

ГЛАВА 2.6.7.

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ВАЛИДАЦИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ

ВВЕДЕНИЕ

Рекомендации МЭБ относительно валидации содержат подробную информацию и примеры к Валидационному стандарту МЭБ, опубликованному в Главе 1.1.6 Руководства по наземным животным или в Главе 1.1.2 Руководства по водным животным. Термин «Валидационный стандарт МЭБ» в данной главе следует воспринимать в формулировке, описанной в данных главах.

Диагностические исследования в области инфекционных болезней диких животных приобретают все большую значимость по мере роста интереса к тем болезням диких животных, которые могут оказывать влияние на их популяцию и видовое многообразие, а также на здоровье человека и домашних животных. Для целей данного стандарта «дикими животными» будут называться представители фауны, относящиеся к одной из следующих групп:

- i) Дикие животные: это животные, которые не находятся под надзором или контролем человека и не имеют фенотипа, выведенного в результате селекции человеком.*
- ii) Содержащиеся в неволе дикие животные: это животные, которые находятся под надзором или контролем человека, но не имеют фенотипа, выведенного в результате селекции человеком.*
- iii) Одичавшие животные: это животные, которые не находятся под надзором или контролем человека, но имеют фенотип, выведенный в результате селекции человеком.*

Дикие животные, как правило, восприимчивы к инфекциям, вызываемым теми же возбудителями, которые поражают и домашних животных, и в некоторых случаях тесты, разработанные и валидированные для других видов животных, могут найти применение и в исследованиях дикой фауны. Однако по ряду причин диагностические исследования в популяциях диких животных вызывают больше затруднений, чем те же исследования у домашних животных. К таким причинам можно отнести затрудненный доступ к диким животным и их образцам, низкое качество образцов, плохое знание патогенеза/эпидемиологии болезней диких животных, а также местные или международные регламенты, ограничивающие или запрещающие владение образцами и/или их транспортировку в другие страны. Доступность тестов с точки зрения их стоимости также является ключевым фактором, поскольку дикие или одичавшие животные не имеют хозяев, которые могли бы оплатить исследования. Следовательно,

низкая стоимость может стать самым важным аспектом при выборе теста для намеченной цели.

Многие из стандартных диагностических тестов, которые были разработаны и в настоящее время широко применяются для обнаружения или подтверждения заболеваний у домашних животных, не были валидированы для использования у диких животных. Вопрос о том, существуют ли важные различия в диагностической чувствительности или специфичности этих тестов в случае их применения для исследования образцов от диких животных, остается открытым.

Диагностические тесты можно условно разделить на две категории: методы прямой и непрямой идентификации. Прямые методы идентификации возбудителей включают микроскопические исследования, посев – обычно используется для выделения бактерий, вирусов, грибов и некоторых простейших; и молекулярные методы – включая амплификацию генетического материала и последовательностей, кодирующих иммунные белки агента методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Следует отметить, что прямые методы идентификации возбудителя, теоретически, не зависят от вида хозяина: то есть неважно, относится ли животное к домашним или диким. Однако у разных видов животных скорость пролиферации или амплификация агента могут варьировать, влияя на объем или распределение патогенов или их продуктов в организме хозяина. Непрямые методы исследования основаны на выявлении клеточно-опосредованного или гуморального иммунного ответа организма животного на воздействие патогена. В отличие от прямых методов обнаружение иммунного ответа, как правильно, требует видоспецифических реактивов, что осложняет процесс диагностики инфекций у тех видов диких животных, для которых не подходят уже существующие тесты, валидированные у близкородственных видов животных. Если по результатам серологического теста установлено, что животное инфицировано или контактировало с возбудителем, фактический статус инфицирования определяют с использованием валидированного прямого метода.

