

## ГЛАВА 2.6.2.

### РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИЗОВ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ АНТИГЕНОВ

#### ВВЕДЕНИЕ

*В рекомендациях МЭБ по валидации представлена подробная информация и примеры в обоснование 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 и идентификация возбудителя является подтверждающим доказательством инфекции или заболевания, вызываемого определенным патогеном. Существует большое количество разных прямых и непрямых методологий испытаний. Классические анализы, представляющие собой прямое обнаружение возбудителя<sup>1,1</sup>, включают электронную микроскопию, световую микроскопию (т.е. наблюдение уникальных гистопатологических или патогномических характеристик, идентификацию паразитов *in situ*, и т.д.), выделение вируса, выращивание бактерии в культуре и приемы деструкции паразита(?). Для многих прямых методов требуются дополнительные процедуры, помогающие охарактеризовать и идентифицировать этих возбудителей (например, тест торможения гемагглютинации или тест нейтрализации вируса, специальные штаммы бактерий или грибов и т.д.). В число непрямых методов обнаружения возбудителя и, в частности, антигена (Ag) входят твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлюоресцентный или иммунопероксидазный анализ, вестерн-блоттинг, гибридизация на микрочипах, сортировка клеток с активацией флюоресценции (СКАФ) и биосенсорные методы. Часто прямые и непрямые методы используют последовательно, например, для выделения, обогащения и/или экстракции микроорганизма используют прямой метод с последующим применением непрямых методов для того, чтобы охарактеризовать и идентифицировать патоген.*

#### **Практические вопросы при выборе формата анализа:**

- Важна ли высокая пропускная способность анализа? Будет ли анализ автоматизирован?
- Будет ли анализ применяться ко всему стаду или к отдельным особям?
- Сколько потребуется времени для одного анализа? Приемлемо ли это?
- Какой уровень 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?

<sup>1</sup> Определения: В контексте прямого или непрямого обнаружения аналита термин «прямой» относится к микроорганизму или его антигену, например, к прямому обнаружению микроскопическими методами. Термин «непрямой» относится к реакции организма-хозяина на организм (например, не прямое обнаружение посредством обнаружения антител к организму). В контексте диагностических методов, используемых для обнаружения инфекции, микроскопия является средством прямого наблюдения за микроорганизмом, тогда как использование реактива для заключения о присутствии возбудителя (например, фермента, конъюгированного с очищенным антителом, специфичным для возбудителя) является непрямым методом.

*Приведенные выше примеры широко варьируют с точки зрения требований к лабораторному оборудованию. Тесты для полевой диагностики (включая тест-полоски) могут также являться тестами на обнаружение антигена. Они просты в применении и были разработаны для тестирования животных в полевых условиях, но могут применяться и в лабораториях. Стоимость, оснащение лаборатории, биоизоляция/безопасность, техническая проработанность, квалификация для интерпретации результатов, продолжительность одного анализа, пропускная способность, характеристики диагностической эффективности, сходимость и воспроизводимость являются важными параметрами, которые необходимо учитывать при выборе наиболее подходящего анализа. Эти параметры варьируют также в отношении пригодности их для различных целей диагностики.*

*В отличие от серологических методов или методов обнаружения антител, методы обнаружения антигенов существенно зависят от времени появления клинических признаков и патогенеза заболевания и от концентрации патогена в определенных тканях и/или жидкостях. Успешная диагностика определяется правильным временем и выбором места получения образца (ткань/очаг поражения, соскоб, мазок, кровь или другие биологические жидкости), условиями хранения и сохранностью образца во время транспортировки. Для решения определенных задач может потребоваться тестирование отдельных животных и/или образцов (например, для подтверждающего анализа), тогда как для других целей (например, скрининга) действенным и эффективным подходом может быть объединение животных. Для правильного выбора образцов требуется хорошее понимание заболевания и влияния матрицы образца на патоген (например, клоакальных или трахеальных мазков в случае птичьего гриппа).*

