

ГЛАВА 2.6.6.

ВЫБОР И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ОБРАЗЦОВ И ПАНЕЛЕЙ

ВВЕДЕНИЕ

В Рекомендации МЭБ по валидации представлена подробная информация и примеры в поддержку Стандарта МЭБ по валидации, опубликованного как Глава 1.1.6 Руководства по наземным животным или Глава 1.1.2 Руководства по водным животным. Термин “Стандарт МЭБ по валидации ” в данной главе используется в качестве ссылки на данные главы.

Референтные образцы и панели имеют крайне важное значение, начиная с момента доказательства концепции в исследовательской лаборатории вплоть до обеспечения технического обслуживания и осуществления мониторинга выполнения анализа в диагностической лаборатории, а также на всех промежуточных этапах. Значимость референтных образцов и панелей невозможно переоценить. Неправильный выбор референтных материалов может привести к погрешностям измерений и недостоверным выводам с самого начала разработки до валидации и применения. Таким образом, следует соблюдать осторожность при выборе референтных образцов и создании панелей.

***Рисунок 1.** Референтные образцы и панели, сгруппированные на основании сходных характеристик и состава.*

Темы и буквенно-цифровые подзаголовки (например, Доказательство концепции, А.2.1) указывают на релевантный раздел в Стандарте МЭБ по валидации.

Группа А		Группа В		Группа D
Доказательство концепции А.2.1		ASp В.1.2.		Сопоставление стандартных методов В.2.6.
Рабочий диапазон А.2.2		Аналитическая точность В.1.4.		Признание на предварительной основе В.2.6.
Оптимизация А.2.3		Референтные образцы и панели		Биологические модификации В.5.2.2.
Робастность А.2.5				
Калибровка А.2.6		Группа С		Группа Е
Контроль процесса А.2.6		Повторяемость В.1.1.		DSp и DSe Золотой стандарт В.2.1.
ASe В.1.3		Предварительная воспроизводимость В.2.6.		
Технические модификации В.5.2.1.		Воспроизводимость В.3.		Группа F
Замена реагентов В.5.2.3.		Квалификационные испытания В.5.1.		DSp и DSe Незолотой стандарт В.2.1.

Asp = аналитическая специфичность; *ASe* = аналитическая чувствительность; *DSp* = диагностическая специфичность; *DSe* = диагностическая чувствительность

Как можно видеть на Рисунке 1, референтные образцы и/или панели постоянно упоминаются в Стандарте МЭБ по валидации. Согласно определению из глоссария Стандарта МЭБ по качеству и Руководства для ветеринарных лабораторий: *Инфекционные болезни, 'референтные материалы – это вещества, чьи характеристики являются в достаточной степени гомогенными и точно установленными для калибровки аппаратов, оценки методов измерения или для присваивания значений материалам'*. В контексте валидации методов тестирования, референтные материалы или образцы содержат интересующий аналит в разных концентрациях или активностях и используются в ходе разработки и оценки аналитических и диагностических характеристик исследования-кандидата. В нашем случае аналит означает специфический компонент тестируемого образца, который обнаруживают или измеряют с помощью метода тестирования: антитело, антиген или нуклеиновая кислота. Референтными образцами могут быть сыворотки, жидкости, ткани, экскреты, образцы корма или окружающей среды, которые содержат интересующий аналит и которые обычно отбирают от инфицированных животных и из окружающей их среды. Тем не менее, в некоторых случаях они могут быть изготовлены в лаборатории из оригинального исходного материала (например, разведение высокоположительной сыворотки в отрицательной сыворотке) или созданы путем введения в выбранную матрицу полученного аналита (например, бактериальной или вирусной культуры, рекомбинантного/экспрессированного белка или геномной конструкции). Вне зависимости от того, естественные они или приготовленные, их используют во всех экспериментах в ходе разработки, при валидации, а также для мониторинга эффективности исследования на протяжении его срока службы.

На Рисунке 1 референтные образцы и панели сгруппированы на основании сходных характеристик и состава, и данные группы будут служить основой для последующего описания. Что касается перекрестной ссылки, под каждым конкретным способом применения референтного образца или панели указан соответствующий Раздел Стандарта МЭБ по валидации.

Референтные образцы можно использовать во многих целях, от начальных этапов разработки и оптимизации, через Этап 1, и до непрерывного мониторинга и обслуживания исследования. По возможности необходимо отобрать или приготовить как можно большее количество таких референтных образцов и хранить их для долговременного использования. Смена референтных образцов в ходе валидации приводит к появлению трудноконтролируемой переменной, что может серьезно подорвать интерпретацию экспериментальных данных и, таким образом, целостность всего процесса разработки и валидации. Что касается исследований, которые могут быть нацелены на несколько видов, образцы должны быть репрезентативными для первых видов, которые представляют интерес. Важным является и тот факт, что данные образцы должны отражать как целевой аналит, так и матрицу, в которой он обнаружен у популяции, для которой предназначено данное исследование. Референтные материалы должны соответствующим образом представлять диапазон концентрации аналита, который необходимо обнаружить в ходе исследования.

