

**РУКОВОДСТВО ПО ВАЛИДАЦИИ ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ
ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ИММУНОДЕФИЦИТА
ЧЕЛОВЕКА (АНТИ-ВИЧ1,2) В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ**

Содержание

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Резюме | 3 |
| 2. | Цель | 4 |
| 3. | Выбор набора реагентов | 5 |
| 4 | Валидация | 6 |
| 4.1 | Специфичность и определение критической ОП/cut off для образцов пула плазмы | 6 |
| 4.2 | Устойчивость (робастность) аналитической методики | 7 |
| 4.3 | Внутрисерийная и межсерийная вариабельность (Повторяемость и воспроизводимость) | 7 |
| 4.4 | Влияние подготовки образцов (пробоподготовки) | 8 |
| 4.5 | Предел обнаружения | 8 |
| 5. | Обеспечение качества | 9 |
| 5.1 | Стандартные операционные процедуры (SOPs) для тестирования пула плазмы | 9 |
| 5.2 | Контрольные образцы набора реагентов | 9 |
| 5.3 | Независимый (внутрилабораторный) контроль наборов реагентов | 9 |
| 5.4 | Проверка (подтверждение) квалификации | 10 |
| 6. | Стратегия подтверждения результатов | 10 |
| 7. | Внедрение руководства | 11 |

1. Резюме

Методы иммуноанализа для определения **антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ_{1,2})** являются качественными тестами на наличие анти-ВИЧ_{1,2} в пуле плазмы для фракционирования. Общие требования к валидации изложены в таких документах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) как Руководство по валидации аналитических методик, Правила надлежащей производственной практики и Фармакопея ЕАЭС.

Используемый тест, должен быть тестом на предельное содержание. В соответствии с Руководством по валидации аналитических методик, специфичность и предел обнаружения наиболее важны при валидации аналитической методики на предельное содержание. Однако возможны исключения, которые должны рассматриваться в индивидуальном порядке и требуют подтверждения при оценке устойчивости методики.

В соответствии с Фармакопеей ЕАЭС (ОФС «Плазма человека для фракционирования») для тестирования пула плазмы требуется использование теста на анти-ВИЧ_{1,2}, подходящего по чувствительности и специфичности.

В соответствии с главой ... «Лекарственные препараты, полученные из плазмы» Правил проведения исследований биологических лекарственных средств, необходимо указать чувствительность испытания.

Должна быть определена чувствительность теста в отношении размера пула с целью предупреждения ошибок при тестировании или пулировании плазмы.

Необходимо использование международных стандартных (референс) материалов. Допускается использование коммерческих наборов реагентов.

В соответствии с Руководством по Надлежащей производственной практике Союза и ISO 17025 (4.6.2) критичные реагенты (наборы реагентов) должны контролироваться.

В соответствии с указанными документами определяют следующие валидационные характеристики:

- Специфичность – способность однозначно оценивать анти-ВИЧ_{1,2} в присутствии других возможных компонентов, ~~присутствие которых возможно.~~
- Предел обнаружения аналитической методики - минимальное количество аналита в образце, которое может быть обнаружено, но не обязательно количественно определено как точное значение. В контексте испытания пула плазмы на анти-ВИЧ_{1,2}, предел обнаружения должен быть

выражен как конечное разведение хорошо охарактеризованного положительного образца.

- Устойчивость аналитической методики (робастность) является мерой ее способности оставаться нечувствительной к небольшим, преднамеренным изменениям параметров метода и свидетельствует о ее надежности при нормальном выполнении.

2. Цель

Наборы реагентов, предназначенные для обнаружения анти-ВИЧ_{1,2} в индивидуальных донациях, должны соответствовать общим техническим требованиям ЕАЭС к медицинским изделиям (CTS) и иметь маркировку ЕАЭС.

Указанные наборы реагентов валидированы для испытания индивидуальных донаций. Использование таких наборов для испытания пулов плазмы для фракционирования представляет собой изменение предполагаемого использования и не валидировано производителем набора реагентов. В связи с этим возможность использования выбранных наборов для испытания плазмы для фракционирования должна быть подтверждена соответствующей валидацией. Если для испытания пула плазмы используются наборы реагентов без маркировки специальным знаком обращения медицинских изделий ЕАЭС, в дополнение к валидации использования наборов реагентов для испытания пула плазмы должна быть доказана их эквивалентность качеству наборов для испытания индивидуальных донаций с маркировкой ЕАЭС, либо при их отсутствии – набором реагентов, зарегистрированных в соответствии с законодательством государств-членов Союза.