Валидация диагностических тестов для отдельных видов диких животных связана с определенными трудностями, включая доступ к достаточному количеству и объему образцов для использования в процессе валидации. основополагающие принципы и поэтапное описание процесса валидации диагностического теста приведены в Валидационном стандарте МЭБ. Цель стандарта, описанная в разделах 1 и 2 данного документа, - предоставить информацию, относящуюся непосредственно к валидации диагностических тестов для диких животных, которые должны быть признаны МЭБ (выполнение Этапов 1, 2 и 3 Пути валидации). Тем не менее, учитывая, что в некоторых обстоятельствах завершение этого процесса, возможно, не потребуются или даже будет невыполнимым, Валидационный стандарт предусматривает выполнение Пути валидации до того этапа, когда данный конкретный тест может быть предварительно признан методом, обеспечивающим уверенность в результатах и предназначенным для применения в определенных условиях в определенном регионе или стране (дополнительную информацию см. в Разделе В.2.6 Валидационного стандарта МЭБ).

Для предварительного признания метода исследования для диких животных необходимо выполнить Этап 1 (аналитические характеристики) и Этап 2а (предварительная оценка диагностической чувствительности и диагностической специфичности) Пути

валидации. Анализ в рамках Этапа 2a с использованием панели положительных и отрицательных эталонных образцов для оценки диагностических характеристики теста является необходимым условием ввиду большого разнообразия видов внутри таксономических семейств, наличия факторов, связанных с определенным хозяином и могущих влиять на патогенез инфекции, а также в связи с различиями в экологии заболеваний. Подробное описание анализа в рамках Этапа 2a представлено в разделе 2 данного стандарта. Прохождение Этапов 2b и 3 также является обязательным для полноценной валидации по пути МЭБ предварительно признанного теста с целью применения его по первоначально предусмотренному назначению.

1. Принципы валидации теста

Валидация – это процесс, определяющий соответствие надлежащим образом разработанного, оптимизированного и стандартизированного метода предусмотренному назначению. В идеале, процесс валидации тестов для диких животных должен осуществляться так же, как и для домашних животных (этот процесс описан в Валидационном стандарте МЭБ). Однако, как уже было упомянуто выше, диагностические исследования в популяции диких животных часто связаны с определенными трудностями, существенно ограничивающими возможность проведения полноценной валидации. Следовательно, в тех случаях, когда проведение полной валидации невозможно, наилучшей из возможных альтернатив может стать оценка пригодности данного теста для диких животных с использованием сокращенного количества эталонных образцов. В ходе предварительной оценки характеристик теста будет получен достаточный объем информации, который позволит регуляторным органам принять решение о предварительном признании теста для исследования животных перед перемещением или осуществлением программ по надзору за патогеном на национальном уровне.

Во многих случаях уже существующие тесты, валидированные для одного вида животных, можно адаптировать к другому виду с минимальными изменениями или вообще без таковых. В других случаях может потребоваться разработка новых методов исследований для диких животных. В любом случае перед разработкой и валидацией теста необходимо определить его назначение(я) и область(и) применения, так как эти параметры могут повлиять на выбор соответствующих эталонных образцов и, в конечном итоге, на возможность обобщения результатов валидации.

Быстрые и простые в исполнении полевые тесты (тесты, проводимые прямо на месте (rep-side или animal-side test)) для диагностики заболеваний у домашних животных пользуются спросом у конечных потребителей, поэтому такие тесты становятся все более популярными для исследований дикой фауны. Процедура проведения полевых тестов и интерпретация их результатов часто полностью зависит от ветеринара, работающего в поле без лабораторной поддержки, поэтому производитель обязан проводить валидацию таких тестов по Этапу 2a, чтобы обеспечить правильную интерпретацию результатов теста. Наборы, предназначенные для применения в полевых условиях, а не в лаборатории, обязательно проходят испытания на воспроизводимость результатов при различных условиях окружающей среды (температура, влажность и т.д.).

