Программное обеспечение «ИГРА»

Руководство пользователя

Версия: 1.1.0

© ООО “Компания «ЭЛТА»”

Зеленоград, 2024

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ 4

1.1 Назначение документа **4**

1.2 Назначение программы **4**

1.2.1 Биологические принципы анализа **4**

1.3 Список терминов и сокращений **5**

1.4 Системные требования **6**

2. УСТАНОВКА, ИЗМЕНЕНИЕ И УДАЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ 7

2.1 Установка программы **7**

2.2 Восстановление установленной программы **10**

2.3 Удаление программы **13**

3. ЗАПУСК ПРОГРАММЫ 15

4. ОПИСАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ 15

4.1 Начальный экран **15**

4.2 Системное меню **16**

4.2.1 Файл **16**

4.2.2 Справка **16**

4.2.3 Настройки **16**

4.3 Контекстное меню **17**

4.3.1 Поля формы, ячейки таблиц Планшет и Образцы **17**

4.3.2 Нередактируемый текст и таблицы **17**

4.4 Проведение исследования **18**

4.4.1 Вкладка «Информация» **18**

4.4.2 Вкладка «Данные» **18**

4.4.2.1 Таблица «Планшет» **19**

4.4.2.2 Таблица «Образцы» **21**

4.4.2.3 Панель «Контрольные образцы» **21**

4.4.2.4 Панель форматирования планшета **22**

4.4.3 Вкладка «Анализ» **25**

4.4.3.1 Порядок проведения анализа **25**

4.4.3.2 Интерпретация результатов **27**

4.4.4 Вкладка «Результаты» **31**

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение документа

Данный документ является полным руководством по использованию программного обеспечения «**ИГРА»** (далее – ПО или ПО ИГРА). ПО предназначено для использования в качестве вспомогательного инструмента для проведения расчетов при обработке данных иммунологических исследований, осуществляемых при помощи технологии IGRA (Interferon-gamma Release Assay) с детекцией гамма-интерферона методом планшетного иммуноферментного анализа (ИФА).

Все разделы документа составлены последовательно, не требуют специальных технических навыков или знаний. Основные функциональные блоки документа разделены на отдельные завершенные инструкции, которые содержат пошаговые описания действий в Системе для каждой задачи пользователя.

1.2 Назначение программы

ПО предназначено для обработки численных результатов биомедицинских и научных исследований, осуществляемых с использованием технологии IGRA (см. выше) с детекцией гамма-интерферона методом ИФА. ПО принимает данные результатов измерения оптического поглощения (выражаемые в единицах оптической плотности, о.е.), получаемые пользователем на приборе – планшетном фотометре, обсчитывает их при помощи алгебраических алгоритмов, строит калибровочные кривые по стандартным образцам и рассчитывает по ним концентрацию исследуемого аналита, формирует таблицу с результатами, а также экспортирует ее в виде печатного заключения по результатам исследования.

1.2.1 Биологические принципы анализа

Технология, известная как interferon-gamma release assay (IGRA) применяется для *in vitro* идентификации Т-клеточного иммунного ответа на различные антигены и заключается в продукции Т-лимфоцитами цитокина интерферона-гамма (ИФН-γ) в ответ на воздействие специфического для данных лимфоцитов антигена. Наиболее широкое применение данная технология нашла при исследованиях Т-клеточного ответа на антигены, ассоциированные с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*. В частности, наличие интерферонового лимфоцитарного ответа на микобактериальные антигены является диагностическим признаком инфекции *M. tuberculosis*.

Устройство и принцип действия IGRA-тестов легко продемонстрировать на примере наиболее часто используемых тестов для идентификации ответа на антигены *M. tuberculosis*. Если человек инфицирован данным возбудителем, в его периферической крови циркулируют Т-лимфоциты (CD4+, CD8+), специфичные по отношению к микобактериальным антигенам, из которых наиболее иммуногенными являются белки ESAT6 и CFP10. 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 иммуноферментного анализа (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 для проведения IGRA-теста обычно 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 концентрации гамма-интерферона в сыворотке или плазме крови) – для определения изменения уровня ИФН-γ в плазме, выделенной из крови после стимуляции по сравнению с базовым (без обработки стимулятором).

Как правило, такой набор реагентов включает вакуумные пробирки трех типов: содержащие специфический антигенный стимулятор (это могут быть рекомбинантные белки или синтетические олигопептиды, соответствующие последовательностям иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов белков ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis*; в рамках настоящей инструкции и ПО ИГРА такие пробирки обозначены Т-АНТИГЕН); содержащие неспецифический индуктор ИФН-γ (ПКО – положительный контрольный образец стимуляции), и не содержащие никаких стимуляторов (ОКО – отрицательный контрольный образец стимуляции). Каждая пробирка рассчитана на забор одного миллилитра цельной венозной крови. У обследуемого человека 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 антигенами и в случае, если распознают их, вырабатывать ИФН-γ. Для этого пробирки инкубируют 24 часа при физиологической температуре +37°С. После окончания инкубации пробирки центрифугируют для отделения плазмы, в которой определяют ИФН-γ методом ИФА (см. ниже). При этом оценивают разницу концентраций ИФН-γ между пробирками со специфическим стимулятором (Т-АНТИГЕН) и без стимулятора (ОКО). Уровень ИФН-γ в пробирке ПКО после инкубации используют для подтверждения наличия жизнеспособных лимфоцитов.

Для определения ИФН-γ в плазме крови после стимуляции используют комплект ИФА-реагентов. Метод определения ИФН-γ основан на двустадийном «сэндвич» - варианте твердофазного ИФА с использованием биотин-стрептавидинового усиления специфического сигнала. В общем случае, ИФА устроен следующим образом.

На внутренней поверхности лунок иммуносорбента иммобилизованы моноклональные антитела к ИФН-γ 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.