*Анализы по обнаружению нуклеиновой кислоты (ОНК) все в большей степени вытесняют классические системы обнаружения антигенов. Разработка и оптимизация анализов ОНК описана в главе 3.6.3. Хотя может показаться, что эти анализы ОНК наиболее предпочтительны для решения многих задач, они не всегда удобны или действенны. В большинстве случаев по-прежнему необходимо и оправданно, по крайней мере, в отношении источника или первого случая заболевания, для того чтобы в дальнейшем определить характеристики и идентифицировать возбудитель, сначала вырастить его на селективной среде или в чувствительной клеточной линии либо на куриных эмбрионах. Хотя генотипирование является важным методом оценки, особенно в молекулярной эпидемиологии, важны также и другие средства определения характеристик возбудителя, такие как серотипирование, патотипирование и биотипирование. Выращенные в культуре и сохраненные патогены имеют огромную историческую ценность и являются важным источником референтных материалов.*

*В этой главе в качестве примера внедрения передовой практики рассматривается использование твердофазного ИФА для обнаружения антигенов, поскольку этот метод находит применение во всем мире. Большинство основных процессов, используемых для валидации других типов анализа по обнаружению антигенов, станут очевидными при распространении на них процессов, использованных для валидации твердофазного ИФА. Поскольку анализы обнаружения антигена и антитела имеют большое концептуальное сходство, в этой главе часто приводятся перекрестные ссылки на главу 3.6.1, описывающие обнаружение антител.*

## А. ПУТИ РАЗВИТИЯ АНАЛИЗОВ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ АНТИГЕНОВ

### 1. Целевое назначение анализа антигенов

Целевое назначение анализа – это ключевой фактор, которым следует руководствоваться, принимая решение о выборе и ранних этапах разработки потенциально подходящего метода анализа. В соответствии определенными МЭБ и показанными в таблице 1 категориями соответствия целевому назначению системы обнаружения антигена могут подходить для решения определенных задач. Для поддержки в искоренении заболевания или для использования в программах надзора обычно требуется проанализировать большое количество образцов, и первостепенное значение имеют диагностическая чувствительность и пропускная способность метода. И наоборот, подтверждение клинических случаев не влечет за собой тестирование многочисленных образцов, но очень важны диагностическая специфичность и время, затрачиваемое на анализ образца до получения результата. В самом начале следует тщательно обдумать вопросы, перечисленные выше во врезке.

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

Характеристики анализов	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.

NB: Для обнаружения патогена могут также применяться методы ОНК, которые рассматриваются в главе 3.6.3. **Обозначение:** +++ = принципиально важно; + = менее важно; - = неважно

### Основные цели, которым может соответствовать метода 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 транспортировки
3. Способствовать искоренению заболевания или удалению инфекции из определенных популяций
4. Для подтверждающего анализа клинических случаев (включая подтверждение положительных результатов скрининга)
5. Для оценки распространенности инфекции или уровня воздействия, 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 цели (таблица 1), наиболее предпочтительными обычно являются обладающие высокой диагностической чувствительностью (ДЧ) скрининг-тесты на антитела, при условии что обнаружимый иммунный ответ является значимым индикатором инфекции. Однако при определенных ситуациях возможны ситуации, в которых гуморальный иммунный ответ приводит к неправильному истолкованию, и более адекватный подход может заключаться в обнаружении патогена (например, при микобактериальной или трипаносомной инфекциях). В этих случаях более эффективными могут оказаться методы обнаружения антигена. Необходимо продемонстрировать высокую ДЧ скрининг-теста на антигены. Тесты с высокой ДЧ характеризуются низкой частотой ложно-отрицательных (ЛО) результатов, и при применении в популяциях с низкой распространенностью патогена, ОПЗ соответствует самому высокому уровню. Поскольку ДЧ и диагностическая специфичность (ДС) обычно связаны обратной зависимостью, снижение ДС будет приводить к повышенной частоте ложноположительных (ЛП) результатов. Поэтому следует проводить подтверждающий анализ всех положительных результатов, полученных при использовании скрининг-тестов, 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.

### **1.2. Цель 2**

Для ряда заболеваний, включенных в *Руководство по наземным животным*, в качестве наиболее предпочтительного метода анализа, проводимого с целью определения «отсутствия инфекции у индивидуальных животных перед перемещением» указана идентификация возбудителя. Хотя во многих случаях подразумевается выращивание патогена в культуре или обнаружение нуклеиновой кислоты, возможны также ситуации, в которых для достижения этой цели целесообразно провести анализ по обнаружению антигена. Для того чтобы не допустить риска распространения заболевания в результате торговли, следует предпочесть метод с высокой ДЧ.

