

DOI 10.23947/1682-5616-2022-4-35-39

УДК 1.619:616.98:578.832.1:636.52/.58:616-078

СРАВНЕНИЕ ВЫБОРОК ТИТРОВ АНТИТЕЛ РАНГОВЫМ МЕТОДОМ

В. Ю. Кулаков¹, А. А. Пяткина¹, Т. Н. Зыбина¹, Н. В. Мороз¹

¹ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных» (г. Владимир, Российская Федерация)

Ключевые слова: серологические методы, грипп птиц, инактивированная вакцина, гуморальный иммунитет, ранговый метод, статистика

Резюме: По результатам серологического мониторинга оценивали напряжённость гуморально-го иммунитета птиц после применения трёх вариантов инактивированных вакцин против гриппа птиц, возбудитель которого способен к генетическим перестройкам и появлению чрезвычайно опасных высоковирулентных форм. В этой связи возникает необходимость точных количественных оценок титров антител, сопоставления их с пороговыми величинами и статистического анализа полученных результатов. Серологические исследования позволяют получить выборки значений титров антител, определить средние арифметические или средние геометрические оценки, а также статистические показатели в виде стандартных отклонений, коэффициентов вариации или стандартных ошибок средних. Перечисленные оценки и показатели относятся к категории параметрических, поскольку основаны на условии, что распределение элементов выборки является нормальным. Однако это условие далеко не всегда выполняется, что приводит к некорректным выводам, особенно при проведении сравнительного анализа. При этом также следует указать, что сравнения, проводимые в группе, состоящей более чем из двух выборок, не могут быть проведены по независимым парам. В этом случае требуются специальные методы множественных сравнений. Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ трёх выборок титров антител. Использовали непараметрический метод множественных сравнений Миллера, который разработан для обнаружения существенности различий средних тенденций в выборках независимо от вида распределения варьирующих переменных. Согласно алгоритму метода, весь массив экспериментальных данных объединяли в общий упорядоченный (ранжированный) ряд, в котором каждой переменной назначали порядковый номер (ранг). Соответственно исходным выборкам вычисляли средние ранги переменных. Определяли разности средних рангов и необходимые статистические операторы, которые сопоставляли с табличными величинами (таблица прилагается). Таким образом, определяли статистическую значимость установленных разностей. Метод не требовал от исполнителей специальной математической подготовки.

Введение. Для многих вирусных болезней птиц гуморальный иммунитет в аспекте протективного эффекта имеет важное значение [1, 2]. Это касается весьма актуальной проблемы – оценки эффективности специфической профилактики гриппа птиц, возбудитель которого способен к генетическим перестройкам и появлению чрезвычайно опасных высоковирулентных форм [3]. В этой связи возникает необходимость точных количественных оценок титров антител, сопоставления их с пороговыми величинами [4, 5] и статистического анализа полученных результатов [6].

Серологические исследования позволяют получить выборки значений титров антител, определить средние арифметические или средние геометрические оценки, а также статистические показатели в виде

стандартных отклонений, коэффициентов вариации или стандартных ошибок средних.

Перечисленные оценки и показатели относятся к категории параметрических, поскольку основаны на условии, что распределение элементов выборки является нормальным. Однако это условие далеко не всегда выполняется [7, с. 18], что приводит к некорректным выводам, особенно при проведении сравнительного анализа. При этом также следует указать, что сравнения, проводимые в группе, состоящей более чем из двух выборок, не могут быть проведены по независимым парам [8, с. 101]. В этом случае требуются специальные методы множественных сравнений [9, с. 182].

Настоящее сообщение иллюстриру-

ет возможность использования непараметрического метода множественных сравнений Миллера [7, с. 141], который позволяет установить существование различий средних тенденций в сопоставляемых выборках независимо от количества выборок и распределения их составляющих. Метод не требует специальной математической подготовки и все необходимые расчёты могут быть выполнены с использованием карманного калькулятора.