1.3 Список терминов и сокращений

В данном руководстве используются следующие условные обозначения и сокращения:

IGRA	Interferon-gamma release asssay
M. tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*
ИФА	Иммуноферментный анализ
ИФН-γ	Интерферон-гамма
ЛИС	Лабораторная информационная система
ПО	Программное обеспечение

ОКО	Отрицательный контрольный образец стимуляции
ОП	Оптическая плотность
о.е.	Единицы оптической плотности
ОС	Операционная система
Т-АНТИГЕН	Специфический антигенный стимулятор (например, синтетические олигопептиды, соответствующие последовательностям иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов белков ESAT6 и CFP10 M. Tuberculosis)
ПКО	Положительный контрольный образец стимуляции

1.4 Системные требования

Использование программы возможно на компьютере, удовлетворяющим следующим требованиям:

Параметр	**Требование**
Процессор	Минимально: 1 GHz CPU. 2 GB RAM 1 GB HDD.
Операционная система	32 и 64-разрядные ОС Windows 7-11 и выше.
Свободная оперативная память	2Гб и больше.
Дисковое пространство	1Гб и больше.
Разрешение экрана	Рекомендуется не менее 1024x768.

2. УСТАНОВКА, ИЗМЕНЕНИЕ И УДАЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Перед началом установки программы для Windows ознакомьтесь с системными требованиями.

Для установки программы необходимо скачать, распаковать и запустить файл с дистрибутивом для 32 или 64-разрядной ОС.

Во время установки система проверит и обновит Microsoft .NET Framework для корректной работы программы.

2.1 Установка программы

Установка программы производится в режиме мастера установки.

Следуйте указаниям программы установки. На любом шаге до начала копирования файлов на компьютер вы можете выполнить следующее:

- Чтобы вернуться к предыдущему шагу программы установки, нажмите кнопку **Назад**;
- Чтобы перейти на следующий шаг установки, нажмите кнопку **Далее**;
- Чтобы прервать установку, нажмите кнопку **Отмена**.

Чтобы установить ПО ИГРА

1. Запустите полученный инсталляционный пакет. Откроется окно проверки и обновления системы.

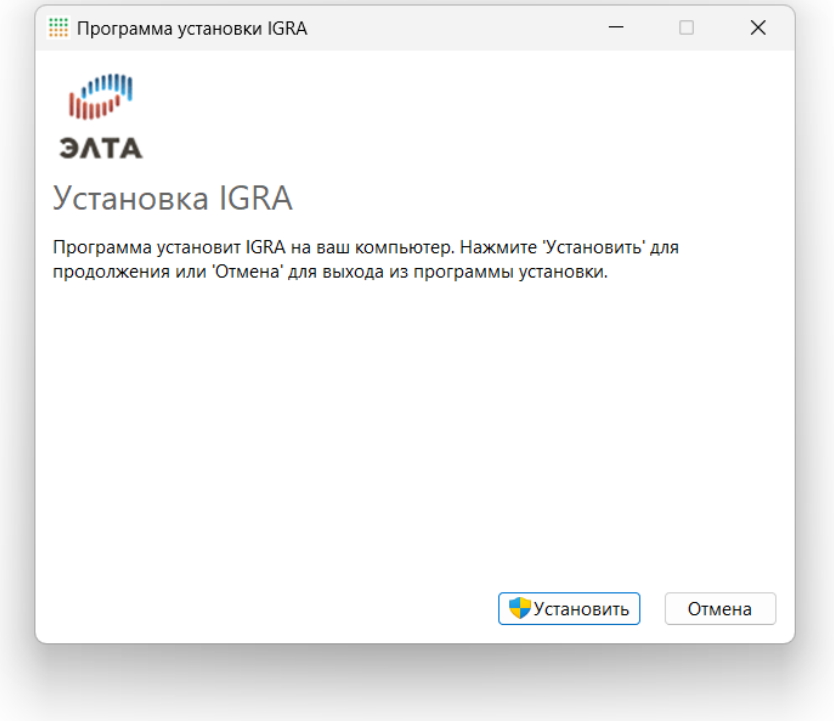

Рис. 1. Окно проверки системы.

2. Нажмите кнопку Установить.
3. Откроется окно Мастера установки. Нажмите Далее.

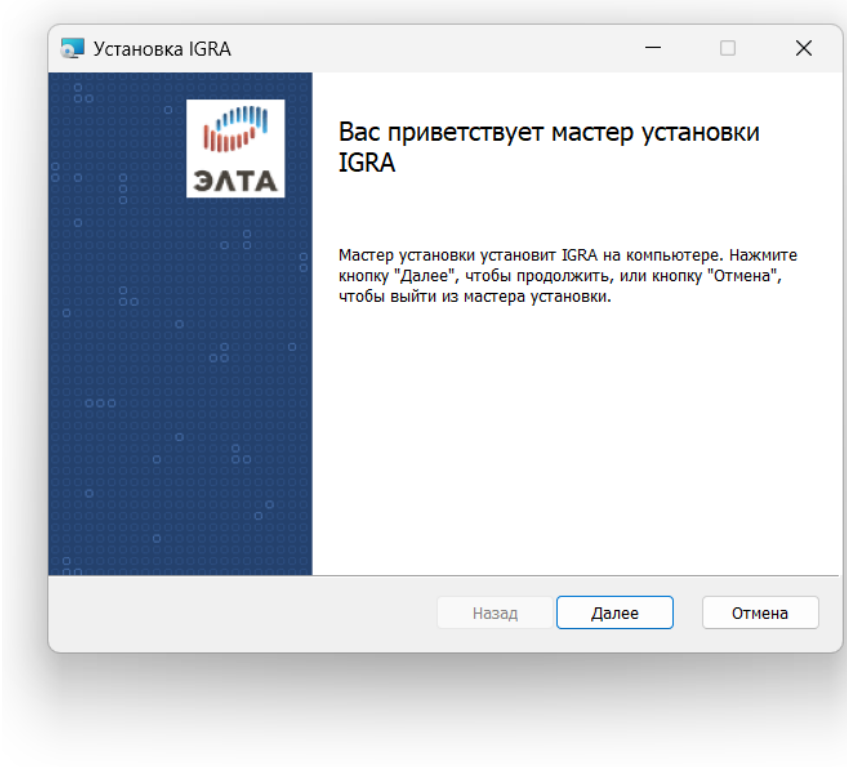

Рис. 2. Окно мастера установки.

