

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ И ИММУНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ/INFECTIOUS DISEASES AND ANIMAL IMMUNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.68>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДЕКСА НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЦЕЛЕВОМУ АНТИГЕНУ В ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКЕ

Научная статья

Пяткина А.А.¹, Зыбина Т.Н.^{2,*}, Мороз Н.В.³, Кулаков В.Ю.⁴

² ORCID : 0000-0002-9434-6680;

³ ORCID : 0000-0002-9672-8594;

⁴ ORCID : 0000-0002-1898-4576;

^{1, 2, 3, 4} Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (zybina[at]arriah.ru)

Аннотация

Введение. Исследовали возможность использования индекса нейтрализации (NI) для выявления антител к вирусу инфекционного бронхита кур в сыворотке крови кур, иммунизированных поливалентной инактивированной вакциной против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК) и синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) «Триовак Мульти» (ФГБУ «ВНИИЗЖ, г. Владимир). При этом валентность ИБК в составе вакцины представлена смесью антигенов трех штаммов: «ВНИИЗЖ793/В» (I), ВНИИЗЖ RF08-10 QX (II) и «Чапаевский» (III).

Материалы и методы. В работе использовали:

- штаммы вируса ИБК;
- сыворотки крови:
- от цыплят, выведенных из СПФ-эмбрионов кур (отрицательная сыворотка);
- от кур, содержащих антитела к вирусу НБ;
- от кур, содержащих антитела к вирусу ССЯ-76;
- от кур, иммунизированных поливалентной инактивированной вакциной «Триовак Мульти»;
- СПФ-эмбрионы кур (тест-объекты).

В реакции, где постоянная доза сыворотки воздействовала на последовательные разведения вируса, определяли индекс нейтрализации вида: $IgIN = IgT_0 - IgT_1$, где T_0 – инфекционный титр вируса после контакта с отрицательной сывороткой; T_1 – инфекционный титр вируса после контакта с иммунной сывороткой. Значимость оценки $IgIN$ (на уровне $p < 0,05$) проверяли используя неравенство $(IgIN/S) \geq 2$, где S – соответствующее стандартное отклонение.

Результаты исследований. Установили, что сыворотки, содержащие антитела в только вирусам НБ и ССЯ-76, в реакции с вирусом ИБК не имели статистически значимых оценок $IgIN \pm S$, что свидетельствовало о специфичности теста. При этом сыворотка, полученная после применения вакцины «Триовак Мульти», показала высокую нейтрализующую активность по отношению ко всем тестируемым штаммам ИБК. Соответствующие средние показатели $IgIN \pm S$ составили:

I) $2,694 \pm 0,313$;

II) $3,434 \pm 0,151$;

III) $3,278 \pm 0,319$.

Коэффициенты вариации средних оценок находились в границах диапазона (%): 4,3-11,6.

Обсуждение и заключение. Исследование сыворотки крови кур, иммунизированных поливалентной инактивированной вакциной «Триовак Мульти», в которой одна из валентностей состоит из смеси антигенов трех штаммов вируса ИБК, показало, что использование индекса нейтрализации вируса позволяет достоверно определить наличие антител отдельно к каждому из трех штаммов вируса ИБК, исключая неспецифические реакции.

Ключевые слова: поливалентная инактивированная вакцина, вирус инфекционного бронхита кур, титр инфекционного вируса, реакция нейтрализации вируса, индекс нейтрализации вируса.

USE OF THE VIRUS NEUTRALIZATION INDEX TO DETECT ANTIBODIES TO TARGET ANTIGEN IN A POLYVALENT SERUM

Research article

Ryatkina A.A.¹, Zibina T.N.^{2,*}, Moroz N.V.³, Kulakov V.Y.⁴

² ORCID : 0000-0002-9434-6680;

³ ORCID : 0000-0002-9672-8594;

⁴ ORCID : 0000-0002-1898-4576;

^{1, 2, 3, 4} Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russian Federation

* Corresponding author (zybina[at]arriah.ru)

Abstract

Introduction. The possibility of using the neutralization index (NI) to detect antibodies to chicken infectious bronchitis virus in blood serum of chickens immunized with polyvalent inactivated vaccine against Newcastle disease (ND), infectious chicken bronchitis (ICB) and syndrome of reduced egg production-76 (SSY-76) "Triovac Multi" (FSBI "VNIIZH, Vladimir)

was studied. In this case, the valence of ICD in the vaccine composition is represented by a mixture of antigens of three strains: "VNIIZH793/B" (I), VNIIZH RF08-10 QX (II) and "Chapaevsky" (III).

Materials and Methods. The following were used:

- ICB virus strains;
- blood sera:
- from chickens bred from SPF-embryos of chickens (negative serum);
- from chickens containing antibodies to ND virus;
- from chickens containing antibodies to SSN-76 virus;
- from chickens immunized with polyvalent inactivated vaccine "Triovac Multi";
- SPF-embryos of chickens (test subjects).