### **1.3. Цель 3**

Если целью анализа является искоренение заболевания или удаление инфекции из определенных популяции, то наиболее предпочтительными являются скрининг-тесты на антигены, аналогичные 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 короткая продолжительность 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 Цели 1, 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 системы обнаружения антигена и/или нуклеиновых кислот.

#### **1.4. Цель 4**

Хотя обладающие высокой ДС анализы антител часть являются наиболее предпочтительными для подтверждающего диагностирования клинических случаев, анализы антител не обязательно окажутся наиболее предпочтительными, особенно в случае проявления клинических признаков до формирования иммунного ответа. Ярким примером могут быть высокопатогенные инфекции птичьего гриппа, при которых животное может погибнуть раньше, чем может быть обнаружен иммунный ответ. При условии быстрого получения результата анализа по обнаружению антигена и/или нуклеиновой кислоты обычно являются более удачным выбором для подтверждения клинических случаев. В этих случаях суть заключается в том, чтобы максимизировать ДС и, тем самым, минимизировать потенциальные ЛП реакции. В некоторых клинических случаях, например, при везикулярных болезнях у наземных животных, может потребоваться провести несколько анализов, чтобы быстро исключить определенные патогены, вызывающие похожие клинические признаки. В этой категории анализов при идентификации потенциальных вспышек заболевания особенно важна возможность быстрого получения результата анализа.

#### **1.5. Цель 5**

Для оценки распространенности инфекции и/или носительства с последующим использованием этих данных при анализе рисков, например, в связи с обследованием в области здравоохранения, определения статуса здоровья стада и мониторинга мероприятий, направленных на борьбу с заболеванием, наиболее предпочтительны анализы по обнаружения антигенов, 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**

Не применим к анализам по обнаружению антигенов.

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

#### **2.1. Референтные образцы, 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 образцов для диагностики «Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных»* или введении к Части 2 *«Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для водных животных»*. Матрицы образцов для анализов по обнаружению антигенов могут быть очень разнородными (например, кровь, кал, молоко, кожа, сперма, слюна, язвы, везикулы или мазки с пораженных тканей, таких как ротоглотка (полученные с помощью зонда), трахея, половые органы, клоака, пищевод и т.д.). Идеальным является образец, который легко получить и содержащий при этом аналит в высокой концентрации. Во многих случаях предпочтительными образцами являются кровь или мазки, но, в зависимости от патогена, могут быть необходимыми другие ткани или жидкости, например, образцы кожи, органов, например, головного мозга (при бешенстве, трансмиссивной губчатой энцефалопатии [ТГЭ]), органов лимфатической системы, например, селезенки и лимфатических узлов (при классической чуме свиней), почек, печени, фрагментов дыхательных путей (при птичьим гриппе), пищеварительного тракта (парвовирус), молоко, кал, сперма, слюна, опухолевый материал (при энзоотическом лейкозе крупного рогатого скота), и т.д.

Как отмечено в главе 1.1.2, важны обычные соображения, а именно, ограничение бактериальной и грибковой контаминации образцов. Как правило, не рекомендуется использовать консерванты и фиксаторы тканей; образцы следует направлять с минимальной задержкой и в замороженном виде в диагностическую лабораторию. Во время транспортировки и хранения важно осознавать физические и химические требования патогена (например, вирус ящура является высоко лабильным при низких рН, и для поддержания рН выше 7 требуется использовать взятые в равных количествах глицерин и фосфатный буферный раствор).

Если предполагается объединение проб перед тестированием, следует провести эксперименты, демонстрирующие пригодность анализа для решения такой задачи (например, демонстрирующие достаточно высокую чувствительность анализа для того чтобы обнаружить одно инфицированное животное в объединенном образце, содержащем 5, 10, 50 или более образцов, полученных у неинфицированных животных).

### **2.1.2. Референтные образцы**

См. главы 3.6.1 *Разработка и оптимизации анализов по обнаружению антител* и 3.6.6 *Выбор и использование референтных образцов и панелей*.