4. Откроется окно выбора установочной папки. Нажмите **Далее**.
   Для выбора другой папки, в которую будет установлена программа нажмите кнопку **Изменить**.

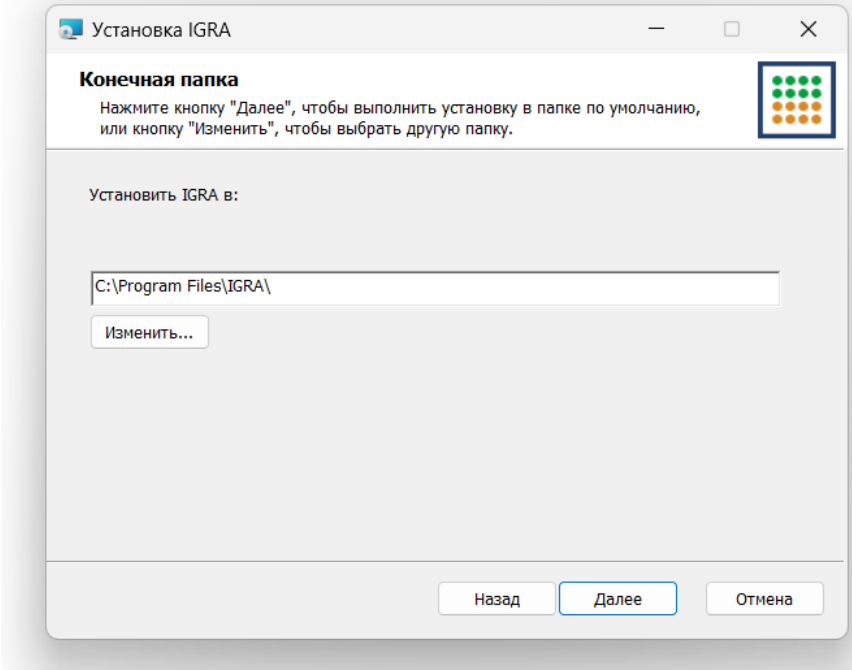

Рис. 3. Выбор установочной папки.

5. Откроется окно готовности к установке. Нажмите **Установить**.

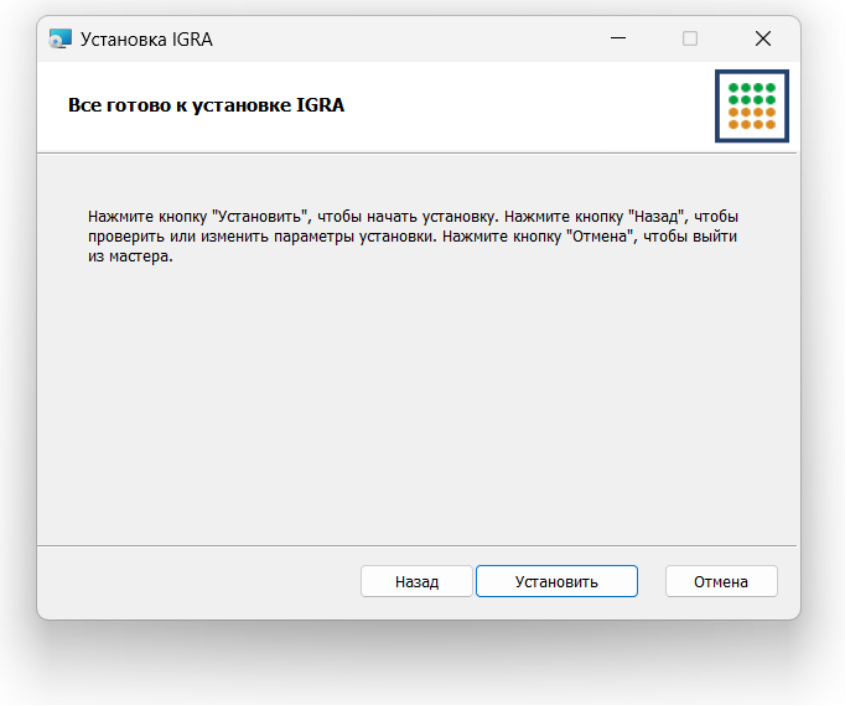

Рис. 4. Окно готовности к установке.

6. Начнется установка программы. Вмешательство пользователя не требуется.
7. В конце установки вы увидите сообщение об успешном окончании процесса. Нажмите **Готово**.