Важно подчеркнуть, что вне зависимости от того, получены ли референтные образцы от естественного источника или приготовлены в лаборатории, все критерии выбора или процедуры приготовления, а также требования к тестированию должны быть полностью описаны и подвергнуты контролю документации. Это является не только надлежащей производственной практикой, но и обеспечивает повышенный уровень постоянства и надежности исследования на протяжении всего срока его службы.

1. Группа А

Очень часто задают вопрос об объединении образцов в пулы для создания референтного образца. Если референтный материал отобран от отдельного животного, важно удостовериться в том, что он является репрезентативным для типичного течения и стадии инфекции в контексте популяции, которая подлежит тестированию. Если он не является таковым – это может привести к ошибке и искаженным выводам в отношении валидации. Объединение образцов в пулы является хорошей альтернативой, однако обязательным условием является получение образцов от животных, находящихся на одинаковой стадии инфекции. Это особенно важно для систем обнаружения антител. Объединение образцов в пулы также ставит вопрос о необходимости большего количества референтного материала, который предстоит хранить для длительного использования, особенно это касается работы с мелкими видами хозяев. Перед объединением образцов в пулы желательно протестировать их по-отдельности, чтобы убедиться в том, что они схожи в плане концентрации аналита и/или реактивности. После объединения необходимо провести оценку, чтобы убедиться, что объединение большого количества образцов в пул не привело к возникновению непредвиденных помех. Например, разные группы крови или композиция антител в отдельных образцах может вступить в перекрестную реакцию с пулом, что приведет к тому, что объединенный образец будет вести себя по-другому в указанном исследовании, не как при тестировании независимых образцов отдельно друг от друга.

Часто бывает сложно получить индивидуальные образцы, которые бы действительно представляли концентрации или реакционные способности аналитов во всем многообразии ожидаемого диапазона. В условиях динамики многих инфекций или ответных реакций на патогены промежуточные диапазоны часто бывают неустойчивыми. В случае с гуморальной реакцией, на ранних стадиях инфекции, у отдельных животных часто возникают высоковариабельные и гетерогенные популяции изотопов антител и авидность антител. В целом, все это не дает хороших референтных образцов для оценки аналитических характеристик исследования. Тем не менее, они важны для разных типов референтных панелей, о чем пойдет речь далее. В большинстве случаев в группе А допустимо использование приготовленных образцов, в которые добавлены аналиты в известной концентрации, или серии разведений высокоположительных образцов в отрицательной матрице для создания диапазона концентраций.

Вне зависимости от того, являются ли референтные образцы естественными или приготовленными, они должны представлять предполагаемый диапазон концентраций аналитов от низкой до высокоположительной, как это происходит в ходе обычной инфекции. Отрицательный референтный образец должен быть включен для регистрации фона. Если отрицательная матрица используется в качестве растворителя для

приготовления положительного референтного образца (т.е. отрицательную сыворотку используют для растворения высокоположительной сыворотки или ткани, в которые добавлена конструкция) – данная отрицательная матрица должна быть обязательно включена в качестве отрицательного референтного образца.

Как упоминалось выше, все референтные образцы должны быть соответствующим образом охарактеризованы. Это включает наличие документации по патогену и хозяину-донору. Что касается патогенов, сюда может входить подробная информация о штамме, серотипе, генотипе, линии и т.д. Источник исходного материала должен быть надлежащим образом описан: должен быть указан вид, порода, возраст, пол, репродуктивный статус, история вакцинации, история стада и т.д. По возможности следует указать стадию инфекции. Сюда может входить подробная информация о клинических признаках, профилях антител, патогенной нагрузке или выделении и т.д. Также важно соответствующим образом задокументировать все испытания, которые были проведены для определения статуса по болезни/инфекции (Смотрите Раздел 5 Руководства по валидации для дальнейших разъяснений). В некоторых случаях единственным способом производства референтного материала может быть экспериментальное инфицирование/подвержение воздействию. В этом случае необходимо предоставить подробную информацию по всем вышеперечисленным пунктам, а также по протоколу эксперимента.

Помимо всего прочего, вне зависимости от того, являются ли референтные материалы естественными или приготовленными, они должны быть однозначными в плане своего статуса как истинно положительных или истинно отрицательных образцов. Иногда может потребоваться подтверждение статуса с помощью другого теста или серии испытаний. Например, многие референтные сыворотки для определения антител охарактеризовывают путем проведения большого количества серологических тестов. Это дает не только уверенность, но и дополнительные задокументированные характеристики, которые могут потребоваться при попытке заместить или продублировать данный референтный материал в будущем.

Рекомендации в отношении стабильности и хранению референтных материалов доступны на сайте:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/GUIDELINE_3_REF_STANDARDS_ANG.pdf

1.1. Доказательство концепции (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел А.2.1)

В Стандарте МЭБ по валидации говорится, что методы тестирования, а также связанные с ними процедуры должны соответствовать конкретным диагностическим целям применения, чтобы результаты исследования были релевантными. Другими словами, метод исследования должен ‘подходить для конкретной цели’. Многие исследования, разработанные с наилучшими намерениями, не имеют конкретной цели применения. В самом начале крайне важно определить диагностическую цель (цели) в отношении популяции (й), подлежащей тестированию. Наиболее распространенные цели в общих чертах описаны в Разделе А Стандарта МЭБ по валидации.