1.1. Соответствие предусмотренному назначению

Список назначений диагностических тестов представлен в Валидационном стандарте МЭБ. Основные цели разработки и применения диагностических тестов для диких животных это:

- 1) Скрининг популяции диких животных на присутствие инфекционных агентов, например:
 - а) для целей надзора (например, с целью раннего обнаружения, оценки тенденций превалентности или частоты возникновения)
 - б) с целью оценки превалентности инфекции или контактов с источником заражения.
- 2) Скрининг или тестирование векторов или образцов окружающей среды на присутствие инфекционных агентов.
- 3) Подтверждение диагноза при подозрении на инфекцию или при наличии клинических признаков заболевания (включая подтверждение положительных результатов, полученных в скрининговом тесте).
- 4) Подтверждение свободы от инфекции или присутствия агента у отдельных животных или в продуктах с целью:
 - а) перемещения или перевозки
 - б) потребления в пищу.
- 5) Мониторинг географического распределения и превалентности изменений, связанных с вмешательством (включая определение иммунного статуса отдельных животных или популяций).
- 6) Изучение возбудителя, хозяев и факторов окружающей среды, связанных с возникновением заболевания.

1.2. Эталонные образцы и качество образцов

Эталонный образец должен быть отобран от животного с состоянием, являющимся объектом интереса исследователя, например: образец от животного с клиническими признаками болезни, образец от животного с субклинической формой болезни. Опыт показывает, что выбор положительных эталонных образцов от животных с клиническими признаками в тех случаях, когда тест предполагается использовать для обнаружения субклинической инфекции, приводит к тому, что показатели чувствительности и специфичности оказываются чрезмерно завышенными. В некоторых случаях единственным источником эталонных образцов могут служить только экспериментально инфицированные животные, однако, если это возможно, в дополнение к ним следует также использовать образцы от естественно инфицированных животных.

По определению, все эталонные образцы должны быть хорошо охарактеризованы по таким параметрам, как хозяин и популяция, а также инфекционный агент. Хотя эталонные образцы, полученные от диких животных, должны сопровождаться такой же информацией, что и образцы от домашних животных, часто, данная

информация не доступна. В таких случаях следует указать как можно больше имеющейся информации. Для адекватной характеристики эталонного образца необходимо указать, как минимум, следующие данные: а) точный вид животного-хозяина и его подвид, если такая информация имеется, б) тесты, использованные для подтверждения присутствия или отсутствия возбудителя/антител к нему, с) место по отношению к установленным благополучным или неблагополучным территориям/регионам, d) дата отбора образца и е) тип образца. Полезной также будет информация о поле, возрастной категории (молодняк, полувзрослая особь, взрослая особь), отсутствии или присутствии клинических признаков и описание последних.

1.2.1. Объединение эталонных образцов в пул

В идеале, эталонные образцы должны быть получены от отдельных животных и разделены на аликвоты небольшого объема (навески) для последующего тестирования. Однако в тех случаях, когда источником эталонных образцов являются животных с небольшой массой тела или когда данным патогеном заражено очень небольшое количество животных, допускается объединять образцы от нескольких животных в пул для получения эталонного образца. Чтобы получить серию образцов со постепенно снижающейся концентрацией агента или продуктов иммунного ответа, сильно положительный образец хорошего качества разводят той же матрицей образца, например, фекалиями или сывороткой, от животного того же вида. При отсутствии образцов определенных стадий инфекции это следует задокументировать.

В тех случаях, когда подходящий образец хорошего качества имеется в наличии в ограниченном объеме, его можно использовать в качестве эталонного образца только в поддержку хорошо продуманной серии испытаний (например, для испытания на сходимость).

1.2.2. Отрицательные эталонные образцы и образцы с неустановленным инфекционным статусом

При отсутствии отрицательных эталонных образцов для определения диагностической специфичности в отношении некоторых агентов, которые могут вызывать перекрестную реактивность, это следует задокументировать.