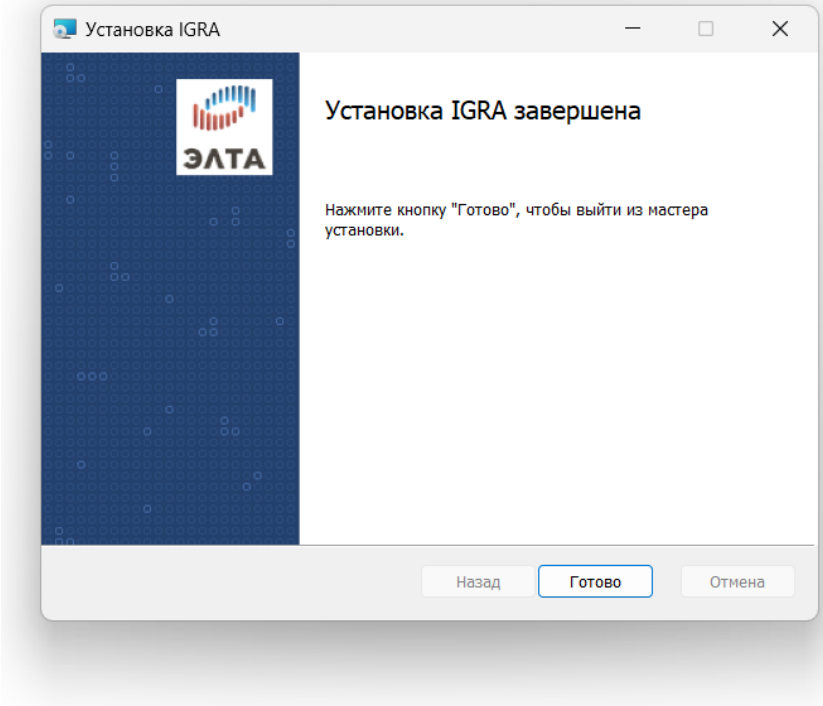

Рис. 5. Окно завершения установки.

8. Нажмите **Закрыть** в окне проверки и обновления системы.

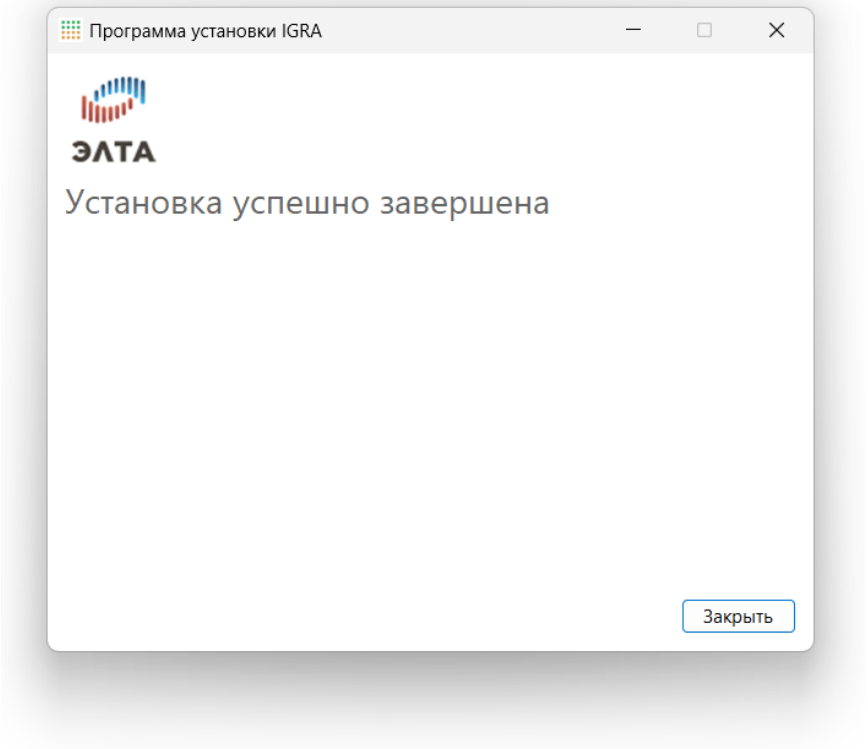

Рис. 6. Окно успешного завершения установки.

2.2 Восстановление установленной программы

Восстановление программы осуществляется через Мастер удаления/изменения. Вы можете открыть Мастер удаления/изменения двумя способами:

- При наличии установочного файла запустите его;
- Из **Панели управления** Windows:

1. Перейдите в раздел **Панели управления** Windows, посвященный установке и удалению программ.
2. В списке установленных программ выберите строку **IGRA**.
3. Нажмите кнопку **Изменить**.

Чтобы восстановить программу

1. В окне Мастера удаления/изменения нажмите **Восстановить**:

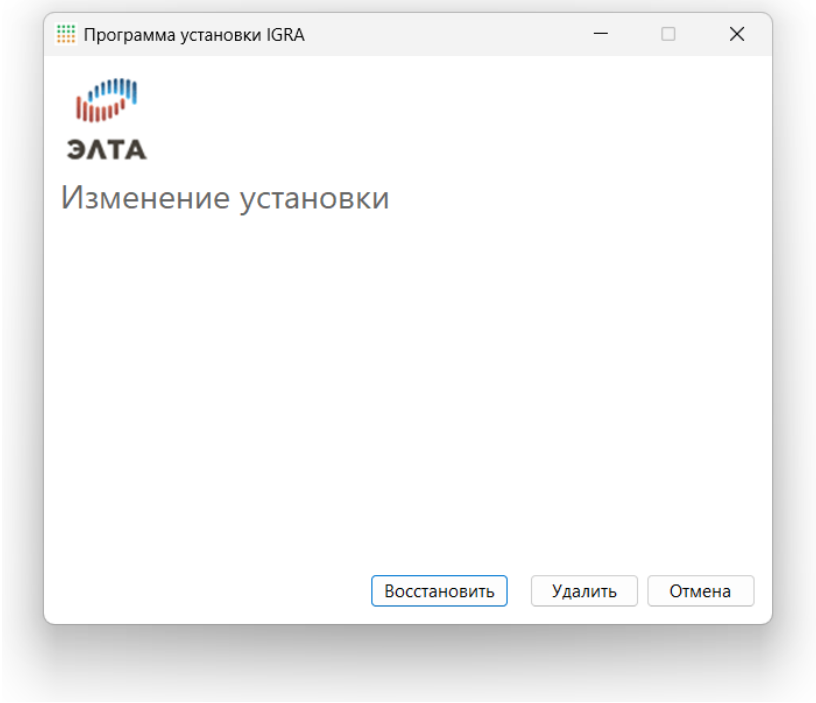

Рис. 7. Окно изменения установки.

2. Мастер выполнит переустановку программы. Вмешательство пользователя не требуется.