Как таковые, они охватывают более узкие и специфичные цели применения. Тем не менее, данные конкретные цели должны быть четко определены еще в самом начале, поскольку имеют решающее значение в контексте полностью валидированных исследований. Как будет видно из последующих описаний, четкое определение цели применения сказывается как на выборе референтных образцов и панелей, так и на разработке аналитических и диагностических оценок.

1.2. Рабочий диапазон (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел А.2.2) и аналитическая чувствительность (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.1.3)

1.2.1. Аналитические подходы

Рабочий диапазон исследования – это интервал концентраций (количеств) аналита в пределах которого метод дает необходимую точность и прецизионность. Он также определяет нижний и верхний предел обнаружения исследования. Для установления данного диапазона выбирают высокоположительный референтный образец. Данный высокоположительный образец, вне зависимости от того, естественный он или приготовленный, серийно разводят вплоть до исчезновения в отрицательной матрице, отражающей матрицу проб, полученных от животных, популяция которых является целевой для исследования. Сюда входит исследование антител, при котором высокоположительная референтная сыворотка должна быть разбавлена в отрицательной референтной сыворотке, чтобы создать серию разведений. Аналитическая чувствительность (ASe) измеряется нижним пределом обнаружения (LOD) аналита в исследовании. Одна и та же высокоположительная референтная сыворотка может быть использована как для определения рабочего диапазона, так и для определения нижнего предела обнаружения аналитического метода.

1.2.2. Сравнительные подходы

Если цель заключается в том, чтобы обнаруживать низкие уровни аналита или субклинические инфекции – может оказаться сложным получить референтные материалы на ранних этапах инфекции. В некоторых случаях может оказаться полезным дать сравнительную оценку аналитической чувствительности путем исследования панели образцов с помощью метода-кандидата или другого независимого анализа. В идеале данная панель образцов должна быть серийно отобрана либо от естественно зараженных, либо от экспериментально инфицированных животных и должна представлять инфицированных животных вскоре после инфицирования вплоть до развития клинической или скоротечной формы болезни, если возможно. Это дает относительную сравнительную оценку аналитической

чувствительности исследований, а также временное сравнение самой ранней точки обнаружения относительно патогенеза болезни.

Эксперимент, подобный описанному выше, дает уникальную возможность отобрать референтные образцы, представляющие естественный диапазон концентраций, который может быть использован и для других целей валидации. Необходимо избегать использования таких образцов, когда это не является целесообразным (смотрите Раздел 4. Группа D ниже). По возможности серийные образцы должны быть получены как минимум от пяти животных на разных этапах течения инфекции. В случае, когда отбор образцов влечет за собой смерть (например, сбор тканей внутренних органов) количество требуемых животных составляет, как минимум, пять на один отбор образцов. Что касается более мелких видов хозяев, данное число может быть увеличено, чтобы собрать достаточное количество референтного материала. В виду того что подобные эксперименты требуют большого количества ресурсов, целесообразно максимально увеличить сбор не только требуемых в настоящее время целевых референтных образцов, но также и дополнительных материалов (например, разных тканей, жидкостей и т.д.), которые можно будет использовать в качестве референтных материалов в будущем.

1.3. Оптимизация (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел А.2.3) и предварительная повторяемость (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел А.2.6)

Оптимизация – процесс, в ходе которого происходит оценка и регулировка наиболее значимых физических, химических и биологических параметров исследования с целью обеспечения таких рабочих характеристик исследования, которые бы наилучшим образом соответствовали его целевому назначению. Из естественных или приготовленных референтных образцов можно выбрать как минимум три референтных образца: отрицательный, низкоположительный и высокоположительный. Эксперименты по оптимизации являются довольно исчерпывающими, особенно когда дело касается исследований, включающих множество этапов подготовки и тестирования. Для полного проведения экспериментов по оптимизации очень важно, чтобы каждого референтного образца было в достаточном количестве. Не рекомендуется изменять референтные образцы в ходе оптимизации, поскольку это приведет к появлению неконтролируемой переменной и разрыву последовательности доказательств оптимизации.

Оценку повторяемости следует начинать на этапах разработки и оптимизации исследования. Повторяемость далее верифицируют в ходе Этапа 1 исследования по валидации (Раздел В.1.1). Чтобы обеспечить непрерывность доказательств, для обоих процессов используют одни и те же референтные образцы.

1.4. Калибровка и контроль процесса (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел А.2.6)

1.4.1 Международные, национальные или внутренние референтные стандарты аналитов

Международные референтные стандарты должным образом охарактеризованы, содержат определенные концентрации аналита и, как правило, изготавливаются и хранятся в международных референтных лабораториях. Они являются теми реагентами, по которым стандартизируют все исследования и/или другие референтные материалы. По возможности национальные референтные стандарты калибруют путем сравнения с международным стандартным реагентом. При отсутствии международного стандарта можно выбрать или приготовить национальный референтный стандарт, который потом станет эталоном для исследования-кандидата. В случае отсутствия международного и национального референтного стандарта исследовательская лаборатория, в рамках ответственной организации, должна выбрать или изготовить внутренний стандарт. Каждый из стандартных реагентов, вне зависимости от того, является ли он естественным или приготовленным, должен быть охарактеризован соответствующим образом в ходе обширного анализа. При этом желательно, чтобы методы их охарактеризации, приготовления и хранения были опубликованы в рецензируемых публикациях. Такие референтные стандарты также должны быть стабильными и безвредными.