CTS определяют минимальные требования к чувствительности наборов реагентов и требует, чтобы специфичность была подтверждена на широком спектре образцов плазмы крови пациентов. Однако этот подход к валидации не обязателен для целей испытания пула плазмы, так как образцы плазмы крови пациентов, которые могут дать неправильный ответ (например, пациенты с аутоиммунными заболеваниями или инфекционными заболеваниями, дающими перекрестную реакцию), как правило, исключаются правилами отбора доноров. Кроме того, неспецифические интерферирующие факторы будут разбавлены в пуле плазмы.

Серологическое исследование пула плазмы не способно обнаружить все контаминации индивидуальными серопозитивными донациями, не обнаруженными в рамках индивидуального скрининга. Анти-ВИЧ-антитела

не являются одним определенным анализом, их можно охарактеризовать как суммарную реактивность индивидуального гуморального иммунного ответа на вирус, обладающий высокой генетической вариабельностью. В частности, образцы, получаемые на ранних стадиях инфекции, содержат низкоаффинные антитела с низкой кинетикой разведения.

Таким образом, серологическое исследование пула плазмы должно рассматриваться не как испытание для обеспечения вирусной безопасности, но как способ обнаружения серьезных нарушений требований Надлежащей производственной практики.

В настоящем документе описываются подходы к выбору и валидации коммерческих наборов реагентов для иммуноанализа (качественный тест) с целью оценки контаминации плазмы антителами к ВИЧ 1 и 2.

3. Выбор набора реагентов

Коммерческие наборы реагентов, используемые для анализа, валидируются производителем только для испытания индивидуальных донаций. Выбор набора реагентов для испытания пула плазмы должен основываться на высокой аналитической чувствительности набора реагентов для обеспечения необходимой чувствительности при большом разведении. В качестве предварительного критерия отбора необходимо сравнить относительные титры конечного разведения хорошо охарактеризованного образца (например, коммерческий рабочий стандарт).

В большинстве случаев инструкции производителя по применению наборов реагентов пригодны для испытания пулов плазмы.

Любое изменение в инструкции производителя должно быть включено в валидацию набора реагентов, предназначенного для испытания пула плазмы.

Критерии оценки производителя конкретного набора реагентов могут быть адаптированы к испытанию пула плазмы в соответствии с данными валидации, относящимися к пулам плазмы (см. настоящий документ п. 4.1. Специфичность и определение критической оптической плотности (ОПкрит/cut off/порога отсечения) для образцов пула плазмы и п. 5.1. Обеспечение качества).

4. Валидация

4.1 Специфичность и определение критической оптической плотности (ОПкрит/cut off /порога отсечения) для образцов пула плазмы

Значение критической оптической плотности (далее ОПкрит/порога отсечения) для коммерческих наборов устанавливается производителем для разделения положительных и отрицательных результатов исследования на основе результатов испытания индивидуальных донаций и является компромиссным с точки зрения соотношения между чувствительностью и специфичностью. Многие производители наборов также определяют «порог отсечения серой зоны», который идентифицирует образцы, дающие ответ выше фона, но ниже ОПкрит/порога отсечения набора реагентов. Рекомендуется повторить испытания таких образцов как положительных.

На основе опыта испытания плазмы, использование меньшего значения ОПкрит/порога отсечения для образцов пула плазмы следует рассматривать как учет возможного влияния неспецифических факторов индивидуальных донаций, которые проявляются за счет их разбавления при получении плазмы для фракционирования. Использование меньшего значения порога отсечения (ОПкрит) увеличит аналитическую чувствительность анализов и будет способствовать выявлению единичных положительных образцов в пуле плазмы. «Серая зона», рекомендуемая производителем наборов реагентов, может быть приемлемой. Альтернативно, предел (ОПкрит/значение порога отсечения) может быть установлен с учетом распределения сигналов отрицательных пулов, например, как средняя величина отношения сигнала к порогу отсечения (ОПкрит) отрицательных образцов пула + 3 стандартных отклонения, и обычно выражается как % порога отсечения (ОПкрит) индивидуальных донаций (см. раздел 4.3). Порог отсечения пула (ОПкрит пула) не должен превышать порога отсечения (ОПкрит) индивидуальных донаций.

