

Общество с ограниченной ответственностью «Компания «ЭЛТА»
(ООО «Компания «ЭЛТА»)
Россия, г. Москва

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ЭЛТЕХ»

В.А. Мануйлов

«18» декабря 2023 г.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Компания «ЭЛТА»

Ю.Ф. Глухов

«18» декабря 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для качественного иммуноферментного определения интерферона-гамма в плазме крови, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации Т-клеточного *in vitro* ответа на антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* «ИГРА-ТБ» по ТУ 21.20.23-004-78939528-2023

(Набор реагентов «ИГРА-ТБ»)

Регистрационное удостоверение № РЗН 2024/21946 от 31.01.2024

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» выпускается в одном варианте исполнения:

Кат. № ЭТ-ИГ-Т1-01.50

Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения интерферона-гамма в плазме крови, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации Т-клеточного *in vitro* ответа на антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* «ИГРА-ТБ» по ТУ 21.20.23-004-78939528-2023, 50 определений

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы.

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	7
4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	10
7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, ИХ ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ.....	11
8. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ	13
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	16
10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	20
12. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	21
13. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА	22
15. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	23
16. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	23
17. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	24
18. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	24

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов набора реагентов для качественного иммуноферментного определения интерферона-гамма в плазме крови, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации Т-клеточного *in vitro* ответа на антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* «ИГРА-ТБ» по ТУ 21.20.23-004-78939528-2023 (кат. № ЭТ-ИГ-Т1-01.50)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов «ИГРА-ТБ» является качественным *in vitro* диагностическим тестом, который использует синтетические олигопептидные антигены на основе последовательностей иммунодоминантных эпитопов белков *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 [1,2]) для стимуляции антиген-специфичных по отношению к данным белкам Т-лимфоцитов в гепаринизированной цельной крови человека с последующим определением методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) интерферона-гамма (ИФН-γ), продуцируемого лимфоцитами в ответ на стимуляцию, в выделенной из крови плазме. Набор реагентов предназначен для вспомогательной *in vitro* диагностики инфекции *M. tuberculosis*.

1.2 Диагностическая роль набора реагентов

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» применяется для *in vitro* идентификации Т-клеточного ответа на антигены, ассоциированные с инфекцией *M. tuberculosis*, выражаемого в продукции ИФН-γ специфическими лимфоцитами периферической крови человека при их стимуляции микобактериальными антигенами. Наличие специфического интерфероновый лимфоцитарного ответа на микобактериальные антигены является диагностическим признаком инфекции *M. tuberculosis* [3-6].

1.3 Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Только для профессионального использования.

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» является вспомогательным средством диагностики туберкулезной инфекции. Для постановки диагноза следует учитывать также результаты рентгенографии, кожных проб и других методов диагностики туберкулезной инфекции.

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» предназначен только для однократного применения по назначению. Только для диагностики *in vitro*. Противопоказаний и побочных эффектов при работе с набором реагентов «ИГРА-ТБ» не выявлено.

1.4. Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

1.5. Потенциальный пользователь

Персонал клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений, имеющих лицензию на вид медицинской деятельности: клиническая лабораторная диагностика.

Специалисты в области клинической лабораторной диагностики, окончившие соответствующие курсы подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности.

1.6. Условия применения

Набор реагентов применяется в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип действия

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» основан на технологии, известной как Interferon-Gamma Release Assay (IGRA-тест) [7,8], заключающейся в продукции Т-лимфоцитами цитокина ИФН- γ в ответ на воздействие специфического для данных лимфоцитов антигена. Применительно к целям определения инфекции *M. tuberculosis* у человека IGRA-тест устроен следующим образом. Если человек инфицирован данным возбудителем, в его периферической крови циркулируют Т-лимфоциты (CD4+, CD8+), специфичные по отношению к микобактериальным антигенам, из которых наиболее часто в диагностических целях используют белки ESAT6 и CFP10 (поскольку они не только иммуногенны, но и отсутствуют в вакцине БЦЖ) [1,3,4]. Если у такого человека взять кровь, содержащую лимфоциты, и добавить к ней микобактериальные антигены, то лимфоциты будут реагировать на них выработкой ИФН- γ , изменение уровня которого (по сравнению с кровью того же пациента без воздействия антигенного стимулятора) можно зафиксировать при помощи метода ИФА. Если же в ответ на стимуляцию антигенами уровень ИФН- γ не меняется, значит, в крови человека отсутствуют Т-лимфоциты, специфичные к данным антигенам, и, следовательно, с высокой вероятностью у пациента не было контакта с *M. tuberculosis*.

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» состоит из двух частей, первая из которых (вакуумные пробирки для забора венозной крови, содержащие антигенные стимуляторы) используется для стимуляции живых лимфоцитов крови антигенами, а вторая (комплект реагентов для иммуноферментного определения гамма-интерферона в плазме крови человека «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА») – для определения изменения уровня ИФН- γ в плазме, выделенной из крови после стимуляции по сравнению с базовым (без обработки стимулятором).

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» включает три комплекта вакуумных пробирок следующих типов: содержащие специфический антигенный стимулятор (синтетические олигопептиды, соответствующие последовательностям иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов белков ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis*, маркировка «Т-АНТИГЕН»); содержащие неспецифический индуктор ИФН- γ (фитогемагглютинин, ФГА, маркировка «ПКО» – положительный контрольный образец стимуляции), и не содержащие никаких стимуляторов (маркировка «ОКО» – отрицательный контрольный образец стимуляции). Каждая пробирка рассчитана на забор одного миллилитра крови из локтевой вены (иглы и их держатели в состав набора не входят). У пациента забирают кровь в пробирки всех трех типов – по одной пробирке каждого – в ходе одной пункции. После попадания Т-лимфоцитов крови в пробирку, они начинают взаимодействовать с пептидными антигенами и в случае, если распознают их, вырабатывать ИФН- γ . Для этого пробирки инкубируют 24 часа при физиологической температуре +37°C. После окончания инкубации пробирки центрифугируют для отделения плазмы, в которой определяют ИФН- γ методом иммуноферментного анализа (ИФА, см. ниже). Оценивают разницу ИФН- γ между пробирками со специфическим стимулятором («Т-АНТИГЕН») и без стимулятора («ОКО») (см. раздел 10. Учет результатов). Определение ИФН- γ в пробирке «ПКО» после инкубации используют для подтверждения наличия жизнеспособных лимфоцитов.