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

Во время разработки и стандартизации метода обнаружения антигена в качестве контрольных образцов следует использовать образцы с концентрациями антигенов, превышающими предполагаемый рабочий диапазон анализа. Их можно получить из полевых образцов или изготовить в лаборатории, добавив известное количество определяемого вещества (см. главу 3.6.6). Отрицательные образцы следует получать у заведомо неинфицированных животных, используя эту же матрицу для приготовления образцов с добавками.

### **2.1.4. Очищенные и неочищенные антигены для получения антител**

Общее правило заключается в том, что антигены, предназначенные для получения иммунологических реактивов, должны быть как можно более натуральными с точки зрения конформации, для того чтобы обеспечить презентацию эпитопов, имитирующую их ориентацию на живых организмах. Поэтому следует использовать такие методы выделения и/или очистки, обеспечивающие максимальное сохранение антигенную целостность патогена.

В случае очень крупных патогенов, например, поксвирусов, бактерий и протозойных паразитов для идентификации и выбора антигенов, вызывающих выраженный иммунный ответ могут применяться белковые микрочипы.

### **2.1.5. Моноклональные и поликлональные антитела для прямого и непрямого обнаружения антигенов**

Моноклональные антитела демонстрируют уникальную аналитическую специфичность и очень полезны для обнаружения специфичных для возбудителя эпитопов на уровне группы, штамма или субштамма. Соответственно, необходимо тщательно рассматривать применение антител с учетом решаемой задачи желаемой специфичности анализа. Поликлональные антитела по своей природе обладают более широким диапазоном специфичности. Для захвата сложных антигенов часто более предпочтительны очищенные или полочищенные поликлональные антитела, обладающие более высокой аффинностью по сравнению с моноклональными антителами.

## 2.2. Дизайн метода испытаний

### 2.2.1. Выбор метода

Для правильного выбора методики требуется тщательно рассмотреть многочисленные переменные в контексте требований к результативности анализа. Выбор анализа должен быть привязан к целевому применению, в отношении которого обычно должно быть принято согласованное решение разработчика анализа, статистиков и других заинтересованных сторон, например, эпидемиологов и контрольно-надзорных органов. Если целью является разработка скринингового метода (например, в период наблюдения после вспышки заболевания), то особенно важны будут ДЧ, высокая пропускная способность, низкая стоимость, техническая простота выполнения, отсутствие высоких требований к квалификации для интерпретации результатов и т.д. Если цель заключается в разработке подтверждающего анализа (например, для подтверждения клинических случаев или подтверждения положительных результатов скрининга), то на первом плане окажутся другие приоритеты, включающие высокую ДС, быстрое получение результата, техническое совершенство и практические навыки интерпретации результатов. Отмечается рост числа методов, применяемых в месте оказания ветеринарной помощи или в полевых условиях, к которым предъявляются особые требования устойчивости и надежности, с учетом непостоянных условий окружающей среды, в которых применяются эти методы и квалификации операторов, которые будут использовать этот метод и интерпретировать результаты.

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

- Какая цель поставлена перед анализом: скрининговая или подтверждающая, или обе этих цели?
- Анализ будет использован в лабораторных или в полевых условиях?
- Анализ будет использован для определения одного или нескольких видов? Каких?
- Предполагается ли использовать тест для типирования микроорганизмов на уровне группы, серотипа или штамма?
- Тест будет применяться в одной стране или в международном масштабе?

Метод твердофазного ИФА, применяемого для обнаружения антигена, концептуально является таким же методом твердофазного ИФА, который используется для обнаружения антител (глава 3.6.1), за исключением того, что антиген является веществом, на который конкретно ориентирован анализ, а антитела – это основные реактивы, используемые для захвата и обнаружения антигенов. Существуют различные форматы анализа, в зависимости от того, происходит ли прямая адсорбция антигена на планшете для микротитрования, или антиген захватывают антитела, иммобилизованные на твердом носителе, и также от последующих этапов детекции.

Не всегда очевидно, какой именно формат анализа следует выбрать для наиболее оптимального достижения поставленной цели. В число важных факторов, ограничивающих выбор метода применительно к той или иной ситуации, могут входить доступность реактивов и порог обнаружения метода. Поскольку в настоящее время многие системы направлены на обнаружение высокоспецифичных антигенов, выбор антитела для захвата и/или для обнаружения антигена приобретает решающее значение.

