

## آزمایش های سرولوژی مورد استفاده جهت مانیتورینگ واکسن Vectormune® ND

Marcelo Paniago<sup>1</sup>, Christophe Cazaban<sup>1</sup>, Fernando Lozano<sup>1</sup>, Pascal Paulet<sup>2</sup> and Yannick Gardin<sup>3</sup>, Vilmos Palya<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Global Veterinary Services / <sup>2</sup>Corporate Marketing / <sup>3</sup>Scientific Direction / <sup>4</sup>SSIU – Ceva Phylaxia







### مقدمه

یکی از مهمترین ابزارهای تشخیص بیماری و مانیتورینگ سلامت گله در صنعت طیور، تست های سرولوژی می باشند. تست ممانعت از همگلوتیناسیون (HI) یکی از پر کاربردترین تست ها در شناسایی آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل است. همچنین تست الیزا (ELISA) به دلیل حساسیت و ویژگی منطقی و همچنین سهولت در تولید و استفاده مقرون به صرفه می باشد.

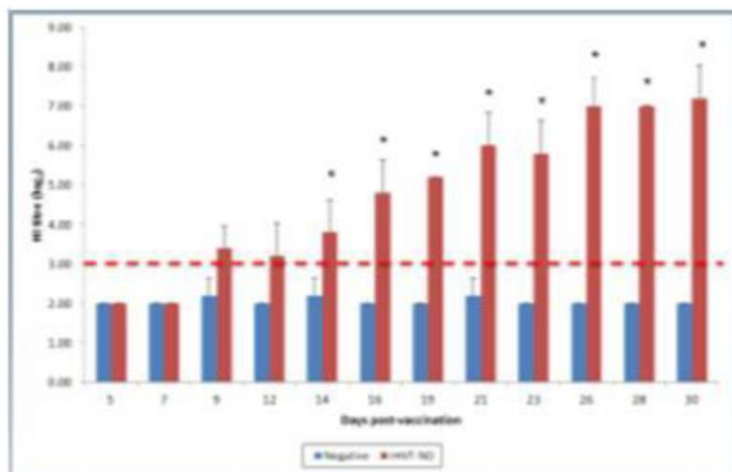
این خبرنامه نحوه بکارگیری دو روش سرولوژیک فوقالذکر برای بررسی پاسخ آنتی بادی به واکسن Vectormune® ND را مورد بحث و بررسی قرار می دهد.

### تست ممانعت از همگلوتیناسیون (HI):

ژن های خاصی در برخی ویروسها پروتئین های سطحی را کد می کنند که قابلیت آگلوتینه کردن گلبول های قرمز حیوانات مختلف را دارند. بعنوان مثال، پروتئینی در قسمت پوشش ویروس آنفلوآنزا وجود دارد که همگلوتنین (HA) نام دارد که با گلبولهای قرمز خون باند شده و یک شبکه از گلبولهای قرمز بهم چسبیده را تشکیل می دهد. به این قابلیت ویروس، همگلوتیناسیون گفته می شود. حضور آنتی بادی های اختصاصی علیه آنتی ژن HA می تواند فعالیت همگلوتیناسیون را مختل نماید. در نتیجه اختلال در این روند، در ته گوده های میکروپلیت بجای تشکیل شبکه، گلبولهای قرمز ته نشین می شوند.

	Components	Interaction	Microtiter Results
A	RBCs		No Reaction 
B	Virus + RBCs		Hemagglutination 
C	Virus + Antibody + RBCs		Hemagglutination Inhibition 

همانگونه که میدانیم واکسن Vectormune® ND یک واکسن زنده است که شامل هرپس ویروس بوقلمون (HVT) بعنوان حامل می باشد که ژن F متعلق به ژنوتیپ I ویروس بیماری نیوکاسل (سویه D26) را بیان کرده است. به بیان دیگر این واکسن پروتئین HN ویروس نیوکاسل که قابلیت ایجاد هماگلوتیناسیون گلبولهای قرمز را دارد بیان نمی کند.



\*موارد ستاره دار نشان دهنده اختلاف معنادار است

بطرز جالب توجهی، واکسن Vectormune® ND می تولد بگونه ای تولید آنتی بادی همورال را تحریک نماید که توسط تست HI قابل شناسایی باشد.