Референтные стандарты, особенно антитела, обычно представлены в одном из двух форматов. Они могут быть представлены как единичный положительный реагент с известным титром, и в этом случае ожидается, что исследование-кандидат при стандартизации даст аналогичный титр (так называемый прямой аналитический подход). Однако многие из таких “единичных” стандартов готовят из высокоположительных образцов как предварительное разбавление в отрицательной матрице, чтобы максимально увеличить количество аликвот. Недостатком в данном случае является отсутствие учета возможного эффекта матрицы в исследовании-кандидате по причине отсутствия контроля матрицы. Другой подход подразумевает использование отрицательного референтного стандарта и набора из низкоположительного и высокоположительного референтного стандарта известных концентраций или реактивностей, которые находятся в пределах рабочего диапазона стандартного метода, с помощью которого они были приготовлены. Это компенсирует любой потенциальный скрытый эффект матрицы. Кроме того, такой набор из трех компонентов выступает в роли шаблона для выбора и/или приготовления контролей процесса (рассматривается ниже).

Традиционно вышеуказанными стандартами являлись стандартные поликлональные антитела и, в меньшей степени, обычные антигены, которые использовали для калибровки серологических исследований. Однако сегодня референтными стандартами могут быть также моноклональные антитела, или рекомбинантные/экспрессированные белки, или геномные конструкции, если целью является калибровка исследований по единому стандарту рабочих характеристик.

1.4.2. Рабочие стандарты или контроль процесса

Рабочие стандартные реагенты, известные как контроль качества или процесса, проходят калибровку по международным, национальным или внутренним стандартным реагентам. Их выбирают или готовят в местной матрице, которую обнаруживают в популяции, для которой предназначено данное исследование. В идеале необходимо приготовить отрицательный, а также низкоположительный и высокоположительный рабочий стандарт. Концентрации и/или реактивности должны быть в пределах нормального рабочего диапазона исследования. Для рутинного использования в каждом диагностическом прогоне исследования необходимо приготовить рабочие стандартные реагенты в большом количестве и хранить их в аликвотах. Идея состоит в том, что данные контроли должны имитировать, настолько точно, насколько это возможно, полевые образцы; обращаться с ними и тестировать их следует как рутинные образцы. Их используют для установления верхнего и нижнего контрольного предела исследования, а также для мониторинга случайной и/или систематической изменчивости с помощью различных методов контрольных карт. Их ежедневные показатели дают понять, находится ли исследование под контролем, и можно ли принять отдельные прогоны. Таким образом, с точки зрения управления качеством, такие рабочие референтные образцы имеют критическую значимость.

1.5. Технические модификации (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.5.2.1)

Технические модификации валидированного исследования, такие как изменения в инструментарии, протоколах выделения, а также преобразование исследования в полуавтоматическую или полностью автоматическую систему с использованием робототехники не обязательно влечет за собой полную ревалидацию исследования. В данном случае скорее понадобится сравнительный анализ методов, чтобы определить, повлияют ли эти незначительные модификации в протоколе исследования на результаты тестирования. Для получения информации о статистических подходах к прецизионности исследования в условиях технических модификаций обратитесь к Главе 3.6.8 Сопоставимость исследований после незначительных изменений в методе валидации.

В целом данные подходы требуют использования трех референтных образцов: отрицательного, низкоположительного и высокоположительного. Опять же данные образцы могут быть как естественными, так и приготовленными. Здесь важно снова повторить о том, что те же самые референтные образцы, которые были использованы на стадиях разработки исследования, могут быть использованы для оценки модификаций после того, как метод входит рутинную диагностику. Это обеспечивает большую уверенность при оценке потенциального влияния, поскольку рабочие характеристики данных референтных образцов охарактеризованы должным образом. Наконец, если необходимо использовать новые референтные образцы – их выбирают или приготавливают, используя те же критерии или процедуры приготовления, которые установлены для предыдущих материалов. Опять же это усиливает непрерывность доказательств.

1.6. Замена реагента (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.5.2.3)

Когда такой запас такого реагента, как образец контроля процесса, близится к истощению, необходимо подготовить и периодически тестировать замену прежде, чем такой контроль закончится. Предполагаемую замену включают в большое количество сеансов испытаний параллельно с оригинальным контролем для установления между ними пропорциональной взаимосвязи. Важно, чтобы за один раз изменялся только один контроль, чтобы избежать возникновения комплекса проблем, связанных с оценкой более, чем одной переменной.

Следует снова сказать о том, что замену референтному реагенту необходимо выбирать или готовить с использованием тех же самых критериев приготовления, которые установлены для предыдущих материалов. Это усиливает непрерывность доказательств и достоверность исследования.

2. Группа В

2.1. Аналитическая специфичность (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.1.2)

Аналитическая специфичность (ASp) – способность методики различать между целевым аналитом и другими компонентами, которые могут быть обнаружены в исследовании. Это относительно широкое определение, которое не всегда понимают правильно. Аналитическую специфичность можно далее разделить на различные элементы, которые описаны ниже.

