

національної академії наук. 2010. № 4. 2. Ятусевич, А. И. Адаптационные процессы и паразитозы животных: монография / А.И. Ятусевич, Н.С. Мотузко, В.А. Самсонович, И.А. Ятусевич, Е.Л. Братушкина. - Витебск: УО ВГАВМ, 2006. - 404 с. 3. Ятусевич, А. И. Разведение и болезни свиней (практическое пособие в 2 частях) / А.И. Ятусевич, В.В. Максимович, А.А. Абрамов [и др.]. Витебск: ВГАВМ, 2013. Ч.1-2. 337-606 с.

УДК 619:615.37.012

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ В СТАТИСТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Самуленко А.Я., Неминущая Л.А., Скотникова Т.А., Ковальский И.В., Еремец Н.К
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности», г. Щелково, Россия

Введение. Одним из направлений биотехнологии является использование в практических целях биологической информации, получаемой с участием физиков, математиков, химиков, биологов.

Решение определенной научно-практической задачи в современной науке реализуется по следующей принципиальной схеме:

- получение больших баз данных при проведении экспериментов;
- их анализ и статистическая обработка, чтобы подтвердить или опровергнуть верность результатов эксперимента и исследований в целом.

Для предотвращения возможных ошибок при анализе больших массивов информации необходимо информационное сопровождение исследований: обработка экспериментальных данных методами многомерной статистики в специализированном программном пакете [1-4]. Это полностью относится к такой важной отрасли биотехнологии, как разработка и производство вакцин для специфической профилактики болезней сельскохозяйственных животных и птицы, поскольку сопровождается широким спектром биологических и физико-химических экспериментов с получением больших объемов данных [5,6].

Стабильность – один из основных показателей качества лекарственных средств (ЛС), в том числе иммуннобиологических препаратов, который обеспечивает сохранение их терапевтических и профилактических свойств в процессе распределения и хранения. В соответствии с ФЗ-№ 61, ГОСТ Р 52249-2009 и «Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств», утв. приказом министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г № 916, стабильность должна быть проверена на этапе разработки нового препарата и является объектом особого внимания на этапах регистрации, производства и пострегистрационного контроля. В комплект документов, представляемых для регистрации ветеринарных ЛС, должен быть включен отчет по изучению стабильности, на основании которого устанавливают срок годности, условия хранения и транспортирования данного препарата [7,8].

Цель данной работы – изучение кинетики термоинактивации биологической активности вируса НБ штамма «Ла-Сота» и автоматизация процесса получения количественной оценки стабильности сухой вакцины в пострегистрационный период.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в отделе обеспечения качества. Для эксперимента использовались образцы сухой вакцины опытно-промышленных серий опытного производства ВНИТИБП.

Термоинактивацию вирусосодержащего материала проводили в термостатах и ультратермостатах с колебанием температуры $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (препарат выдерживали при температурах 37° , 55° , 70° С в течение времени, выбранного так, чтобы снижение биологической активности вируса было статистически значимым).

Инфекционную активность вируса НБ и образцов вакцин определяли титрованием на 9-10 суточных КЭ и рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Для предобработки данных использовано приложение MS Excel из пакета офисных программ компании Microsoft – MS Office.

Для обеспечения эффективной работы на всех этапах анализа данных и представления результатов проведен анализ трех доступных статистических пакетов (STADIA - Россия, STATISTICA - США, SPSS - Statistical Package for Social Science).

Результаты исследований. Авторами исследована кинетика термоинактивации биологической активности вакцинного вируса НВ; проведен статистический анализ, для чего были вычислены основные показатели для каждой отдельной серии при температурах 37, 55, 70⁰С; проанализированы существующие программные пакеты для статистической обработки, проведен анализ на нормальность распределения рассматриваемых выборок; проведен корреляционный и регрессионный анализ для определения порядка кинетического уравнения; вычислены константы скорости инактивации.

Для разработки математической модели процесса термоинактивации и получения необходимой биологической информации проводили активный эксперимент с применением искусственного воздействия температур на биообъект по специальной программе. Всю совокупность полученных данных и, как следствие, методов их автоматизированного анализа можно разделить на две группы: детерминированные и статистические. Детерминированные данные имеют место в тех случаях, когда известен вид функциональной зависимости, связывающей значения исследуемых показателей. Лишь в сравнительно немногих случаях можно считать, что реальная зависимость, связывающая некоторые исследуемые показатели биологического объекта, носит детерминированный характер. Результатами наших экспериментов являются недетерминированные данные, к которым применимы методы математической статистики.