При отсутствии надлежащего эталонного стандарта (иногда называемого «золотым стандартом») для оценки диагностической чувствительности и специфичности в рамках валидации теста для диких животных интерес представляют статистические модели латентных классов. Такой подход к оценке чувствительности скорее будет полезен для анализов для детекции нуклеиновых кислот, чем для методов выделения вирусов, бактерий и паразитов. Модели латентного класса включают заранее заложенные допущения и требуют подробного описания популяции-источника, которое может быть трудно или невозможно получить в отношении свободно обитающих диких животных (см. Валидационный стандарт МЭБ и Главу 3.6.5 Статистические подходы к валидации).

1.2.3. Качество образца

Условия, при которых происходит отбор проб диких животных, часто бывают неблагоприятными и сами по себе могут привести к перекрестной контаминации. Кроме того, незапланированный отбор образцов является важным аспектом скрининга и мониторинга популяций диких животных на присутствие инфекционных агентов. Часто это приводит к сбору образцов с нарушенной целостностью (контаминация, высокая степень автолиза). Поэтому исследователи сами должны определять пригодность таких образцов для валидации теста, однако, учитывая общую нехватку образцов определенных состояний или от определенных видов хозяев (например, от видов животных, находящихся под угрозой исчезновения), необходимо обеспечить использование максимального количества образцов с субоптимальным качеством. Качественную оценку качества образца (хорошее, плохое, автолиз) необходимо указать в базах данных, в которых зарегистрированы характеристики эталонных образцов.

Следовательно, валидация тестов по таким параметрам, связанным с состоянием образцов, как изменения в степени выявляемости со временем, при различных температурах хранения, в процессе автолиза, и т.д., является полезной и необходимой. Однако данный этап процесса валидации следует проводить только после получения для данного теста статуса предварительного признания.