In the reaction, where a constant dose of serum was exposed to successive dilutions of the virus, the neutralization index of the form was determined: $\lg IN = \lg T_0 - \lg T_1$, where T_0 – infectious titre of the virus after contact with negative serum; T_1 – infectious titre of the virus after contact with immune serum. The significance of the $\lg IN$ estimate (at the $p < 0.05$ level) was tested using the inequality $(\lg IN/S) \geq 2$, where S is the corresponding standard deviation.

Research Results. It was found that sera containing antibodies only to ND and SSN-76 viruses did not have statistically significant $\lg IN \pm S$ values in the reaction with ICB virus, which indicated the specificity of the test. At the same time, serum obtained after application of Triovac Multi vaccine showed high neutralizing activity against all tested ICB strains. The corresponding mean $\lg IN \pm S$ values were:

- I) 2.694 ± 0.313 ;
- II) 3.434 ± 0.151 ;
- III) 3.278 ± 0.319 .

The coefficients of variation of the mean scores were within the range (%): 4,3-11,6.

Discussion and Conclusion. The study of blood serum of chickens immunized with polyvalent inactivated vaccine "Triovac Multi", in which one of the valences consists of a mixture of antigens of three strains of ICB virus, has shown that the use of the virus neutralization index allows to reliably determine the presence of antibodies separately to each of the three strains of ICB virus, excluding non-specific reactions.

Keywords: polyvalent inactivated vaccine, infectious chicken bronchitis virus, infectious virus titre, virus neutralization reaction, virus neutralization index.

Введение

Для объективной оценки напряженности гуморального иммунитета после применения поливалентных вакцин (включающих нескольких антигенов) необходим отдельный анализ воздействия каждого антигена, исключая при этом неспецифические (гетерологичные) эффекты.

Настоящая работа проведена с сыворотками крови кур, иммунизированных вакциной против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК) и синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) инактивированной эмульсионной «Триовак Мульти» (ФГБУ «ВНИИЗЖ, г. Владимир). При этом валентность ИБК в составе вакцины представлена смесью антигенов трех штаммов.

Оценивали поствакцинальную гуморальную реакцию птиц отдельно на каждый антиген ИБК по нейтрализующему эффекту сыворотки в отношении вируса соответствующего штамма.

Использовали вариант реакции нейтрализации, при котором фиксированная доза иммунной сыворотки крови взаимодействует с последовательными разведениями вируса. Результат реакции выражали в виде соотношения (индекса) титров вируса, установленных после воздействия иммунной и контрольной (не иммунной) сывороток.

Целью работы было доказательство возможности использования данного варианта реакции нейтрализации для выявления антител к конкретным антигенам в сыворотке, содержащей различные антитела.

В рамках основной цели были определены задачи, позволяющие обосновать возможность использования индекса нейтрализации для выявления антител к целевому вирусу в полиспецифической сыворотке:

1. Оценить специфичность метода. Исключить статистически значимый эффект нейтрализации целевого вируса сыворотками, содержащими антитела к вирусам других видов;
2. Показать, что индекса нейтрализации вируса позволяет достоверно определить наличие антител в полиспецифической сыворотке отдельно к штаммам целевого вируса;
3. Определить коэффициенты вариации индексов нейтрализации, как ожидаемой статистической неопределенности результирующих оценок реакции.

Анализ проводили, опираясь на принципы, изложенные в известных научных публикациях, связанных с оценками концентрации инфекционного вируса и определением соответствующих статистических показателей [1], [2], [3], [4], [5].

Методы и принципы исследования

Штаммы вируса ИБК:

- штамм «ВНИИЗЖ793/В» серотипа 793/В;
- штамм «ВНИИЗЖ RF08-10 QX» серотипа «QX»;
- штамм «Чапаевский» серотипа «Массачусетс».

Все вирусные материалы хранили при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в виде вакуумированных лиофилизованных образцов, предназначенных для однократного вскрытия. Перед экспериментами лиофилизаты ресуспендировали до исходного объема в 0,9% растворе натрия хлорида (физиологическом растворе).

