

**Указания по валидации иммуноанализа для обнаружения
поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в пулах плазмы**

1. Резюме

Иммуноанализы для определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) являются качественными тестами на наличие HBsAg в плазме для фракционирования (в пуле плазмы). Общие требования к валидации изложены в таких документах Евразийской экономической комиссии (далее – ЕЭК) как Руководство по валидации аналитических методик, Руководство по Надлежащей производственной практике Евразийского экономического союза (далее Союз) и Фармакопее Союза.

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 (робастности) методики.

В соответствии с Фармакопеей Союза (ОФС «Плазма человека для фракционирования») для тестирования пула плазмы требуется использование теста на HBsAg, подходящего по чувствительности и специфичности.

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

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

Необходимо использование стандартных образцов, откалиброванных по международному стандартному образцу. Допускается использование коммерческих наборов реагентов.

В соответствии с Руководством по Надлежащей производственной практике Союза и ISO 17025 (4.6.2) необходимо, чтобы критические реагенты (наборы реагентов) постоянно контролировались.

В соответствии с указанными документами определяют следующие валидационные характеристики:

- Специфичность – способность однозначно оценивать HBsAg в присутствии других 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 HBsAg, предел обнаружения должен быть выражен в МЕ/мл со ссылкой на Международный стандарт.

- 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 HBsAg в индивидуальных донациях, должны соответствовать общим техническим требованиям ЕАЭС к медицинским изделиям (СТS) 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 специальным знаком обращения медицинских изделий ЕАЭС либо, при их отсутствии - наборам реагентов, зарегистрированных в соответствии с законодательством государств – членом Союза.

СТS определяет минимальные требования к диагностической и аналитической 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 тех пациентов, которые могут дать неправильный ответ (например, пациенты с аутоиммунными заболеваниями или 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 контаминированные индивидуальные донации и, таким образом, не исключает возможность использования ложноотрицательных индивидуальных донаций. Например, у пациентов со скрытой или бессимптомной инфекцией гепатита В выявляется низкое содержание антигена, которое не может обнаруживаться после разбавления в производственном пуле плазмы. Более того, в общих пулах плазмы могут содержаться антитела к HBsAg (преимущественно от вакцинированных лиц), которые могут приводить к образованию комплексов HBsAg/anti-HBs, что в свою очередь может влиять на предел обнаружения.

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

В настоящем документе описываются подходы к выбору и валидации коммерческих наборов реагентов для иммуноанализа (качественный тест) с целью оценки контаминации плазмы поверхностным антигеном вируса гепатита В (HBsAg).

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.

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 (ОП_{кр}/cut off/порога отсечения) для образцов пула плазмы и п. 5.1. Обеспечение качества).

4. Валидация

4.1 Специфичность и определение критической оптической плотности (ОП_{кр}/cut off/порога отсечения) для образцов пула плазмы

Значение критической оптической плотности (далее ОП_{кр}/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 ОП_{кр}/порога отсечения набора реагентов. Рекомендуется повторить испытания таких образцов как положительных.

На основе опыта испытания плазмы, использование меньшего значения ОП_{кр}/порога отсечения для образцов пула плазмы следует рассматривать как влияние неспецифических факторов индивидуальных донаций, которые проявляются за счет их разбавления при получении плазмы для фракционирования. Использование меньшего значения порога отсечения (ОП_{кр}) 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 (ОП_{кр}/значение порога отсечения) может быть установлен с учетом распределения сигналов отрицательных пулов, например, как средняя величина отношения сигнала отрицательных образцов пула к порогу отсечения (ОП_{кр}) + 3 стандартных отклонения, и обычно выражается как % порога отсечения (ОП_{кр}) при оценке индивидуальных донаций (см. раздел 4.3). Порог отсечения пула (ОП_{кр} пула) ни в коем случае не должен превышать порога отсечения (ОП_{кр}) индивидуальных донаций.

Для всех практических применений в контексте данного документа, если серая зона используется как порог отсечения/ $ОП_{кр}$ для пулированных образцов, то же значение серой зоны должно использоваться для выявления НВsAg 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. Особое внимание должно быть уделено обращению с образцами и их хранению до проведения испытания.