Для определения ИФН- γ в плазме крови после стимуляции используют комплект реагентов «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА», входящего в состав набора реагентов «ИГРА-

ТБ». Метод определения ИФН- γ основан на двухстадийном «сэндвич» - варианте твердофазного ИФА с использованием биотин-стрептавидинового усиления специфического сигнала.

На внутренней поверхности лунок иммуносорбента иммобилизованы моноклональные антитела к гамма-ИФН человека. На первом этапе проведения анализа в лунки иммуносорбента вносятся исследуемые образцы (гепаринизированная плазма крови человека) и конъюгат №1 (биотинилированные моноклональные антитела к ИФН- γ). Присутствующий в исследуемом образце ИФН- γ связывается с моноклональными антителами к ИФН- γ , иммобилизованными на поверхности лунок планшета, и также входящими в состав конъюгата № 1. Происходит образование иммунных комплексов «антитело/гамма-интерферон/конъюгат №1».

На второй стадии анализа, после удаления несвязавшихся компонентов, образовавшиеся иммунные комплексы связываются с конъюгатом № 2 (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена).

После отмывания несвязанных компонентов в лунки иммуносорбента добавляют раствор субстрата пероксидазы с хромогеном. Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках планшета при двухволновом режиме (450 нм относительно 620-700 нм). Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации ИФН- γ , содержащегося в исследуемых образцах.

2.2 Состав набора

Набор реагентов «ИГРА-ТБ» выпускается в одном варианте исполнения:

Кат. № ЭТ-ИГ-Т1-01.50, Набор реагентов для качественного иммуноферментного определения интерферона-гамма в плазме крови, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации Т-клеточного *in vitro* ответа на антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* «ИГРА-ТБ» по ТУ 21.20.23-004-78939528-2023, 50 определений, включая контрольные образцы.

В части ИФА-анализа, набор реагентов может быть использован как для ручной постановки, так и для постановки на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа с возможностью проведения четырех независимых постановок.

Состав набора представлен в таблице 1.

2.3 Время проведения анализа – от 20 часов 40 минут до 26 часов 40 минут, в том числе:

5 мин. – забор крови у пациента в три вакуумные пробирки по 1 мл, их перемешивание;

18-24 часа – инкубация в суховоздушном термостате при +37°C, не требующая присутствия оператора;

10 мин. – центрифугирование пробирок для отделения плазмы крови;

2 часа 25 мин. – проведения ИФА-анализа для определения ИФН- γ в плазме.

Таблица 1 – Состав набора реагентов «ИГРА-ТБ».

№ п/п	Код	Наименование компонента	Количество
1	Т-Антиген	Комплект 1. Пробирки вакуумные для забора 1 мл крови с литий-гепарином, разделительным гелем и антигенным стимулятором	1 штатив, 50 штук
2	ПКО	Комплект 2. Пробирки вакуумные для забора 1 мл крови с литий-гепарином, разделительным гелем и фитогемагглютинином	1 штатив, 50 штук
3	ОКО	Комплект 3. Пробирки вакуумные для забора 1 мл крови с литий-гепарином и разделительным гелем	1 штатив, 50 штук
4	-	Комплект 4. Комплект реагентов для иммуноферментного определения гамма-интерферона в плазме крови человека «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА», в составе:	1 комплект
4.1	P1	Иммуносорбент ¹	2 планшета по 96 лунок
4.2	P2 	Контрольный образец – содержит рекомбинантный интерферон человека, лиофилизированный ²	4 фл.
4.3	P3 	Раствор для разведения контрольного образца ²	1 фл., 7,0 мл
4.4	P4	Конъюгат №1 – биотинилированные моноклональные антитела к гамма-ИФН	1 фл., 6,0 мл
4.5	P5-1	Концентрат конъюгата №2, 11-кратный – стрептавидин, меченный пероксидазой хрена	1 фл., 2,5 мл
4.6	P5-2	Раствор для разведения конъюгата №2	1 фл., 25 мл
4.7	P6-1	Хромоген - 3,3',5,5'- тетраметилбензидин	1 фл., 2,5 мл
4.8	P6-2	Раствор для разведения хромогена – цитратный буферный раствор с перекисью водорода ²	1 фл., 25 мл
4.9	P7	Концентрат промывочного раствора, 25-кратный – концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с Твин-20	2 фл. по 50 мл
4.10	P8 	Стоп-реагент ²	1 фл., 25,0 мл
4.11	-	Клейкая пленка для заклеивания иммуносорбента	8 шт.
4.12	-	Одноразовые ванночки для реагентов	8 шт.
4.13	-	Одноразовые сменные наконечники к дозаторам пипеточным (10-300 мкл)	64 шт.
4.14	-	Инструкция по применению набора реагентов	1 шт.
4.15	-	Трафарет для построения графика	2 шт.
4.16	-	Паспорт	1 шт.

¹В каждом планшете содержатся 12 восьмилуночных стрипов с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к гамма-ИФН.

²Реагенты содержат потенциально опасные вещества, информацию по которым, а также меры предосторожности при работе с ними см. в разделе инструкции «Меры предосторожности».

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты измерения оптической плотности для контрольных образцов должны соответствовать заданным критериям валидности, приведенным в разделе 10 настоящей инструкции. В случае получения невалидных результатов не может быть гарантировано соответствие полученных результатов выявления заявленным аналитическим характеристикам, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1 Предел обнаружения

Предел количественного определения ИФН- γ набора реагентов «ИГРА-ТБ» в ИФА, составляет 3,125 пг/мл.