Сыворотки:

- сыворотка крови кур, свободная от антител к вирусам ИБК, ньюкаслской болезни (НБ), синдрома снижения яйценоскости -76 (ССЯ-76) и метапневмовирусной инфекции птиц (МПВИ) от цыплят в возрасте 28 суток, выведенных из СПФ-эмбрионов кур. Отсутствие антител к вирусам ИБК и ССЯ-76 подтверждали в ИФА, к вирусу НБ - в РТГА. Сыворотку использовали в качестве отрицательного контроля;

- содержащая антитела к вирусу НБ сыворотка крови цыплят, иммунизированных против НБ (в тексте – сыворотка "НБ"), и отобранная в возрасте 40 суток. Титр в РТГА составил 1:1024;

- содержащая антитела к вирусу ССЯ-76 сыворотка крови (в тексте – сыворотка "ССЯ") кур, иммунизированных против ССЯ-76, и отобранная в возрасте 120 суток. Титр в РТГА составил 1:2048;

- смесь образцов сыворотки крови от 25 кур в возрасте 150 суток. Образцы получены через 28 суток после иммунизации инактивированной эмульсионной вакциной против ньюкаслской болезни (НБ), инфекционного бронхита кур (ИБК) и синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76) «Триовак Мульти» (в тексте – Триовак). В составе вакцины валентность ИБК представлена смесью антигенов штаммов «ВНИИЗЖ793/В» серотипа 793/В, штамм «ВНИИЗЖ RF08-10 QX» серотипа «QX» и штамм «Чапаевский» серотипа «Массачусетс». Пробы сыворотки исследованы на присутствие антител к трем антигенным валентностям вакцины. Среднегеометрические значения титров антител ($n=25$), соответственно валентностям, составили: НБ - 1:1753 (оценка в РТГА); ИБК - 1:4855 (оценка в ИФА); ССЯ-76 - 1:924 (оценка в РТГА).

Все сыворотки были расфасованы по 1см³ в герметичные криопробирки (для однократного использования) и хранили при минус (40±5)°С. Перед экспериментами сыворотки проходили термообработку при (56±1)°С в течение 30 минут.

Чувствительные тест-объекты: Для оценки инфекционного титра вируса в качестве чувствительных тест-объектов использовали СПФ-эмбрионы кур 9-10-суточной инкубации от поставщика/производителя: VALO BioMedia GmbH, Sachsenring 11, 27711 Osterholz-Scharmeeck, Germany.

Процедура постановки реакции. На физиологическом растворе готовили последовательные десятикратные разведения вирусного материала данного штамма для реакции с контрольной и тестируемыми сыворотками (в тексте величина разведения указана в положительных десятичных логарифмах). В каждое разведение вносили 1/5 объема сыворотки. Полученные смеси на 30 мин помещали в термостат, после чего применяли для заражения эмбрионов. Вирусный материал в объеме 0,2 см³ вводили шприцом в аллантоисную полость эмбриона через отверстие в скорлупе. Инфицированные эмбрионы содержали в термостате в течение 7 суток.

Оценка результатов. Ежедневно проводили осмотр инфицированных эмбрионов в проходящем свете (овоскопию). Гибель эмбрионов в течение первых 24 ч после заражения, считали неспецифической. По истечении 24 ч, в продолжение 7 суток у эмбрионов оценивали реакцию на вирусную инфекцию (гибель, или характерные дефекты развития). Результат клинических наблюдений интерпретировали однозначно: объект либо проявлял клинический признак (реакция положительная), либо не проявлял (реакция отрицательная).

Обработка экспериментальных данных. Расчет логарифмической величины титра 50%-ных эмбриональных инфицирующих доз (T , $Ig_{ЭИД_{50}}$) выполняли по методу Спирмена-Кербера [6, С. 212]. Вычисляли стандартное отклонение ($\pm s$) оценки титра [7, С. 242]. При анализе экспериментального материала опирались на положения о статистической неопределенности измерений, изложенные в ГОСТ 34100.3 [8]. Для проверки статистической значимости оценки индекса нейтрализации на уровне $p < 0,05$, использовали общую дисперсию двух установленных параллельно значений титров ($S^2 = s_1^2 + s_2^2$) [5]. Процедура проведения вычислительных операций представлена в виде алгоритма с примером в таблице 1.

Таблица 1 - Алгоритм расчета индекса нейтрализации вируса

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.68.1>

<p><i>Принцип.</i> Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.</p>	
Обозначения	Формулы и пояснения
h	кратность (шаг) последовательных разведений вирусного материала (h=10)
x	логарифм величины разведения: $x=lg d$, где d - положительная величина разведения («во сколько раз разведено»)
v	объем инъекции вирусного материала в тест-объект ($v=0,2 \text{ см}^3$)

<p><i>Принцип.</i> Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.</p>	
- ; +; θ	оценка реакции тест-объекта: «-» - отрицательная; «+» - положительная; « θ » - неспецифическая (тест-объект исключен)
C	доля положительных реакций в группе: $C=e/n$, где: e - количество положительно реагирующих тест-объектов; n - общее число тест-объектов в группе, на которых испытано данное разведение
X	логарифм наибольшего разведения вирусного материала, при котором $C = 1$
lgT/v	логарифмическая оценка титра 50%-х эмбриональных инфицирующих доз (ЭИД ₅₀) вируса в тестируемом объеме: $lgT/v = X + lgh \times (\Sigma C + 0,5)$, где ΣC - сумма всех $C < 1$
q^{2*}	дисперсия величины C: $q^2 = [C(1-C)]/(n-1)$