Материалы и методы. *Исходные данные.* Группа из k -числа выборок варьирующих элементов одного типа (x). Объёмы выборок одинаковы ($n_1 = n_2 \dots = n_k$), при условии, что $n \geq 15$.

Алгоритм. Элементы каждой выборки промаркировать с возможностью последующей идентификации (например, записать выборки разными цветами). Объединить выборки, располагая элементы по возрастанию, и получить общий ранжированный ряд ($x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_{n_{\max}}$). Пронумеровать элементы ранжированного ряда по возрастанию. Порядковый номер элемента будет являться его рангом (h), при этом для одинаковых по величине элементов вычислить средние ранги. Выделить ранги, соответствующие элементам сопоставляемых выборок, и для каждой выборки определить средний ранг (H_1, H_2, \dots, H_k).

В неповторяющихся комбинациях провести парные сравнения значений H и для каждой пары (например, H_1, H_2) вычислить статистический оператор вида (1)

$$q = |H_1 - H_2| / \sqrt{(k(n+1)/12)} \quad (1)$$

Полученное значение q следует сопоставить с критериальными показателями q_p , приведёнными в таблице 3 в строке « k », и определить наибольший показатель, для которого выполняется неравенство (2)

$$q \geq q_p \quad (2)$$

Соответственно установленному значению q_p , по таблице 3 определить величину p , которая является вероятностью ошибки прогноза о том, что средние ранговые показатели статистически не равны ($H_1 \neq H_2$), т. е. средние тенденции в данной паре выборок различаются. Существенными считают различия при условии, если $p \leq 0,05$. При $0,05 < p \leq 0,2$ прогноз признают не устойчивым. В этом случае для достижения существенных различий, как правило, требуется увеличение объёма выборок.

Результаты и обсуждение. На базе птицефабрики в трёх цехах, содержащих по 10 тыс. голов в возрасте 70 суток, испыта-

ли три варианта (1, 2, 3) инактивированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц. Через 21 сутки после иммунизации в каждом цехе в случайном порядке (в разных точках) отобрали по 20 образцов крови для оценки напряжённости поствакцинального гуморального иммунитета. Сыворотки крови исследовали в РТГА и определяли величину титра сывороточных антител к вирусу гриппа.

В результате были получены три выборки ($k = 3$) значений титров (x и $\log x$), для которых в общем упорядоченном ряду определили ранговые показатели (h) и, соответственно испытанным вакцинам, рассчитали средние ранги (H). Далее было проведено сравнение средних тенденций выборок титров, которые рассматривались как характеристики иммунологических свойств испытанных вакцин. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что наибольшая оценка средней тенденции была установлена для выборки 2 и соответствовала значению $H_2 = 42,85$. Остальные выборки демонстрировали меньшие средние оценки ($H_1 = 23,375$ и $H_3 = 25,475$). Далее, в неповторяющихся комбинациях провели последовательное парное сравнение полученных средних рангов. Таким образом, для каждой пары по формуле (1) были рассчитаны статистические операторы q , позволяющие определить существование различий средних тенденций в данных выборках. Результаты сравнения оценок H приведены в таблице 2.

Приведённые в таблице 2 оценки статистических операторов q сопоставляли с критериальными значениями q_p из таблицы 3.

Установили, что для значений $q_{1.2} = 4,987$ и $q_{1.3} = 4,449$ по строке $k = 3$ неравенство (2) выполнялось до критериальной величины $q_{p=0,005} = 4,424$ включительно. Это означало, что средний ранговый показатель $H_2 = 42,85$ имел существенное превосходство ($p < 0,005$) над оценками $H_1 = 23,375$ и $H_3 = 25,475$, которые между собой статистических различий не имели ($q_{2.3} = 0,538$).

Результаты проведённого анализа позволили с высокой вероятностью считать, что из трёх вариантов инактивированной вакцины против гриппа птиц, тестированных по показателю антигенного действия (индукции гуморального иммунного ответа птицы), преимущества показал вариант 2.