Выбор референтных образцов, необходимых для оценки аналитической чувствительности, зависит от конкретной цели или применения, которые изначально было предусмотрено на стадии разработки исследования. Оценка аналитической чувствительности является критически важным элементом при доказательстве концепции и верификации пригодности для цели.

Важным элементом является степень, в которой метод может точно обнаруживать или количественно определять целевой анализ в среде нуклеиновых кислот, белки и/или антитела в исследуемой матрице. Для этого еще иногда используют термин “селективность”. Примером может служить использование референтных образцов для тестов, разработанных для дифференциации между инфицированными и вакцинированными животными (DIVA тесты).

Референтные образцы, подлежащие тестированию, необходимо отбирать от: i) не инфицированных/не вакцинированных, ii) не инфицированных/вакцинированных, iii) инфицированных/не вакцинированных, iv) инфицированных/вакцинированных животных. Такие образцы можно отобрать в полевых условиях, но важно, чтобы при этом была точная история, в идеале в отношении животных, или хотя бы вовлеченных стад (история вакцинации и возникновения болезней). В качестве альтернативы может понадобиться производство данного материала в таких экспериментах, какие описаны в Разделе 1.2.2 данного Руководства по валидации, но при этом должны быть использованы как экспериментально вакцинированные, так и контрольно зараженные животные. Следует избегать использования вакцины в качестве захвата антигена в исследовании (например, в непрямом твердофазном иммуоферментном анализе), поскольку белки-носители в вакцине могут стимулировать неспецифический гуморальный ответ у вакцинированных животных, который можно обнаружить с помощью ИФА, что приведет к появлению ложно положительных результатов исследования. Как и при сравнительном подходе, описанном выше в отношении аналитической чувствительности, необходимо рассмотреть, как минимум, пять животных в каждой группе. Для более мелких видов хозяев данное число необходимо увеличить, чтобы получить достаточное количество референтного материала. В зависимости от DIVA теста, можно разработать один эксперимент, чтобы оценить как аналитическую чувствительность, так и аналитическую специфичность.

Второй элемент, в отношении которого иногда используют термин “эксклюзивность” – это способность исследования обнаруживать анализ или геномную последовательность, которая является уникальной для целевого организма, исключая при этом все остальные известные потенциально перекрестно-реактивные организмы. Это особенно касается серологических исследований с большим количеством примеров антител, экспрессированных другими организмами, которые могут вызывать перекрестно-реагирующее антитело. Следует попытаться получить референтные образцы из задокументированных случаев инфекций и/или организмы, которые могут быть перекрестно реактивными. В зависимости от вида исследования такие референтные материалы могут представлять сам организм, образцы, полученные от хозяина, или геномные последовательности. Необходимо установить профиль эксклюзивности

исследования и непрерывно его расширять по мере появления организмов, которые потенциально могут вступить в перекрестную реакцию.

Третье важное конструктивное соображение касается способности исследования обнаруживать один или несколько штаммов или сероваров вида, нескольких видов рода или схожей группы близкородственных организмов или антител. Это определяет сферу обнаружения и, соответственно, пригодность для цели. Референтные образцы необходимо для того, чтобы определить сферу применения исследования. Если, например, исследование разработано как скрининговый тест для обнаружения всех известных генотипов или серотипов вируса – тогда необходимо протестировать референтные образцы от каждого репрезентативного вида. По мере возникновения новых линий или вариантов серотипов их подвергают тестированию как часть профиля теста, который необходимо непрерывно обновлять.

2.2. Аналитическая точность вспомогательных тестов (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.1.4)

Некоторые методы тестирования или процедуры являются исключительно аналитическими инструментами, и их обычно используют для дальнейшей охарактеризации аналита, который обнаружили в первичном исследовании, например, такие исследования как реакция вирус нейтрализации, который проводят для типирования выделенного вируса или охарактеризации гуморального ответа. Такие вспомогательные тесты должны быть валидированы на предмет аналитических рабочих характеристик, но отличаются от рутинных диагностических тестов, поскольку не требуют валидации в отношении диагностических рабочих характеристик. Аналитическая точность данных тестов часто зависит от использования референтных реагентов. Данные реагенты, вне зависимости вида: антитело для типирования штаммов организма или референтные штаммы организма и т.д., должны быть соответствующим образом задокументированы, как и другой референтный материал (т.е. должен быть указан их источник, идентичность и рабочие характеристики).

3. Группа С

Референтные образцы из группы С можно использовать для целого ряда целей. На начальных этапах разработки их можно использовать для оценки повторяемости и воспроизводимости (как предварительной на Этапе 1, так и более глубокой оценки воспроизводимости на Этапе 3 Пути валидации). Однако данные образцы также можно использовать в других целях после того, как исследование переходит в диагностическую лабораторию. Их можно использовать в качестве панелей для обучения и квалификации лаборантов, а также для оценки квалификации лаборатории во внешних программах кольцевого тестирования. В идеале необходимо приготовить не менее 20 индивидуальных образцов в больших объемах. Около четверти (25%) должны составлять отрицательные образцы, а остальные (75%) должны представлять коллекцию положительных образцов,

покрывающих рабочий диапазон исследования. Образцы должны быть разделены на аликвоты и помещены в индивидуальные пробирки в количестве, достаточном для однократного использования, и храниться для длительного применения. Количество аликвот каждого образца, которое может понадобиться, будет зависеть от того, как много лабораторий будет проводить данное исследование на рутинной диагностической основе, и как часто планируется проводить сличительные испытания. В идеале их необходимо приготовить в неограниченном количестве, но это редко бывает возможным. Как минимум несколько сотен аликвот каждого образца необходимо приготовить за один раз, если исследование планируют проводить во многих лабораториях. Это позволяет провести оценку квалификации лабораторий путем тестирования одного и того же образца с разной периодичностью, что является эффективным способом обнаружения систематической ошибки (погрешности), которая может возникнуть при долгосрочном использовании исследования.