<p><i>Принцип.</i> Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.</p>								
s	стандартное отклонение оценки титра: $s = \sqrt{(\sum q^2)}$							
<p><i>Пример.</i> Результаты реакции вируса ИБК штамма «Чапаевский» с контрольной и иммунной сывороткой "ИБК"</p>								
<p>Реакция с контрольной сывороткой (контроль)</p>								
Оценки	x							Σ
	1	2	3	4	X=5	6	7	

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

- ; +; θ	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	Θ ++ +++	Θ ++ +--	--- ---	
C	6/6=1	6/6=1	6/6=1	6/6=1	5/5=1	3/5=0,6	0/6=0	0,60 0
q^2	-	-	-	-	-	0,060	-	0,06 0

Обработка данных: $lgT_0 = 5+1 \times (0,6+0,5)=6,100$; $s_0 = \sqrt{(0,060)} = 0,245$

Реакция с иммунной сывороткой (опыт)

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

Оценки	Логарифмы разведений вирусного материала ($lgd = x$)							Σ
	1	$x=2^*$	3	4	5	6	7	
-; +; θ	$\Theta ++$ $+++$	$\Theta ++$ $+++$	$++-$ $---$	$---$ $---$	$+-$ $---$	$---$ $---$	$---$ $---$	
$C = e/n$	5/5=1	5/5=1	2/6=0,333	0/6=0	1/6=0,167	0/6=0	0/6=0	0,50 0
q^2	-	-	0,044	-	0,028	-	-	0,07 2

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

Обработка данных: $lgT_1 = 2+1 \times (0,5+0,5)=3,000$; $s_1 = \sqrt{(0,072)} = 0,268$

Расчет логарифмической величины индекса нейтрализации
 $lgNI = lgT_0 - lgT_1 = 6,100 - 3,000=3,100$

Расчет стандартного отклонения индекса:
 $\pm S = \sqrt{(s_0^2 - s_1^2)} = \sqrt{(0,245^2 + 0,268^2)} = 0,363$

Оценка значимости установленной величины индекса на уровне $p \leq 0,05$.
 Проверка выполнимости неравенства $|lgNI/S| \geq 2$.
 $|lgNI/S| = 3,100/0,363 = 8,540 > 2$

Заключение
 Неравенство $|lgNI/S| = 8,540 > 2$ выполняется, на этом основании величину $lgNI=(3,1 \pm 0,364)$ считают значимой ($p < 0,05$).

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

**Дополнение к алгоритму:* значения q^2 соответственно величинам n и e (для n от 2 до 10)

n	e								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,250								
3	0,111	0,111							

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

4	0,063	0,083	0,063						
5	0,040	0,060	0,060	0,040					
6	0,028	0,044	0,050	0,044	0,028				
7	0,020	0,034	0,041	0,041	0,034	0,020			
8	0,016	0,027	0,033	0,036	0,033	0,027	0,016		

Принцип. Разведениями вируса с контрольной (контроль) и иммунной (опыт) сыворотками инфицируют чувствительные тест-объекты. Определяют и сравнивают значения инфекционных титров вируса, установленных в контроле (T_0) и в опыте (T_1). Оценочным показателем реакции является величина индекса нейтрализации вида $NI = T_0/T_1$, или $lgNI = lgT_0 - lgT_1$.

9	0,012	0,022	0,028	0,031	0,031	0,028	0,022	0,01 2	
10	0,010	0,018	0,023	0,027	0,028	0,027	0,023	0,01 8	0,010

Примечание: $lg NI \pm S$

Основные результаты

Определение специфичности индекса нейтрализации. В исследовании возможности проявления неспецифического эффекта нейтрализации вируса ИБК сыворотками, содержащими антитела к вирусам других видов, определяли оценки $IgNI \pm S$ и статистическую значимость показателей, установленных для штамма «ВНИИЗЖ793/В» серотипа 793/В, штамма «ВНИИЗЖ RF08-10 QX» серотипа «QX», и штамма «Чапаевский» серотипа «Массачусетс» в реакциях и сыворотками «НБ» и «ССЯ». Провели три опыта, полученные результаты представили в таблице 2.