Приготовление исследуемого образца тоже заслуживает критического рассмотрения в зависимости от используемого формата анализа. Использование захватывающего антитела при сэндвич-анализах повышает селективность и уменьшает потенциальные эффекты матрицы. При проведении анализов, требующих нанесения анализата непосредственно на твердый носитель, могут потребоваться подготовительные методы экстракции,

центрифугирования или фильтрования для удаления постороннего материала. Более подробное обсуждение различных форматов анализа см. в публикации Crowther (2001).

Первостепенное значение имеют размер и сложность структуры антигена и доступность необходимых реактивов, например, захватывающих антител (например, для того чтобы антигены можно было обнаружить сэндвич-методом, у них должны присутствовать не менее двух несвязанных эпитопа), в связи с чем применение этого метода ограничивается относительно крупными антигенами или цельными патогенами. Имеет значение аффинность иммунологических реактивов, поскольку устойчивость образующихся комплексов в лунке планшета или на гранулах влияет на рабочие параметры анализа.

Практические соображения включают доступность и применение стандартных антигенов для контроля и обеспечения качества, сходимость, воспроизводимость, пропускную способность, продолжительность анализа до получения результата, стоимость и техническая проработанность метода и уровень квалификации интерпретирующего результаты специалиста.

При работе с возбудителями экзотических заболеваний и/или возбудителями зоонозов требуется уделить особое внимание правилам биобезопасности и биозащиты (см. также главу 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита, Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

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

Для проверки методов обнаружения антигена требуется провести такие же эксперименты, которые используются применительно к методам обнаружения антител (см. главу 3.6.1).

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

### **2.4.1. Выбор, хранение и использование контрольных образцов, предназначенных для разработки методов и валидационных исследований**

В процессе разработки и валидации метода важно оценивать и постоянно контролировать его чувствительность и специфичность. Для этого следует отобрать несколько образцов (достаточно 4-5) с концентрацией антигена аналита от нулевой до высокой. Эти образцы используются в экспериментах, предназначенных для оптимизации анализа. Для непрерывного поступления данных требуется внимание и заблаговременный планирование подготовки и хранения образцов. Каждый контрольный образец получают в большом объеме (~10 мл) и делят на аликвоты по 0,1 мл, которые хранят при температуре не выше -80°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 образцов, поскольку оно может привести к денатурации антигена и/или способствовать росту других нежелательных микроорганизмов). Кроме того, использование одного и того же источника образца во всех экспериментах снижает изменчивость, по сравнению с использованием разных образцов 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 (Wright, 1998).

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

К анализу обнаружения антигенов применяются такие же процедуры нормализации, как к анализам обнаружения антител (см. подробную информацию в главе 3.6.1).

#### **2.5. Оптимизация**

Цель этой стадии заключается в том, чтобы окончательно согласовать параметры, связанные с реактивами, расходными материалами и оборудованием, которые впоследствии будут включены в утвержденный протокол и будут использованы в соответствии с описанным в части В плане валидации анализа. См. подробную информацию в главе 3.6.1.

##### **Оптимизация и стандартизация**

- Позволяет ли метод отличать образцы, содержащие аналит, от образцов, не содержащих аналит (каков порог обнаружения = аналитическая чувствительность метода?)
- Дает ли метод перекрестную реакцию с нецелевыми антигенами, которые могут присутствовать в образце или матрице образца (аналитическая специфичность)?
- Какова величина шума или фоновой активности в отрицательном образце?
- Выполнялась ли оценка сходимости серии контрольных образцов, проанализированных в разные дни?
- Имеются ли в достаточном количестве положительные и отрицательные образцы для выполнения экспериментов, направленных на оптимизацию и валидацию анализа?
- Если да, было ли выполнено надлежащим образом разделение и хранение референтных и контрольных образцов, для того чтобы исключить связанное с образцом смещение (порчу образца)?
- 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 референтные реактивы и рабочие стандарты/образцы и выполнили ли нормализацию данных ОП, чтобы получить наилучшие возможные результаты для сравнения?

