

ПРАВИЛЬНОЕ ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ

Dr Bart van Leerdaam, Ph.D.



BioChek

BETTER DIAGNOSTICS FOR BETTER RESULTS



Правильное взятие образцов

- Правильность результатов и их интерпретации
зависит от того, насколько правильно было
проведено взятие образцов.



Определение титров стада

- Цель исследования: получить достоверные и репрезентативные величины титров стада.
- Необходимо сводить к минимуму вероятность ошибок при определении титров для получения статистически достоверных результатов.
- Статистически достоверные данные обеспечивают достоверную интерпретацию.



Как добиться достоверных результатов в ELISA?

- Используйте статистически достоверные методы отбора образцов для обеспечения репрезентативной выборки.
- Аккуратно обращайтесь с образцами крови для обеспечения однородного качества образцов сыворотки, а также
- Используйте надлежащее оборудование и тест-наборы для ELISA с целью обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов исследований.



Обеспечение статистической достоверности

Для того, чтобы результаты, полученные при анализе отобранных образцов были статистически достоверны, необходимо соблюдать 2 условия:

- 1) Случайная выборка птиц для забора образцов
- 2) Достаточное количество взятых образцов



СЛУЧАЙНАЯ ВЫБОРКА

- Случайная выборка: каждая птица имеет равные шансы при отборе.
- Случайная выборка снижает влияние факторов «неконтролируемой вариации» («неровное» прививание вакцины, разница в потреблении кормов, разница температур, света, влажности воздуха и т.д.)



Иллюстрация необходимости случайной выборки

Предположим, что в птичнике плохо работает система поения. Проводилась вакцинация выпаиванием.

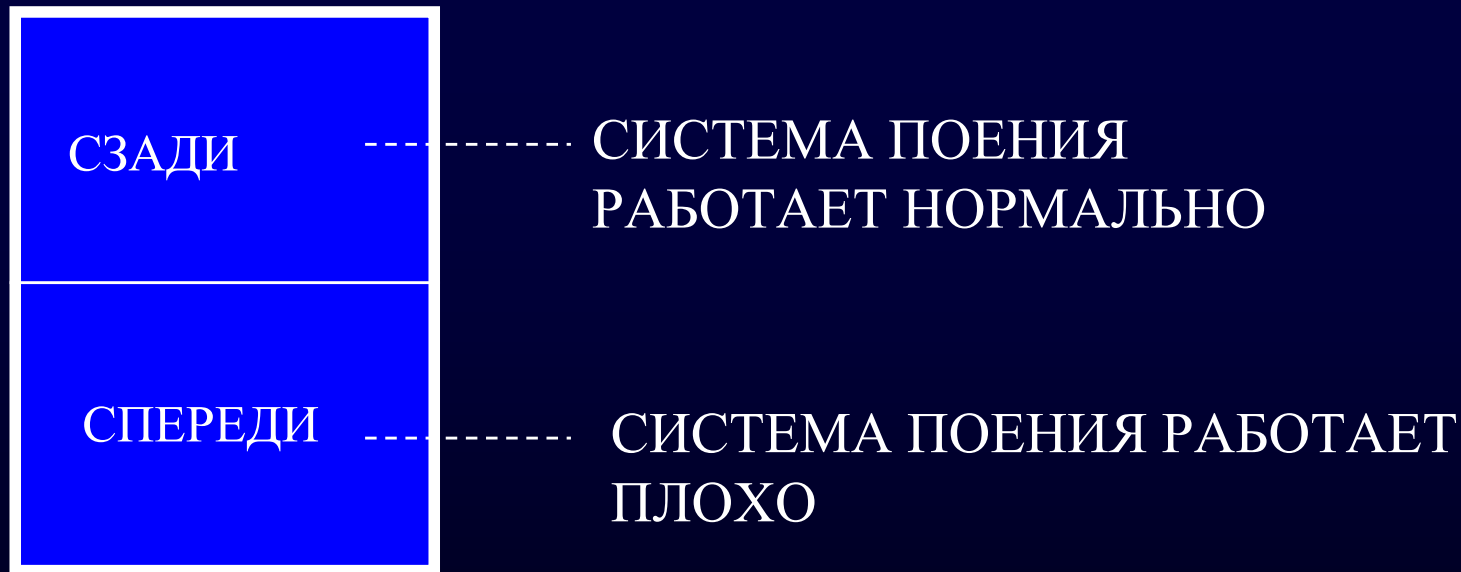




Иллюстрация необходимости случайной выборки (продолжение)