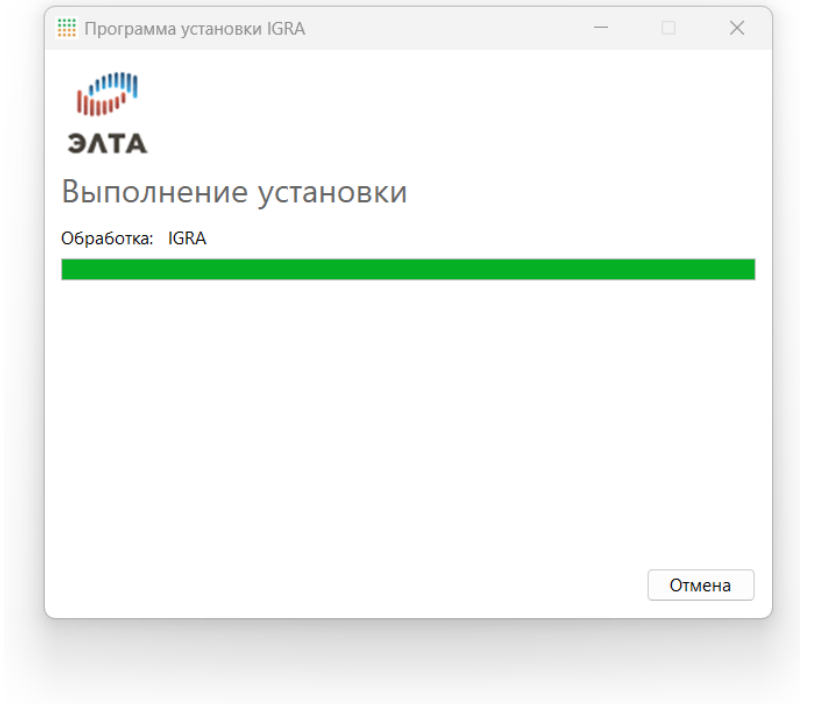

Рис. 8. Окно процесса установки.

3. После успешного окончания процесса нажмите **Готово**.

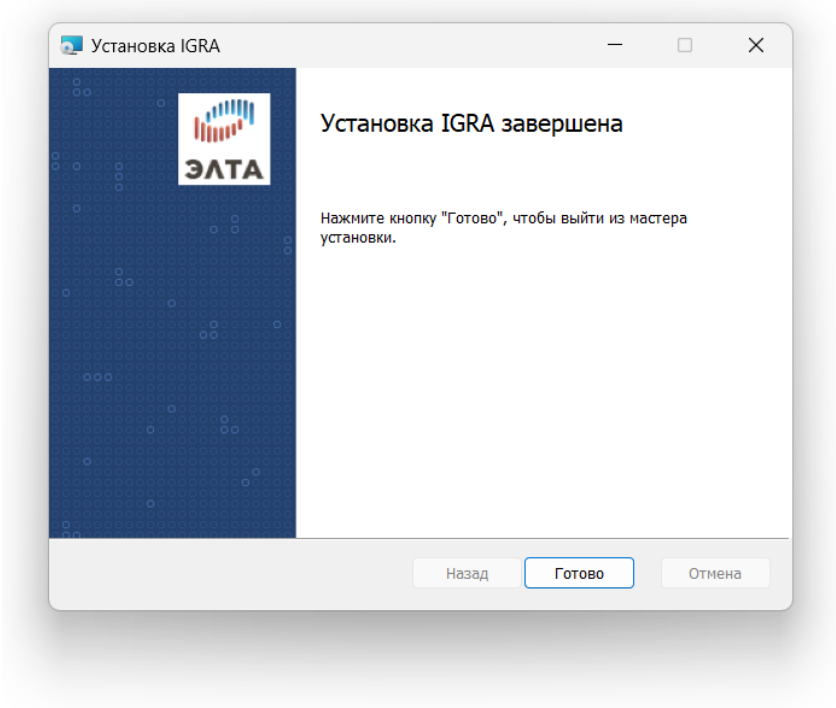

Рис. 9. Окно завершения установки.

4. Нажмите **Закрыть** в окне проверки и обновления системы.

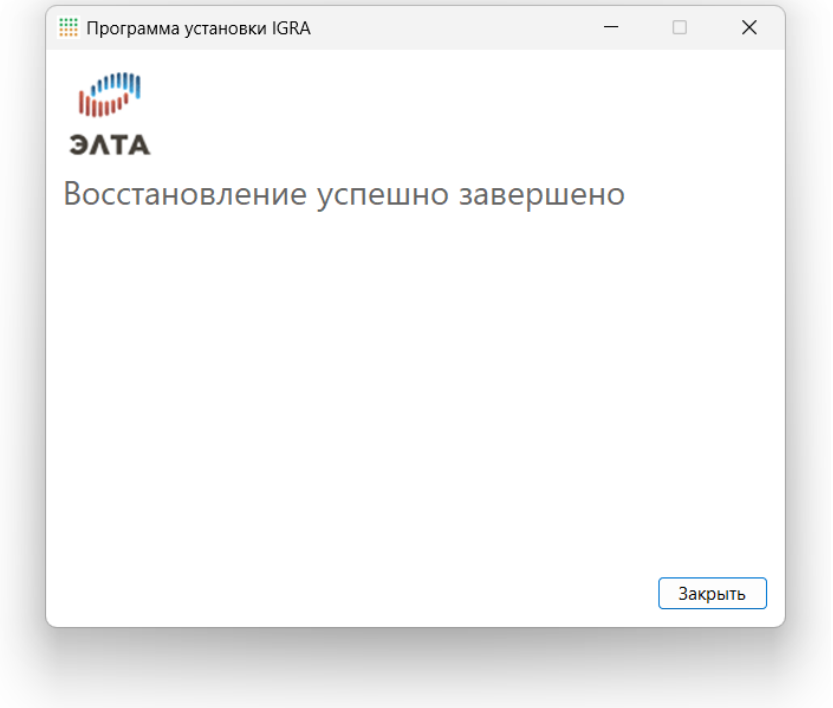

Рис. 10. Окно успешного завершения восстановления.

