

## ГЛАВА 2.6.1

### РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИЗОВ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ АНТИТЕЛ

#### ВВЕДЕНИЕ

*В рекомендациях МЭБ по валидации представлена подробная информация и примеры обоснования стандарта валидации МЭБ, опубликованного в главе 1.1.6 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или главе 1.1.2 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для водных животных. При упоминании термина «стандарт валидации МЭБ» в этой главе следует ориентироваться на указанные главы.*

*Обнаружение антител, образующихся в ответ на контакт с возбудителем или его компонентами, является непрямым подходом к лабораторной диагностике заболевания. Наиболее распространенными методами обнаружения антител являются классическая реакция нейтрализации вируса (РНВ), твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), реакция торможения гемагглютинации (РТГ) и реакция связывания комплемента (РСК). К другим, реже применяемым методам обнаружения антител, относятся иммунодиффузия в агаровом геле (ИДАГ), непрямая реакция флуоресцирующих антител (НРФА), реакция агглютинации (РА), реакция латекс-агглютинации (РЛА) и реакция микроагглютинации (РМА). Последние инновационные методы включают биосенсорные системы, биolumинометрию, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, хемолюминисценцию и устройства для иммунохроматографии (в виде тест-полосок), которые известны также, как тесты для полевой диагностики или «диагностики на месте». Другие иммунологические анализы, в которых используются антитела для обнаружения антигенов, описаны в главе 3.6.2.*

*В рассмотрении потенциальных методов анализа, применяемых для диагностики заболевания, важно включить анализы по обнаружению антител, учитывая их удобство, простоту получения и подготовки образцов, в целом, хорошие характеристики диагностической эффективности, возможность автоматизации анализа (обеспечивающей высокую пропускную способность), низкую стоимость и быстроту получения результата. Эти методы особенно полезны, когда требуется обработать большое число образцов в эпидемиологических и популяционных исследованиях, и также для массовой диагностики и применения в надзорных программах. Кроме того, анализы антител широко применяются при вывозе, ввозе и продаже животных, и по-прежнему составляют наибольшую часть в списке методов, рекомендованных МЭБ для использования в контексте международной торговли.*

*Особенность анализов антител заключается в том, что они позволяют обнаружить предшествовавший контакт с возбудителем инфекции в отсутствие обнаружимых микроорганизмов или их анализатов. Кроме того, эти анализы могут быть адаптированы к разнообразным матрицам, включая сыворотку, плазму, цельную кровь, молоко, секрет слезных желез и слюну. Тест-системы, специфичные в отношении изотипа или подкласса иммуноглобулинов позволяют селективно выявлять ранний или поздний иммунный ответ, т.е. IgM или IgG, соответственно. Специально разработанные специфичные системы позволяют отличить ответ на вакцину от ответа на полевые штаммы, и выпускаются в форме коммерческих диагностических наборов, например, для обнаружения антител к вирусу европейской чумы свиней. Конкурентные или блокирующие форматы позволяют один и тот же основной тест для разнообразных видов животных, тогда как другие*

форматы являются видоспецифичными. Для указания на присутствие специфического антитела в образце используются многочисленные типы химических или физических индикаторов (в том числе, хромогены, флуорохромы, агглютинины). Из-за большого числа методов обнаружения антигенов в данной главе описать наилучшие практические приемы валидации каждого из них невозможно. Поэтому в качестве примера применения наиболее передовых подходов к анализу антител будет рассмотрена широко используемая система обнаружения антител – твердофазный ИФА. Большинство основных процессов, используемых для валидации систем анализа других типов станут очевидными, если распространить на них процессы, используемые для валидации твердофазного ИФА.

## А. ПЛАН РАЗРАБОТКИ АНАЛИЗА ПО ОБНАРУЖЕНИЮ АНТИТЕЛ

### 1. Предполагаемое назначение анализа антител

При разработке анализа следует начать с ясного определения конкретного назначения и применения метода, который следует разработать. На этих первых соображениях будут основываться многие решения в процессе разработки анализов. Применительно к анализам по обнаружению антител (далее в тексте данной главы – «анализов антител»), таким как твердофазный ИФА, для достижения заданной цели этими знаниями следует руководствоваться при выборе наиболее подходящего типа системы обнаружения антител. Следует принять во внимание многочисленные факторы, связанные с предполагаемым назначением и применением анализа и соответствием предъявляемым к анализу требованиям (см. другие возможные цели в главе «Стандарт валидации МЭБ»).

Шесть основных целевых назначений диагностических анализов рассмотрены в Стандарте валидации МЭБ и перечислены в сноске к представленной ниже таблице 1. Поскольку анализы антител находят такое широкое применение и могут быть адаптированы для очень конкретных целей, при определении этих конкретных целей потенциального метода анализа целесообразно рассмотреть и оценить несколько параметров. В таблице 1 обобщены характеристики анализов антител, применяемых для различных целей. Рассмотрение этих характеристик позволит иметь ориентиры при определении этих конкретных целей, которые могут быть достигнуты при использовании потенциального анализа.

**Примечание** – Перед дальнейшим обсуждением читателю рекомендуется прочитать раздел В.4. *Осуществление программы*. В этом разделе описана взаимозависимость между диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью, ложноположительными и ложноотрицательными результатами, и положительной и отрицательной прогностической значимостью. Более подробное обсуждение прогностической значимости, как функции от распространенности, см. в публикации Jacobson, 1998.

*Таблица 1. Факторы, определяющие соответствие метода анализа антител целевому назначению*

Характеристики анализа	Факторы соответствия целевому назначению						
	1*		2*	3*	4*	5*	6*
	a	b					
Диагностическая чувствительность (ДЧ)	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Диагностическая специфичность (ДС)	+	+	+	+	+++	+	+++
Положительная прогностическая значимость (ППЗ)	+	+	+	+	+++	+	+++
Отрицательная прогностическая значимость (ОПЗ)	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Пропускная способность	+	+++	++	+	-	++	++

Продолжительность анализа	+	+	+	+	+++	-	+
Возможность обеспечения качества	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Воспроизводимость	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Сходимость	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Другие характеристики, такие как техническая проработанность анализа и квалификация, требуемая для интерпретации результатов, будут связаны с исследуемым заболеванием или инфекцией.

**Обозначение:** +++ = принципиально важно; + = менее важно; - = неважно

### **Основные цели, которым может соответствовать метод анализа:**

1. Способствовать демонстрации отсутствия инфекции в определенной популяции
2. Свидетельствовать об отсутствии инфекции или о присутствии патогена у отдельных животных или в продуктах в коммерческих целях/целях перемещения
3. Способствовать искоренению заболевания или удалению инфекции из определенных популяций
4. Для подтверждающего диагноза в клинических случаях (включая подтверждение положительных результатов скрининга)
5. Для оценки распространенности инфекции или контакта с инфекцией, которая облегчит анализ рисков.
6. Определить иммунный статус отдельных животных или популяций (после вакцинации)

#### **1.1. Цель 1**

Для категорий отсутствия заболевания, указанных в качестве целей 1a и 1b (таблица 1), наиболее предпочтительными являются обладающие высокой диагностической чувствительностью (ДЧ) скрининговые тесты. Как указано при перечислении целей анализов выше, эти методы должны применяться в популяциях с кажущейся распространенностью инфекции, равной нулю. Аналитические методы, имеющие высокую ДЧ, демонстрируют низкую частоту ложноотрицательных результатов (ЛН), и при использовании их в популяциях с низкой распространенностью патогена отрицательная прогностическая значимость (ОПЗ) соответствует самому высокому уровню. Однако ДЧ и диагностическая специфичность (ДС) обычно связаны обратной зависимостью, поэтому снижение ДС будет приводить к повышенной частоте ложноположительных (ЛП) результатов. Другие соображения в случае непрерывного поступления образцов в рамках надзорных программ, должны включать высокую пропускную способность, низкую стоимость и простоту применения метода. Следует проводить подтверждающий анализ всех положительных результатов, полученных при использовании скрининговых методов, чтобы оценить истинный статус соответствующих животных. Для подтверждающих анализов характерна высокая ДС и, следовательно, низкая частота ЛП результатов. Часто эти анализы оказываются технически сложными и требуют более высокой квалификации для интерпретации результатов.