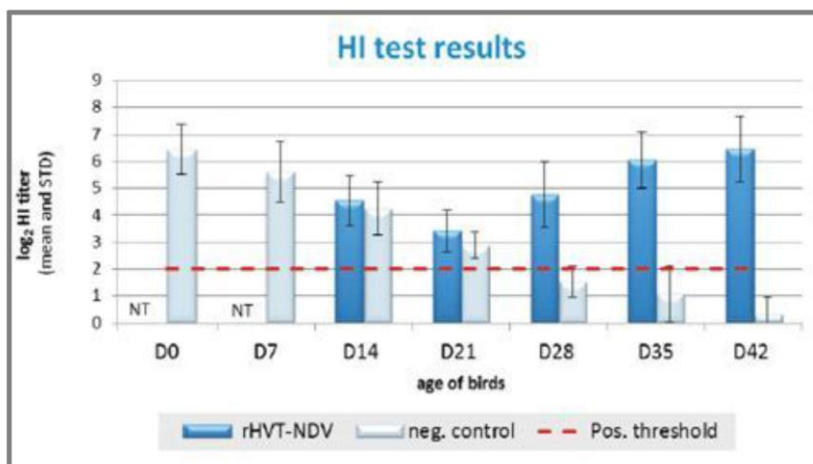
در پرنده های SPF که در سن یک روزگی واکسن Vectormune® ND را بصورت زیرجلدی دریافت کرده اند، از نه روز پس از واکسیناسیون نتیجه تست HI آنها مثبت بود و بصورت مستمر افزایش پیدا کرد تا در سن ۲۶ روزگی به  $6-7 \log_2$  رسید (Rauw et al., 2012). در این مقاله نویسنده در قسمت نتیجه-

گیری شرح ذیل به این نکته اشاره کرد:

"علیرغم اینکه پرنده پروتئین HN را دریافت نکردند، از سن ۹ روزگی به تست HI مثبت داشتند."

در پرنده هایی که ایمنی پسینو علیه بیماری نیوکاسل داشتند (پرنده های دارای آنتی بادی مادری علیه نیوکاسل)، پدیده مشابه پرنده های SPF مشاهده شد. در یک مطالعه که توسط پروفیسور ویلموش پالایا و همکاران (Palya et al., 2012) بر روی جوجه های گوشتی تجاری انجام شد، جوجه های گوشتی تجاری یکروزه واکسن Vectormune® ND را دریافت کردند و حضور آنتی بادی بصورت هفتگی با تست HI مانیتور شد. این مطالعه نیز به روشنی نشان که تست HI قادر به شناسایی پاسخ آنتی بادی ایجاد شده در اثر تلقیح واکسن

Vectormune® ND بود (ستون های آبی تیره).

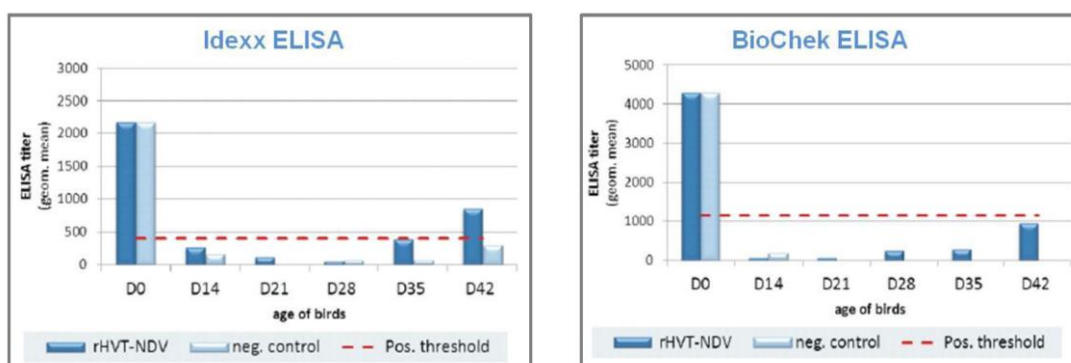


در واقع، این رویداد بخاطر پدیده شیمیایی بنام  $steric\ hindrance^1$  می باشد که طی آن آنتی بادی های تولید شده علیه آنتی ژن F با گلیکوپروتئین های HN موجود در سطح پوشش ویروس نیوکاسل واکنش میدهند.

<sup>1</sup>steric hindrance: پروتئین های HN و F در سطح ویروس های نیوکاسل در کنار یکدیگر قرار گرفته اند. بنابراین بسیار محتمل است که آنتی بادی های تولید شده علیه پروتئین F (آنتی بادی تولید شده در اثر واکسن Vectormune® ND) تاحدی با آنتی ژن HN هم پوشانی داشته و بنابراین می تواند از ایجاد آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز جلوگیری بعمل آورد.