#### **2.6. Ингибирующие факторы в матрице образца**

В связи с большим разнообразием и сложной структурой образцов влияние матрицы образца при анализах по обнаружению антигенов более вероятно, чем при анализе по обнаружению антител, которые обычно проводятся для обнаружения антител в сыворотке. Ингибирующие вещества, которые могут повлиять на результат анализа, часто обнаруживаются в сложных матрицах, таких как гной, сперма, трахеальные/назальные/клоакальные мазки. Системы для обнаружения антигена методом твердофазного ИФА достаточно устойчивы к ингибирующим факторам, см. описание типов ингибиторов, которые могут повлиять на результаты анализа в главе «Стандарт валидации МЭБ», раздел А.2.4, и в публикации Greiner *et al.* (1997). Следует внимательно ознакомиться с этими ссылками, чтобы гарантированно учесть и контролировать все ингибирующие факторы.

#### **2.7. Калибровка референтного образца и сравнение со стандартным методом анализа**

Важная для этой процедуры информация включена в главу 3.6.1.

## В. ПЛАН ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗА

### 1. Этап 1 – Характеристики аналитической эффективности

#### 1.1. Сходимость

Глава 3.6.1.

#### 1.2. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность (АС) определяют как степень различения целевого аналита от других компонентов, которые могут быть обнаружены в матрице образца (см. главу 3.6.6, раздел 2.1). Чем выше, тем меньше ложноположительных результатов. Для определения АС следует протестировать хорошо охарактеризованные образцы сходных или родственных патогенов, вызывающие поражения, похожие на поражения, вызываемые целевым патогеном, или часто обнаруживаемых в образцах, содержащих целевой патоген. Например, чтобы оценить АС метода твердофазного ИФА, применяемого для обнаружения ящура, в отношении одного из определенных серотипов (например, серотипа О), необходимо оценить реактивность метода в отношении всех субштаммов с этим серотипом (например, О Campos, О Manisa, и т.д.). В то же время важно показать, что при анализе отсутствует перекрестная реактивность в отношении других серотипов, например, А, Asia 1, С, SAT 1, 2 и 3. Наконец, необходимо также оценить, отмечается ли при анализе перекрестная реактивность с возбудителями заболеваний, при которых могут возникать сходные признаки, таких как везикулярный стоматит, везикулярная болезнь свиней и везикулярная экзантема свиней. Другим примером является метод твердофазного ИФА, разработанный для обнаружения вируса птичьего гриппа: при применении этого метода в качестве скринингового при анализе должны обнаруживаться все подтипы нуклеопротеина или антигена матрикса, т.е. N1-N16 и N1-N9. Однако не допускается перекрестная реактивность с вирусами, вызывающими похожие клинические признаки, например, с вирусом Ньюкаслской болезни или вирусом инфекционного бурсита птиц (диагностическая специфичность) и также с другими присутствующими в матрице или на твердом носителе неспецифическими компонентами. При использовании некоторых разновидностей твердофазного ИФА могут быть получены ложноположительные результаты, обусловленные неспецифичными факторами, например, неспецифичным связыванием содержащих антитело конъюгатов с поверхностью пластмассы, и в этом случае могут потребоваться блокирующие вещества. Для исключения таких ошибок следует проявить осмотрительность.

#### 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?

#### 1.3. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность метода (АЧ) является синонимом порога обнаружения (ПО) (пороговой концентрацией) антигена в образце. 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. Чем больше количество повторностей, тем более точным

будет определение разведения, при котором антиген более не обнаруживается. Более подробную информацию о ПО и АЧ см. в главе «Стандарт валидации МЭБ» и в главе 3.6.5.

Скрининговые методы анализа и методы, предназначенные для обнаружения субклинических инфекций или носителей, должны иметь очень высокую АЧ. В этих случаях может быть сложно получить подходящие образцы и определить сравнительную АЧ изучении панели образцов посредством потенциального метода и другого независимого метода. Временную информацию о способности метода обнаруживать антиген по мере развития инфекции можно получить, используя образцы экспериментально инфицированных животных, при наличии таких образцов.

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

Глава 3.6.1.

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

См. также главу 3.6.1.