2. Пути и этапы валидации теста для диких животных

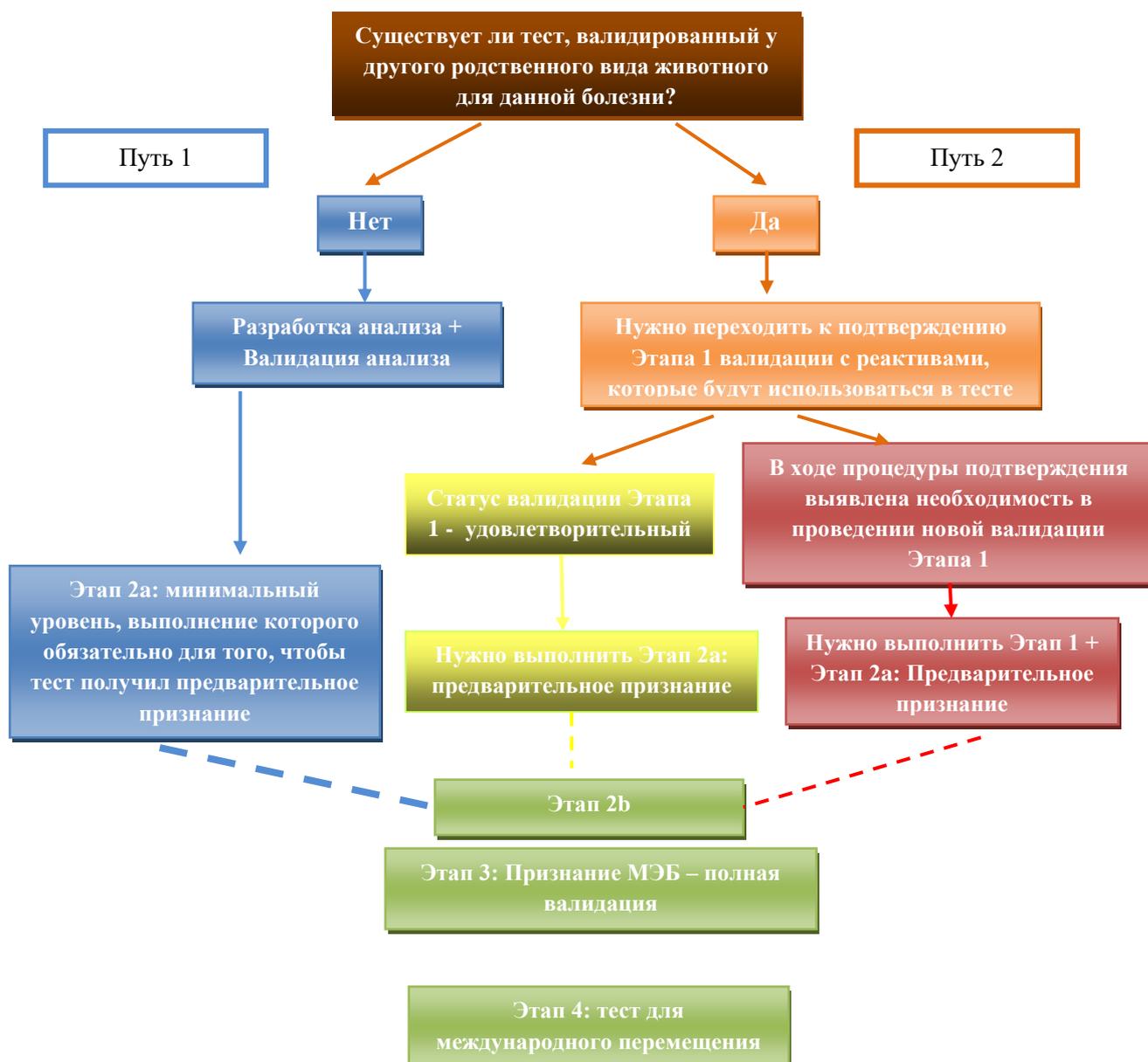
2.1. Введение

Два сценария, рассматриваемые в данном Стандарте, включают отсутствие (Путь 1) или наличие валидированного теста для другого родственного вида животного (Путь 2) для того же патогена. На Схеме (Рисунок 1) и в Таблице 1 описаны этапы процесса валидации. Соответствующие требования к выполнению критериев валидации и примерные характеристики теста представлены в Таблице 1. При выборе нужного пути (Путь 1 или 2, см. Таблицу 1) всегда следует учитывать таксономическое родство видов, особенно, в случае применения непрямых методов. Также необходимо принимать во внимание и другие критерии, например, поведение животных, вариации штаммов патогена или в экологии заболеваний. Во многих случаях, если речь идет о диких животных, выбирают Путь 1 ввиду отсутствия валидированных тестов для близкородственных видов животных. Выбор Пути 2 необходимо обосновать, представив документальное подтверждение существования валидированного теста.

Таблица 1: Путь валидации: Этапы, проведение которых необходимо для выполнения критериев валидации, описанных в Валидационном стандарте МЭБ, и для оценки характеристик теста. Требования на различных этапах должны быть выполнены с приемлемым результатом

Путь валидации: Валидационный стандарт МЭБ	Путь 1: Валидированный тест для родственного вида животного отсутствует	Путь 2: Валидированный тест для родственного вида животного
Этап 1	Этапа-1 подтвержден для нового целевого вида животного	Этапа-1 подтвержден для нового целевого вида животного
Аналитическая специфичность	Да	Да
Аналитическая чувствительность	Да	Да
Сходимость	Да	Нет
Воспроизводимость (предварительная)	Да	Нет
Этап 2	Этап 2а (предварительное признание)	Этап 2а (предварительное признание)
Диагностическая чувствительность	Да (минимум 30 положительных эталонных образцов)	Да (минимум 10 положительных эталонных образцов)
Диагностическая специфичность	Да (минимум 30 отрицательных эталонных образцов)	Да (минимум 10 отрицательных эталонных образцов)
Определение точки раздела	Да (всего 60 образцов)	Да (всего 20 образцов)
Описание эталонного образца	Да	Да
	Этап 2б	Этап 2б
Диагностическая чувствительность	Да	Да
Диагностическая специфичность	Да	Да
Определение точки раздела	Да	Да
Описание эталонного образца	Да	Да
Этап 3	Этап 3	Этап 3
Воспроизводимость	Да	Да
Сходимость	Да	Да
Этап 4	Этап 4	Этап 4
Прогностическая ценность (популяции)	Да	Да

