در یک گله واحد، بر اساس تیتراژ ارائه



شکل ۲ - درصد ایت‌هایی که به‌طور کامل توسط هر آزمایشگاه کسب گردید.



شکل ۱ - درصد تعداد آزمایشگاه‌های که توانستند در گروه تیتراژی مشخص امتیاز کامل کسب کنند.

جدول ۴ - جمع امتیاز کسب شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف در تکرارپذیری تست.

کد آزمایشگاه	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L	M
درصد پاسخ صحیح در تکرارها بدون اختلاف (گزارش تیتراژ یکسان)	۲۵	۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۰	۰	۷۵	۵۰	۰	۰
درصد پاسخ صحیح در تکرارها (صحیح در نظر گرفتن یک لوگ اختلاف در تکرارها)	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۷۵	۵۰	۷۵	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۷۵	۷۵
میانگین امتیازها	۶۲/۵	۲۵	۱۰۰	۶۲/۵	۳۷/۵	۳۷/۵	۵۰	۷۵	۷۵	۳۷/۵	۳۷/۵

کالیبراسیون مناسب سمپلرها و محلول‌هایی که در این آزمون استفاده می‌شود می‌تواند یکی از خطاهای انجام آزمایش باشد. نیروی انسانی دقیق و آموزش دیده و عدم استفاده از نیروهای جدید، با تصور ساده بودن این آزمون می‌تواند از سایر نکات قابل توجه جهت دستیابی به جواب دقیق گردد. قرائت پلیت و معیار آگلوتینه کردن RBC نیز باید یکسان‌سازی گردد. همچنین هنگام قضاوت در مورد تیتراها بهتر است از میانگین‌های حسابی یا هندسی استفاده شود تا خطاهای کم مربوط به آزمون پوشانده شود.

براساس نتایج مطالعه دوم و ارزیابی آنتی‌ژن‌های مختلف مشخص شد که آنتی‌ژن کلون شاید از نظر یکنواختی و نتایج بهتر باشد ولی از نظر قیمت تمام شده نسبت به لاسوتا و B1 بسیار بالاتر خواهد بود. نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن‌های ساخته شده در آزمایشگاه (in-house) و آنتی‌ژن تجاری شرکت X متاسفانه خوب عمل نکردند. لازم است سازمان دامپزشکی کشور کنترل و نظارت بیشتری بر روی کیفیت آنتی‌ژن‌های عرضه شده در بازار نماید و در بازه‌های زمانی مشخص این آنتی‌ژن‌ها را مورد بررسی قرار دهد. همچنین ساخت آنتی‌ژن‌های HI در آزمایشگاه باید با رعایت حداقل الزامات GMP یا GLP صورت پذیرد.

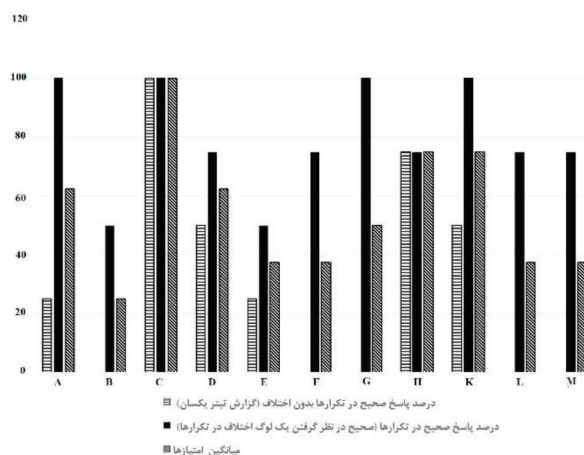
نتیجه‌گیری کلی

این اولین مطالعه در ارزیابی یکی از ساده‌ترین و در عین حال مهم‌ترین آزمون تشخیصی در کشور بود. چون بسیاری از تشخیص‌ها، سیاست‌گذاری‌ها و واکسیناسیون‌ها بر اساس این پاسخ انجام می‌گردد. لازم است بازنگری جدی در انجام این آزمون صورت پذیرد. استفاده از الیزای نیوکاسل برای چک کردن کنترل کیفی هر آزمایشگاه بصورت داخلی توصیه می‌گردد. انجام کار مشابه بر روی بیماری آنفلوآنزا توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب دکتر عباس برین (آزمایشگاه ایران)، سرکار خانم

مختلف دارای تیتراهای مختلفی خواهند بود. در این زمینه می‌توان با استانداردسازی مناسب پروتکل‌های انجام HI و همچنین معرف‌ها و آموزش‌های ضمن خدمت کارکنان آزمایشگاه‌ها به تیتراهای تقریباً یکسان و استاندارد دست یافت. با توجه به اینکه میزان تکرارپذیری نمونه‌ها در تمامی آزمایشگاه‌ها به جز یک مورد مناسب نبود نیاز به بررسی بیشتر در این زمینه وجود دارد. بروگ و همکاران در سال ۱۹۷۸ گزارش دادند که تغییر در غلظت گلبول‌های قرمز و مقدار واحد HA آنتی‌ژن به مراتب نقش کمتری نسبت به زمان بین اضافه کردن آنتی‌ژن به PBS و اضافه کردن گلبول‌های قرمز به واکنش دارد (۴). نوع و درصد گلبول قرمزی که در آزمون HI استفاده می‌شود می‌تواند در قرائت دقیق جواب‌ها نوسان ایجاد کند و بهتر است که از گلبول قرمز مرغ‌های عاری از پاتوژن و یا نهایتاً از پرندگان که به بیماری نیوکاسل مواجه نشده‌اند و یا غیرواکسینه استفاده شود تا میزان تغییرات در جواب‌ها کمتر شود.