2.3 Удаление программы

Удаление программы осуществляется через Мастер удаления/изменения. Вы можете открыть Мастер удаления/изменения двумя способами:

- При наличии установочного файла запустите его;
- Из **Панели управления** Windows:

1. Перейдите в раздел **Панели управления** Windows, посвященный установке и удалению программ.
2. В списке установленных программ выберите строку **IGRA**.
3. Нажмите кнопку **Удалить**.

Чтобы удалить программу

1. В окне Мастера удаления/изменения нажмите **Удалить**:

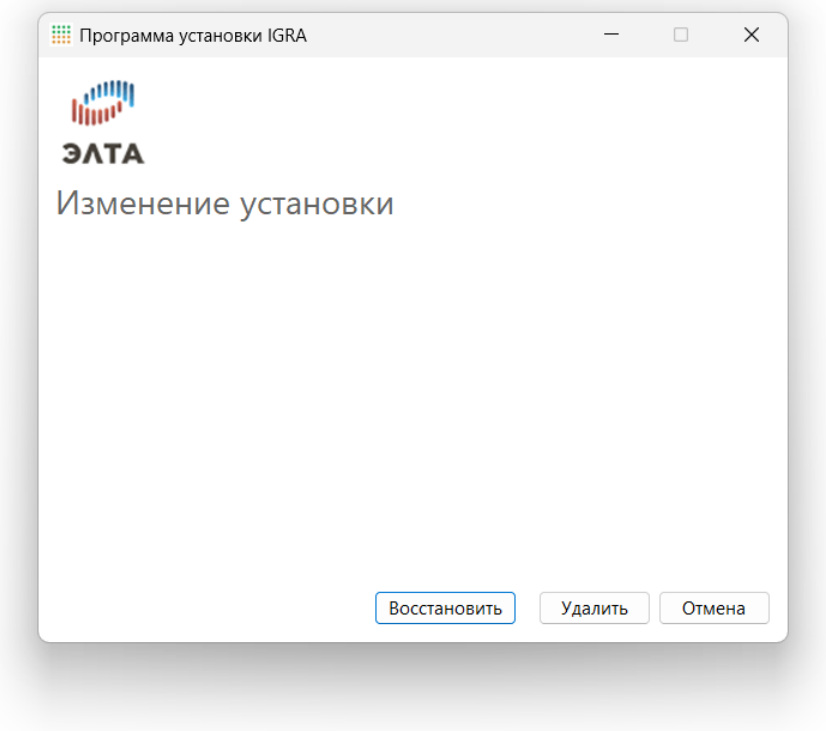

Рис. 11. Окно изменения/удаления программы.

2. Мастер удаления произведет удаление всех компонентов программы.
3. Нажмите кнопку **Готово** в появившемся окне:

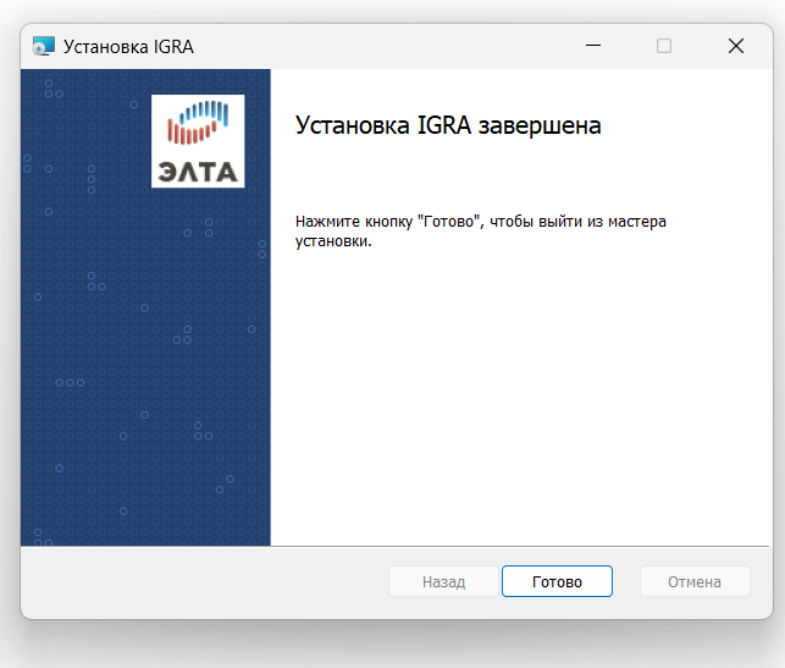

Рис. 12. Окно завершения удаления.

4. Нажмите кнопку **Закрыть** в конце.