Для любого практического применения в контексте настоящего документа, если серая зона используется как порог отсечения/ОП_{кр} для пулированных образцов, то же значение серой зоны должно использоваться для выявления анти-ВИЧ_{1,2} в пуле плазмы исходно и при повторных испытаниях (см. раздел 5, стратегия подтверждения).

4.2 Устойчивость (робастность) аналитической методики

Устойчивость аналитической методики должна быть оценена, так как все методы, использующие биологические или биохимические реагенты, от серии к серии наборов характеризуются значительной вариабельностью используемых реагентов, и подвержены влиянию окружающих условий.

4.3 Внутрисерийная и межсерийная вариабельность (повторяемость и воспроизводимость)

В первую очередь, качественные иммунологические анализы создают количественный сигнал, который сравнивается с $ОП_{крит}$ (порогом отсечения), установленном на определенном этапе. Положительные образцы при получении пула плазмы могут давать низкие сигналы из-за сильного разбавления при объединении. Вариабельность набора реагентов (включая контрольные образцы) между сериями может оказать существенное влияние на результаты и должна контролироваться, как это предусмотрено Правилами надлежащей производственной практики (Часть I, Глава 6, раздел 6.21, 6.22) и ISO 17025 (4.6.2).

Устойчивость при использовании конкретного набора реагентов должна быть подтверждена с использованием панели репрезентативных/стандартных отрицательных образцов пула (например, образцов пулов, для которых получены отрицательные результаты как производителем, так и уполномоченным органом), независимого положительного образца с низким содержанием анти-ВИЧ_{1,2} (например, слабopоложительный контроль, см. п.4.3).

В исследовании должны быть оценены:

- Промежуточная прецизионность (межсерийная вариабельность) в 6 независимых испытаниях (включая изменение условий окружающей среды, различное оборудование, если возможно, с использованием более одной серии набора реагентов).
- Повторяемость (внутрисерийная вариабельность по меньшей мере 6 определений слабopоложительного контроля (с низким содержанием анти-ВИЧ_{1,2}) за один аналитический цикл. Внутрисерийная вариабельность может быть выражена как коэффициент вариации в % CV (относительное стандартное отклонение) сигнала слабopоложительного образца относительно $ОП_{крит}$ /порога отсечения конкретного используемого набора (S/SO , отношение сигнала образца к $ОП_{крит}$ /порогу отсечения).

4.4 Предел обнаружения

Не существует Международного стандарта антител к ВИЧ 1 и 2. Поскольку анти-ВИЧ_{1,2} не является определенным аналитом (веществом), предел обнаружения (разведение в пределах чувствительности) должен быть установлен с помощью панели положительных образцов, отражающих разные субтипы и группы, принимая во внимание эпидемиологическую ситуацию в соответствующем регионе, откуда была получена плазма. Подтвержденные положительные образцы от обычного донорского скрининга могут рассматриваться как репрезентативные образцы без дальнейшей характеристики, если количество образцы в панели представляют основные генотипы.

Для облегчения сопоставимости данных по пределу обнаружения, независимый референсный материал антител к ВИЧ-1, как только станет доступным, должен быть включен в панель.

Панель представляет собой серийные разведения положительных образцов в пулах плазмы, отрицательных по анти-ВИЧ_{1,2}. Минимальное и максимальное возможное число дозаций в типичном пуле должно учитываться при приготовлении серии разведений для моделирования наилучшего и наихудшего случая. Результаты выражаются как титр конечного разведения.