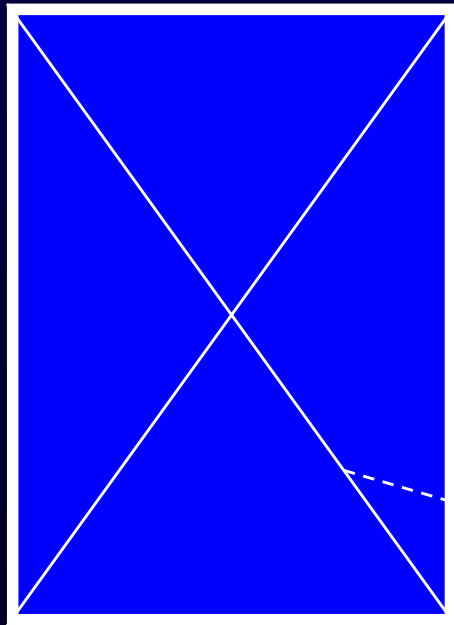
<u>ОБРАЗЦЫ ВЗЯТЫ</u>	<u>РЕЗУЛЬТАТЫ</u>	<u>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</u>
Только спереди п-ка	100% Отр. стадо	100% «провал» вак-ции
Только сзади п-ка	100% Полож. стадо	100% «успех» вак-ции
Случайная выборка	50% Полож., 50% Отр.	Частичный «успех»

Только результаты исследования образцов, полученных случайной выборкой верно отражают реальную ситуацию в стаде.



Случайная выборка

Пример случайной выборки птиц в птичнике свободного содержания.



Пример: отобрано 24 птицы = по 12 голов с
 с диагонали
 При диагонали = 60 м,
 отбираем 1 голову на каждые 5 м

Диагональ



Случайная выборка

- При отборе птицы из клеток или ящиков, пронумеруйте каждую клетку или ящик, например, от 1 до 88
- Используйте таблицу чисел, запишите номер, и отберите по одной голове из клетки с соответствующим номером.



Рекомендации по обращению с образцами

- Правильное обращение с образцами и их надлежащее хранение обеспечивает однородное и хорошее качество сыворотки.
- 2-3 мл крови \Rightarrow 0.5 - 0.75 мл сыворотки
- Используйте одноразовые шприцы
- Отделите сыворотку центрифугированием или естественной коагуляцией (2-3 часа при комнатной температуре)



Рекомендации по обращению с образцами (продолжение)

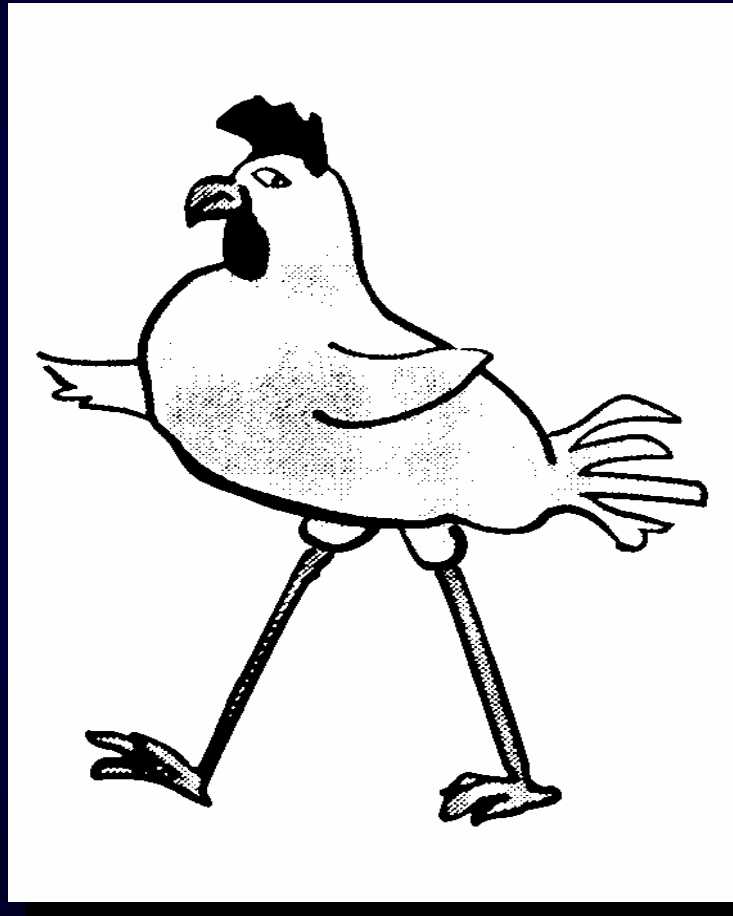
- ВСЕГДА ЧЕТКО МАРКИРУЙТЕ ОБРАЗЦЫ (название птицефабрики, код стада, возраст, тип птицы и т.д.).
- При непродолжительном хранении (< 24 часов): 4- 8 С
- При длительном хранении : -20 С, пластиковые плотно закрытые пробирки для хранения (микропробирки для центрифугирования по 1.5 мл) в маркированных закрытых пластиковых пакетах.
- Избегайте частого замораживания/оттаивания сыворотки