Таблица 2 - Индексы нейтрализации, установленные для штаммов вируса ИБК в реакциях с сыворотками, полученными на другие виды вирусов

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.68.2>

Соответственно номеру опыта (№) и штамму вируса (I - «ВНИИЗЖ793/В», II - «ВНИИЗЖ RF08-10 QX», III - «Чапаевский») даны значения титров, установленные после контакта с контрольной ($IgT_0 \pm s$) и иммунными сыворотками ($IgT_1 \pm s$), а также оценки индексов ($IgNI \pm S$) и отношение вида $ IgNI /S$ для проверки значимости полученной оценки*.						
№	Штамм	$IgT_0 \pm s$	Иммунная сыворотка	$IgT_1 \pm s$	($IgNI \pm S$)	$ IgNI /S$
1	I	6,047±0,245	“НБ	5,834±0,297	0,163±0,385	0,423
			“ССЯ	5,986±0,358	0,061±0,431	0,142
	II	6,024±0,234	“НБ	6,215±0,315	-	0,487
			“ССЯ	5,841±0,387	0,183±0,452	0,405
	III	6,192±0,310	“НБ	6,012±0,245	0,180±0,395	0,456
			“ССЯ	6,121±0,333	0,071±0,455	0,156
2	I	5,880±0,340	“НБ	6,095±0,163	-	0,570
			“ССЯ	5,912±0,233	0,032±0,412	0,078
	II	6,280±0,322	“НБ	6,130±0,280	0,150±0,427	0,351
			“ССЯ	6,320±0,390	0,040±0,506	0,079
	III	5,890±0,301	“НБ	5,803±0,317	0,087±0,437	0,199
			“ССЯ	5,706±0,331	0,184±0,447	0,412
3	I	5,920±0,261	“НБ	6,120±0,226	-	0,580
			“ССЯ	6,022±0,248	0,102±0,360	0,283
	II	6,140±0,332	“НБ	5,930±0,322	0,210±0,463	0,454
			“ССЯ	6,115±0,340	0,025±0,475	0,052
	III	6,180±0,242	“НБ	6,066±0,266	0,114±0,360	0,317
			“ССЯ	6,207±0,232	-	0,081

Примечание: “НБ”, “ССЯ”; * - оценку индекса нейтрализации считали значимой ($p \approx 0,05$), если выполнялось неравенство вида: $IgNI/S \geq 2$

Из данных таблицы 2 следовало, что критериальное неравенство $|IgNI|/S \geq 2$ ни в одном случае не было выполнено, т. е. все установленные индексы нейтрализации не имели статистической значимости. Без учета статистики однократных опытов, средняя оценка общей выборки неспецифических индексов составила $(0,042 \pm 0,160)$ Ig. На этом основании считали, что уровень неспецифической реакции исследуемых сывороток по отношению к штаммам ИБК находится в границах стандартных отклонений эмпирических величин $IgNI$.

Показатели $IgNI \pm S$, установленные для штаммов вируса ИБК в реакциях с сыворотками, содержащими антитела к данному возбудителю. Определяли значения и статистические характеристики индексов нейтрализации для штаммов вируса ИБК «ВНИИЗЖ793/В», «ВНИИЗЖ RF08-10 QX» и «Чапаевский», установленных в реакциях с сывороткой крови кур, полученной из птицефабрики через 28 суток после иммунизации поливалентной вакциной «ТРИОВАК Мульти».

Таблица 3 - Индексы нейтрализации, установленные для штаммов вируса ИБК в реакциях с сывороткой крови кур, полученной из птицефабрики через 28 суток после иммунизации вакциной «ТРИОВАК Мульти»

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.68.3>

Соответственно номеру опыта (№) и штамму вируса (I – «ВНИИЗЖ793/В», II – «ВНИИЗЖ RF08-10 QX», III – «Чапаевский») даны значения титров, установленные после контакта с контрольной ($\lg T_0 \pm s$) и иммунной сывороткой «Триовак ($\lg T_1 \pm s$), а также оценки индексов ($\lg NI \pm S$) и отношение вида $ \lg NI /S$ для проверки значимости индекса*						
№	Штамм	$\lg T_0 \pm s$	Иммунная сыворотка	$\lg T_1 \pm s$	($\lg NI \pm S$)	$ \lg NI /S$
1	I	5,167±0,316	«Триовак»	2,834±0,237	2,333±0,395	5,906
	II	5,866±0,385		2,334±0,286	3,532±0,469	7,531
	III	6,112±0,246		2,466±0,268	3,646±0,364	10,016
2	I	5,960±0,310	«Триовак»	3,095±0,123	2,865±0,332	8,630
	II	6,191±0,282		2,930±0,210	3,261±0,352	9,264
	III	5,890±0,301		2,803±0,217	3,087±0,372	8,298
2	I	5,905±0,261	«Триовак»	3,020±0,226	2,885±0,345	8,362
	II	6,040±0,222		2,530±0,302	3,510±0,375	9,360
	III	6,100±0,245		3,000±0,268	3,100±0,363	8,340

Примечание: * - оценку индекса нейтрализации считали значимой ($p \approx 0,05$), если выполнялось неравенство вида $\lg NI/S \geq 2$.