5. Обеспечение качества

5.1 Стандартные операционные процедуры (СОП) для испытания пулов плазмы

Процедуры испытания должны быть подробно изложены в стандартной операционной процедуре (СОП). СОП должна охватывать по меньшей мере следующие операции:

- Условия хранения и отбора образцов
- Подготовку образцов (например, замораживание/размораживание, смешивание, разведение)
- Описание используемого оборудования и наборов реагентов.
- Условия инкубации (включая допустимые пределы по времени и температуре согласно инструкции по применению/спецификации производителя наборов реагентов);
- Подробную формулу расчета и интерпретацию результатов;
- Критерии валидности/приемлемости результатов для отдельного анализа;
- Условия повторного испытания;

- Ссылка на подтверждающие процедуры, если это применимо.

5.2 Контрольные образцы набора реагентов

Каждый анализ должен сопровождаться обязательным включением контрольных образцов производителя лекарственного препарата для обеспечения и подтверждения правильной работы набора реагентов в соответствии с инструкцией по применению. Критерии валидности результатов в случае изменения условий испытания должны быть точно определены и задокументированы.

5.3 Независимый (внутрилабораторный) контроль наборов реагентов

Положительный контроль во многих коммерческих наборах реагентов характеризуется высокой концентрацией аналита и, следовательно, не позволяет дать оценку при низкой концентрации антител в образцах контаминированных пулов плазмы. Кроме того, как и для всех биологических реагентов, активность этих контрольных образцов варьирует между сериями наборов. В связи с этим для текущего мониторинга результатов настоятельно рекомендуется включать в каждое испытание независимый положительный контроль с низким содержанием анти-ВИЧ_{1,2} (соответствующий диапазону анализа, например, в 2-3 раза превышающий ОПкрит/порог отсечения единичной донации).

Кроме того, каждая серия наборов реагентов должна быть подвергнута процедуре входного контроля на соответствие показателей качества в отношении чувствительности и специфичности с использованием стандартных панелей и стандартных образцов, и/или Международными референс панелями.

5.4 Проверка (подтверждение) квалификации

Обязательно регулярное участие в программах внешнего контроля качества (подтверждения профессиональной компетентности лаборатории), которые включают в себя испытание образцов с низкой реакционной способностью для оценки аналитической чувствительности наборов.

6. Стратегия подтверждения результатов

Необходимо располагать валидированной стратегией подтверждения первичных положительных результатов. Пул плазмы может считаться отрицательным по анти-ВИЧ_{1,2}, если первоначально активный образец дает отрицательный результат при повторном испытании в двойной повторности. Образец следует считать положительными, если не доказано обратного при использовании для повторного испытания валидированного серологического метода с антигенами, отличающимися от антигенов при первичном тестировании.

Все повторные положительные реакции должны быть подтверждены альтернативным методом. Если иммуноблот используется как подтверждающий тест, рекомендуется проявлять большую внимательность при формулировании критериев интерпретации, так как высоко специфичные ENV полосы трудно обнаружить при высоких разведениях, а в некоторых пулах образцов выявляют неспецифические полосы в области 24 и 40 kDa. Поэтому положительные результаты иммуноблота можно использовать для подтверждения первоначально положительного результата. Однако на отрицательный результат иммуноблота следует проанализировать и данные об этом предоставить в досье.

Поскольку анти-ВИЧ_{1,2} может присутствовать у доноров с низким или неопределяемым содержанием нуклеиновой кислоты в плазме, технику амплификации нуклеиновых кислот ПЦР не следует рассматривать как подтверждающий тест, поскольку отрицательный ПЦР результат не может опровергнуть положительный серологический результат. Но с другой стороны, положительные ПЦР результаты могут подтверждать серологическое обнаружение контаминации.

7. Внедрение Руководства

Настоящее руководство было разработано для того, чтобы устранить возможные недочеты при валидации аналитических методик обнаружения анти-ВИЧ_{1,2} в пулах плазмы, которые наблюдались при экспертизе досье. Держатели регистрационных удостоверений и держатели мастер-файла плазмы должны пересмотреть валидацию своих методов тестирования пула в соответствии с настоящим руководством. Если ключевые аспекты, описанные в руководстве, соответствуют существующей валидации, дальнейшая валидация не требуется. В противном случае, методика оценки качества пула плазмы должна быть валидирована в соответствии с

настоящим руководством, о чем должно быть сообщено при обновлении документации по плазме.