Если отсутствие инфекции следует продемонстрировать после вспышки заболевания, при которой для борьбы с заболеванием использовали вакцинацию, то часто требуется протестировать большое количество сывороток. В дополнение к перечисленным выше соображениям, для этого требуется метод обнаружения антител, позволяющий различить инфицированных и вакцинированных животных (т.е. метод ДИВА [дифференциации инфицированных вакцинированных животных]). В то же время в некоторых ситуациях целесообразно использовать метод обнаружения антигена или нуклеиновой кислоты для того чтобы продемонстрировать прекращение выделения и/или циркуляции возбудителя.

## **1.2. Цель 2**

Если цель анализа заключается в том, чтобы установить соответствие отдельных животных требованиям, предъявляемым при перемещении из одной страны в другую, то оптимальными опять-таки будут обладающие высокой ДЧ скрининг-тесты на антитела. Такое же обоснование, как отмечено выше, применяется и в отношении ОПЗ. И в этой ситуации для всех животных с положительными результатами потребуется подтверждающее тестирование в той или иной форме с целью оценки истинного статуса, либо животное может быть исключено из перемещаемой группы животных без дополнительных исследований. Если получены погранично положительные результаты, то благоразумный подход будет заключаться в том, чтобы запросить повторное получение образцов у животного через приемлемый интервал времени для уверенности в том, что стадо/стая не были инфицированы в самое последнее время.

## **1.3. Цель 3**

Если целью анализа является искоренение заболевания или удаление инфекции из определенных популяции, то наиболее предпочтительными являются скрининг-тесты на антитела, ДЧ которых варьирует от средней до высокой. Однако в этом случае обоснование будет несколько другим, в том смысле, что анализ, вероятно, будет проведен на уровне стада или отделения. В начале кампании искоренения заболевания, когда распространенность заболевания высока, приемлемы методы со средней ДЧ и ДС, поскольку в этой точке частота ЛП и ЛО результатов менее значима, и допускается средний уровень ошибки. В зависимости от природы заболевания и скорости его распространения, критическое значение могут иметь высокая пропускная способность и быстрота выполнения анализа. В этой точке решения обычно принимают без подтверждающего анализа.

На более поздних этапах кампании требуется более высокая ДЧ, поскольку частота ЛО результатов становится решающим фактором. Как и при достижении Целей 1 и 2, может потребоваться проведение подтверждающего анализа животных, для которых были получены положительные результаты, чтобы оценить их истинный статус. На этих более поздних этапах решающее значение для обнаружения субклинических случаев, животных, выделяющих возбудитель, и, возможно, латентных носителей инфекции приобретают методы обнаружения антител, которые часто применяют совместно с системами обнаружения антигена и/или нуклеиновых кислот.

## **1.4. Цель 4**

Для подтверждения диагноза в клинических случаях наиболее предпочтительными являются обладающие высокой ДС анализы антител. В этих случаях основная идея заключается в том, чтобы минимизировать частоту ЛП результатов и повысить ППЗ анализа. Как правило, инфекция уже достаточно развилась и вызвала мощный иммунный ответ. В некоторых ситуациях более предпочтительным может оказаться скрининг-тест с высокой ДЧ, но более низкой ДС, после которого следует провести подтверждающий тест с высокой ДС. Для некоторых клинических случаев, например, при везикулярных заболеваниях у наземных животных, может потребоваться несколько тестов, чтобы исключить патогенны, вызывающие сходные клинические признаки. Иногда тесты, направленные на обнаружение антигена и/или нуклеиновой кислоты могут быть наилучшим выбором для подтверждения клинических случаев, если такие тесты обеспечивают быстрое получение результата. Ярким примером могут быть высокопатогенные инфекции птичьего гриппа, при которых животное может погибнуть раньше, чем может быть обнаружен иммунный ответ.

### 1.5. Цель 5

Для оценки распространенности инфекции или контакта с инфекцией с последующим использованием этих данных при анализе рисков, например, в связи с медицинскими обследованиями, определением статуса здоровья стада и мониторингом мероприятий, направленных на борьбу с заболеванием, наиболее предпочтительны анализы антител, обладающие средней ДЧ и ДС. В целом, эти анализы характеризуются оптимальным сочетанием частоты ЛО и ЛП результатов и приводят к более точной оценке истинной распространенности инфекции в целевой популяции. Однако если установлены точные оценки ДЧ и ДС, то с помощью статистических подходов можно минимизировать смещение, обусловленное частотой ЛО и ЛП результатов (см. главу 3.6.5 *Статистические подходы к валидации*).

### 1.6. Цель 6

Для определения иммунного статуса отдельных животных или популяций, например, после вакцинации, необходимо использовать методы анализа антител с высокой ДС. Такие методы характеризуются очень низкой частотой ЛП результатов, поэтому обеспечивают высокую степень достоверности ППЗ результата. Применительно к диагностике у отдельных животных, ярким примером теста с высокой ДС, используемого для выражения титров в международных единицах, может быть применение реакции нейтрализации вируса (РНВ) в клеточной культуре для обнаружения индуцированных вакциной нейтрализующих антител против вируса бешенства у собак и кошек. Однако эти анализы являются технически сложными, дорогостоящими как для поддержания, так и в процессе проведения, и требуют строго соблюдения процедур биобезопасности. Когда требуется протестировать большое количество образцов, например, при мониторинге региональных программ вакцинации, более востребованными оказываются разнообразные модификации твердофазного ИФА – простого, эффективного и обладающего высокой пропускной способностью. К этим типам анализов должны быть применимы аналогичные доводы, основанные на ДС.

#### **Решающие факторы, на которые следует обратить внимание:**

- Предусмотрели ли вы, что концентрации аналита в матрице значимо влияют на нижнюю границу метода обнаружения антител и на рабочий диапазон метода?
- Имеются ли у вас все необходимые препараты антител (моноклональных/поликлональных)?
- Имеющийся у вас антиген достаточно чистый?
- Доступны ли коммерческие реактивы? Если нет, насколько осуществима задача получения их в лаборатории?
- Доступны ли референтные препараты? Если нет, то как вы собираетесь без них обойтись (см. главу «Стандарт валидации МЭБ», раздел А.2.6.)

Опыт персонала лаборатории не только имеет принципиальное значение при выборе надлежащего анализа для достижения желаемой цели, но требуется также для надежного определения научно обоснованных ограничений анализа и практической оценки важных факторов, включая стоимость анализа, доступность оборудования и реактивов, пропускную способность лаборатории и времени проведения анализа до получения результата.