Для получения достоверной информации проводили несколько серий экспериментов с существенным объемом данных, что потребовало автоматизации их обработки.

Процесс автоматизации обработки результатов состоял из двух этапов:

1. Перевод качественных показателей – в количественные для последующей обработки.

2. Анализ полученных данных – методами математической статистики.

Из трех доступных статистических пакетов (STADIA - Россия, STATISTICA - США, SPSS - Statistical Package for Social Science) был выбран последний, имеющий русскоязычную версию. SPSS предлагает полный набор инструментов, обеспечивающих эффективную работу на всех этапах анализа данных и представления результатов.

Для вычисления констант скорости инактивации (K_T) по исходным данным 4-х серий вакцины при температурах 37, 55, 70⁰С была проведена следующая работа:

а) проверка на нормальность распределения с целью выбора параметрических либо непараметрических статистических методов, используя для этого: построение гистограмм частот; определение обобщенных показателей; проверку гипотезы согласия с нормальным распределением по критерию Шапиро-Уилка;

б) обоснование использования кинетического уравнения 1 порядка для нахождения K_T с помощью проверки гипотезы о наличии линейной связи между активностью и временем с использованием: корреляционного анализа для определения наличия и значимости связи между вирусной активностью и временем инактивации при каждой из температур; регрессионного анализа для определения вида связи между активностью и временем инактивации и определением достоверности уравнений регрессии; вычисление коэффициентов регрессии, оценка их достоверности;

с) сравнение стабильности вакцин разных серий с проведением для этого анализа на достоверность различий.

Установлено, что исследуемые распределения имеют вид нормальных, что позволяет использовать параметрические методы. Препятствий к применению корреляционного и регрессионного анализа нет.

Корреляционный анализ показал наличие связи между временем и активностью

вируса. Значения коэффициентов корреляции исследуемых серий вакцины находятся в пределах $0,7 < r \leq 0,99$. Из этого следует, что между временем инактивации активности вируса и снижением его инфекционной активности наблюдаются высокие корреляции. При этом знак минус означает, что связь является обратной - увеличение времени ведет к снижению активности.

Для определения K_T - константы скорости инактивации (при конкретной температуре) необходимо было подтвердить, что экспериментальная зависимость соответствует уравнению химической кинетики 1 порядка:

$$Lgy = Lg - K_T \times t (1)$$

Чтобы определить соответствие этой модели, вначале необходимо было установить вид уравнения регрессионного анализа, а следовательно, построить диаграмму рассеяния, которая в графическом виде отображает отношения между двумя переменными: X и Y.

Линейная модель регрессии является простейшей и имеет вид:

$$y = b_0 + b_1 \times x (2), \text{ где}$$

y – прогнозируемое значение параметра Y,

b_0 – свободный член, b_1 – коэффициент регрессии.

Далее вычисляли коэффициент детерминации R-квадрат, чтобы определить, насколько точно регрессионное уравнение описывает экспериментальную зависимость.

Коэффициент детерминации R-квадрат = 0,869, то есть в 86,9% случаев изменения X приводят к изменению активности Y по линейной зависимости.

Для проверки значимости регрессионной модели использован критерий Фишера. Значение $F_{\text{эсп.}} = 1,438$ больше $F_{\text{табл.}} = 5,99$ при уровне значимости $p = 0,05$ свидетельствует о том, что модель является статистически значимой.

Таким образом, используя коэффициенты регрессии, можно определить величины констант скоростей инактивации в образцах каждой серии вакцины при любой температуре, и, следовательно, рассчитать соответствующее снижение ее активности.

Заключение. В результате проделанной работы показан линейный характер процесса термоинактивации, характеристикой которого является константа скорости инактивации (K_T), что позволяет обоснованно перейти к количественной оценке стабильности биологической активности иммунобиологических препаратов.

Зависимость изменения активности вируса в сухой вакцине от времени при каждой из температур – линейная, поэтому величины K_T процесса термоинактивации вируса являются количественным выражением стабильности вакцины и при соответствующей постановке экспериментов могут быть использованы для оценки вклада различных факторов в ее стабильность на всех этапах жизненного цикла биопрепарата.

Применение специализированного программного обеспечения позволяет значительно ускорить исследовательский процесс с одновременным повышением точности обработки экспериментальных данных.

Разработанные методические подходы могут быть использованы разработчиками и производителями, выпускающими иммунобиопрепараты для ветеринарии и биологически активные добавки к кормам.