В качестве иллюстрации для анализа

Таблица 1. Результаты серомониторинга птиц, иммунизированных инактивированными вакцинами против гриппа

Титры антител к вирусу гриппа (x и $\log_2 x$), их ранговые показатели (h) и средние значения рангов (H), установленные соответственно испытанным вариантам вакцин (1, 2, 3)								
1			2			3		
x	$\log_2 x$	h	x	$\log_2 x$	h	x	$\log_2 x$	h
4	2	3,5	32	5	15,5	16	4	5,5
4	2	3,5	64	6	33	16	4	5,5
4	2	3,5	64	6	33	32	5	15,5
4	2	3,5	64	6	33	32	5	15,5
32	5	15,5	64	6	33	32	5	15,5
32	5	15,5	64	6	33	32	5	15,5
32	5	15,5	64	6	33	32	5	15,5
32	5	15,5	64	6	33	32	5	15,5
32	5	15,5	128	7	48,5	32	5	15,5
32	5	15,5	128	7	48,5	32	5	15,5
32	5	15,5	128	7	48,5	32	5	15,5
32	5	15,5	128	7	48,5	64	6	33
64	6	33	128	7	48,5	64	6	33
64	6	33	128	7	48,5	64	6	33
64	6	33	128	7	48,5	64	6	33
64	6	33	128	7	48,5	128	7	48,5
128	7	48,5	512	9	57	128	7	48,5
512	9	57	512	9	57	128	7	48,5
1024	10	59	4096	12	60	128	7	48,5
H₁		23,375	H₂		42,85	H₃		25,475

Таблица 2. Результаты сравнения средних ранговых показателей (H) тестируемых выборок титров антител (по данным таблицы 1)

Оценки q^* , установленные для данной пары значений H			
	H₁ = 23,375	H₂ = 42,85	H₃ = 25,475
H₂	4,987	-	-
H₃	0,538	4,449	-
Примечание:	* - например, $q_{1,2} = 23,375 - 42,85 / \sqrt{(3 \times (3 \times 20 + 1) / 12)} = -19,475 / 3,905 = 4,987$		

Таблица 3. Некоторые критериальные значения q_p соответственно уровню p и k-числу выборок [2, с. 340]

k	P						
	0,2	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001
2	1,812	2,326	2,772	3,170	3,643	3,970	4,654
3	2,424	2,902	3,314	3,682	4,120	4,424	5,063
4	2,784	3,240	3,633	3,984	4,403	4,694	5,309
5	3,037	3,478	3,858	4,197	4,603	4,886	5,484
6	3,232	3,661	4,030	4,361	4,757	5,033	5,619
7	3,389	3,808	4,170	4,494	4,882	5,154	5,730
8	3,520	3,931	4,286	4,605	4,987	5,255	5,823
9	3,632	4,037	4,387	4,700	5,078	5,341	5,903
10	3,730	4,129	4,474	4,784	5,157	5,418	5,973

приведённых в таблице 1 выборки $\log_2 x$ использовали параметрический метод множественных сравнений Шеффе [4, с. 182]. Рассчитали групповые средние ($\log_2 X_1 = 5,20$; $\log_2 X_2 = 7,00$; $\log_2 X_3 = 5,55$), определили общую сумму квадратов отклонений ($\sum_0 = 146,15$), статистический оператор для k -числа выборок ($D = (\sum_0 (k-1))/(\sum_n k) = 5,128$) и операторы парных сравнений вида $F_{1,2} = (\log_2 X_1 - \log_2 X_2) / (D/n_1 + D/n_2)$, оценки которых составили $F_{1,2} = 6,32$; $F_{1,3} = 4,10$ и $F_{2,3} = 0,24$. Для каждой пары проверяли выполнимость неравенства $F \geq F_p$, где F_p табличное значение критерия Фишера [10, с. 346] соответственно степеням свободы $v_1 = k-1 = 2$, $v_2 = \sum_n k = 57$ и уровням вероятности: $p = 0,05$ (3,15); $p = 0,01$ (4,98); $p = 0,001$ (7,76). Установили, что параметрический способ позволил обнаружить существенность различий средних оценок титров, однако требовал значительно большего объёма вычислительных операций и не повысил уровня значимости (p) искомым разли-

чий.