#### **Планирование метода**

- Учитывалось ли при планировании предполагаемое назначение анализа?
- Назовите конкретное применение метода
- Назовите типы образцов и статистически значимое количество образцов, которые предстоит протестировать (см. главу 3.6.5)

• Этот анализ будет проводиться в полевых условиях или в лаборатории?

## **2. Разработка анализа – проведение экспериментов**

### **2.1. Референтные образцы и реактивы и контрольные образцы**

#### **2.1.1. Исследуемые образцы**

С образцами, требуемыми для анализов по обнаружению антигенов, следует обращаться в соответствии с описанием в главе 1.1.2 *Получение, представление и хранение диагностических образцов* «Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных». Матрицей образцов, в которой обычно обнаруживают антитела, является сыворотка, но антитела могут присутствовать также в плазме, цельной крови, молоке, мясном соке, яичном желтке, секрете слезных желез и слюне.

#### **2.1.2. Референтные образцы**

Референтными сыворотками или референтными образцами называют антисыворотки против референтного штамма патогена (Wright *et al.*, 1993; Стандарт валидации МЭБ; раздел 1.4 главы 3.6.6 *Выбор и использование стандартных образцов и панелей*). Такие сыворотки, содержащие антитела в известной концентрации/с известной активностью, используются на первом этапе разработки анализа. Для ряда перечисленных МЭБ заболеваний (например, птичьего гриппа, ящура, европейской чумы свиней и т.д.) можно приобрести международные стандартные образцы в Референтных лабораториях МЭБ и партнерских центрах. Если невозможно приобрести такие образцы из других источников, то может оказаться необходимым получить внутрифирменные стандартные образцы, при использовании которых выполняют эталонирование рабочих стандартов (для контроля производственного процесса или качества).

#### **2.1.3. Панели положительных и отрицательных контрольных образцов**

Эти сыворотки с концентрациями антител, соответствующими предполагаемому рабочему диапазону (также называемому динамическим диапазоном) анализа, следует использовать на протяжении всего процесса разработки и стандартизации анализа антител. Рекомендуется получить эти сыворотки в достаточном количестве, чтобы иметь возможность использовать их для разных аспектов валидации. Эти образцы должны быть получены от заведомо инфицированных и неинфицированных животных-представителей популяции, для которой, в конечном счете, предназначен валидированный метод анализа. Предпочтительно получить образцы от отдельных животных, но могут быть использованы также объединенные образцы нескольких животных (глава 3.6.6).

#### **2.1.4. Препараты моноклональных антител**

Появление моноклональных антител существенно повысило эффективность иммуноферментных анализов. Конъюгаты с поликлональными анти-иммуноглобулинами используются в большинстве непрямых твердофазных ИФА, тогда как конъюгаты с моноклональными антителами могут быть направлены на специфичные изотипы иммуноглобулинов. В зависимости от того, на какой эпитоп направлен иммуноглобулин, многие такие моноклональные антитела могут быть эффективно использованы для обнаружения антител у родственных видов, например, жвачных животных. Используя конъюгаты с моноклональными антителами к эпитопам легкой или тяжелой цепи, можно эффективно модулировать ДС и ДЧ непрямого твердофазного ИФА.

Моноклональные антитела хорошо известны в связи с применением в конкурентном или блокирующем твердофазном ИФА. В этом случае специфичность моноклональных антител направлена на эпитопы интересующего патогена. Аналитическую специфичность анализа можно модулировать в соответствии с эпитопом, на который направлено моноклональное антитело.

Моноклональные антитела могут применяться также для иммуноферментного сэндвич-анализа, либо для связывания антигена с планшетом, либо для последующего обнаружения захваченных антигенов. В некоторых случаях, в зависимости от размера и сложности структуры антигена, предпочтительнее использовать для захвата антигенов препараты поликлональных антител, поскольку, как правило, они содержат антитела с более высокой аффинностью связывания.

### 2.1.5. Антигены

Антигены, используемые для твердофазного ИФА, имеют критическое значение для диагностической эффективности при решении определенной задачи. Антигены, экспрессирующие высококонсервативные эпитопы, которые присутствуют, например, в некоторых вирусных матрицах или нуклеопротеинах, в целом, используют при проведении группо-специфичных анализов, например, твердофазного ИФА, для обнаружения ответа на все вирусы гриппа А. Другие эпитопы антигенов могут применяться для обнаружения лишь определенных серотипов. Выбор антигена следует делать после подробного исследования и оценки.

#### **Факторы, влияющие на выбор теста**

- Какая цель поставлена перед анализом: скрининговая или подтверждающая, или обе этих цели?
- Анализ будет использован для определения одного или нескольких видов? Каких?
- Метод предназначен для обнаружения ранней или поздней инфекции?
- Метод предназначен для измерения содержания серотип-специфичных или подтип-специфичных антител?
- Предполагается ли использовать метод для подтверждения сероконверсии после вакцинации?
- Позволяет ли этот анализ дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных?
- Будет ли этот метод применяться для коммерческих операций?

В прошлом широко применялись препараты неочищенных антигенов, например, клеточные лизаты, которые и в настоящее время находят применение в некоторых анализах. Однако качество антигенов существенно улучшилось после появления методов очистки, например, аффинной хроматографии, и еще в большей степени – после внедрения молекулярного клонирования. Технологии рекомбинантных антигенов позволили усовершенствовать все аспекты эффективности твердофазного ИФА, от аналитических до диагностических характеристик.

### 2.2. Дизайн метода испытаний

При планировании теста выбор формата анализа, наиболее подходящего для решения задачи, будет зависеть от предполагаемого применения этого теста. Например, если метод предполагается применять преимущественно в надзорных целях, то тип твердофазного ИФА должен способствовать достижению высокой ДЧ, как описано выше в описании целей. Однако, если ДЧ скринингового метода настолько высока, что приводит к высокой частоте ложноположительных результатов, следует одновременно обдумать проведение дополнительного подтверждающего анализа. Твердофазный ИФА существует во многих форматах, каждый из которых имеет преимущества и недостатки, что позволяет адаптировать его для достижения конкретных целей (таблица 2).

#### **Практические аспекты при выборе формата анализа**

- Важна ли высокая пропускная способность анализа? Будет ли анализ автоматизирован?

- Сколько потребуется времени для проведения анализа до получения результата?  
Приемлемо ли это?
- Какой уровень технического совершенства необходим для проведения этого анализа
- Какая квалификация требуется для интерпретации результатов анализа?
- Возможно ли практически осуществить этот анализ в моей лаборатории?
- Легко ли будет передать этот метод анализа в другие лаборатории?