Рекомендации по обращению с образцами (продолжение)

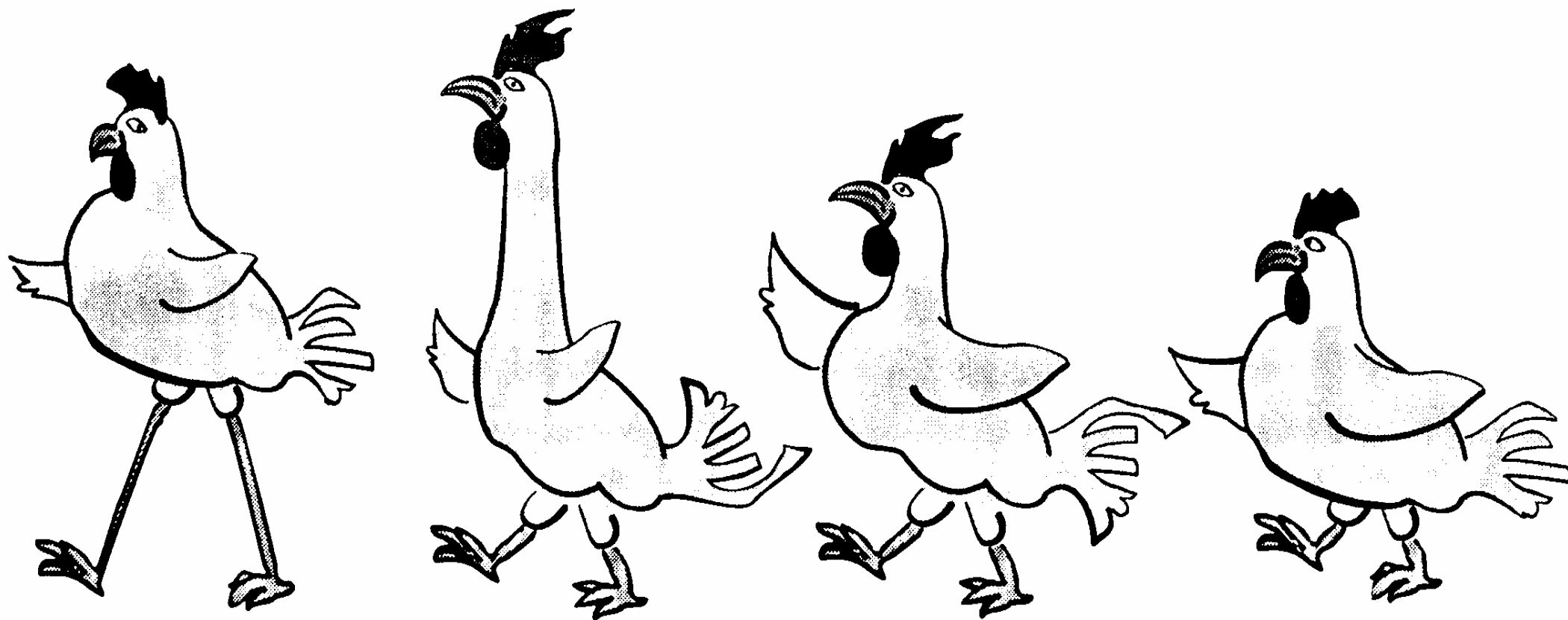
- Разбавленная сыворотка (в специальном разбавителе) более стабильна, чем неразбавленная.
- Не используйте для исследований испорченную сыворотку. В испорченных образцах содержатся протеолитические ферменты, которые могут дать ложно-положительные результаты в ELISA.