4.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов «ИГРА-ТБ», т.е. способность выявлять в ИФА только ИФН- γ вне зависимости от присутствия в анализируемом образце других цитокинов, доказана при исследовании лабораторных образцов, содержащих интерлейкины 2, 4, 6, 10, альфа-интерферон человека и бета-интерферон человека отдельно и в смеси с ИФН- γ .

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты, перекрёстные реакции с данными веществами, а также с билирубином, гемоглобином, γ -глобулином, сывороточным альбумином человека, трансферрином человека, триглицеридами в физиологически нормальных концентрациях выявлены не были. Аналитическая специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составляет 100%.

4.3 Правильность (trueness)

Правильность аналитической методики определения ИФН- γ , выраженная через отклонение полученных с помощью нее значений от номинальных концентраций анализируемого вещества и выраженная в процентах [9], в ИФА с набором реагентов «ИГРА-ТБ» не превышает 15%.

4.4 Прецизионность (precision)

Прецизионность набора реагентов «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА» – степень близости результатов между отдельными повторными измерениями, выражающаяся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации) [9] не превышает 15%.

4.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическую чувствительность определяли при исследовании 50 образцов цельной крови добровольцев, имеющих положительный результат на наличие инфекции *M. tuberculosis* в тесте с МИ сравнения: набор реагентов для качественного определения интерферона-гамма (ИФН- γ) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в плазме крови человека, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации *in vitro* ответа на рекомбинантный ТБ антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* (STANDARD E TB-Feron IGRA), РУ № РЗН 2021/14954 от 03.08.2021 г., срок действия – бессрочно.

Доверительный интервал (ДИ) = 95 %

Диагностическая чувствительность набора реагентов составила 100% (ДИ 95%: 92,89– 100%).

4.6 Диагностическая специфичность.

Диагностическую специфичность определяли при исследовании 50 образцов цельной крови добровольцев, имеющих отрицательный результат на наличие инфекции *M. tuberculosis* в тесте с МИ сравнения: набор реагентов для качественного определения интерферона-гамма (ИФН-γ) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в плазме крови человека, выделенной из гепаринизированной цельной крови человека для идентификации *in vitro* ответа на рекомбинантный ТВ антиген, ассоциированный с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis* (STANDARD E TB-Feron IGRA), РУ № РЗН 2021/14954 от 03.08.2021 г., срок действия – бессрочно.

Доверительный интервал (ДИ) = 95 %

Диагностическая специфичность набора реагентов составила 100,0% (ДИ 95%: 92,89– 100%).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1 Потенциальный риск применения набора реагентов «ИГРА-ТБ» по ГОСТ 31508–2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» и Номенклатурной классификации медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от № 4н от 6 июня 2012 года (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н) – класс 2б.

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2021.

5.2 Набор реагентов «ИГРА-ТБ» предназначен только для профессионального использования. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории, отвечающей требованиям СП 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". При работе с Набором требуется соблюдать требования ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- рассматривать исследуемые образцы биологического материала как инфекционно-опасные;
- применять набор реагентов строго по назначению;
- допускать к работе с набором реагентов только специально обученный персонал с высшим и средним медицинским или биологическим образованием, соответствующий квалификационным требованиям, перечисленным в п. 1.5 настоящей Инструкции и окончивший соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности;
- использовать средства индивидуальной защиты, такие как одноразовые перчатки, халаты, защитные очки, респираторы; манипуляции производить в ламинарных или изолирующих укрытиях класса не ниже ПА, не допускать попадания биологического материала на кожу, слизистые оболочки и в глаза, а при их попадании немедленно

применить необходимые меры оказания первой помощи в соответствии с действующими инструкциями по технике безопасности.

5.3 Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечении срока годности.

5.4 Все компоненты набора реагентов «ИГРА-ТБ», за исключением стоп-реагента (P8) являются нетоксичными. Стоп-реагент (P8, содержит серную кислоту) классифицируется как опасный. Необходимо избегать контакта стоп-реагента с кожей и слизистыми оболочками. В случае попадания промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

Контрольный образец (P2), раствор для разведения контрольного образца (P3) не классифицируются, как опасные, однако содержат в своем составе инактивированные компоненты крови человека, что необходимо учитывать при работе в соответствии с п. 5.2 настоящего раздела.

В компонентах набора реагентов, содержащих биологический материал человека (P2, P3), отсутствуют антитела к *Treponema pallidum*, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, гепатиту С, антиген р24 ВИЧ-1, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).

5.5 Все компоненты, входящие в состав набора реагентов «ИГРА-ТБ», предназначены для диагностики «in vitro».

5.6 При работе с набором реагентов «ИГРА-ТБ» необходимо использовать индивидуальные средства защиты: халат, головной убор, резиновые или пластиковые перчатки, специальную обувь, защитные очки или щиток), так как исследуемые образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированный биоматериал.

5.7 Нельзя пипетировать растворы ртом.

5.8 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5.9 Все промывные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

5.10 Все твердые отходы следует собирать в специальный контейнер, обеззараживать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

5.11 Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество ИФА.

5.12 Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70% раствором этилового спирта.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1 При проведении анализа с использованием набора реагентов «ИГРА-ТБ» требуется следующее оборудование:

- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру $37 \pm 2^\circ\text{C}$;
- штативы вертикальные для пробирок размером 13x75 мм;
- шейкер термостатируемый, поддерживающий температуру $37 \pm 2^\circ\text{C}$ и скорость вращения 700 об/мин;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- фотометр вертикального сканирования двухволновой (планшетный фотометр), позволяющий проводить измерения оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм и 620-700нм;
- центрифуга настольная на $(1-3) \times 10^3$ об/мин для получения образцов плазмы крови;
- дистиллятор;
- холодильник, обеспечивающий температуру хранения при $+2-8^\circ\text{C}$;
- дозаторы пипеточные одноканальные, позволяющие работать с объемами в диапазоне 5-1000 мкл и сменные наконечники к ним;
- дозатор пипеточный многоканальный, позволяющий работать с объемами в диапазоне 10-300 мкл и сменные наконечники к нему;
- таймер электронный.
- прибор(ы), позволяющий(ие) измерять температуру воздуха в диапазоне $(0-25)^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$, относительную влажность – 20-90%.