## تست ELISA:

تولید کننده متعددی برای کیت الیזای نیوکاسل در بازار حضور دارند و هیچ کدام از آنها ضرورتاً نتایج یکسانی را نشان نمی‌دهند. هر دو کیت الیزای IDEXX<sup>2</sup> و BioChek<sup>3</sup> می‌توانند تغییرات آنتی بادی القا شده توسط واکسن Vectormune® ND را در مقایسه با گروه غیر واکسینه نشان دهند. با اینحال نسبت پرنده های آنتی بادی مثبت شناسایی شده در هفته ۶ برای گروه کیت IDEXX عددی در حدود ۸۰٪ و برای کیت BioChek عددی در حدود ۳۸٪ بود. تست HI انجام شده بر روی همین



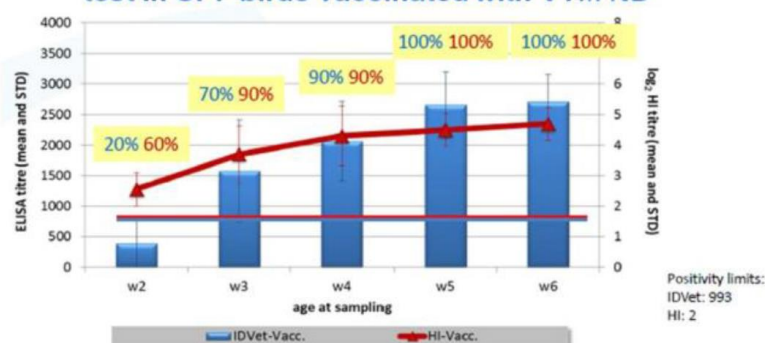
نمونه های سرمی ۹۵٪ تا ۱۰۰٪ مثبت بودن را در سن ۴ هفتگی نشان داد (نتایج در گراف صفحه قبل نشان داده شدند).

بر اساس این نتایج، تست HI حساسیت و ویژگی بسیار بالا و قابل اتکائی در شناسایی آنتی بادی القا شده توسط واکسن Vectormune® ND در پرنده های واکسینه داشته است.

## کیت الیزا IDVet:

به میزان بسیار جالب توجهی، کیت الیزا IDVet<sup>4</sup> می‌تواند آنتی بادی تولید شده علیه واکسن Vectormune® ND را شناسایی نماید.

### Antibody response measured by IDVet ELISA and HI test in SPF birds vaccinated with VTM ND



در یک مطالعه، جوجه های SPF در یک روزگی با واکسن Vectormune® ND بصورت زیر جلدی واکسینه شدند و تغییرات تیترا نیوکاسل آنها با استفاده از کیت الیزا IDVet مانیتور شد. بر اساس نتایج این کیت، نمونه های سرمی از هفته سه به

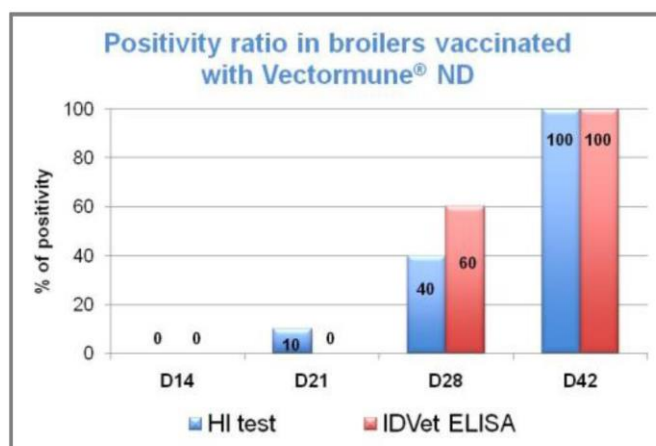
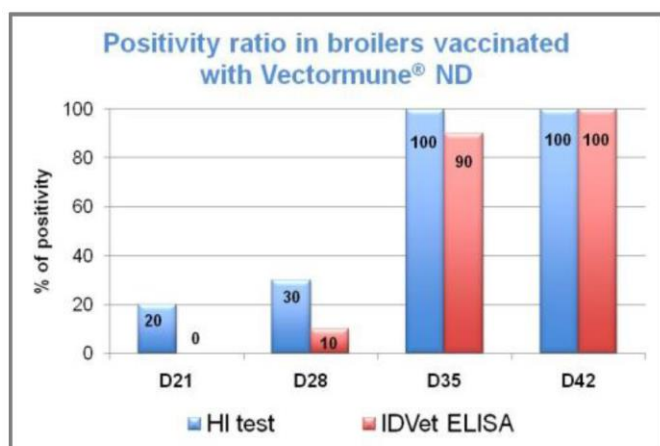
<sup>2</sup> IDEXX NDV Ab Test for chickens (<https://www.idexx.com/livestock-poultry/poultry/newcastle-disease-virus.html>)