Важные факторы, влияющие на выбор анализа антител, включают доступность реактивов и вероятность непрерывных поставок этих реактивов, не только на стадии разработки и оптимизации, но и для применения анализа в рабочем масштабе. Ограничением при выборе формата может являться отсутствие необходимых препаратов антител для определенного формата исследования, например, для конкурирующего или блокирующего форматов обычно требуются антиген-специфичные моноклональные антитела. Другим примером является потребность в эффективном захватывающем антигене: для скринингового анализа твердофазным сэндвич-методом может подойти малоочищенный антиген, тогда как для подтверждающего анализа требуется очищенный антиген. Другими важными соображениями, которые следует учитывать при выборе определенного формата твердофазного ИФА, являются диагностически релевантные изотипы и концентрации антител, авидность и антигенная специфичность; значимый антиген и в особенности эпитопы антигена; и также желаемый рабочий масштаб анализа. Все эти соображения будут иметь большое значение при выборе определенной разновидности твердофазного ИФА (таблица 2). Если ожидается применение анализа для оценки образцов различных видов животных, в том числе, диких животных, то может быть полезен конкурирующий/блокирующий формат. При принятии решения о формате анализа требуется также учитывать задачи анализа. Аспекты, которые следует учесть, подробно перечислены выше в рамке «Практические аспекты при выборе формата анализа», и практические вопросы перечислены в рамках ниже таблицы 2. Принципиально важно разобраться с этими вопросами на данном этапе разработки анализа, поскольку они существенны для правильного конечного результата и применения анализа.

**Таблица 2. Форматы твердофазного ИФА: преимущества и недостатки \***

<b>Тип твердофазного ИФА</b>	<b>Преимущества</b>	<b>Недостатки</b>
Непрямой – обнаружение связанных антител при использовании антивидоспецифичных конъюгатов или конъюгатов с протеином A/G	Использование и доступность разнообразных антивидоспецифичных конъюгатов, часто направленных на определенных подгруппы антител, например IgM, IgG1, IgG2, etc.	Изменчивость неспецифичного связывания в индивидуальных сыворотках  Для компенсации этой проблемы требуется использовать высокие начальные разведения
	Конъюгаты с протеином А и протеином G имеют широкую видоспецифичность и могут давать более низкие фоновые сигналы по сравнению с антителами класса Ig. Широкое использование для скрининга большого числа образцов	Это может приводить к снижению ДЧ по сравнению с конкурентными/блокирующими форматами. Одновременно можно анализировать только один или небольшое число видов.
Сэндвич – презентация антигена на захватывающем антителе, связанном с твердым носителем	Присутствие захватывающего антитела на твердом носителе может помочь сориентировать антигенную молекулу, что повышает шанс связывания антител из исследуемого образца. Возможность использования неочищенных препаратов антигена, поскольку захватывающее антитело селективно связывается с неочищенным антигеном.	У антигенов должно быть не менее 2 антигенных участков или эпитопов, в связи с чем применение этого типа анализа ограничивается относительно крупными антигенными комплексами или более сложными белками. На результаты анализа могут влиять размер и взаимное пространственное расположение эпитопов



	Предварительное внесение в планшет захватывающего антитела позволяет снизить вероятность последующего связывания с неспецифичными белками во время проведения анализа.	
Конкурентный (непрямой и сэндвич) – исследуемое тело в образце смешивают с оттитрованным детекторным антителом, затем вносят в лунки планшета, покрытые захватываемым антигеном, либо в прямом, либо в ингибирующем/блокирующем формате	<p>Простая адаптация для использования в качестве теста по обнаружению антител. При использовании высокоспецифичных моноклональных антител не требуется высокая очистка антигена. Метод может быть использован при анализе образцов животных другого вида, для которых не существует конъюгированных антител.</p> <p>Преимущества конкурентного/блокирующего ИФА сэндвич-типа зависит от захвата антигена. Возможность тестирования с использованием низких разведений сыворотки без риска интерференции, вызванной неспецифичным связыванием антител. Это может способствовать более высокой чувствительности данного формата анализа. Возможность использования антител в разных концентрациях для повышения аналитической чувствительности или аналитической специфичности. Это особенно важно для анализов с использованием поликлональных антител, на которые существенно больше влияет использование разных разведений сыворотки</p>	<p>Как правило, включает больше этапов и может потребовать большей оптимизации, например, предварительного титрования и оптимизации жидкофазного и твердофазного носителя. Требуется более совершенное техническое оснащение</p>

\* Первоисточник: Crowther (2001).

### 2.3. Экспериментальная проверка концепции (исследования осуществимости)

После выбора формата твердофазного ИФА проводят первые эксперименты, чтобы определить практическую осуществимость предложенного анализа. При проведении прототипного анализа следует протестировать панель референтных образцов, описанную в разделе А.2.1.3. Если планируется использовать референтный образец для нормализации экспериментальных данных, то такой образец должен быть выбран и включен на данном этапе в разработку анализа. Для согласованной оценки данных на всех этапах во все остальные аспекты валидационных исследований следует включать и референтную панель и любые референтные образцы. Используемая при экспериментальной проверки концепции референтная панель должна полностью включать ожидаемый рабочий диапазон потенциального анализа, и должна быть протестирована в нескольких повторностях в качестве быстрой проверки сходимости.

#### Проверка концепции

- Включало ли исследование осуществимости анализа не менее 4-5 образцов, полностью охватывающих рабочий диапазон анализа?
- Включили ли вы в анализ один или несколько референтных образцов, если это требовалось для нормализации данных?
- Обеспечивался ли адекватный разрыв между результатами анализа отрицательных, слабо положительных и резко положительных образцов?

Анализ должен обеспечивать хороший разрыв значений оптической плотности (ОП) и охват всего рабочего диапазона активности антител. Особенно важен достаточный разрыв между отрицательными и слабо положительными образцами. Нижняя граница диапазона значений ОП должна находиться на уровне 0,1 или ниже для отрицательных контрольных образцов при твердофазном непрямом ИФА и для резко положительных контрольных образцов при конкурентном/блокирующем твердофазном ИФА. Значения ОП вблизи верхней границы рабочего диапазона не должны превышать 2,0, поскольку выше этого значения измерения спектрофотометров для прочтения планшетов становятся довольно неточными. В случае получения обнадеживающих результатов переходят к следующему этапу - оптимизации.

## **2.4. Образцы и представление данных**

### **2.4.1. Приготовление и хранение панелей сывороток для исследований оптимизации**

В соответствии с апробированной практикой, для анализа антител следует выбрать несколько (не менее 4–5) образцов сыворотки, начиная с образца без антител и кончая образцом с высокой концентрацией антител к интересующему возбудителю инфекции.

Вначале эти образцы используют в экспериментах, которые проводятся для подтверждения концепции. Для каждого образца следует получить большой объем сыворотки (не менее 10 мл), который делят на аликвоты по 0,1 мл и хранят их при температуре -20°C. По одной аликвоте каждого образца размораживают, используют для экспериментов и в идеале затем утилизируют. Если утилизировать аликвоту невозможно, допускается хранение при 4°C между экспериментами в период до приблизительно 2 недель; однако в таких обстоятельствах существует возможность порчи образца. Затем размораживают другую аликвоту и используют ее в эксперименте. Этот метод предусматривает использование во всех экспериментах образцов из одного источника и подвергшихся одному и тому же количеству циклов замораживания-оттаивания (не следует допускать многократного замораживания и оттаивания сыворотки, поскольку оно может привести к денатурации антител). Кроме того, использование сыворотки из одного источника во всех экспериментах снижает изменчивость, по сравнению с использованием разных сывороток в экспериментах. Еще одно достоинство такого подхода заключается в получении серии данных для неоднократно анализируемого образца.

После завершения первых этапов валидации анализа один или несколько образцов могут быть признаны референтными реактивами, являющимися основой для представления данных и оценки внутрисерийной и межсерийной сходимости метода (Jacobson, 1998). В случае предварительного определения активности этих образцов они могут также служить внутрифирменными рабочими стандартами; такие стандарты гарантируют получение точных данных в разных сериях анализа; такие контрольные образцы гарантируют получение точных данных в разных сериях анализа (Wright *et al.*, 1993).