Оборудование должно быть поверено или аттестовано в установленном порядке в соответствии с предъявляемыми требованиями, в случае их наличия.

6.2 При проведении исследования с использованием набора реагентов «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-ТБ» требуются следующие расходные материалы, не входящие в состав набора:

- иглы одноразовые с колпачком для взятия венозной крови, совместимые с вакуумными системами забора крови;
- держатели для игл для взятия крови;
- вода дистиллированная;
- спирт этиловый, 70°;
- вата гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- мерный стакан или цилиндр (1000 мл);
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл типа «Эпандорф»;
- перчатки смотровые/процедурные неопудренные;
- дезинфицирующие растворы, соответствующие санитарным требованиям;
- контейнер для твердых загрязненных отходов;

– контейнер для загрязненных жидкостей.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ, ИХ ЗАБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ

7.1 Все работы по отбору проб от пациентов, транспортировке и все этапы лабораторного исследования проводить в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

ВНИМАНИЕ: точность, достоверность и качество исследования с использованием набора «ИГРА-ТБ» в значительной мере зависят от дословного соблюдения процедуры забора, обработки и инкубации крови пациента, описанной в данном разделе. Любое отклонение от данной процедуры может привести к получению невалидного результата. Необходимо внимательно изучить и строго соблюдать описываемый порядок действий.

7.2 В случае, если вакуумные пробирки, входящие в состав набора «ИГРА-ТБ», хранили в холодильнике при +2-8°C, перед использованием их нужно выдержать при комнатной температуре +22±5°C в течение не менее 1 часа. Допускается хранение вакуумных пробирок, входящих в состав набора «ИГРА-ТБ», при температуре до +25°C в течение всего срока годности (см. раздел 11).

ВАЖНО: температура вакуумных пробирок влияет на уровень отрицательного давления внутри них. В случае, если пробирки не прогрелись до комнатной температуры, они будут забирать менее 1 мл крови, что критично для качества исследования (см. ниже).

7.3 От каждого пациента в ходе одной пункции забирают кровь из локтевой вены по 1 мл в три вакуумные пробирки с антикоагулянтом литий-гепарином, входящие в состав набора «ИГРА-ТБ»:

одна пробирка с антигенным стимулятором, маркировка «Т-АНТИГЕН»;

одна пробирка с неспецифическим индуктором ИФН-γ (ФГА), маркировка «ПКО»;

одна пробирка без стимуляторов, маркировка «ОКО».

Пробирки необходимо подписать уникальным идентификатором пациента. Пробирки «ИГРА-ТБ» совместимы с одноразовыми двусторонними иглами размера 0,8x38 мм (21G x 1½"), например, ООО «Гранат Био Тех» (Россия).

ВАЖНО: объем забираемой крови (1 мл) критически важен для качества и достоверности исследования. В каждую пробирку необходимо забирать 1±0,2 мл цельной крови; больший или меньший объем крови в пробирке существенным образом влияет на концентрацию антигенных стимуляторов и, следовательно, выраженность интерферонового ответа. Кровь в пробирки, вакуумированные для забора 1 мл, набирается относительно медленно. Эксперименты, проведенные производителем, показали, что для полного набора 1 мл крови, пробирку необходимо держать надетой на иглу десять секунд или более (даже если визуально кажется, что набор крови прекратился). Для контроля набора крови можно ориентироваться на риск требуемого объема, имеющуюся на этикетке каждой пробирки (уровень крови в пробирке не должен выходить за границы риски). Если после забора крови ее уровень ниже риски, необходимо открыть крышку пробирки и добавить кровь того же пациента до требуемого уровня. **Необходимо проинструктировать**

медицинский персонал, осуществляющий венепункцию, об этом важном требовании обращения с набором «ИГРА-ТБ».

7.4 Альтернативным и допустимым методом внесения крови в пробирки «ИГРА-ТБ» является следующий. У пациента забирают кровь в вакуумную пробирку большего объема (не менее 3,5 мл, например, производства ООО «Гранат Био Тех», Россия), содержащую антикоагулянт литий-гепарин (использование других антикоагулянтов, таких как ЭДТА или цитрат натрия, не допускается). Пробирку осторожно перемешивают 5-6 раз, чтобы растворить антикоагулянт, при этом нельзя трясти пробирку (см. ниже). Затем открывают крышки пробирок с антигенными стимуляторами, ОКО и ПКО, и с использованием автоматической пипетки и одноразового наконечника вносят в эти пробирки по 1 мл крови, после чего вновь закрывают их крышками.

При этом важно соблюдать следующие требования. Манипуляции нужно проводить в стерильных условиях или в условиях чистой лаборатории для того, чтобы внутрь пробирок со стимуляторами не попали бактерии (это может привести к неспецифической лимфоцитарной реакции). Используемые пробирки, а также наконечники для автоматической пипетки должны быть **стерильными и апиrogenными**

Если дозирование крови из «большой» пробирки в пробирки «ИГРА-ТБ» осуществляется не сразу же, а спустя какое-то время после забора (более 5-10 минут), следует предварительно еще раз перемешать кровь для равномерного распределения лимфоцитарных клеток по объему. Чем раньше кровь после забора попадет в пробирку с антигенным стимулятором, тем большая популяция жизнеспособных лимфоцитов может быть подвергнута стимуляции и, следовательно, тем более выраженным может быть интерфероновый ответ (в случае наличия антигенспецифичных лимфоцитов). Подробнее см. раздел 7.6.

7.5 После забора крови в пробирки «ИГРА-ТБ» (или внесения в соответствии с п. 7.4), необходимо перемешать пробирки, осторожно переворачивая их вверх дном и обратно 10 раз.

ВАЖНО: некоторые олигопептиды, входящие в состав антигенного стимулятора, обладают низкой растворимостью в воде и плазме крови. Поэтому необходимость переворачивания пробирки 10 раз для их растворения установлена экспериментально, и это требование необходимо выполнять наряду с остальными. При перемешивании пробирки нельзя трясти, так как это может привести к повреждению лимфоцитов и неспецифической индукции ИФН- γ .