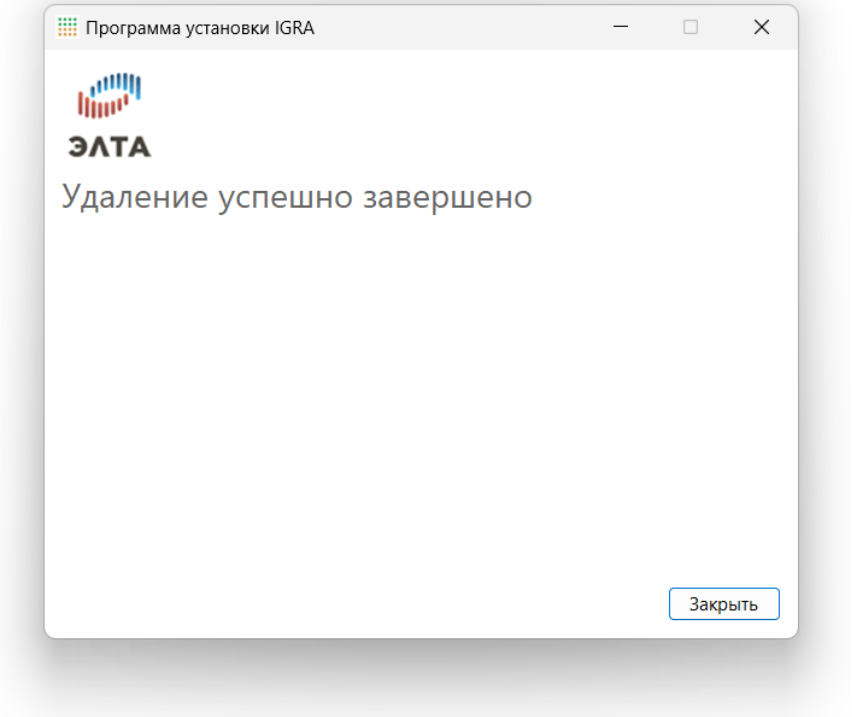

Рис. 13. Окно успешного удаления программы.

3. ЗАПУСК ПРОГРАММЫ

После установки программы на Рабочем столе добавится иконка. Чтобы запустить программу нажмите на иконку программы на **Рабочем столе** или из меню **Пуск**.

Рис. 14. Изображение иконки программы на Рабочем столе Windows.

4. ОПИСАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ

4.1 Начальный экран

После запуска программы откроется окно начального экрана следующего вида:

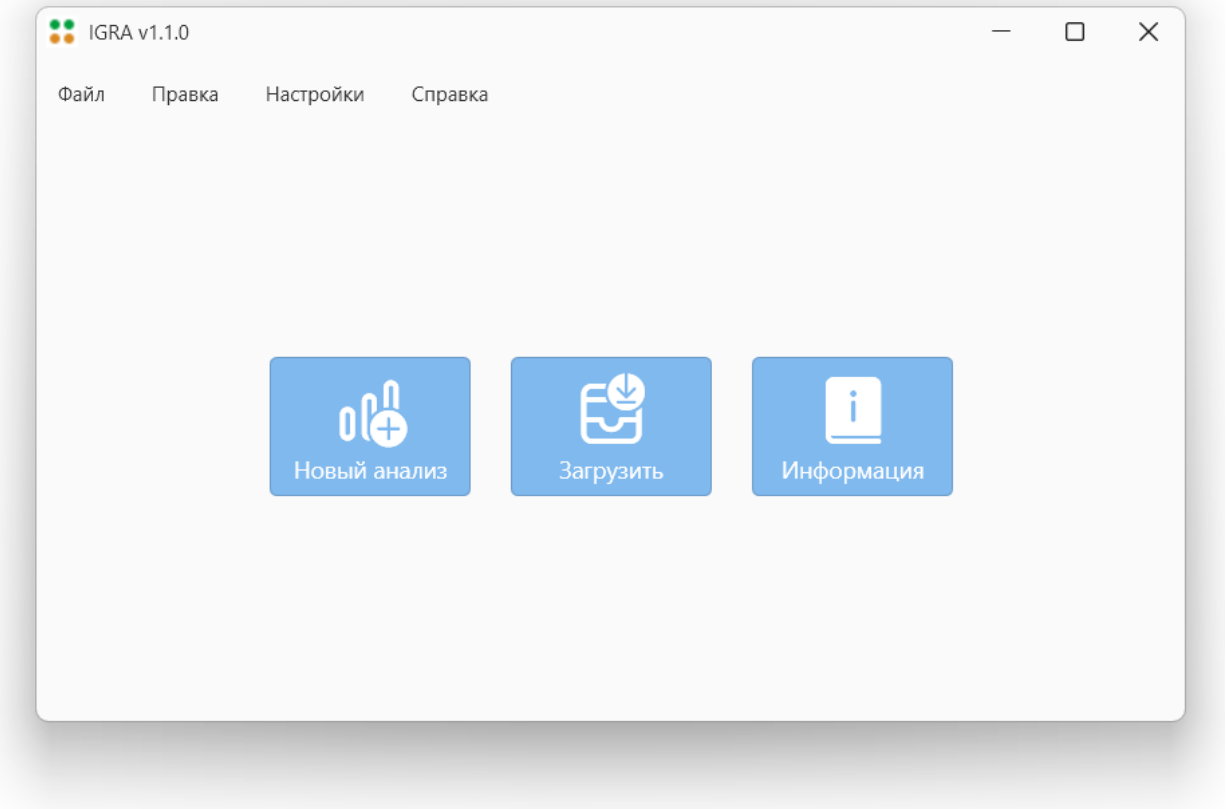

Рис. 14. Окно начального экрана.

Кнопка **Новый анализ** запускает проведение нового исследования (см. раздел. 4.4). Кнопка **Загрузить** позволяет загрузить файл с данными сохраненного ранее исследования (рис. 15). Кнопка **Информация** открывает настоящее руководство пользователя. В верхней части начального экрана располагается **Системное меню** (см. раздел 4.2): вкладки **Файл**, **Правка**, **Настройки**, **Справка**.