### **2.4.2. Нормализация и представление результатов**

Считывание показаний оптической плотности (ОП) в контексте твердофазного ИФА – это измерение интенсивности развившейся окраски, которая зависит от количества присутствующих в образце антител. Поскольку развитие окраски является функцией от взаимодействия между ферментом и субстратом в присутствии хромогена, полученные в разные дни результаты подвержены изменчивости, обусловленной внешними факторами, такими как температура, продолжительность взаимодействия и т. д. При сравнении результатов измерения ОП одних и тех же образцов в разных сериях анализа, выполненных в одной и той же лаборатории или разных лабораториях отсутствует прецизионность из-за изменчивости результатов, полученных для референтных образцов, которые включают в каждую серию анализа. Поэтому результаты измерения ОП, полученные для исследуемых

образцов, следует корректировать в зависимости от значений ОП, полученных для одного или нескольких референтных образцов в каждой серии анализа. Этот процесс называют нормализацией результатов твердофазного ИФА (более подробно см. Стандарт валидации МЭБ, раздел А.2.7). способ нормализации и представления данных желательно определить не позднее, чем в конце исследований осуществимости анализа.

Существует несколько способов выражения ОП (Wright *et al.*, 1993). Проще всего выразить ОП в процентах от значения, полученного для единственного резко положительного контрольного образца сыворотки, который включают в каждый планшет. Для выполнения таких расчетов результаты, полученные для этого положительного контрольного образца, должны находиться в линейном сегменте рабочего диапазона анализа. Более строгая процедура нормализации заключается в том, чтобы рассчитать результаты по калибровочной кривой, для построения которой откладывают измеренные значения ОП в зависимости от концентрации (или разведения) антитела для нескольких контрольных сывороток, при этом измеренные значения должны охватывать диапазон активности антител, предусмотренный для анализа. Для такого подхода требуется более сложный алгоритм, например, линейная регрессия, логарифмическая-логистическая регрессия либо 4-5-параметрический логистический регрессионный анализ. Этот подход более точный, потому что он не зависит от всего лишь одного резко положительного контрольного образца, используемого для нормализации данных, но основан на построении калибровочной кривой с поправкой на ожидаемые значения при использовании нескольких контрольных сывороток, с последующей экстраполяцией значения, полученного при измерении исследуемого образца. Этот метод позволяет также исключить значение, полученное для контрольного образца, но находящееся за пределами ожидаемого доверительного интервала.

## 2.5. Оптимизация

Применительно к твердофазному ИФА наиболее важными переменными, которые необходимо оптимизировать, являются концентрация/разведение антигена, адсорбированного на твердом носителе, рабочее разведение исследуемой сыворотки, молярность фермента, разведение конъюгированного антитела и концентрация субстратного раствора. Для оценки этих переменных применяется оценка методом шахматного анализа (каждую переменную в сочетании со всеми другими переменными в одной серии анализа, который затем повторяют несколько раз). Другими переменными, которым требуется уделить внимание, являются рН и степень ионизации реактивов, молекулярные факторы, например, валентность и плотность эпитопов на антигенах, изотип целевого антитела и аффинность антитела. Прецизионность результатов анализа можно отобразить на графике или выразить в цифрах, используя разнообразные статистические методы (Crowther, 2001). Для твердофазного ИФА требуется надлежащая калибровка оборудования (устройства для отмытки планшетов и спектрофотометра для считывания результатов и т.д.) перед использованием, являющаяся частью осуществляемой в лаборатории программы контроля качества.

### Оптимизация и стандартизация

- Тестировали ли вы все критические реактивы попарно при титровании методом шахматного анализа?
- Нашли ли вы оптимальную концентрацию/разведения для каждого реактива?
- Включили ли вы в анализ процедуры и реактивы для контроля качества или процесса?
- Включили ли вы методы нормализации измеренных данных?

## 2.6. Ингибирующие факторы в матрице образца

Хотя системы обнаружения антител методом твердофазного ИФА достаточно утойчивы к ингибирующим факторам, в Стандарте валидации МЭБ, раздел А.2.4, и публикации Greiner *et al.* (1997) представлены описания типов ингибиторов, которые могут повлиять на проведение анализа. Следует внимательно ознакомиться с этими ссылками, чтобы гарантированно учесть и контролировать все ингибирующие факторы.

## **2.7. Калибровка референтной сыворотки**

При наличии международных, национальных или полученных из других источников референтных сывороток следует выполнить калибровку анализа с целью соответствия аналитической чувствительности в метрологических единицах, использованных для калибровочной сыворотки (Wright, 1998).

## **В. ПЛАН ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗА**

### **1. Этап 1 – Характеристики аналитической эффективности**

#### **1.1. Сходимость**

Сходимость – степень согласованности результатов, полученных при измерении образца в нескольких повторностях, в одной серии и в разных сериях анализа, выполняемых в одной лаборатории. Для оценки сходимости используют панель образцов, использованную в исследовании осуществимости, или аналогичную. Готовят не менее 3 (предпочтительно 5) образцов, охватывающих рабочий диапазон анализа, в достаточном количестве, позволяющем выполнить не менее 20 серий измерений в течение нескольких дней. Требования к приготовлению и обращению с образцами представлены в главе 3.6.6 и в Стандарте валидации МЭБ, раздел В.1.1. Важно включать по крайней мере один референтный образец в непрямой твердофазный ИФА (положительную контрольную сыворотку), по которому могут быть нормализованы исследуемые образцы в процентах от положительного контроля. Для определения внутрисерийной изменчивости можно использовать среднее значение оптической плотности (ОП) и коэффициент вариации (КВ), полученные для повторностей одного образца. КВ не должен превышать приблизительно 15% (при возможном исключении отрицательных и очень слабо положительных образцов, для которых допустимы более высокие и не имеющие значения) ВК). Если все образцы были предварительно откалиброваны по референтным образцам и поэтому известна их оптическая плотность, измеренные значения ОП каждого образца в каждой серии могут быть нормализованы, как функция от ожидаемых значений ОП в условиях линейного регрессионного анализа. В результате будет получен коэффициент корреляции, демонстрирующий точность соответствия ожидаемому значению и позволяющий отложить нормализованные значения на контрольных графиках (Crowther, 2001).

#### **Характеристики аналитической эффективности**

- Установлена ли внутрисерийная и межсерийная сходимость при анализе серии положительных и отрицательных образцов?
- Установлены ли верхние и нижние контрольные пределы обнаружения для данного анализа?
- Определили ли вы АЧ и АС данного анализа?
- Не уступает ли потенциальный метод анализа стандартному методу, исходя из объективных количественных и качественных критериев?

#### **1.2. Аналитическая специфичность**

Для определения аналитической специфичности (АС) проводят тестирование сывороток животных, которые заведомо инфицированы/находились в контакте со всеми видами/штаммами патогена, которые должны обнаруживаться при использовании

соответствующего метода (глава 3.6.6, раздел 2.1). Для оценки АС изучают перекрестную реактивность с сыворотками животных, инфицированных родственными видами. Кроме того, твердофазный ИФА может давать ложноположительные результаты, обусловленные экзогенными факторами, например, неспецифическим связыванием сыворотки или конъюгата с поверхностью пластмассы, и в этом случае могут потребоваться блокирующие вещества. Для исключения таких ошибок следует проявить осмотрительность. При использовании блокирующего и конкурирующего твердофазного ИФА возможны также проблемы со специфичностью из-за стерического несоответствия, препятствующего связыванию белков с участками-мишенями.