Данные таблицы 3 демонстрируют, что критериальное неравенство $|\lg NI|/S \geq 2$ во всех случаях выполнялось, т.е. все установленные индексы нейтрализации были статистически значимы. При этом уровень значимости значительно превосходил $p=0,05$.

На основании данных, полученных в реакции с сывороткой «Триовак, для каждого штамма вируса ИБК (без учета статистики однократных опытов) были рассчитаны средние оценки индексов ($\lg'NI$), стандартные отклонения ($'S$) и коэффициенты вариации ($kv, \%$). Указанные величины соответственно штаммов вируса приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Средние оценки индексов нейтрализации ($\lg'NI$), стандартные отклонения ($'S$) и коэффициенты вариации (kv), установленные для штаммов вируса ИБК по данным трех опытов с сывороткой «Триовак»DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.68.4>

Штамм	$\lg'NI$	$'S$	$kv = ('S/(\lg'NI)) \times 100, \%$
ВНИИЗЖ793/В	2,694	0,313	11,6
ВНИИЗЖ RF08-10 QX	3,434	0,151	4,3
Чапаевский	3,278	0,319	9,7

Представленные в таблице 4 величины позволили считать, что реакции, проведенные со всеми изученными штаммами, имеют удовлетворительную воспроизводимость, характеризуемую коэффициентами вариации в границах от 4,3 до 11,6 %.

Вирусологические методы, где в качестве тест-объектов используют биологические системы, как правило, имеют высокую степень статистической неопределенности конечного результата. Например, при сопоставлении двух величин инфекционных титров вируса допускается, что доверительный интервал ($p=0,05$) их логарифмической разности может достигать $0,5 \lg$ [9], т.е. результирующий показатель может варьировать более чем в три раза.

Надежным способом снижения естественных вариаций является параллельный контроль и получение относительных показателей (индексов). Такой метод постановки вирусологических тестов известен и применяется на практике для количественной оценки воздействия какого-либо фактора ингибиции инфекционности вируса [1], [4], в том числе и нейтрализующего действия иммунной сыворотки [10], [11], [12]. Следует подчеркнуть, что именно индекс нейтрализации вируса используется в наиболее ответственных областях эпиданализа [13], [14], [15].

В доступной литературе вариант постановки реакции по индексу нейтрализации вируса освещен значительно меньше, чем по нейтрализующим дозам сыворотки. Особенно это касается оценки достоверности и интерпретации результатов. Например, принято считать, что значение $\lg NI \geq 1,7$ (или $T_1/T_0 \geq 50$), установленное при воздействии 1/5 объема иммунной сыворотки, соответствует достоверной гомологичной реакции [14], [13]. Однако объяснений этому показателю не приводится.

В целом представляется, что индекс нейтрализации значительно более надежная оценка в сравнении с титром нейтрализующих доз сыворотки, который требует достаточно точной корректировки по количеству нейтрализуемого вируса [16], [17], [18]. Конечно, следует понимать, что количественные характеристики эффективности взаимодействий в системе «антиген-антитело» являются дискуссионными, однако непреложным остаются положения о соотношении концентраций и о рецепторной аффинности [19]. Другими словами, определяющими являются фактор вероятности образования комплексов антиген-антитело и фактор тесноты связи. Индекс нейтрализации, очевидно, отражает влияние обоих указанных факторов. При этом статистическая значимость каждой эмпирической оценки индекса может быть легко проверена по соотношению со стандартным отклонением [20] с использованием карманного калькулятора.