Литература. 1. Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко. – Киев: «Морион», 2001. - 408с. 2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев - Л.: Ленмедгиз, 1962. – 180 с. 3. Пеккер, Я.С. Компьютерные технологии в медико-биологических исследованиях. Сигналы биологического происхождения и медицинские изображения. Учебное пособие / Я.С. Пеккер, К.С. Бразовский. – М.: Темплан, 2002. - 240 с. 4. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. - М., 2003. – 79с. 5. Самуйленко, А.Я. Задачи биотехнологии в реализации доктрины производственной безопасности Российской Федерации / А.Я. Самуйленко, А.А. Раевский, Н.А. Бондарева и др. //

Ветеринария и кормление. - 2011. - №2. - С.22-29. 6. Самуйленко, А.Я. Стабильные иммунобиопрепараты – залог успешной вакцинопрофилактики птиц / А.Я. Самуйленко, Л.А. Неминущая, Т.А. Скотникова // Труды Кубанского государственного аграрного университета (серия: Ветеринарные науки).- 2009.- № 1(ч.1).- С. 91-92. 7. Смоленский, В.И. Качество и стандартизация биопрепаратов против болезней птиц / В.И. Смоленский, Ю.В. Зуев, Т.В. Руденко и др. Ветеринария. – 2011. - №1. – С.44-47. 8. Стандартизация результатов по титрованию инфекционности вирусов. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. – Серия Технических Докладов ВОЗ, 31-й доклад, №658. – Женева, 1981. – С. 157-173.

УДК 619:615:636.5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ ГРИБА ШИИТАКЕ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИББ

Стебловская С.Ю., Михалева Т.И., Бледнова А.В.

ФГБОУ ВПО «Курская ГСХА им. проф. И.И. Иванова», г. Курск, Россия

Введение. Как правило, большинство вирусных заболеваний животных тяжело поддаются лечению современными фармацевтическими препаратами, поэтому в настоящее время возникает большой интерес к разработке новых комбинированных средств с использованием сочетания вакцин и биостимуляторов. Одним из таких препаратов, на наш взгляд, может являться мицелий гриба Шиитаке. Выбор нами этого препарата основан на особенностях механизма действия грибного мицелия при вирусных инфекциях: модификация собственного иммунного ответа организма и прямое противовирусное действие, основанное на содержании в нем фитонутриентов – «вирусоподобных частиц», способствующих выработке интерферона – мощного белкового компонента иммунной системы, блокирующего размножение вирусов.

Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) птиц в нашей стране наносит огромный экономический ущерб бройлерным хозяйствам, т. к. часто протекает субклинически и на первый план выходят клинические и патологоанатомические признаки, свойственные вторичным инфекциям, что создает трудности при постановке диагноза и требует дополнительных исследований. Субклиническое течение ИББ возникает при заражении птицы в раннем возрасте. Так как клетками мишенями для этого вируса являются В-лимфоциты фабрициевой сумки, а она полностью развивается лишь к 21 дню, то вирус ИББ не имеет возможности размножиться в необходимом количестве и вызывать яркие клинические признаки, но подобное вмешательство вызывает иммуносупрессию. В результате птица отстает в росте, ухудшается однородность стада, повышается восприимчивость к секундарным инфекциям, птицы неадекватно реагируют на вакцинопрофилактику других заболеваний. Иногда результаты неудачной вакцинации против ИББ могут быть сопоставимы по нежелательным последствиям с субклиническим течением этой болезни [1].

Одно из условий успешной вакцинации – правильно подобранная вакцина. На сегодняшний день в арсенале врачей имеется 3 вида вакцин, условно – это мягкие (средние), промежуточные (средние плюс) и жесткие (горячие). Эти вакцины кардинально отличаются. У мягких вакцин отсутствуют негативные поствакцинальные последствия, но в то же время они не всегда могут обеспечить надежную защиту, а жесткие вакцины созданы для работы в очаге, во многом, благодаря им, удалось ликвидировать вспышки ИББ, но негативное воздействие этих вакцин на организм также велико из-за реактогенности. Естественно, наибольшей популярностью у ветеринарных врачей пользуются средние плюс вакцины – баланс эффективности и безопасности, хотя и они нуждаются в минимизации негативного воздействия на организм птицы. Из перечня этих вакцин выделяется Бурсин Плюс, производства Пфайзер. Она изготовлена из неклонированного штамма Лукерт. Этот штамм был получен ученым Lukert P.D. в 1973 году из вирулентного изолята ИИБ. Вакцины из этого штамма широко распространены в Европе и завоевывают популярность в России [2].