ЧТО СЧИТАТЬ НОРМОЙ?



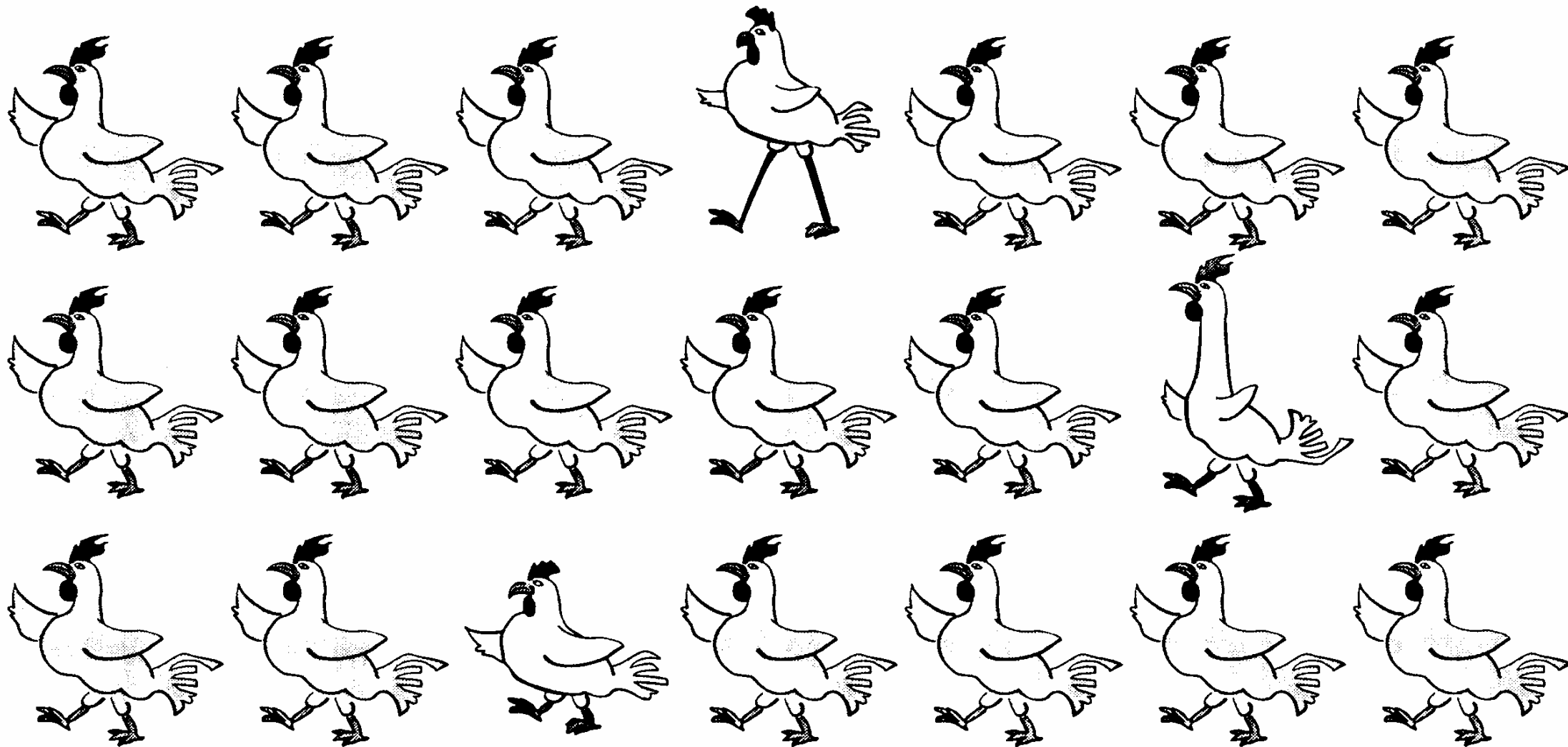
Один образец

ЧТО СЧИТАТЬ НОРМОЙ?



Четыре образца

ЧТО СЧИТАТЬ НОРМОЙ?