### **1.3. Аналитическая чувствительность**

Аналитическая чувствительность метода (АЧ) является синонимом порога обнаружения (ПО) (пороговой концентрацией) антитела в образце. Различные типы анализов антител существенно различаются по собственному порогу обнаружения антител. Например, у 8 разных анализов антител порог обнаружения составляет от 1000 нг/мл (радиальная иммунодиффузия) до 0,01 нг/мл (хемолюминисценция) (Nielsen *et al.*, 1996). Обычно ПО определяют по разведению, соответствующему конечной точке титрования, для определения которой анализируют повторные (предпочтительно в количестве 10) разведения, полученные в серии 2-кратных разведений.

### **1.4. Сравнение стандартного метода анализа с потенциальным методом**

Для того чтобы установить, обладает ли потенциальный метод такими же количественными и качественными характеристиками, как стандартный метод, следует параллельно проанализировать принадлежащие к одной панели образцы потенциальным методом и методом МЭБ или другим признанным референтным методом. Высокая сопоставимость подтверждает представление о том, что потенциальный метод сможет успешно заменить референтный метод (см. также исследования с целью сравнения методов, глава 3.6.5).

## **2. Этап 2 – Характеристики диагностической эффективности**

ДЧ и ДС являются основными показателями эффективности анализа в процессе валидации. Для оценки ДЧ и ДС анализа антител применяются такие же общие процедуры, которые необходимы для анализов всех других типов (см. важную подробную информацию в главе «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.2). Количество образцов, необходимых для оценки ДЧ и ДС определенного анализа антител, зависит от плана выборочного исследования, учитывающего многочисленные переменные. Такой план включает создание панели образцов с учетом предполагаемого назначения анализа (который может быть предназначен для скринингового или подтверждающего тестирования). Также для получения этих оценок требуются заданные желаемые уровни ДЧ и ДС (указывающие на приемлемую частоту ложноотрицательных и ложноположительных результатов), допустимая ошибка при оценке таких ДЧ и ДС и уровень достоверности.

Количество животных, необходимых для определения приемлемых оценок ДЧ и ДС зависит от желаемого уровня достоверности оценок ДЧ и ДС и признанной допустимой ошибки. Например, применительно к инфекционному заболеванию, например, ящуру, необходимо снизить вероятность ошибочного признания инфицированных животных неинфицированными, при этом снизится допустимая ошибка результата испытания, и, в свою очередь, увеличится количество образцов, необходимым для определения высокого уровня достоверности оценок ДЧ. Альтернативно, для подтверждающего анализа желательно снизить вероятность признания неинфицированных животных инфицированными. Поэтому желательна высокая ДС при минимальной допустимой ошибке, а для этого требуется более широкая выборка неинфицированных животных. Все

эти общие вопросы, касающиеся размера выборки, доверительных интервалов и допустимых ошибок при оценке ДЧ и ДС, и также более подробные сведения и таблицы с указанием требуемого числа образцов, цитируемые по другим публикациям, описаны в Стандарте валидации МЭБ, раздел В.2 (Jacobson, 1998).

Часто бывает сложно получить достаточное число хорошо охарактеризованных сывороток, чтобы достичь ДЧ и ДС, достаточных для предназначения анализа. Первоначально это может быть компромиссом между статистически значимым и практически осуществимым, и в результате анализ считают временно признанным (Стандарт валидации МЭБ, раздел В.2.6). Однако со временем по мере накопления более хорошо охарактеризованных образцов, оценки ДЧ и ДС могут быть подтверждены (см. раздел 5.4 ниже).

### **2.1. Проблемы при определении точных оценок ДЧ и ДС для анализов антител**

В контексте валидации анализов антител возникают уникальные проблемы при попытке скомпоновать заведомо положительные и заведомо отрицательные образцы в достаточном количестве для определения характеристик эффективности анализа. Антитела являются косвенным указанием на присутствие инфекции или состоявшегося контакта с возбудителем или его компонентами. Вывод, который будет сделан при обнаружении антител (или их в случае их отсутствия) зависит от качественной и количественной реакции организма хозяина на возбудитель инфекции. Факторы, влияющие на концентрацию и состав специфичных антител в образцах сыворотки, являются внутренними факторами хозяина (например, пол, возраст, порода, питание, беременность, иммунологическая реактивность) или приобретенными (пассивно приобретенные антитела или активный иммунитет, сформировавшийся в результате вакцинации или инфекции). Теоретически в панели, используемые для оценки ДЧ и ДС, следует включить образцы животных, у которых представлены все эти переменные. Ясно, что такая задача является обескураживающей и даже невозможной. Для того чтобы преодолеть эту проблему первые панели образцов должны быть репрезентативными для большинства животных из целевой популяции, чтобы иметь возможность получить предварительные оценки ДЧ и ДС. В реальности после завершения разработки анализа необходимо подтверждать оценки ДЧ и ДС по мере появления большего числа охарактеризованных образцов (см. раздел 5.4, ниже).

В связи с тем, что часто желательно применить анализы антител к большому числу животных, населяющих крупные географических регионах (например, в случае скринингового анализа желательно охватить им весь континент), скомпоновать полностью репрезентативные панели образцов для такого широкого диагностического окна переменных может быть почти невозможно. Полезный альтернативный подход заключается в том, чтобы вначале оценить ДЧ и ДС для достаточно однородной популяции животных. Если анализ предполагается использовать в неоднородных популяциях животных с различающимся профилем возбудителей инфекции (при возможном отсутствии перекрестных реакций в первоначальной целевой популяции), может оказываться необходимой повторная оценка ДЧ и ДС, которая приведет к включению данных, полученных при использовании новых панелей образцов, репрезентативных для целевых популяций..

#### **Характеристики диагностической эффективности**

- Являются ли нормативными критерии, используемые для определения положительных и отрицательных референтных популяций?
- Полностью ли референтные образцы отражают популяцию, в которой проводится анализ?

- Возникали ли трудности при получении достаточного числа образцов? Если да, то как была решена эта проблема?

## **2.2. Референтные популяции животных**

### **2.2.1. «Заведомо инфицированные животные»**

Референтные животные с известным статусом наличия или отсутствия инфекции являются идеальным источником образцов для определения ДЧ и ДС. Однако такие образцы встречаются редко и их сложно обеспечить. Наиболее знакомым термином для референтных животных или образцов, используемых для определения ДЧ и ДС является неточно передающий смысл так называемый «золотой стандарт», который часто используется для классификации почти любого референтного животного, как инфицированного/находившегося в контакте с инфекцией или неинфицированного, и соответствующей классификацией полученных у таких животных образцов, как положительных или отрицательных (см. Стандарт валидации МЭБ, разделы В.2.1-3).