Данные образцы могут быть естественными или могут быть приготовлены из единичного либо из объединенного исходного материала. Основная идея состоит в том, чтобы они имитировали как можно точнее истинный тестовый образец. В виду того, что массовое хранение всегда является проблемой, возможно, потребуется хранить данные материалы в не фасованном виде и время от времени готовить аликвоты. Однако если хранилище позволяет - желательно приготовить и хранить большое количество аликвот, поскольку прохождение аналитом в не фасованном виде циклов замораживание-оттаивание для приготовления нескольких аликвот может привести к его порче. Поскольку данный тип референтного материала используют в довольно больших объемах, его необходимо постоянно замещать или восполнять. Как только во время рутинного тестирования или во время вспышки идентифицирован потенциальный замещающий материал, рекомендуется работать с полевыми аналогами для получения не фасованного референтного материала и хранить его для дальнейшего использования. В качестве альтернативы может понадобиться произвести данный материал в ходе таких экспериментов, как те, что описаны в Разделе 1.2.2 данного Руководства по валидации. Как и в сравнительном подходе, описанном выше в отношении аналитической чувствительности, необходимо, по меньшей мере, пять животных в каждой группе. Для более мелких видов хозяев данное число может быть увеличено, чтобы получить достаточное количество референтного материала.

3.1. Повторяемость (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.1.1) и первичная воспроизводимость (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2.6)

Повторяемость – это уровень соответствия между результатами репликатов образца как внутри, так и между прогонами одного и того же метода тестирования в конкретной лаборатории. Повторяемость оценивают путем анализа вариабельности результатов в отношении репликатов, полученных как минимум от трех (желательно от пяти) образцов, представляющих активность аналита в пределах рабочего диапазона исследования. Для получения информации о статистических подходах к измерению погрешностей при оценке повторяемости обратитесь к Главе 3.6.4 *Погрешность измерений*.

Воспроизводимость – это способность метода тестирования давать надежные результаты, которая определяется оценками прецизионности при тестировании аликвот одного и того же образца в разных лабораториях. Однако оценка первичной воспроизводимости исследования-кандидата должна быть проведена на стадии разработки. Адекватным является использование небольшой панели, состоящей из трех (но более желательно из пяти) репрезентативных отрицательных, низкوپоложительных и высокوپоложительных образцов, как описано выше. Такой вид панели также можно использовать для ограниченной оценки воспроизводимости, чтобы усилить предварительный статус по допуску испытания. Метод тестирования обычно оценивают в одной или нескольких лабораториях, имеющих большой опыт и квалификацию в проведении исследований, аналогичных исследованию-кандидату. Панель “контрольных проб” оценивают с помощью исследования-кандидата в каждой из данных лабораторий, следуя одному и тому же протоколу, используя одинаковые реагенты и сопоставимое оборудование. Это уменьшенный вариант Этапа 3 валидации исследования. Для получения дальнейших разъяснений по данной теме обратитесь к Главе 3.6.4.

3.2. Воспроизводимость (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.3)

Воспроизводимость – это важный показатель прецизионности исследования при рассмотрении в разрезе лабораторий, расположенных в отдаленных или разных регионах страны и проводящих одинаковое исследование (протокол, реагенты и контроли). По мере увеличения количества лабораторий увеличивается также и количество переменных, возникающих в отношении лабораторных условий, оборудования и технической компетентности. Данные исследования отражают способность метода не поддаваться влиянию значительных изменений или замен при проведении тестирования, которые могут возникнуть в разных лабораториях (например, условия отгрузки, передача технологий, партии реагентов, оборудование, платформы и/или условия для тестирования). Каждая из как минимум трех лабораторий должна протестировать одну и ту же панель “контрольных образцов”, содержащую, по меньшей мере, 20 образцов, представляющих отрицательные образцы и ряд положительных образцов. Если выбранные отрицательные и/или положительные образцы в панели продублированы, внутрилабораторные оценки воспроизводимости можно дополнить параллельным тестированием данных образцов при использовании в исследовании на воспроизводимость.

3.3. Квалификационные испытания (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.5.1)

При рутинном использовании в большом количестве лабораторий необходимо проводить мониторинг валидированного исследования, чтобы обеспечить его единообразное исполнение, а также общую надежность результатов тестирования. Это оценивают с помощью внешних программ по

обеспечению качества. Квалификационное испытание – это один из показателей компетентности лаборатории, полученный в ходе межлабораторного сравнения; при условии, что лаборатории-участники используют одинаковые (или аналогичные) методы тестирования, реагенты и контроли. Результаты обычно выражают качественно, т.е. как положительные или отрицательные, чтобы определить критерий “прошло успешно”/ “не прошло”. Тем не менее, в отношении исследований с одним разведением полукачественные результаты дают дополнительные данные для оценки не случайной ошибки среди лабораторий-участников.