#### **2.1. Проблемы при определении точных оценок ДЧ и ДС для анализа антигенов**

Применительно к анализам по обнаружению антигенов, включая твердофазный ИФА, следует уделить особое внимание срокам получения образца, поскольку вероятность обнаружения антигена или собственно патогена очень тесно связана со стадией инфекции. Вероятно, для анализов по обнаружению антигена/патогена диагностическое окно будет намного уже, чем для анализов по обнаружению антител, поскольку иммунный ответ, как правило, можно измерять в течение длительного периода времени. При разработке рекомендаций по срокам получения образцов важным фактором является динамика инфекции, которая может иметь острое, персистирующее, подострое, хроническое течение или представлять собой состояние носительства. Например, во время острой вирусной инфекции образец следует получить как можно раньше после появления клинических признаков. У животных с персистирующей, подострой, хронической инфекцией или животных-носителей патоген и организм-хозяин находятся в состоянии равновесия, и патоген может присутствовать в ничтожно низких концентрациях, которые бывает очень сложно обнаружить. При развитии заболевания могут поражаться другие системы органов, и другие ткани или физиологические жидкости могут оказаться более подходящими целевыми тканями при получении образцов по мере прогрессирования заболевания.

#### **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**

В зависимости от состава положительных и отрицательных референтных образцов один и тот же метод анализа может иметь разные оценки ДЧ и ДС. В идеале состав референтных образцов и животных должен максимально близко соответствовать образцам, ожидаемым в целевой популяции, для которой был разработан метод анализа. Важно иметь ясное определение случая. Такое определение представляет собой набор критериев,

используемых для решения о том, является ли животное или группа животных инфицированным. Референтный статус должен быть связанным с целью тестирования. Например, если цель анализа – использование в качестве скринингового метода для обнаружения на ранней стадии инфекции ящура (например, у свободно пасущегося крупного рогатого скота с везикулами), то большинство образцов для определения ДЧ и ДС следует получить в этой целевой популяции. На этом этапе валидации следует собрать и обобщить важную информацию для всех вовлеченных животных (вид, пол, возраст, порода) и также информацию о других факторах, влияющих о ДЧ и ДС (дата и место получения образцов, иммунологический статус, проведенная вакцинация и перенесенные заболевания, патогномические и косвенные анализы, использованные для определения статуса животных, распространенность заболевания в популяции и описание фактов, на основании которых было сделано заключение о референтном статусе).

Образец, полученный у отрицательного референтного животного означает отсутствие контактов животного с рассматриваемой инфекцией, или отсутствие инфекции соответствующим возбудителем. Например, популяцию, отрицательную по европейской чуме свиней, можно определить, как район со стадами свиней, в котором в последние годы отсутствуют подтвержденные клинические случаи заболевания, что подтверждено отрицательными результатами серологических проб и отрицательными результатами вирусологических проб, проведенных животным с подозрением на заболевание. Полученные у этих животных образцы соответствуют статусу отрицательных референтных образцов. Отрицательную референтную популяцию следует выбирать очень тщательно, чтобы гарантировать ее репрезентативность и соответствие положительной референтной популяции (например, одинаковая порода и одинаковый риск естественного заражения).

Если животное было вакцинировано, то вакцинация (например, модифицированной живой вирусной вакциной) может исказить результаты анализа по обнаружению антигена. Образцы вакцинированных животных не следует относить к категории отрицательных референтных образцов.

Далее перечислены типы и ограничения референтных образцов, которые часто используют для оценки характеристик нового анализа. Более подробное описание каждого из референтных образцов см. в главе 3.6.1, раздел В.2.2.1, и в публикации Jacobson, 1998. При использовании образцов животных, относящихся к одной из следующих четырех категорий, в качестве источников для определения ДЧ и ДС потенциального метода анализа, следует тщательно рассмотреть сильные и слабые стороны эти референтных образцов (Jacobson, 1998).

i) Несомненный референтный образец

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

ii) Составной референтный образец

Составной референтный образец: подтверждение отсутствия инфекции у животных или контактов животных с инфекцией.

iii) Относительный референтный образец

Относительный референтный образец: референтные животные, у которых статус инфекции был установлен посредством сравнения с результатами другого анализа по обнаружению антигена или нуклеиновой кислоты с использованием одних и тех же образцов. Как и при анализе антител 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).