Разработчикам методов анализа должны быть известны преимущества и в особенности типичные ошибки, ассоциированные с разнообразными методами, которые используются для классификации референтных животных, как положительных или отрицательных, и которые собирательно становятся референтными особями, на которых основываются ДЧ и ДС потенциального анализа. Таким образом, крайне важно тщательно рассматривать адекватность разнообразных референтных образцов, что можно продемонстрировать с помощью следующих четырех примеров:

- i) Несомненный референтный образец: присутствие в организме-хозяине возбудителя или убедительные (патогномичные) гистопатологические доказательства

Если у животного обнаружен возбудитель инфекции или соответствие однозначному гистопатологическому критерию, то животное в большинстве случаев признают несомненным референтным животным. Полученные у такого животного образцы сыворотки обычно считаются несомненными референтными образцами сыворотки применительно к определению ДЧ и ДС потенциального анализа. Однако такие образцы могут иметь недостатки. На уровне популяции патоген может несомненно присутствовать у некоторых животных, но если образец сыворотки был получен у животного в начале инфекционного процесса, то иммунный ответ мог не привести еще к образованию антител в обнаружимом количестве. В этом случае такие образцы сыворотки, используемые в качестве референтных образцов, окажутся ложноотрицательными для подгруппы животных, находящихся на ранней стадии инфекции. И наоборот, при более хронических типах инфекции использование только референтных животных с подтверждающим ростом в культуре или подтверждающими гистопатологическими данными, может привести к завышенным оценкам ДЧ, нереалистичным для целевой популяции, для которой предназначен анализ, потому что иммунный ответ будет во всех случаях сформированным.

- ii) Составной референтный образец: подтверждение неинфицированных и не находившихся в контакте с инфекцией животных

Этот стандарт достигается при выборе референтных животных в географических районах, в которых история, клинические профили, результаты предыдущих тестирований и другие параметры позволяют предположить отсутствие патогенна и, следовательно, отсутствие специфического гуморального иммунного ответа у организма-хозяина на патоген, для обнаружения которого предназначен потенциальный метод анализа. Такие типы референтных материалов, их сильные и слабые стороны описаны в другой публикации

(Jacobson, 1998), и их надо тщательно рассматривать при использовании образцов из подобных источников для определения ДЧ и ДС потенциального метода анализа.

iii) Относительный референтный образец: сравнительная серология

Этим стандартом являются референтные животные, статус которых (инфекция или отсутствие инфекции) был установлен посредством сравнения результатов потенциального анализа с результатами другого серологического анализа тех же самых образцов. Часто такой стандарт является единственным источником референтного материала, имеющегося для оценки нового серологического теста. Если результаты такого референтного метода выбраны в качестве стандарта для определения характеристик диагностической эффективности потенциального анализа, то полученные при этом оценки ДЧ и ДС полезны, только если для референтного метода имеются документированные, признанные и приемлемые характеристики эффективности. Недостатком относительных референтных образцов является наличие собственных установленных уровней ЛП и ЛО результатов, являющихся источником ошибки, которая еще больше увеличится при оценках ДЧ и ДС нового метода анализа. Однако, в целом, использование других хорошо описанных методов анализа считается полезной практикой при определении статуса референтных животных, но лишь при возможности учесть неустранимое смещение, внесенное относительным референтным образцом (Всемирная организация по охране здоровья животных [МЭБ], 2008).

iv) *Дополнительный референтный образец:* экспериментальная инфекция или вакцинация

(Существенные слабые стороны этого типа образца описаны в главе «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.2.3). В некоторых случаях экспериментальная инфекция является единственным способом получить положительные образцы. Такой подход исключительно подходит для моделирования динамики инфекции и определения «диагностического окна» для нового анализа. Например, можно оценить временной интервал между контактом с патогеном и первым обнаружением антитела, или временем получения положительного результата у 25, 50, 75 и 100% инфицированных животных. Тем не менее, существуют типичные оценки при использовании полученных последовательно данных, и не следует допускать эти ошибки. Данные, отражающие многократные наблюдения за одними и теми же животными, нельзя использовать для расчета ДЧ и ДС, потому что в статистических моделях, которые применяются для определения ДЧ и ДС, предусмотрены независимые наблюдения (лишь один образец от каждого животного). Для статистически обоснованных исследований, которые проводятся в течение периода времени, или в случае использования одного образца от каждого из многочисленных экспериментальных животных, штамм выращенного в культуре микроорганизма, способ и доза при контакте с инфекцией, инфекция другими родственными и перекрестно реагирующими или неродственными не вступающими в перекрестные реакции микроорганизмами, являются переменными, которые могут вызывать качественно и количественно нетипичный ответ, который отсутствует при естественных инфекциях в целевой популяции. Как правило, в экспериментальных условиях наблюдается завышенная оценка чувствительности и специфичности, например, вследствие использования искусственно высоких доз для экспериментального заражения и свободных от патогенной микрофлоры животных в качестве отрицательного контроля.

Необходимо указать время получения образцов (количество дней после заражения). Следует описать источники получения и историю экспериментальных животных. Валидация не должна основываться исключительно на экспериментальных животных,



поскольку они не являются естественными популяциями животных, которые подвергаются воздействию патогенов при естественном контакте.

### **2.2.2. Модели латентных случаев для получения образцов**

Для обсуждения этого подхода к отбору образцов см. главу «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.2.5, и главу 3.6.5.

### **2.3. Определение порогового (граничного) значения**

Методики определения пограничного значения между отрицательными и положительными результатами анализов антител описаны в главе «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.2.4.

## **3. Этап 3 – Оценки воспроизводимости и повышенной сходимости**

Воспроизводимость – это мера прецизионности анализа, который проводится в нескольких лабораториях, расположенных разных регионах или странах, в идентичных условиях (с использованием одного протокола, идентичных реактивов и контрольных образцов) для тестирования одной и той же панели образцов. Оценки воспроизводимости в анализах по обнаружению антител не имеют уникальных отличий от аналогичных оценок, выполняемых для анализов любого другого типа. Поэтому мы предлагаем читателю ознакомиться с главой «Стандарт валидации МЭБ», раздел 3, в котором подробно описан анализ воспроизводимости, и с главой 3.6.6, в которой описаны референтные образцы и панели образцов.

## **4.1. Этап 4 – Осуществление программы**

### **4.1. Интерпретация результатов и определение прогностической значимости**

Практические рекомендации по осуществлению программы являются общими для всех типов анализа (Стандарт валидации МЭБ, раздел В.4). Однако, поскольку твердофазный ИФА часто оказывается наиболее оптимальным анализом в рамках надзорных программ, которые проводятся для подтверждения отсутствия заболевания, или искоренения заболевания или удаления инфекции из определенных популяций, ложноположительные результаты могут представлять собой существенную проблему даже при очень высокой диагностической специфичности.