Программы квалификационных испытаний варьируют в зависимости от вида проводимого исследования. Для исследований с одним разведением размеры панелей также варьируют, но должны включать, как минимум, пять образцов, представляющих отрицательные, слабopоложительные и высокоположительные образцы, как те, что описаны выше. Квалификационное испытание не отличается от непрерывной формы оценки воспроизводимости. Тем не менее, воспроизводимость, согласно определению - показатель функционирования испытания во многих лабораториях; в то время как квалификационное испытание – оценка компетентности лаборатории при проведении установленного и валидированного исследования. Показатели прецизионности можно оценить как для воспроизводимости, так и для повторяемости, если репликаты одного и того же референтного образца включены в панель с “контрольными образцами”. Для дальнейшего разъяснения данной темы и ее применения обратитесь к Главе Руководства по валидации 3.6.4.

4. Группа D

Референтные образцы в Группе D отличаются от предыдущих групп тем, что каждый образец в панели должен быть получен от разных отдельных животных. Как указано в Главе 3.6.8, исследования с проведением контрольного заражения часто включают повторный отбор образцов от отдельных животных для определения степени развития болезни, однако данная цель отличается от сравнения рабочих характеристик, связанных с диагностической чувствительностью (DSe) и диагностической специфичностью (DSp) метода тестирования. Серийно отобранные образцы, полученные в разные дни от одного и того же животного, не могут быть использованы как репрезентативные для отдельных животных в популяциях, на которые нацелено исследование, поскольку такие образцы нарушают правило независимости образцов, которое необходимо для данных исследований.

Необходимо с осторожностью подходить к выбору референтных образцов и стандартного (независимого) метода, используемого в подобном сравнении, чтобы гарантировать, что аналиты, будучи обнаруженными (если они разные), демонстрируют однотипный патогенный профиль в плане времени появления после подвергания воздействию инфекционного возбудителя и относительную распространенность в выбранных тестовых образцах.

4.1. Сопоставление стандартных методов и предварительное признание (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2.6)

Бывают случаи, когда невозможно или нежелательно выполнять Этап 2 Пути валидации в виду недостатка соответствующих образцов от целевой популяции и труднодоступности животных (например, экзотические болезни). Тем не менее, маленькая выборочная панель высокоохарактеризованных тестовых образцов, представляющих диапазон концентраций аналита, должна пройти исследование стандартным методом МЭБ параллельно с методом-кандидатом, как указано в *Руководствах* МЭБ. Если методы кажутся сопоставимыми (Глава 3.6.8), а также в зависимости от цели проведения исследования, выбор может быть сделан в пользу отсутствия необходимости проведения дальнейшей диагностической валидации. Например, если целевое назначение – скрининг импортированных животных или продуктов животного происхождения на экзотические патогены или подтверждение клинических признаков, полная валидация за пределами сравнения тестовых методов является не оправданной или необоснованной.

Опыт показал, что наиболее серьезным препятствием в прохождении Этапа 2 Пути валидации является число установленных образцов, необходимое для оценки параметров диагностической эффективности с высокой степенью надежности (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2). В некоторых случаях исследование, которое не прошло полную оценку после аналитических этапов, может получить предварительное признание от международных, национальных или местных компетентных органов. В Стандарте МЭБ по валидации приводятся различные обоснования в отношении предварительного признания. Во всех случаях, однако, должны иметься достоверные данные по сравнительным оценкам диагностической чувствительности и диагностической специфичности, основанным на исследовании маленькой селективной панели с хорошо охарактеризованными образцами, содержащими целевой аналит.

В идеале, как для сравнения со стандартным методом, так и для предварительного признания, необходимо собрать панель, например, из 60 образцов, чтобы обеспечить достаточный размер образца для статистического анализа полученных данных. Такая панель должна включать 30 “истинно ” отрицательных и 30 “истинно ” положительных образцов. По мере возможности положительные образцы должны отражать диапазон концентраций аналита или активностей, ожидаемых от целевой популяции. Как указано выше, каждый образец в панели должен представлять отдельное животное. Для получения информации о статистических подходах при определении сопоставимости методов с помощью диагностических образцов обратитесь к Главе 3.6.5.

4.2. Биологические модификации (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.5.2.2)

Бывают случаи, когда необходимо или оправдано внести изменения в некоторые биологические препараты, используемые в исследовании. Сюда может входить как изменение самих реагентов, так и замена на образец другого типа, который содержит такой же аналит, как целевой в оригинальном валидированном исследовании (например, замена сыворотки на слюну). В любом случае все аналитические критерии пути валидации необходимо повторно оценить прежде, чем двигаться дальше. Если все условия соблюдены – тогда останется ответить на вопрос, понадобится ли полная диагностическая валидация. Можно использовать подход, аналогичный описанному выше, с использованием панели из 60 индивидуальных референтных образцов. Однако в данном случае оригинальный метод тестирования будет считаться стандартным (независимым) тестом, а модифицированный метод будет считаться кандидатным. Для получения информации о статистических подходах при определении сопоставимости методов с помощью диагностических образцов обратитесь к Главе 3.6.5.