<sup>3</sup> NDV) Newcastle Disease Antibody Test Kit (<http://www.biochek.com/ndv-newcastle-disease-antibody-test-kit.html>)

<sup>4</sup> ID Screen® Newcastle Disease Indirect - Indirect ELISA for the detection of antibodies against the Newcastle Disease Virus (NDV) in chicken sera. <http://www.id-vet.com>

بعد مثبت بودند (در هفته سه حدوداً ۷۰٪ نمونه ها مثبت بودند) و در هفته پنج درصد نمونه های مثبت به ۱۰۰٪ رسید. نرخ تغییرات آنتی بادی هم در تست HI و هم در تست الایزا IDVet همخوانی قابل توجهی داشتند (درصد مثبت بودن نمونه ها در هر دو روش الایزا و HI در باکس زرد رنگ نمایش داده شده است).

در دو مطالعه مختلف که روی جوجه های گوشتی تجاری واکسینه شده با واکسن Vectormune® ND در یک روزگی به روش زیر جلدی انجام شده اند، پاسخ آنتی بادی علیه نیوکاسل با دو روش HI و الایزا IDVet بررسی شدند.



همانند نتایجی که در مورد پرنده های SPF مشاهده شد، ریتم تغییرات تیترا آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل (ایمنی همورال) شناسایی شده توسط روش های HI و الایزا IDVet در جوجه های گوشتی تجاری از یک دینامیک مشابه برخوردار بود.

### نتیجه گیری:

بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف بر روی جوجه های گوشتی تجاری، جوجه های تخمگذار تجاری و پرنده های SPF که فقط واکسن Vectormune® ND را دریافت کرده بودند، تست HI و الایزا IDVet حساسترین روش ها برای شناسایی زودهنگام پاسخ ایمنی همورال القا شده توسط این واکسن می باشند.

کیت های الایزا Idexx و BioChek قادر به شناسایی افزایش تیترا آنتی بادی نیوکاسل در گروه واکسینه شده در مقایسه با گروه واکسینه نشده بودند اما نسبت نمونه هایی که توسط این کیت ها در ۶ هفتهگی مثبت تشخیص داده شدند به ترتیب ۸۰٪ و ۳۸٪ بود.

اگرچه تست HI، یک تست کاملاً مناسب برای ارزیابی پاسخ آنتی بادی القا شده توسط Vectormune® ND می باشد، ذکر این نکته خالی از لطف نمی باشد که این روش بایستی تحت یک پروتکل کاملاً استاندارد انجام شود. در غیر اینصورت، نتایج بدست آمده ممکن است گمراه کننده باشند.

بمنظور دستیابی به پاسخ صحیح در تست HI شرکت سوا با همکاری آزمایشگاه GD (دونتر-هلند) یک فیلم آموزشی در مورد جزئیات دستور العمل انجام این تست تهیه کرده اند. همچنین سرم استاندارد برای واکسن Vectormune® ND نیز توسط آزمایشگاه GD تولید شده و در آدرس ذیل در دسترس می باشد:



<http://www.gdanimalhealth.com/gd-diagnostics/product-overview/poultry>

منابع:

1. Butcher, G.D. Diagnostic and Monitoring Serology in Commercial Poultry Integrations: Practical Applications – University of Florida (<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VM/VM10200.pdf>)
2. Newcastle Disease - Chapter 2.3.14 (<http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Healthstandards/tahm/2.03.14NewcastleDis.pdf>)
3. Hemagglutination Inhibition Test (HAI): Principle, procedure, result and interpretations (<http://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations>)
4. Palya, V., Tatár-Kis, T., Felföldi, B., Lozano, F., Gardin, Y. Monitoring the vaccination with a rHVT-NDV vectored vaccine in commercial broilers through serological methods. Poster at AAAP Meeting, San Diego – CA, 2012.
5. Rauw. F., Gardin Y., Palya, V., Ngabirano E., van Borm S., van den Berg T., Lambrecht B. Distribution and humoral immunity induced by a rHVT-ND vaccine in SPF chickens. Poster at 9th International Meeting on Marek's Disease and Avian Herpesviruses. June, 24th to 28th, Berlin, Germany, 2012