Также отметим, что рассмотренный ранговый метод не предполагал обязательного логарифмирования значений титров. В данном случае размерность показателей не имела значения, поскольку метод основан на определении и сравнении параметров положения показателей в общем ранжированном ряду. Величины $\log x$ были вычислены для удобства представления данных и выполнения процедуры ранжирования.

Заключение. Считаем, что метод Миллера удобен и вполне может иметь практическое применение при обработке данных серологических исследований. В дополнение укажем, что существует основанный на аналогичном принципе ранговый метод Данна [7, с. 142], который может быть использован для анализа выборок первичных данных неравных объёмов.

Библиографический список:

1. Кэллек Б. У. Болезни диких и сельскохозяйственных птиц / под ред. Б. У. Кэллека, Х. Дж. Барнса, Ч. У. Биэрда, Л. Р. Макдугалда, И. М. Сэйфа // – Ч. 3. – 10-е изд., пер. с англ. – М.: Аквариум-Принт, 2011. – 1232 с.
2. Hartle S. Structure and Evolution of Avian Immunoglobulins / S. Hartle, K. E. Magor, T. W. Goden, F. Davison, B. Kaspers // Avian Immunology / Edited by Davison, F. & Kaspers, B. & Schat, Karel. (2008). 10.1016/B978-0-12-370634-8.X5001-X. / P 103–114.
3. Katz J. M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses / J. M. Katz [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy 2000; 54: 178–187.
4. OIE. High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) – Situation report 11/04/2022.
5. OIE. Terrestrial Animal Health 2021. Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). P 1–24.
6. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (version adopted in May 2013), – P. 72–87.
7. Холлендер М. Непараметрические методы статистики / М. Холлендер, Д. Вулф // – М.: Финансы и статистика, 1983. – 518 с.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // – М.: Практика, 1998. – 459 с.
9. Поллард Д. Справочник по вычислительным методам статистики / Д. Поллард // – М.: Финансы и статистика, 1982. – 344 с.
10. Плохинский Н. А. Биометрия. – М.: Изд-во Московского университета, 1970. – 367 с.

References:

1. Kelnek B. U. Bolezni dikih i sel'skhozoyajstvennyh ptic / pod red. B. U. Kelneka, H. Dzh. Barnsa, Ch. U. Bierda, L. R. Makdugalda, I. M. Sejfa // – Ch. 3. – 10-e izd., per. s angl. – M.: Akvarium-Print, 2011. – 1232 s.
- 2–6. Vide supra.
7. Hollender M. Neparametricheskie metody statistiki [Non-parametric methods of statistics] / M. Hollender, D. Vulf // – M.: Finansy i statistika, 1983. – 518 s.
8. Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika [Medicobiological statistics] / S. Glanc // – M.: Praktika, 1998. – 459 s.
9. Pollard D. Spravochnik po vychislitel'nyh metodam statistiki [Handbook of computational methods of statistics] / D. Pollard // – M.: Finansy i statistika, 1982. – 344 s.
10. Plohinskij N. A. Biometriya [Biometrics] – M.: Izdvo Moskovskogo universiteta, 1970. – 367 s.