7.6 Пробирки после перемешивания и с закрытыми крышками установить вертикально в штатив и поместить в суховоздушный термостат (подвод CO₂ не требуется). **До и во время инкубации пробирки не центрифугировать!** Инкубировать при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в вертикальном положении в течение 18-24 часов.

ВАЖНО: кровь необходимо поместить на инкубацию как можно быстрее после забора. Однако, при необходимости, временной интервал между забором крови и началом инкубации может составлять до 16 часов. В этот период кровь необходимо хранить в пробирках «ИГРА-ТБ» в вертикальном положении строго при комнатной температуре $+22\pm 5^\circ\text{C}$, не убирая в холодильник. При необходимости транспортировки в холодное время года необходимо использовать термоконтейнеры для поддержания обозначенной

температуры $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$. Переохлаждение крови до начала инкубации может привести к гибели лимфоцитов и получению ложноотрицательного результата. Также во время транспортировки до инкубации следует избегать вибраций и тряски пробирок (см. выше).

В случае, если между забором крови и постановкой на инкубацию прошло более 30 мин., перед помещением пробирок в инкубатор рекомендуется перемешать их еще раз путем переворачивания вверх дном и обратно 2-3 раза для ресуспендирования клеточной массы.

7.7 После окончания инкубации пробирки центрифугировать в течение 10 минут при 2800-3000 об./мин. для отделения плазмы. Полученную плазму можно использовать для анализа или, при необходимости, перенести в отдельную пробирку типа «Эппендорф» для длительного хранения.

Хранение плазмы (непосредственно в вакуумной пробирке над гелевым разделителем или в отдельной пробирке):

при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ – не более 6 часов до анализа;

при $+2-8^{\circ}\text{C}$ – в течение 28 суток;

в замороженном состоянии $-18-20^{\circ}\text{C}$ – в течение одного года, при этом допускается только однократное размораживание.

7.8 Во избежание получения ложноположительных результатов образцы гепаринизированной плазмы крови следует готовить и хранить в условиях, исключающих бактериальный пророст, а образцы с выраженным гемолизом, гиперлипидемией или бактериальным проростом не рекомендуется использовать.

8. ПОДГОТОВКА К ИММУНОФЕРМЕНТНОМУ АНАЛИЗУ

8.1 Подготовка образцов после хранения:

8.1.1 Для проведения анализа использовать гепаринизированную плазму крови человека, полученную согласно процедуре, описанной в разделе 7.

8.1.2 Образцы гепаринизированной плазмы крови хранить при комнатной температуре не более шести часов.

8.1.3 Непосредственно перед исследованием образцы гепаринизированной плазмы крови (в том числе – содержащие агрегаты и осадок), необходимо осветлять с помощью центрифугирования при 2800-3000 об/мин. в течение 5-10 мин при температуре $+18-25^{\circ}\text{C}$.

ВАЖНО: при центрифугировании плазмы непосредственно в вакуумной пробирке на границе разделительного геля и плазмы может образовываться плохо различимый осадок. Его не следует касаться наконечником или забирать для последующего исследования. Плазму для ИФА необходимо отбирать из верхней части отцентрифугированного объема.

8.1.4 Допустимо замораживание образцов плазмы для более длительного хранения (до температуры -20°C и ниже) не более одного раза.

8.1.5 Образцы, подвергнутые замораживанию, перед проведением исследования, следует тщательно перемешать и осветлить с помощью центрифугирования.

8.2 Компоненты набора и анализируемые образцы должны быть выдержаны при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ не менее 60 минут до начала проведения анализа. После

вскрытия набора компоненты набора следует хранить при температуре 2-8° С в течение 3 месяцев.

8.3 Жидкие реагенты, готовые к использованию:

- конъюгат № 1 (P4);
- стоп-реагент (P8).

8.4 Унифицированные неспецифические реагенты (взаимозаменяемые реагенты для наборов разных серий набора реагентов):

- концентрат промывочного раствора, 25-кратный (P7);
- стоп-реагент (P8).

8.5 Приготовление иммуносорбента (P1):

Вскройте пакет и извлеките иммуносорбент. Установите на рамку планшета необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы уберите обратно в пакет, герметично закройте и храните их при температуре 2-8° С в течение 3 месяцев.

Хранение иммуносорбента: неиспользованные стрипы храните в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре 2-8° С в течение 3 месяцев.

8.6 Приготовление промывочного раствора:

В случае появления осадка белого цвета при хранении, перед началом использования прогреть флакон с концентратом промывочного раствора, 25-кратным (P7) при температуре +37°С до растворения осадка.

Перенесите необходимое количество концентрата промывочного раствора (P7) из флакона в мерный стакан и разведите его в 25 раз дистиллированной водой, тщательно перемешайте (см. таблицу 2).

Хранение промывочного раствора: неиспользованный вскрытый концентрат промывочного раствора, 25-кратный (P7) хранить при температуре +2-8°С в течение 3 месяцев, приготовленный промывочный раствор храните при комнатной температуре +22±5°С не более 15 дней или при температуре +2-8°С не более 30 дней.

8.7 Приготовление разведений контрольного образца:

Внесите во флакон с лиофилизированным контрольным образцом (P2) ИФН-γ дистиллированную воду в объеме, указанном на этикетке. Выдержите 10-15 мин до полного растворения при комнатной температуре +22±5°С. Тщательно перемешайте, избегая образования пены.

Восстановленный контрольный образец содержит ИФН-γ в концентрации 400 пг/мл. Рекомендуется приготовить 4 последовательных разведений контрольного образца, используя раствор для разведения контрольного образца (РРО, P3): 200 пг/мл, 50 пг/мл, 12,5 пг/мл, 3,125 пг/мл.