Согласно распространенному заблуждению, если ДС и ДЧ метода составляют 99%, неправильная классификация животных, т.е. ЛП или ЛО результаты будут отмечаться только в течение 1% времени. Частота ЛО и ЛП результатов варьирует в зависимости от распространенности инфекции в целевой популяции. При проведении кампаний по искоренению заболевания частота ложноположительных реакций в начале кампании, когда распространенность инфекции относительно высока (например, 10%), существенно отличается от частоты ложноположительных реакций ближе к окончанию кампании, когда распространенность инфекции снижается до 0,1%. В связи с этим становится очень важной прогностическая значимость. Прогностическая значимость – это вероятность того, что результат анализа является истинно положительным или истинно отрицательным. В нашем примере использования анализа с ДЧ и ДС, равными 99%, для тестирования популяции животных, в которой распространенность заболевания составляет 10%, прогностическая значимость положительного результата анализа (ППЗ) составляет 91,7%; это означает, что животное с вероятностью 91,7% является истинно инфицированным. Прогностическая значимость отрицательного результата анализа (ОПЗ) составляет 99,9. Когда распространенность заболевания снижается до 5%, ППЗ и ОПЗ составляют 83,9% и 99,9%, соответственно. Однако, если распространенность заболевания снижается еще больше до 0,1% за счет успешного удаления инфицированных животных из популяции, для этого же анализа ППЗ составит 9% и ОПЗ составит 99,9%, следовательно, положительный результат анализа лишь с 9%-й вероятностью будет указывать на истинно инфицированное

животное (из 1000 протестированных животных лишь приблизительно 1 из 10 положительных результатов анализа отражает инфицированное животное, тогда как остальные 9 результатов являются ложноположительными). Поэтому, если анализ предназначен для демонстрации искоренения заболевания или удаления инфекции из популяции, то для того чтобы снизить вероятность ложноположительных результатов, разработчику анализа рекомендуется рассмотреть переход анализа ко второму граничному значению, при котором более высокая ДС достигается на более позднем этапе компании. Применительно к анализам с варьирующими ДЧ и ДС, уместно будет исследовать карту прогностической значимости, чтобы визуализировать влияние сниженной распространенности заболевания на прогностическую значимость анализа (Стандарт валидации МЭБ, таблица 2, и Jacobson, 1998).

## **5. Мониторинг эффективности анализа**

### **5.1. Мониторинг анализа**

После того как анализ будет внедрен в повседневную практику, внутренний контроль качества осуществляется посредством систематического мониторинга анализа с использованием карт контроля качества для оценки сходимости и точности. Карты, отражающие не менее 30 серий анализа, позволят выявить тенденции или сдвиги результатов измерения контрольных и стандартных образцов. Линии, отражающие среднее значение для не менее чем 30 серий анализа  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонения, являются полезными критериями при принятии решения о включении или невключении серии измерений. Серию отклоняют, если один результат измерения контрольного/стандартного образца отличается от среднего значения более чем на  $\pm 3$  среднеквадратичных отклонения (СКО) или если результаты измерения 2 (или более) контрольных образцов отличается от среднего значения на  $\pm 2$  СКО (Crowther, 2001). Иногда бывает необходимо адаптировать критерии принятия решения для конкретного анализа в связи с внутренними различиями анализов, обусловленными взаимодействием в системе патоген-хозяин. В главе 3.6.4 рассмотрен пример применения неопределенности измерения к твердофазному ИФА антител посредством использования положительного внутреннего контрольного образца.

Воспроизводимость результатов анализа, полученных в разных лабораториях, является обязательным требованием к аккредитованным лабораториям, согласно стандарту ISO 17025, и подлежит оценке Внешней группой обеспечения качества не реже одного раза в год (Всемирная организация по охране здоровья животных [МЭБ], 2008). Высоко оценивается членство в объединении лабораторий, заинтересованных в оценке своих результатов.

### **5.2. Незначительные модификации метода анализа – замена закончившихся реактивов**

Когда образцы для контроля качества или процесса заканчиваются, необходимо приготовить и многократно протестировать заменяющие их образцы. Заменяющие образцы следует включить не менее чем в 10 рутинных серий анализа с последующей нормализацией результатов по имеющемуся референтному образцу. Активность заменяющего контрольного образца должна быть сопоставимой с активностью заменяемого контрольного образца. Если требуется заменить референтный образец, следует тщательно выбрать заменяющий образец, как можно ближе соответствующий всем характеристикам оригинальной сыворотки, что позволит использовать заменяющий образец для нормализации результатов анализа с сопоставимым исходом (см. также главу 3.6.8 *Сопоставимость анализов после изменения валидированных методов испытания*).

#### **Мониторинг эффективности анализа**

- Изменилось ли назначение анализа?

- Изменилась ли эпидемиология рассматриваемого заболевания, например, распространенность, новые серотипы или штаммы и т.д.?
- Изменились ли имеющиеся критические реактивы, и если да, то проводилась ли оценка сопоставимости новых реактивов?
- Включены ли показатели эффективности в повседневное использование анализа (контрольные карты, основные статистические показатели)?
- Обновляются ли периодические верхние и нижние пределы в контрольных картах, по мере расширения опыта применения контрольных образцов?
- Предоставляются ли панели образцов другим лабораториям для оценки воспроизводимости?
- Включены ли квалификационные испытания в непрерывную оценку анализа?

При необходимости замены других реактивов, например, антигенов для захвата антителами, их следует получить по тем же протоколам или приобрести в соответствии с теми же критериями, которые использовались для получения оригинальных реактивов. Для оценки этих реактивов следует использовать рутинно применяемые сыворотки и выполнить 5-10 серий анализа, включающих текущий и новый реактивы. Другим полезным инструментом для оценки сопоставимости реактивов является панель репрезентативных образцов, например, панель для аттестационных испытаний (глава 3.6.6).

### **5.3. Важные изменения метода анализа – переход на новую разновидность твердофазного ИФА**

В случае изменения формата анализа, например, с сэндвич-модификации твердофазного ИФА на конкурирующий/блокирующий формат, потребуется выполнить ревалидацию, поскольку на характеристики эффективности анализа могут влиять многие переменные. Если решается вопрос об использовании анализа в другом географическом регионе, например, перенос анализа из северного в южное полушарие, то принципиально важно выполнить повторную валидацию анализа с использованием сывороток, полученных в популяциях животных, населяющих соответствующую местность. Оценка референтных сывороток, полученных у животных из этих популяций, выполняют в соответствии с этапами 3-5, показанными на рисунке 1 в главе «Стандарт валидации МЭБ». Это единственный способ гарантировать пригодность анализа для популяций, состав которых отличается от состава оригинальной популяции, для тестирования которой был предназначен анализ.

### **5.4. Повышение доверия к критериям валидации**

В связи с обширным набором переменных, оказывающих влияние на эффективность серодиагностических анализов, полезно насколько возможно увеличивать число референтных сывороток, поскольку увеличение выборки приводит к уменьшению ошибки. Следует наращивать расширенный банк референтных сывороток, пополняя его хорошо охарактеризованными сыворотками, и периодически использовать эти сыворотки для обновления оценок ДЧ и ДС в популяции, для которой предназначен соответствующий анализ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

CROWTHER J.R. (2001). The ELISA guidebook. *In: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1–421.

JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.

GREINER M., BHAT T.S., PATZELT R.J., KAKAIRE D., SCHARES G., DIETZ E., BÖHNING D., ZESSIN K.H. & MEHLITZ D. (1997). Impact of biological factors on the interpretation of bovine trypanosomosis serology. *Prev. Vet. Med.*, **30**, 61–73.

NIELSEN K., GALL D., KELLY W., VIGLIOCCO A., HENNING D. & GARCIA M. (1996). Immunoassay Development: Application to Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Brucellosis, Copyright, Agriculture and Agri-Food Canada.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2008). OIE Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Diseases. *In: OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases*. OIE, Paris, France, 1–31.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2013). Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, seventh edition. OIE, Paris, France.

WRIGHT P.F. (1998). International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 527–533.

WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M., LELENTA, M. & JEGGO, M.H. (1993). Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12** (2), 435–450.

\* \* \*