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

Существенные слабые стороны этого типа образца описаны в главе «Стандарт валидации МЭБ», раздел В.2.3. Примечание: В контексте обнаружения антигена «сравнительные» методы должны включать обнаружение патогена посредством выделения, роста в культуре, анализов на обнаружение НК, либо гистопатологических или других *in-situ* методов.

### **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.

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

Важно ясно описать метод и образцы, использованные для выбора граничного значения. Мы настоятельно рекомендуем провести анализ соотношения правильных и ложных результатов (ROC), чтобы продемонстрировать потенциальную эффективность метода в других эпидемиологических условиях.

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

Оценки воспроизводимости анализов по обнаружению антигенов 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. МЭБ опубликовало руководство по лабораторным квалификационным испытаниям (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/proficiency-testing/>).

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

### **4.1. Интерпретация результатов**

См. главу 3.6.1, раздел В.4.1.

## **5. Мониторинг эффективности анализа**

### **5.1. Мониторинг анализа**

После того, как будут установлены характеристики эффективности нового метода, требуется проводить длительный мониторинг, поддерживать и совершенствовать метода анализа. Важно продолжать контролировать сходимость и воспроизводимость анализа в течение длительного времени, в каждой серии образцов, проверяя соответствие образцов для контроля качества установленным интервалам. При невыполнении этого требования результат недействителен, и эксперимент следует повторить. Мониторинг эффективности анализа контрольных образцов является важным способом обнаружения изменений или тенденций в качестве анализа. В процессе мониторинга целесообразно проводить простой анализ результатов, например, статистическую оценку средних значений, среднеквадратичного отклонения и коэффициента вариации, и откладывать полученные

значения на контрольном графике. Участие в независимых программах контроля качества или программах квалификационных испытаний полезно для идентификации случайных и систематических ошибок и подтверждения результатов испытаний. С дополнительной информацией по этому вопросу можно ознакомиться в публикации Crowther *et al.* (2006) и в главе 3.6.1, раздел В.5.1.

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

Через некоторое время может потребоваться изменить протокол испытаний в связи с появлением более качественных или менее дорогостоящих реактивов или в связи с изменением целевого анализата. Изменчивость биологических реактивов, принадлежащих к разным сериям, считается важнейшим фактором изменчивости результатов испытания. При необходимости замены реактивов, например, антител или антигенов, их следует получить по тем же протоколам или приобрести в соответствии с теми же критериями, которые использовались для получения оригинальных реактивов. Необходимо выполнить оценку сопоставимости новых биологических препаратов (например, контрольных образцов, антигена, захватывающих или детекторных антител, конъюгата, химических реактивов или расходным материалов). В главе 3.6.8 «Сопоставимость анализов после изменения валидированных методов» представлен обзор подходящих исследований сопоставимости. Основное правило заключается в том, чтобы не заменять более одного реактива в определенный момент времени, чтобы не допустить усугубления проблемы, требующего одновременной оценки нескольких переменных (см. также главу 3.6.1, раздел В.5.2).

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

Важная проблема лабораторной диагностики заключается в том, чтобы не отставать от эволюционирующей природы вызывающих инфекции патогенов. С течением времени антигенные характеристики патогенов могут меняться, могут возникать новые штаммы, например, в 2009 г. в Северной Европе возник серотип 8 вируса синего языка овец. При таком изменении требуется выполнить полное исследование по разработке и валидации нового метода. Другое важное изменение заключается в использовании метода анализа для обследования других видов животных, а не вида, в отношении которого проводилась оригинальная валидация, например, может потребоваться использовать метод твердофазного ИФА для ящура, валидированный для крупного рогатого скота для тестирования верблюдов или буйволов в других географических регионах и климатических зонах. Для выполнения этого требования может потребоваться провести оценку референтных образцов, репрезентативных для этих популяций, которые показаны на рисунке 1 главы Стандарт валидации МЭБ (см. также главу 3.6.1, раздел В.5.3).

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

В связи с обширным набором переменных, оказывающих влияние на эффективность анализов по обнаружению антигенов, полезно насколько возможно увеличивать число референтных образцов, поскольку увеличение выборки приводит к уменьшению ошибки (см. также главу 3.6.1, раздел В.5.4).

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

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

CROWTHER J.R., UNGER H. & VILJOEN G.J. (2006). Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 913–935.

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.

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

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. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf)

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.

\* \* \*