Большое количество образцов дает ясную картину



Количество образцов

- Наряду со случайным отбором образцов, очень важным является количество взятых образцов для получения достоверных значений «истинных средних титров стада».
- Определить достаточное количество образцов можно на основании анализа «истории» значения титров в стадах.
- Чем больше разброс титров (неоднородность титров), тем большее количество образцов вам понадобится для получения достоверных значений «истинных средних титров».



Исследование влияния количества образцов на результаты (1)

- 100 индивидуальных образцов, протестированных BioChek ELISA, болезнь Гамборо.
- Средний титр = 4057, коэффициент вариации 48%
- Прогноз дня вакцинации:
- Метод Log2: 19 день
Формула Девентера: 21 день
- Индивидуальные образцы были разделены на меньшие группы The individual samples were divided into smaller groups of sample sizes and the AMT and DTV were calculated. (repeated 16 times).



Исследование влияния количества образцов на результаты (2)

Влияния кол-ва образцов на определение средних титров по стаду и расчетного дня вакцинации

Кол-во образцов	Ср. титры		%КВ		День вакцинации	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
в группе						
46	3712	4449	42	58	20	22
30	3333	4779	37	57	20	22
23	3388	4753	40	64	20	22
15	3390	4973	33	62	19	22
10	2374	5260	25	71	17	23
5	2221	5371	23	71	16	23

С уменьшением кол-ва образцов, увеличивается разброс значений средних титров, значение % К.В; а расчетный день вакцинации приходится на более отодвинутые сроки



Исследование влияния количества образцов на результаты (3)

Взаимозависимость кол-ва образцов и % достоверных величин истинного среднего по стаду.

Кол-во образцов в группе	Ср. титры % в пределах 4057 +/- 20%	День вакцинации	
		% в пределах LOG2	Среднее +/- 1 день Девентера LOG2
46	100%	100%	100%
30	100%	100%	100%
23	100%	88%	100%
15	88%	88%	94%
10	50%	43%	57%

При количестве образцов менее 23 наблюдается выраженное снижение достоверности значений средних титров и расчетного дня вакцинации.



Заключение. Количество образцов

- 23 образца представляется разумным количеством образцов для составления профиля поголовья или прогнозирования дня вакцинации.
- После составления профилей, 15 образцов даст вам общую картину, покажет наиболее часто встречающиеся титрогруппы, но для проведения количественного анализа ситуации, 15-ти образцов недостаточно.



Заключение. Количество образцов

- На практике, кол-во взятых образцов – это компромисс между статистически верным числом и затратами на взятие образцом и их исследование.
- Однако, если вы будите слишком сильно экономить на кол-ве взятых образцов, это может отрицательно сказаться на достоверности полученных результатов и величине средних титров, что, в свою очередь приведет к неверной интерпретации результатов и к неправильным выводам.



Мониторинг болезней и количество образцов

- Для мониторинга болезней кол-во образцов зависит от уровня зараженности поголовья и частоты взятия образцов.
- Надо брать более 23 образцов для выявления заболевания при низкой степени зараженности ($<2\%$) (мониторинг *Salmonella*)



% Степени зараженности и количество образцов

Необходимое кол-во образцов, которое дает уверенность на 95%, что болезнь будет обнаружена при разной степени зараженности

РАЗМЕР СТАДА	СТЕПЕНЬ ЗАРАЖЕННОСТИ						
	20%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
	КОЛ-ВО ОБРАЗЦОВ = n						
N	n	n	n	n	n	n	n
20	10	15	19	48	20	20	20
50	12	22	34	77	50	50	50
100	13	25	44	94	96	100	100
200	13	26	48	105	155	190	200
500	14	28	55	128	225	349	500
1000	14	28	56	138	258	450	950
5000	14	28	58	146	290	564	2253
10000	14	28	58	147	294	581	2588
100000	14	28	58	148	299	596	2995