Хранение контрольных образцов: **восстановленный контрольный образец и приготовленные разведения контрольного образца хранению не подлежат.**

- | |
|--|
| 1. Промаркируйте 4 пробирки «200 пг/мл», «50 пг/мл», «12,5 пг/мл» и 3,125 пг/мл. |
|--|

2. Внесите 170 мкл РРО в пробирку «200 пг/мл».
3. Внесите 240 мкл РРО в пробирки «50 пг/мл», «12,5 пг/мл» и «3,125 пг/мл».
4. Внесите 170 мкл образца 400 пг/мл в пробирку «200 пг/мл», тщательно перемешайте.
5. Перенесите 80 мкл из «200 пг/мл» в «50 пг/мл», тщательно перемешайте.
6. Перенесите 80 мкл из «50 пг/мл» в «12,5 пг/мл», тщательно перемешайте.
7. Перенесите 80 мкл из «12,5 пг/мл» в «3,125 пг/мл», тщательно перемешайте.
8. В качестве нулевого контроля используйте РРО.

Рисунок 1 - Рекомендации по приготовлению разведений контрольного образца.

8.8 Приготовление рабочего разведения конъюгата № 2.

Отберите необходимый объем концентрата конъюгата №2, 11-кратного (P5-1) и разведите его в 11 раз раствором для разведения конъюгата №2 (P5-2) (см. таблицу 2).

Тщательно перемешайте приготовленный раствор рабочего разведения конъюгата № 2, избегая вспенивания.

Хранение конъюгата №2: приготовленный для использования раствор рабочего разведения конъюгата № 2 хранить при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ не более 3 часов.

8.9 Приготовление индикаторного раствора:

За 5-10 мин до окончания реакции с раствором конъюгата № 2 приготовьте индикаторный раствор. Для этого отберите необходимый объем хромогена (P6-1), поместите в чистую емкость и разведите его в 11 раз раствором для разведения хромогена (P6-2) (см. таблицу 2).

Тщательно перемешайте.

Перед использованием индикаторный раствор должен быть бесцветным.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Посуду, применяемую для его приготовления, отмывают без применения синтетических моющих средств.

Хранение индикаторного раствора: Готовый индикаторный раствор хранению не подлежит.

Таблица 2 – Таблица расхода реагентов.

Реагенты	КОЛИЧЕСТВО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СТРИПОВ											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА											
Р7, мл	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Дист. вода, мл, до	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200
	ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЪЮГАТА №2											
Р5-1, мл	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
Р5-2, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10	11	12
	ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНДИКАТОРНОГО РАСТВОРА											
Р6-1, мл	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
Р6-2, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10	11	12

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Внесите **по 100 мкл** контрольных образцов:

- в две лунки планшета разведения контрольного образца, содержащего ИФН-γ в концентрации 200 пг/мл;
- в две лунки планшета разведения контрольного образца, содержащего гамма- в концентрации 50 пг/мл;
- в две лунки планшета разведения контрольного образца, содержащего гамма- в концентрации 12,5 пг/мл;
- в две лунки планшета разведения контрольного образца, содержащего гамма- в концентрации 3,125 пг/мл;
- в две лунки планшета раствор для разведения контрольного образца (РРО).

В остальные лунки планшета внесите **по 100 мкл** исследуемых образцов гепаринизированной плазмы крови человека.

Примечание 1: при необходимости повышения точности анализа, исследуемые образцы рекомендуется вносить в парных повторах (по две лунки на образец).

Примечание 2: в случае, если количество образцов для постановки недостаточно для заполнения всего планшета (используется только часть стрипов планшета), контрольные образцы в повторах разведений необходимо анализировать при каждой постановке. Количество контрольных образцов рассчитано на проведение четырех независимых постановок (по две на каждый планшет).

На Рис. 2 представлена рекомендуемая схема внесения образцов при использовании целого планшета.

Рисунок 2 – Рекомендуемая схема внесения образцов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	№1	№1	№1	№7	№7	№7	№13	№13	№13	№21	№21	№21
B	№2	№2	№2	№8	№8	№8	№14	№14	№14	№22	№22	№22
C	№3	№3	№3	№9	№9	№9	№15	№15	№15	№23	№23	№23
D	200 пг/мл	50 пг/м	12,5 пг/мл	3,125 пг/мл	РРО	РРО*	№16	№16	№16	№24	№24	№24
E	200 пг/мл	50 пг/м	12,5 пг/мл	3,125 пг/мл	РРО	РРО*	№17	№17	№17	№25	№25	№25
F	№4	№4	№4	№10	№10	№10	№18	№18	№18	№26	№26	№26
G	№5	№5	№5	№11	№11	№11	№19	№19	№19	№27	№27	№27
H	№6	№6	№6	№12	№12	№12	№20	№20	№20	№28	№28	№28
	ОКО	Т антиген	ПКО	ОКО	Т антиген	ПКО	ОКО	Т антиген	ПКО	ОКО	Т антиген	ПКО

**) Достаточно двух повторов РРО в каждой постановке, две из четырех указанных лунок можно использовать для образцов исследуемой плазмы.*

9.2. Внесите в лунки иммуносорбента по 25 мкл конъюгата №1 (P4).

Заклейте иммуносорбент клейкой пленкой или накройте крышкой и **инкубируйте при температуре +37±2°С и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 90 минут.**

По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз.

Требования к качеству промывки:

- заполните лунки промывочным раствором в объеме не менее 350 мкл в лунку;
- не допускайте переполнения и перетекания жидкости в соседние лунки;
- выдержите промывочный раствор в лунках иммуносорбента не менее 30 секунд;
- полностью удалите содержимое лунок;
- по окончании промывки удалите остатки жидкости в лунках, перевернув иммуносорбент и постукивая им по фильтровальной бумаге.
- не допускайте высыхания лунок используемого иммуносорбента между отдельными стадиями.

Некачественное промывание иммуносорбента может привести к получению некорректных результатов.

9.3. Внесите во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата № 2.

Заклейте иммуносорбент клейкой пленкой или накройте крышкой и **инкубируйте при температуре +37±2°С и постоянном встряхивании (700 об/мин) в течение 30 минут.**

По окончании инкубации промойте лунки планшета 5 раз.