DOI 10.23947/1682-5616-2022-4-35-39

BENCHMARKING OF ANTIBODY TITRES SELECTIONS USING THE RANKING METHOD

V. Yu. Kulakov¹, A. A. Pyatkina¹, T. N. Zybina¹, N. V. Moroz¹

¹ «All-Russian Research Institute of Animal Protection» (Vladimir, Russian Federation)

Key words: serological methods, avian influenza, inactivated vaccine, humoral immunity, ranking method, statistics

Abstract: Based on the serological monitoring results the humoral immunity level in birds was assessed after the use of three variants of inactivated vaccines against avian influenza, which causative agent is capable of genetic rearrangements and generation of extremely dangerous highly virulent forms. The reason there arises the need for accurate quantitative assessments of antibody titres, their benchmarking against threshold values and statistical analysis of the received results. The serological examinations allow obtaining the selections of antibody titres values, determining the arithmetic or geometric mean values, as well as statistical indicators such as standard deviations, coefficients of variation or standard error of the mean. In the parametric ones, since they are based on the given normal distribution of the elements of a selection. However, this condition is not always met, which leads to the incorrect conclusions, especially when conducting a comparative analysis. Alongside, it should be noted that benchmarking made in a group consisting of more than two selections cannot be made on independent pairs. In this case the special multi-comparative methods are required. The aim of this work was to conduct a comparative analysis of three antibody titres selections. The nonparametric multiple comparison Miller's method was applied, which is designed to detect the essentiality of mean trends differences in selections, regardless of the type of changing variables distribution. According to the method's algorithm, the entire array of experimental data was integrated into a common rank-ordered (ranked) row, where each variable was assigned a serial number (rank). Respective with the original selections, the variables' mean ranks were calculated. The mean ranks subtraction results and the necessary statistical operators were determined, which were benchmarked against the table values (the table is attached). Thus, the statistical significance of the discovered results of subtraction was drawn. The method did not require any special mathematical background of the researchers.

Сведения об авторах:

Кулаков Владимир Юрьевич, канд. ветеринар. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»; мкр. Юрьево, г. Владимир, Российская Федерация, 600900; тел.: +7 (915) 793-02-62; e-mail: kulakov@arriah.ru

Пяткина Алла Александровна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»; мкр. Юрьево, г. Владимир, Российская Федерация, 600900; тел.: +7 (919) 010-82-29; e-mail: pyatkina@arriah.ru

Мороз Наталья Владимировна, канд. ветеринар. наук, зав. лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»; мкр. Юрьево, г. Владимир, Российская Федерация, 600900; тел.: +7 (900) 480-77-96; e-mail: moroz@arriah.ru

Зыбина Татьяна Николаевна, канд. ветеринар. наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных»; мкр. Юрьево, г. Владимир, Российская Федерация, 600900; тел.: +7 (904) 593-77-08; e-mail: zybina@arriah.ru

Author affiliation:

Kulakov Vladimir Yur'evich, Ph. D. in Veterinary Medicine, Leading Researcher of the Laboratory for the Prevention of Bird Diseases of the FSBI «All-Russian Research Institute for Animal Welfare»; Yuryevets microdistrict, Vladimir city, Russian Federation, 600900; phone: +7 (915) 793-02-62; e-mail: kulakov@arriah.ru

Pyatkina Alla Aleksandrovna, Ph. D. in Biology, Leading Researcher of the Laboratory for the Prevention of Bird Diseases of the FSBI «All-Russian Research Institute for Animal Welfare»; Yuryevets microdistrict, Vladimir city, Russian Federation, 600900; phone: +7 (919) 010-82-29; e-mail: pyatkina@arriah.ru

Moroz Natal'ya Vladimirovna, Ph. D. in Veterinary Medicine, Head of the Laboratory for the Prevention of Bird Diseases of the FSBI «All-Russian Research Institute for Animal Welfare»; Yuryevets microdistrict, Vladimir city, Russian Federation, 600900; phone: +7 (900) 480-77-96; e-mail: moroz@arriah.ru

Zybina Tat'yana Nikolaevna, Ph. D. in Veterinary Medicine, Junior Researcher of the Laboratory for the Prevention of Bird Diseases of the FSBI «All-Russian Research Institute for Animal Welfare»; Yuryevets microdistrict, Vladimir city, Russian Federation, 600900; phone: +7 (904) 593-77-08; e-mail: zybina@arriah.ru