5. Группа E

Референтные животные и референтные образцы из группы E хорошо описаны в Стандарте по валидации МЭБ, Раздел В.2.1. Тем не менее, есть несколько моментов, о которых стоит снова повторить здесь.

5.1. “Золотой стандарт”¹ – диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2.1)

Что касается традиционной оценки диагностической специфичности, под отрицательными референтными образцами понимается истинно отрицательные образцы, полученные от животных, у которых не было инфекции, или которые не могли быть подвержены воздействию возбудителя. В некоторых ситуациях, когда болезнь никогда не регистрировалась в стране или обнаруживалась в каких-то конкретных регионах страны, идентификация истинно отрицательных референтных образцов не составляет проблемы. Однако в тех случаях, когда болезнь является эндемичной, бывает сложно определить местонахождение таких образцов. Часто такие образцы можно получить из регионов в пределах большой страны или, возможно, из разных стран, где рассматриваемая болезнь либо была искоренена, либо ее там вообще не было.

Что касается традиционной оценки диагностической чувствительности, под положительными референтными образцами понимают истинно

¹ Термин “Золотой стандарт” ограничивается идеальным референтным стандартом, как описано в Стандарте МЭБ по валидации, Раздел В.2.1.2, Глава 3.6.5, Введение и Рисунок 1.

положительные образцы. Необходимо позаботиться о том, чтобы популяция, от которой были отобраны образцы, действительно представляла популяцию, которая является целевой для валидированного исследования. В целом довольно проблематично найти достаточное количество истинно положительных референтных животных, которые определяются путем выделения организма. Возможно, понадобится обратиться к образцам от животных, в отношении которых был проведен ряд исследований, которые безоговорочно классифицируют животных как инфицированные/подвергнутые воздействию, о чем говорится в Стандарте МЭБ по валидации.

Важно отметить, что все образцы, вне зависимости от их происхождения, должны быть задокументированы, как и в случае с любыми другими референтными образцами, так чтобы безоговорочно классифицировать животных как инфицированных или подверженных воздействию в зависимости от пригодности для цели и предполагаемого использования теста. Как упоминается в Разделе 1 данного Руководства по валидации, все референтные материалы должны быть соответствующим образом охарактеризованы. Сюда входит документация как о патогене, так и о хозяине-доноре. Что касается патогенов, это может быть информация о штамме, серотипе, генотипе, линии и т.д. Необходимо должным образом описать источник материала, т.е. указать вид, породу, возраст, пол, репродуктивный статус, историю вакцинации, историю стада и т.д. По возможности необходимо отметить стадию инфекции. Сюда входит информация о клинических признаках, профилю антител, патогенной нагрузке или выделении и т.д. В некоторых случаях экспериментальное инфицирование/подвержение воздействию является единственным способом производства референтного материала (смотрите Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2.3). В таком случае необходимо предоставить подробную информацию по протоколу эксперимента.

Имея особое значение для таких референтных образцов, тесты, которые проводят для установления так называемого “истинного” статуса по болезни/инфекции, должны быть соответствующим образом задокументированы, чтобы иметь возможность установить потенциальные погрешности в оценках исследования-кандидата. В самом деле, при использовании несовершенных стандартных исследований для определения статуса референтного животного или образца оценки показателей диагностической чувствительности и диагностической специфичности исследования-кандидата могут оказаться ошибочными и часто переоцененными. Обратитесь к Главе 3.6.5 для получения информации по статистическим аспектам.

6. Группа F

6.1. Животные с неизвестным статусом – диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность (Стандарт МЭБ по валидации, Раздел В.2.2)

В Стандарт МЭБ по валидации введены модели латентного класса. Они не полагаются на расчеты идеального референтного (стандартного или индивидуального) теста, а скорее оценивают точность теста-кандидата и референтного стандарта с помощью результатов смешанных тестов. В виду того, что данные статистические модели являются комплексными и требуют критических гипотез, необходимо найти статистическую поддержку, чтобы провести исследование и описать отбор образцов от целевой популяции(ий), характеристики других тестов, входящих в анализ, соответствующий выбор модели и оценку методов на основании рецензируемой литературы. Обратитесь к Главе 3.6.5 для получения информации по статистическим аспектам.

Референтные популяции, не индивидуальные референтные образцы, используемые в изучении латентного класса, должны быть соответствующим образом описаны. Это подразумевает наличие документации как по патогену, так и по хозяину-донору. Что касается патогенов, сюда может входить подробная информация о штамме, серотипе, генотипе, линии и т.д., который может циркулировать в популяции. Необходимо должным образом описать источник материала, а именно указать вид, породу, возраст, пол, репродуктивный статус, историю вакцинации, историю стада и т.д. По мере возможности необходимо отметить стадию инфекции в популяциях, т.е. заболеваемость, смертность, случаи выздоровления и т.д.

Особо следует отметить, что если планируется использовать модели латентного класса для присвоения оценки диагностической специфичности и диагностической чувствительности во многих лабораториях, в оценку можно внедрить оценку воспроизводимости. Как указано выше, в этом плане необходимо обратиться за статистической консультативной помощью.

*

* *