9.4. Внесите во все лунки по 100 мкл индикаторного раствора. **Выдержите при комнатной температуре +22±5°С в течение 25 минут в защищенном от света месте.**

9.5. Внесите в лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки реакции.

Не более чем через 10 минут после остановки цветной реакции **измерьте на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450/620-700 нм).**

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Результаты ИФА-анализа в целом следует учитывать только при соблюдении следующих условий:

- значения оптических плотностей в лунках с нулевым контролем (РРО) должны быть не выше 0,15 оптических единиц;
- значения оптических плотностей в лунках с контрольным образцом 200 пг/мл должны быть не ниже 0,8 оптических единиц.

10.2 Учет результатов исследования включает следующие этапы:

10.2.1 Построение графика зависимости ОП от разведения контрольного образца, содержащего ИФН- γ

- Вычислите среднее значение ОП для каждого разведения контрольного образца.
- Постройте график зависимости средних значений ОП контрольных образцов от их разведения (ОП – ось ординат, пг/мл ИФН- γ соответствующего разведения контрольного образца – ось абсцисс).
- По графику определите содержание гамма-интерферона в исследуемых образцах, используя значение ОП для каждого образца.

Определение содержания ИФН- γ в исследуемых образцах можно проводить с использованием пакета программного обеспечения планшетного фотометра или стандартных программ, позволяющих проводить статистическую обработку результатов, например Microsoft Excel. Коэффициент корреляции между аппроксимирующей модельной функцией, используемой для расчета пг/мл ИФН- γ , и экспериментальным графиком должен быть не менее 98%.

Образцы, содержащие гамма-интерферон менее чем 3,125 или более 200 пг/мл, учитываются как содержащие <3,125 пг/мл и >200 пг/мл гамма-интерферона, соответственно.

10.2.2 Расчет интерферонового ответа при стимуляции микобактериальными антигенами лимфоцитов крови

Используя график зависимости ОП от пг/мл ИФН- γ , построенной в соответствии с п. 10.2.1, определите содержание ИФН- γ в плазме из пробирок со специфическим антигеном («Т-АНТИГЕН») и «ОКО» каждого пациента. Используйте вид графика, наиболее соответствующий точкам контрольных образцов, например - кусочно-линейную функцию, которая соединяет экспериментальные точки прямыми отрезками. Для построения графика можно воспользоваться трафаретом, входящим в состав набора.

Вычислите разницу между этими значениями ДИФН, пг/мл, которая будет равна изменению ИФН- γ после стимуляции антигеном по сравнению с базовым уровнем, то есть искомой величине лимфоцитарного интерферонового ответа на микобактериальные антигены.

10.2.3 Критерии валидности анализа для конкретного пациента (дополнительно к общим критериям, указанным в п. 10.1):

- значение ИФН- γ в плазме без стимуляции (ОКО) не должно превышать 100 пг/мл;
- значение ОП в лунке с ПКО для образцов, которые учитываются, как отрицательные (см. ниже) не должно быть менее 0,5 о.е.
- превышение сигнала (ОП) в лунке с Т-АНТИГЕНОМ для образцов, которые учитываются, как положительные (см. ниже) должно быть не менее 25% (отношение ОП (Т-АНТИГЕН) / ОП (ОКО) $\geq 1,25$).

10.3 Учет результатов исследования представлена в таблице 3:

Таблица 3 – Учет результатов исследования с набором реагентов «ИГРА-ТБ».

Δ ИФН*, пг/мл	ИФН- γ (ОКО), пг/мл	ОП (Т- АНТИГЕН) / ОП (ОКО)	ОП (ПКО), о.е.	Учет результата
≤ 8	≤ 100	любой	$\geq 0,5$	результат отрицательный , инфекция <i>M. tuberculosis</i> маловероятна
8-9	≤ 100	любой	$\geq 0,5$	«серая зона», рекомендуется повторить анализ, заново взяв кровь у пациента
≥ 9	≤ 100	$\geq 1,25$	любой	результат положительный , инфекция <i>M. tuberculosis</i> вероятна
≥ 9	любой	$< 1,25$	любой	невалидный результат, рекомендуется повторить анализ, заново взяв кровь у пациента
любой	> 100	любой	любой	
≤ 8	любой	любой	$< 0,5$	

* Δ ИФН – разница ИФН- γ между плазмой после стимуляции (пробирка «Т-АНТИГЕН») и без стимуляции (пробирка «ОКО»), выраженная в пг/мл.

Иными словами, положительным считается ответ (разница после стимуляции с базовым уровнем) 9 пг/мл и более, отрицательным – 8 пг/мл и менее, промежуточный результат считается неопределенным («серая зона»). При этом, критерии валидности для отрицательного результата включают фоновый уровень ИФН- γ (в пробирке «ОКО») менее 100 пг/мл и наличие сигнала в лунке «ПКО» более 0,5 о.е.; для положительного – превышение уровня сигнала ОП в лунке «Т-АНТИГЕН» над «ОКО» не менее, чем на 25%.

Примечание: полученный результат следует рассматривать исключительно как качественный в отношении вероятности наличия или отсутствия инфекции *M. tuberculosis* у пациента (данная вероятность определяется параметрами диагностической чувствительности и специфичности, указанными в разделе 4). Отсутствуют данные о том, что величина интерферонового ответа (Δ ИФН, пг/мл, таблица 3) коррелирует с выраженностью инфекции, стадией туберкулеза или каким-либо иным обоснованным клиническим показателем.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1 Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, установленными на данном виде транспорта, при температуре, соответствующей условиям хранения комплектов, входящих в состав набора (см. ниже).

11.2 Набор реагентов «ИГРА-ТБ» при хранении необходимо разукomплектовать. Комплект реагентов «ГАММА-ИНТЕРФЕРОН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес. от даты производства, указан на упаковке). Вакуумные пробирки («Т-антиген», «ПКО», «ОКО») должны храниться при температуре от $+2$ до $+25^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

При этом допускается как хранение вакуумных пробирок отдельно от ИФА-комплекта (при комнатной температуре), так и совместно с ним в холодильнике при $+2-8^{\circ}\text{C}$.