Рисунок 1: Схема путей и этапов валидации теста для диких животных в случае наличия или отсутствия ранее валидированного теста



2.2. Дополнительные аспекты, которые необходимо учитывать при выполнении общего пути валидации в соответствии с описанием в Валидационном стандарте МЭБ

2.2.1. Этап 1 – Оценка аналитических характеристик

Оценка аналитических характеристик должна осуществляться в соответствии с рекомендациями, установленными в Валидационном стандарте МЭБ.

Характеристики, требующие валидации, будут различаться в зависимости от наличия или отсутствия методов диагностического тестирования, валидированных согласно пути МЭБ для другого вида животного. Если валидированный метод диагностического теста отсутствует, оценке подлежат все характеристики, описанные в Этапе 1 (Путь 1). Если валидированный

метод диагностического теста уже существует, повторная оценка параметров сходимости и воспроизводимости потребуется только на Этапе 3 (Путь 2).

Ввиду того, что разнообразие микроорганизмов, вступающих в перекрестную реакцию, как правило, не установлено, оценка аналитической специфичности метода для диких животных, как правило, вызывает больше затруднений, чем оценка данного параметра метода для домашних животных.

2.2.2. Этап 2 – Оценка диагностических характеристик

Оценка диагностических характеристик должна осуществляться в соответствии с рекомендациями, установленными в Валидационном стандарте МЭБ.

Для целей исследований среди диких животных Этап 2 предлагается разделить на Этапы 2а и 2б. Как уже было упомянуто выше, выполнение Этапа 2а необходимо для получения «предварительного признания». Этап 2а предусматривает допущение, что путь валидации, выбранный с учетом наличия валидированного теста для родственного вида домашнего животного (в отличие от отсутствия такого валидированного теста), основан на не менее чем 10 положительных и 10 отрицательных эталонных пробах при схожести или даже идентичности показателей диагностической чувствительности и специфичности у двух видов животных. Эти образцы обеспечивают «доверие» к данному сокращенному объему выборки (сравнение Пути 1 и Пути 2 описано в Таблице 1). Выбор пути с сокращенным объемом выборки (Путь 2) необходимо обосновать на основании опубликованных в рецензируемых журналах данных об объеме выборки и сопоставимости (например, одинаковые точки раздела и реактивы).

Выбор объема выборки для выполнения Этапа 2 (Этапа 2б) должен быть основан на ожидаемых значениях диагностической чувствительности и специфичности, желаемом уровне достоверности и пределах допустимой погрешности (Таблица 1 в Валидационном стандарте МЭБ). Например, для получения ожидаемых показателей диагностической чувствительности и специфичности равных 90%, объем выборки должен будет составить 138 образцов, при этом пределы допустимой погрешности составят 5%, а уровень достоверности – 95% (см. правую панель Таблицы 1 в Валидационном стандарте МЭБ). Однако следует учитывать, что такое количество действительно положительных и отрицательных эталонных образцов некоторых видов диких животных обеспечить достаточно сложно, и возможно, единственным способом получения такого количества образцов будет постепенное объединение результатов исследований нескольких лабораторий, использовавших один и тот же тест согласно стандартизированной методике. Следовательно, первоначальное количество исследуемых образцов может быть ниже, чем то, которое рекомендуется в Таблице 1 Валидационного стандарта МЭБ.