4.3 Внутрисерийная и межсерийная вариабельность (повторяемость и воспроизводимость)

В первую очередь, качественные иммунологические анализы создают количественный сигнал, который сравнивается с $ОП_{кр}$ (порогом отсечения) на определенном этапе. Образцы 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 Союза (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 НВsAg (например, слабopоложительный контроль, см. п.4.3) и свежеприготовленной с помощью типичного пула плазмы серии разведений стандартного образца, откалиброванного в МЕ.

В исследовании должны быть оценены:

- Воспроизводимость (межсерийная вариабельность) в 6 независимых испытаниях (включая изменение условий окружающей среды, различное оборудование, если возможно, с использованием более одной серии набора реагентов).

- Внутрисерийная вариабельность по меньшей мере 6 определений слабоположительного контроля (с низким содержанием HBsAg) за один аналитический цикл. Внутрисерийная вариабельность может быть выражена как коэффициент вариации в % CV (относительное стандартное отклонение) отношения сигнала слабоположительного образца к ОПкр/порогу отсечения конкретного используемого набора (S/CO, отношение сигнала образца к ОПкр/порогу отсечения).

4.4 Влияние подготовки образцов (пробоподготовки)

HBsAg может не обнаруживаться (маскироваться) из-за образования комплекса с антителами к HBsAg, присутствующими в любом пуле (преимущественно от вакцинированных доноров), образование комплекса зависит от времени, температуры и концентрации антител к HBsAg. Формирование иммунных комплексов в объединенной плазме при температуре фракционирования представляет собой довольно медленный процесс (приблизительно за 3-4 дня происходит 50 % потери сигнала), поэтому во избежание ложноотрицательных результатов следует минимизировать время от момента взятия проб до момента их замораживания, а также от момента размораживания до начала испытания. По этой же причине для повторного испытания/подтверждения следует использовать свежеразмороженные образцы.

4.5 Предел обнаружения

Определение предела обнаружения с использованием значений ОПкр (порога отсечения) пула должно проходить с использованием стандартного образца, откалиброванного в международных единицах, и разбавленного не содержащим антитела к HBsAg пулом плазмы (например, индивидуальные донации или пул из 10 индивидуальных донаций). Ожидается, что это будет значительно ниже минимального требования, установленного СТС.

Влияние матрицы (матрикса), содержащей антитела к HBsAg, может быть оценено при сравнении результатов титрования положительного по

HBsAg образца, с использованием для разведения матрицы, содержащей и не содержащей антитела к HBsAg (см. раздел 4.3.). По возможности, должен быть смоделирован наихудший случай в отношении времени от момента смешивания донаций для получения типичного пула до момента отбора проб пула, а также в отношении зависимости от концентрации антител к HBsAg, температуры и процедуры 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 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 для обеспечения и подтверждения правильности 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 антигена в контаминированных образцах. Кроме того, как и для всех биологических реагентов, активность этих контрольных образцов варьирует между сериями. В связи с этим для текущего мониторинга результатов настоятельно рекомендуется включать в каждое испытание независимый положительный контроль с низким содержанием HBsAg (соответствующий диапазону анализа, например в 2-3 раза превышающий ОПкр/порог отсечения единичной дозации).

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, для которых установлена прослеживаемость к соответствующим международным стандартным образцам (аттестованным с использованием международных стандартных образцов). В случае отсутствия международных стандартных образцов, допускается использование рабочих стандартных образцов, требования к которым и правила установления аттестованных характеристик которых изложены в главе XXX Правил проведения исследований биологических лекарственных средств ЕАЭС.

5.4 Проверка (подтверждение) квалификации

Обязательно регулярное участие в программах внешнего контроля качества (межлабораторных сличительных испытаниях) с целью подтверждения профессиональной компетентности лаборатории, которое включает 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 HBsAg, если аликвота первоначально активного образца 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 антителами, отличающимися от антител при первичном тестировании (альтернативное испытание, нейтрализация в присутствии нейтрализующего агента).

Для подтверждения присутствия HBsAg тест нейтрализации должен всегда использоваться на исходных реактивных (положительных) образцах. Тест нейтрализации должен быть отвалидирован для образцов пула плазмы, учитывая что эффект нейтрализации антител уже присутствует в пуле (само-нейтрализация) в сравнении с нейтрализованным образцом (инкубированным с добавлением дополнительных антител к поверхностному антигену гепатита В).

Поскольку HBsAg может присутствовать у доноров с низким или неопределяемым содержанием нуклеиновой кислоты в плазме, технику амплификации нуклеиновых кислот (НАТ) 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 HBsAg 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.