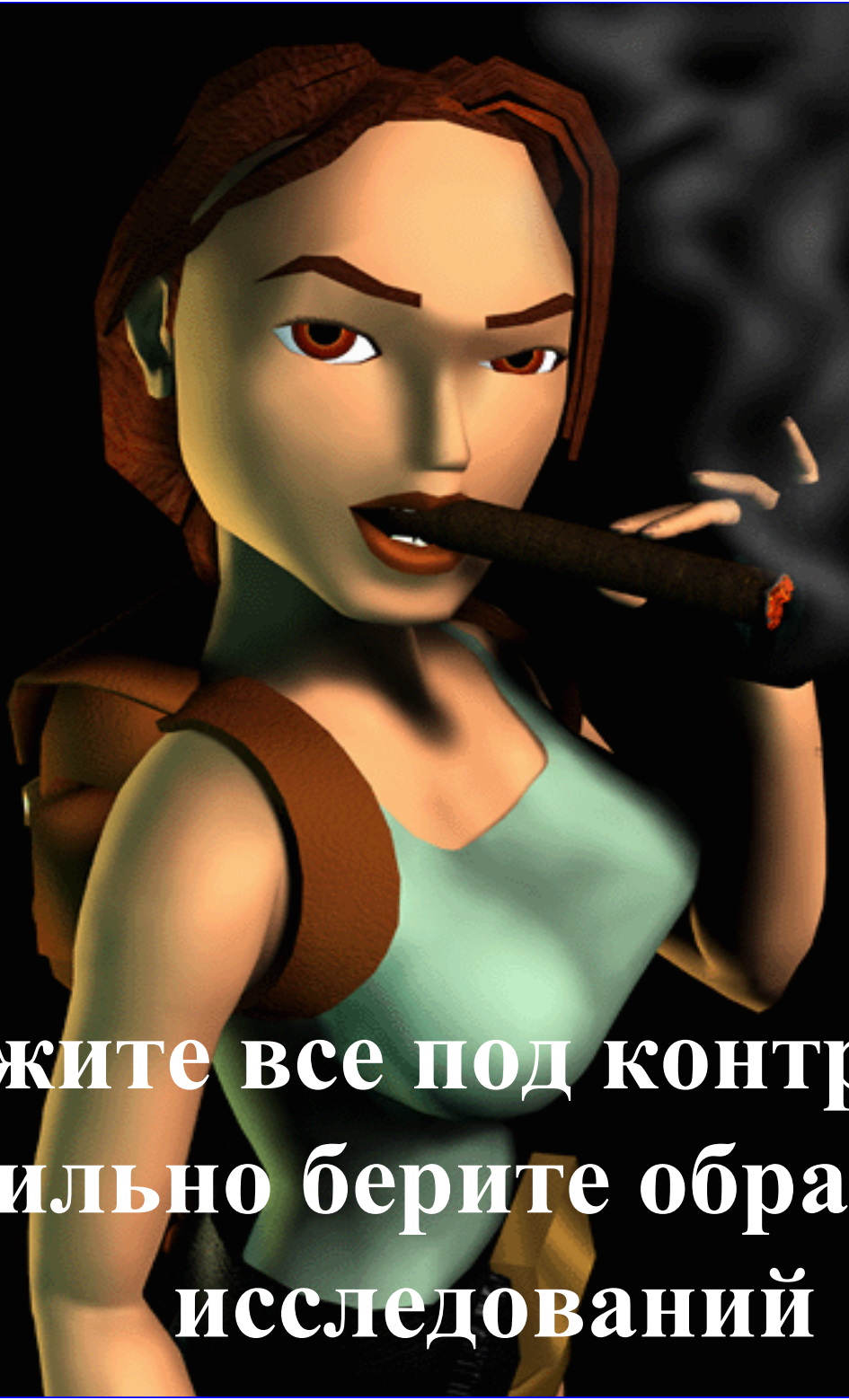
Для определения степени зараженности в 10% в стаде 5000 – 10000 голов, надо взять 28 случайных образцов

Для определения степени зараженности в 2% в стаде 5000 - 10000 голов, надо взять 147 случайных образцов



**ПРАВИЛЬНОЕ ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ =
ХОРОШИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

ЕСЛИ ВАША ЦЕЛЬ – ПОЛУЧЕНИЕ
ХОРОШИХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ВАМ
НЕОБХОДИМО ОБЕСПЕЧИТЬ
ПРАВИЛЬНОЕ ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ

A 3D rendered image of Lara Croft, the character from the Tomb Raider series. She is shown from the chest up, wearing her signature green tank top and brown leather backpack. She has short brown hair and is holding a large cigar in her mouth with her right hand. A plume of smoke is rising from the cigar. The background is dark and out of focus.

**Держите все под контролем —
правильно берите образцы для
исследований**