Заключение

В результате проведенной работы было установлено, что использованный методический подход к дифференцированной оценке гуморального иммунитета может быть рекомендован на практике при необходимости достоверного определения наличия антител к заданному вирусу в сыворотках крови птиц, вакцинированных поливалентными препаратами.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Апробация оборудования для вирус-инактивации плазмы донорской крови "THERAFLEX-MB PLASMA" (без участия пациентов): Отчет о НИР (заключит.) / ГУ НИИ гриппа, РАМН; рук. Цибалова Л.М.; исполн.: Мигунов А.И. — Санкт-Петербург, 2007. — 25 с.
2. Чернохаева Л.Л. Состояние поствакцинального иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения эндемичной территории, динамика иммунитета у вакцинированных и невакцинированных пациентов / Л.Л. Чернохаева, Г.Б. Майкова, Ю.В. Рогова и др. // Вопросы вирусологии. — 2019. — 1. — с. 36-40.
3. Щербинина М.С. Состояние поствакцинального иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения эндемичной территории, динамика иммунитета у вакцинированных и невакцинированных пациентов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Щербинина Мария Сергеевна. — Москва, 2019. — 150 с.
4. Horowitz B. Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures Intended to Assure the Viral Safety of Human Blood Plasma Products / B. Horowitz, T. Burnouf, R. McIntosh et al. // World Health Organisation (WHO), Technical report series. — 2004. — P. 224.
5. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (version adopted in May 2013), updated on 01.12.2022. — P. 72-87.
6. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. — Москва: Статистика, 1976. — 598 с.
7. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. — Москва: Медицина, 1975. — 297 с.
8. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения. — Введ. 2018-09-01. — Москва: Стандартинформ, 2018. — 15 С.
9. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 89 Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза (Примечание I. Статистическая оценка вирусных титров и коэффициентов снижения вирусной нагрузки и оценка их валидности). — URL: https://sudact.ru/law/reshenie-soveta-evrazijskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-03112016_16/pravila-provedeniia-issledovani-biologicheskikh-lekarstvennykh/iii/glava-4/ (дата обращения 19.03.2024).
10. Козлова В.И. Реакция нейтрализации вируса герпеса на белых мышах / В.И. Козлова. — URL: <https://www.medeffect.ru/venerology/gerp-0028.shtml> (дата обращения 19.03.24).
11. Monath T.P. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections / T.P. Monath [et al] // Vaccine. — 2002. — Vol. 20. — №7. — P. 18.
12. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. — URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69687/who_ivb_07.07_eng.pdf?sequence=1 (accessed 19.03.24).
13. Соколов М.И. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней / М.И. Соколов, Р.М. Шен, Н.Н. Носик. — Москва: Медицина, 1965. — 591 с.
14. Сизенцов А.Н. Общая вирусология с основами таксономии вирусов позвоночных / А.Н. Сизенцов, А.О. Плотников, Е. А. Дроздова и др. — Оренбург: ОГУ, 2012. — 624 с.
15. Щербинина М.С. Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита / М.С. Щербинина, О.А. Бархалева, О.С. Дорохова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2020. — №3. — С. 174-186.

16. Vanderheiden A. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / A. Vanderheiden, V.V. Edara, K. Floyd et al. // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2020. — № 131(1). — URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33215858/> (accessed 19.03.2024).
17. Katzelnick L.C. Viridot: An automated virus plaque (immunofocus) counter for the measurement of serological neutralizing responses with application to dengue virus / L.C. Katzelnick, A. Coello Escoto, B.D. McElvany [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases.* — 2018. — № 12(10). — URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006862> (accessed 19.03.2024).
18. Lv J. Detection of Neutralizing Antibodies to Tembusu Virus: Implications for Infection and Immunity / J. Lv, L. Yang, S. Qu [et al.] // *Front. Vet. Sci.* — 2019. — 6. — P. 442. — URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00442/full> (accessed 19.03.2024).
19. William A. McEwan. Chapter Six - TRIM21-Dependent Intracellular Antibody Neutralization of Virus Infection / W.A. McEwan, J.C. Leo; ed. by P.J. Klasse // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press. — 2015. — Vol. 129. — P. 167-187. — URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117314000076> (accessed 19.03.24).
20. Kim A. What is the 2 sigma rule? / A. Kim. — 2019. — URL: <https://www.theburningofrome.com/contributing/what-is-the-2-sigma-rule/> (accessed 19.03.2024).