Если количество эталонных образцов (положительных и отрицательных) меньше, чем то, которое указано в Таблице 1 Валидационного стандарта

МЭБ, рассчитанные пределы допустимой погрешности для показателей (обычно представляемые в виде границ доверительного интервала) диагностической чувствительности и специфичности будут шире, чем те, которые используются в таблице. Следовательно, небольшие объемы выборки повышают неуверенность в характеристиках теста. Использование эталонных образцов, представляющих целевое состояние, необходимо для получения объективных (и практически применимых) значений диагностической чувствительности и специфичности, которые смогут выдержать строгую проверку временем. Например, образцы должны быть получены от животных с субклинической инфекцией, если тест, который проходит валидацию, предназначен для клинически здоровых животных. В этом случае получение и использование репрезентативных образцов такого состояния будет более важным, чем объем выборки.

В целом, эффект от использования сокращенного объема выборки можно описать как большую степень неуверенности в полученных значениях показателей, однако, это не касается тех случаев, когда имевшиеся ранее данные по диагностической чувствительности и специфичности теста у родственного вида животного были просто вставлены по результатам байесовского анализа. В Таблице 2 представлен эффект от использования положительных образцов в количестве 140 или меньше в случае расчета показателя диагностической чувствительности (90%) после сбора и исследования полевых образцов.

Таблица 2: Примерные пределы допустимой погрешности и 95% доверительные интервалы для показателя диагностической чувствительности при снижении количества положительных эталонных проб

Количество положительных эталонных образцов	Количество положительных результатов	Диагностическая чувствительность (%)	Примерные пределы допустимой погрешности по показателю диагностической чувствительности	95% точный биномиальный доверительный интервал для диагностической чувствительности
140	126	90	± 0,05	83,8-94,4
100	90	90	± 0,06	82,4-95,1
60	54	90	± 0,08	79,5-96,2
30	27	90	± 0,10	73,5-97,9
10	9	90	± 0,18	55,5-99,7

Количество отрицательных эталонных образцов, используемых для валидации, таким же образом влияет на расчет 95% доверительных интервалов для диагностической специфичности.

2.2.3. Этап 3 – Воспроизводимость

В целом, для оценки воспроизводимости применяются рекомендации, приведенные в Валидационном стандарте МЭБ, что означает, что минимум 20 образцов должны быть исследованы в трех разных лабораториях в трех разных регионах или странах. В случаях, когда определенный тест для диких животных проводят всего несколько лабораторий или стран, или если передача проб от диких животных через государственные границы

регламентируется соглашением по CITES¹, оценку воспроизводимости можно отложить до более позднего этапа, когда данный тест будет принят достаточным количеством лабораторий или будет получено соответствующее разрешение CITES.

2.2.4. Этап 4 Интерпретация результатов теста

Интерпретация результатов теста (прогностическая ценность) у всех видов животных зависит от установленной превалентности заболевания в целевой популяции. Для большинства популяций свободно обитающих диких животных этот параметр *a priori* установить сложно, и даже в популяциях животных, содержащихся в неволе, численность которых хорошо известна, показатели превалентности существенно варьируют между разными популяциями. Таким образом, не стоит ожидать, что расчет прогностической ценности будет точным для большинства популяций диких животных. В тех редких случаях, когда превалентность можно точно установить, прогностическую ценность результатов теста в этих популяциях не следует экстраполировать на другие популяции.

2.2.5. Мониторинг характеристик анализа после первоначальной валидации: изменения и усовершенствования – рассмотрение возможности внесения изменений в данный анализ

Изменения в протоколе валидированного теста могут существенно повлиять на характеристики теста. Например: использование жидкостей организма от живых или павших животных (то есть жидкость из асцитов, легочный экстракт или плевральная жидкость) в тесте для обнаружения антител, валидированном для сыворотки; изменение природы или источника реактивов и изменения в параметрах циклов протокола ПЦР.

В связи с этим любые модификации требуют частичной переоценки аналитических характеристик (Этап 1). Если данные характеристики сопоставимы с первоначальным протоколом, без существенных изменений, процесс валидации можно продолжить с того момента, когда были внесены эти изменения. В случае значительного изменения аналитических характеристик, Этапы 1 и 2а следует повторить полностью.

¹ CITES: Конвенция по международной торговле вымирающими видами дикой фауны и флоры