ВАЖНО: при хранении вакуумных пробирок в холодильнике необходимо выдержать их перед использованием при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ в течение не менее 1 часа (см. раздел 7).

11.3 Допускается хранение и транспортирование при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ всех компонентов набора «ИГРА-ТБ» (невскрытых, в заводской упаковке) в течение не более чем одних суток. Замораживание не допускается.

11.4 Компоненты набора являются свето- (хромоген) и влагочувствительными (иммуносорбент). Хранить в условиях отсутствия прямого воздействия солнечного света и при влажности не более 80%. Избегать намокания.

11.5 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11.6 В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

оставшиеся неиспользованными стрипы иммуносорбента (P1) хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 3 месяцев;

– приготовленный для использования контрольный образец P2 хранению не подлежит. При каждой новой постановке необходимо использовать новый флакон с контрольным образцом;

– конъюгат №1 (P4), концентрат конъюгата №2 11 кратный (P5-1), раствор для разведения контрольного образца (P 3), раствор для разведения конъюгата №2 (P5-2), стоп-реагент (P8), хромоген (P6), раствор для разведения хромогена, концентрат промывочного раствора (P7) после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение в течение 3 месяцев.

11.7 Рабочие растворы компонентов:

– приготовленный промывочный раствор хранить при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ не более 15 дней или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 дней.

– приготовленный для использования раствор рабочего разведения конъюгата № 2 хранить при комнатной температуре $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$ не более 3 часов.

11.8 При использовании набора необходимо придерживаться следующих правил:

– не использовать набор после окончания срока годности;

- не смешивать компоненты наборов разных серий, кроме унифицированных неспецифических реагентов (концентрат промывочного раствора, 25-кратный (P7), стоп-реагента (P8);
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов химически чистую посуду, обработанную дистиллированной водой;
- использовать только оборудование, прошедшее метрологическую поверку;
- использовать только одноразовые наконечники для дозаторов;
- исключить прямое воздействие солнечных лучей на планшет во время проведения исследования;
- не допускать присутствие паров перекиси водорода и хлора в помещении при проведении ИФА.

11.9 Срок годности набора – 12 мес. от даты изготовления.

11.10 Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.

11.11 Условия эксплуатации набора реагентов:

- температура окружающей среды $+22\pm 5^{\circ}\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80%;
- атмосферное давление (84,0 – 106,7) кПа / (630 – 800) мм. рт. ст.

12. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 Уничтожение и утилизацию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.2 Все промывные растворы, собранные в специальный контейнер и обработанные дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке, следует утилизировать как отходы класса Б.

12.3 Все твердые отходы, собранные в специальный контейнер, обеззараженные в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21, следует утилизировать как отходы класса Б.

12.4 Неиспользованные наборы реагентов с истекшим сроком годности перед утилизацией следует разуконплектовать.

12.5 Неиспользованный концентрат промывочного раствора, 25-кратный (P7) и раствор для разведения хромогена (P6-2) следует утилизировать, как отходы класса А.

12.6 Неиспользованные контрольные образцы, конъюгаты, растворы для разведения конъюгата, раствор для разведения контрольного образца и иммуносорбент следует обеззараживать и утилизировать, как медицинские отходы класса Б.

12.7 Неиспользованный стоп-реагент следует утилизировать как отходы класса Г.

12.8 Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

13. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

13.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

Сроки годности вскрытых компонентов набора реагентов – в течение срока годности набора реагентов.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Предел температуры
	Использовать до
	Код партии (номер серии / номер партии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Не допускать воздействия солнечного света
	Беречь от влаги
	Осторожно!
	Радиационная стерилизация
	Запрет на повторное применение
	«Восклицательный знак», «Жидкости, выливающиеся из двух пробирок и поражающие металл и руку» Сигнальное слово: «Осторожно» При попадании на кожу и в глаза может вызывать раздражение. Обратитесь к инструкции.

15. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

16. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. .

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

ГОСТ Р ИСО 6710-2021 Контейнеры для взятия проб венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний.

ГОСТ EN 556-1-2011 Стерилизация медицинских изделий. Требования к медицинским изделиям категории «стерильные». Часть 1. Требования к медицинским изделиям, подлежащим финишной стерилизации.

СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Примечание: Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

17. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Компания «ЭЛТА» (ООО «Компания «ЭЛТА»)

Адрес для переписки: Россия, 124460, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Силино, г. Зеленоград, ул. Конструктора Гуськова, д. 3 стр. 4

Телефон для обращений: +7 (499) 995 25 47

Адрес электронной почты: mail@eltaltd.ru

Разработчик и место производства: Общество с ограниченной ответственностью «Экспертные лабораторные технологии» (ООО «ЭЛТЕХ»), 141981, Московская область, г. Дубна, ул. Большеволжская, д.15, пом. 106, info@eltec.bio, www.eltec.bio.

18. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Mar;7(2):155-60. doi: 10.1128/CDLI.7.2.155-160.2000.

2. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff TH. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3314-21. doi: 10.1128/IAI.68.6.3314-3321.2000.

3. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000 Sep 23;356(9235):1099-104. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02742-2.

4. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей. – М.: РООИ «Здоровье человека», 2015. – 36 с.

5. Выявление и диагностика туберкулеза у детей, поступающих и обучающихся в образовательных организациях. Клинические рекомендации. Утверждено президентом Российского общества фтизиатров 7 марта 2017 года. – Москва, 2017. – 28 с.

6. Плеханова, М. А., Аксенова, В. А., Ткачук, А. П., Пацула, Ю. И., Кривцова, Л. А., Коломеец, А. Н. Оценка специфических антигенов ранней стадии туберкулезной инфекции у детей. // *Туберкулез и болезни легких.* – 2017. – Т. 95. – № 1. – С. 27-33.

7. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. // *Enferm Infec Microbiol Clin.* – 2010. – Vol. 28(4). – p. 245-252. – doi:10.1016/j.eimc.2009.05.01.

8. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jan;27(1):3-20. doi: 10.1128/CMR.00034-13

9. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов. Приложение № 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года N 85.