Список литературы на английском языке / References in English

1. Aprobaciya oborudovaniya dlya virus-inaktivacii plazmy donorskoj krovi "THERAFLEX-MB PLASMA" (bez uchastiya pacientov) [Testing of equipment for viral activation of donated blood plasma "THERAFLEX-MB PLASMA" (without patient participation)]; Research report (conclusion) / Influenza Research Institute, RAMS; hands. Tsybalova L.M.; performed by: Migunov A.I. — St. Petersburg, 2007. — P. 25. [in Russian]
2. Chernohaeva L.L. Sostojanie postvaksinal'nogo immuniteta k virusu kleshevoogo entsefalita u naselenija endemichnoj territorii, dinamika immuniteta u vaksinirovannyh i nevaksinirovannyh patsientov [The state of post-vaccination immunity to tick-borne encephalitis virus in the population of an endemic territory, the dynamics of immunity in vaccinated and unvaccinated patients] / L.L. Chernohaeva, G.B. Majkova, Ju.V. Rogova et al. // *Virology issues.* — 2019. — 1. — p. 36-40. [in Russian]
3. Shcherbinina M.S. ASostoyanie postvakcinal'nogo immuniteta k virusu kleshchevogo encefalita u naseleniya endemichnoj territorii, dinamika immuniteta u vakcinirovannyh i nevakcinirovannyh pacientov [The state of post-vaccination immunity to tick-borne encephalitis virus in the population of an endemic territory, the dynamics of immunity in vaccinated and unvaccinated patients]: abstract. ... candidate of Medical Sciences. / Shcherbinina Maria Sergeevna. — Moscow, 2019. — 150 p. [in Russian]
4. Horowitz B. Guidelines on Viral Inactivation and Removal Procedures Intended to Assure the Viral Safety of Human Blood Plasma Products / B. Horowitz, T. Burnouf, R. McIntosh et al. // *World Health Organisation (WHO), Technical report series.* — 2004. — P. 224.
5. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases (version adopted in May 2013), updated on 01.12.2022. — P. 72-87.
6. Zaks L. Statisticheskoe ocenivanie [Statistical evaluation] / L. Zaks. — Moscow: Statistika, 1976. — 598 p. [in Russian]
7. Urbax V.Yu. Statisticheskij analiz v biologicheskix i medicinskix issledovaniyax [Statistical analysis in biological and medical research] / V.Yu. Urbax. — Moscow: Medicina, 1975. — 297 p. [in Russian]
8. Neopredelennost' izmereniya. Chast' 3. Rukovodstvo po vy'razheniyu neopredelennosti izmereniya [Measurement uncertainty. Part 3. Guidelines for expressing measurement uncertainty]. — Introduced 2018-09-01. — Moscow: Standartinform, 2018. — 15 P. [in Russian]
9. Reshenie Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 N 89 Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennyh sredstv Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza (Primechanie I. Statisticheskaya ocenka virusnyh tirov i koefficientov snizheniya virusnoj nagruzki i ocenka ih validnosti) [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated 03.11.2016 No. 89 On Approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicines of the Eurasian Economic Union (Note I. Statistical assessment of viral titers and viral load reduction coefficients and assessment of their validity)]. — URL: https://sudact.ru/law/reshenie-soveta-evrazijskoi-ekonomicheskoi-komissii-ot-03112016_16/pravila-provedeniia-issledovaniy-biologicheskikh-lekarstvennykh/iii/glava-4 / (accessed 19.03.2024). [in Russian]
10. Kozlova V.I. Reakciya nejtralizacii virusa gerpesa na belyh myshah [The reaction of neutralization of the herpes virus in white mice] / V.I. Kozlova. — URL: <https://www.medeffect.ru/venerology/gerp-0028.shtml> (checked on 03/19/24). [in Russian]
11. Monath T.P. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections / T.P. Monath [et al.] // *Vaccine.* — 2002. — Vol. 20. — №7. — P. 18.
12. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. — URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69687/who_ivb_07.07_eng.pdf?sequence=1 (accessed 19.03.24).
13. Sokolov M.I. Rukovodstvo po laboratornoj diagnostike virusnyh i rikketsioznyh boleznej [Guidelines for laboratory diagnostics of viral and rickettsiosis diseases] / M.I. Sokolov, R.M. Shen, N.N. Nosik. — Moscow: Medicine, 1965. — P. 591. [in Russian]
14. Sizentsov A.N. Obshchaya virusologiya s osnovami taksonomii virusov pozvonochnyh: uchebnoe posobie xGeneral virology with the basics of vertebrate virus taxonomy: textbook / A.N. Sizentsov, A.O. Plotnikov, E.A. Drozdova et al. — Orenburg: OSU, 2012. — P. 624. [in Russian]

15. Shcherbinina M.S. Effektivnost' specificheskoy profilaktiki kleshchevogo encefalita [The effectiveness of specific prevention of tick-borne encephalitis] / M.S. Shcherbinina, O.A. Barkhaleva, O.S. Dorokhova [et al.] // *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment]. — 2020. — № 3. — P. 174-186. [in Russian]
16. Vanderheiden A. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / A. Vanderheiden, V.V. Edara, K. Floyd et al. // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2020. — № 131(1). — URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33215858/> (accessed 19.03.2024).
17. Katzelnick L.C. Viridot: An automated virus plaque (immunofocus) counter for the measurement of serological neutralizing responses with application to dengue virus / L.C. Katzelnick, A. Coello Escoto, B.D. McElvany [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases.* — 2018. — № 12(10). — URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006862> (accessed 19.03.2024).
18. Lv J. Detection of Neutralizing Antibodies to Tembusu Virus: Implications for Infection and Immunity / J. Lv, L. Yang, S. Qu [et al.] // *Front. Vet. Sci.* — 2019. — 6. — P. 442. — URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00442/full> (accessed 19.03.2024).
19. William A. McEwan. Chapter Six - TRIM21-Dependent Intracellular Antibody Neutralization of Virus Infection / W.A. McEwan, J.C. Leo; ed. by P.J. Klasse // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Academic Press. — 2015. — Vol. 129. — P. 167-187. — URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117314000076> (accessed 19.03.24).
20. Kim A. What is the 2 sigma rule? / A. Kim. — 2019. — URL: <https://www.theburningofrome.com/contributing/what-is-the-2-sigma-rule/> (accessed 19.03.2024).