شکل ۳ - جمع امتیاز کسب شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف در تکرارپذیری تست.

جدول ۵ - نتایج بدست آمده از ۵ آنتی‌ژن مختلف در تست‌های که روی ۴۱ نمونه سرم با تیتراهای مختلف انجام شد.

آنتی ژن	B1	شرکت X	تولید شده داخلی	لاسوتا	کلون لاسوتا
تعداد تیترا یکسان	۳۷	۳۳	۳۱	۳۴	۳۹
تعداد نمونه با یک لوگ اختلاف	۴	۶	۸	۷	۲
تعداد نمونه با دو لوگ اختلاف	۰	۲	۲	۲	۰
درصد تعداد تیترا یکسان	۹۰/۳۴	۸۰/۴۹	۷۵/۶۱	۸۲/۹۳	۹۵/۱۲
درصد تعداد نمونه با یک لوگ اختلاف	۹/۷۶	۱۴/۶۳	۱۹/۵۱	۱۷/۰۷	۴/۸۸
درصد تعداد نمونه با دو لوگ اختلاف	۰/۰۰	۴/۸۸	۴/۸۸	۰/۰۰	۰/۰۰

Antibody Titers. *Journal of Visualized Experiments* 2017: 55833.

9- Mehrabanpour, M., M. R. Bushehri and D. Mehrabanpour. 2017. Molecular and serological diagnosis of Newcastle and Ornithobacterium rhinotracheale broiler in chicken in Fars Province, Iran. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 11: 224-227.

10- Nagai, Y., H. D. Klenk and R. Rott. (1976). Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72: 494-508.

11- Rajmani, R. S., S. K. Gupta, P. K. Singh, P. K. Gandham, A. P. Sahoo, U. Chaturvedi and A. K. Tiwari. 2016. HN protein of Newcastle disease virus sensitizes HeLa cells to TNF- α -induced apoptosis by downregulating NF- κ B expression. *Archive Virology* 161: 2395-2405.

12- Reber, A. and J. Katz. 2013. Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection. *expert review vaccines* 12: 519-536.

13- Saadat, Y., S. A. Ghafouri, F. Tehrani and A. G. Langeroudi. 2014. An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province, Iran, 2012–2013. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4: S213-S216.

14- Sabouri, F., M. Vasfi Marandi and M. Bashashati. 2018. Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran. *Avian Pathol* 47: 90-99.

15- Stephenson, I., A. Heath, D. Major, R. W. Newman, K. Hoschler, W. Junzi, J. M. Katz, J. P. Weir, M. C. Zambon and J. M. Wood. 2009. Reproducibility of serologic assays for influenza virus A (H5N1). *Emerging infectious diseases* 15: 1250.

16- Zacour, M., B. J. Ward, A. Brewer, P. Tang, G. Boivin, Y. Li, M. Warhuus, S. A. McNeil, J. J. LeBlanc and T. F. Hatchette. 2016. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clinical Vaccine Immunology* 23: 236-242.

دکتر شاه‌حسینی (آزمایشگاه رایب روشن)، دکتر صالحی‌قمی (آزمایشگاه انجمن جوجه یکروزه) و خانم مهندس سعیده عباسیان (آزمایشگاه ایران) و آقای مهندس حامد خودکاری و آقای مهندس جواد بیات (آزمایشگاه رایب روشن) جهت کمک با انجام پروژه تشکر می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

1- Ahmadi, E., S. A. Pourbakhsh, M. Ahmadi and A. Talebi. 2014. Pathotypic characterization of the Newcastle disease virus isolated from commercial poultry in northwest Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 38: 383-387.

2- Beard, C., S. Hopkins and J. Hammond. 1975. Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. *Avian diseases*: 692-699.

3- Beard, C. and W. Wilkes. 1985. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States. *Avian diseases*: 1048-1056.

4- Brugh Jr, M., C. Beard and W. Wilkes. 1978. The influence of test conditions on Newcastle disease hemagglutination-inhibition titers. *Avian diseases*: 320-328.

5- Cox, R. M. and R. K. Plemper. 2017. Structure and organization of paramyxovirus particles. *Current Opinion in Virology* 24: 105-114.

6- Dimitrov, K. M., C. Abolnik, C. L. Afonso, E. Albina, J. Bahl, M. Berg and et al. 2019. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infection, Genetics and Evolution* 74: 103917.

7- Dimitrov, K. M., A. M. Ramey, X. Qiu, J. Bahl and C. L. Afonso. 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infection, genetics and evolution* 39: 22-34.

8- Kaufmann, L., Syedbasha, M., Vogt, D., Hollenstein, Y., Hartmann, J., Linnik, J. E. and Egli, A. 2017. An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) Assay to Quantify Influenza-specific