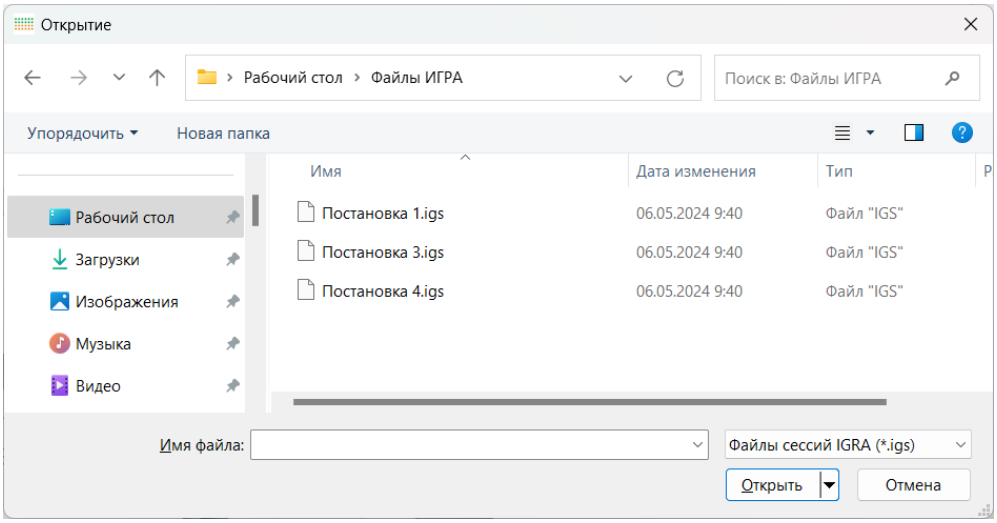

Рис. 15. Окно открытия сохраненного файла.

4.2 Системное меню

4.2.1 Файл

Новый анализ - открывает новую сессию с пустыми полями и таблицами на вкладке «Информация». Если в текущей сессии есть несохраненные данные, открывается диалоговое окно «Все несохраненные данные будут удалены. Продолжить? Да/нет».

Сохранить - сохранение изменений в текущей сессии.

Загрузить - загрузить сохраненную сессию. Если в текущей сессии есть несохраненные данные, открывается диалоговое окно «Все несохраненные данные будут удалены. Продолжить? Да/нет».

ВНИМАНИЕ: ПО ИГРА позволяет обрабатывать данные только одного исследования за раз. Если вам необходимо обрабатывать несколько исследований одновременно, откройте несколько окон ПО ИГРА. Для этого еще раз воспользуйтесь иконкой запуска программы на рабочем столе вашего компьютера (рис. 14).

4.2.2 Справка

Содержание – открывает окно с разделами описания работы программы.

О программе – открывает диалоговое окно с информацией о программе.

4.2.3 Настройки

Выбор кнопки **Настройки** позволяет выбрать папку на компьютере, в которую по умолчанию будут сохраняться csv-файлы для передачи в лабораторную информационную систему (ЛИС, см. раздел 4.4.3.3). Выбор папки можно изменить в любой момент.

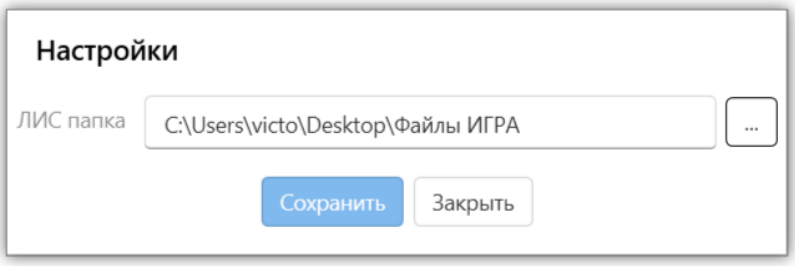

Рис. 16. Окно настроек выбора папки по умолчанию для сохранения файлов ЛИС.

4.3 Контекстное меню

При нажатии правой кнопки мыши, где это применимо, открывается окно Контекстного меню, содержащее стандартные функции:

4.3.1 Поля формы, ячейки таблиц Планшет и Образцы

Активна только функция **Копировать** (Ctrl+C).

Отменить (Ctrl+Z).

Вырезать (Ctrl+X).

Копировать (Ctrl+C).

Вставить (Ctrl+V).

Удалить (Del).

4.3.2 Нередактируемый текст и таблицы

Активна только функция **Копировать** (Ctrl+C).

4.4 Проведение исследования

Процесс внесения данных и получения результатов исследования разделен на 4 шага, находящиеся на вкладках:

- Информация;
- Данные;
- Анализ;
- Результаты.

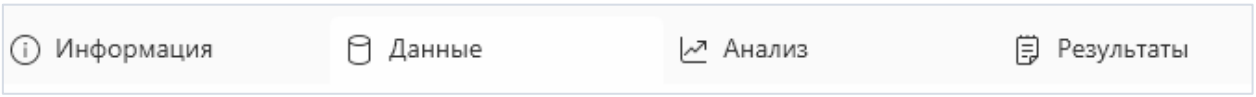

Рис. 17. Вкладки шагов исследования с выделением активной.

4.4.1 Вкладка «Информация»

На вкладке **Информация** вносятся общие данные о проводимом анализе. Описание полей приведены в таблице ниже.

Таблица 1. Описание полей формы.

Название поля	Значение по умолчанию	Формат	Валидация	Обязательность
Тест	Набор реагентов «Игра-ТБ»	text	нет	нет
Организация		text	нет	нет
ФИО оператора	[Имя пользователя Windows]	text	нет	нет
Должность оператора		text	нет	нет
Дата постановки	Текущая дата	data	нет	нет
Серия набора		text	нет	нет

Кнопка **Продолжить** под таблицей активна, т.к. все поля не являются обязательными для заполнения. При нажатии на кнопку происходит переход на вкладку **Данные**.

Так же можно перейти на вкладку **Данные**, нажав на нее. Вкладки **Анализ** и **Результаты** на данном этапе неактивна, на них можно перейти только после заполнения необходимых данных исследования.

4.4.2 Вкладка «Данные»

Во вкладке **Данные** происходит настройка формата ячеек и вносятся данные, выражаемые в единицах оптической плотности, полученной для разных лунок планшета – образцов анализируемой плазмы крови и стандартные контрольные образцы.

На вкладке присутствуют следующие рабочие элементы:

- Таблица **Планшет**;
- Таблица **Образцы**;
- Таблица **Контрольные образцы**;
- Меню настроек;
- Кнопки **Назад** и **Анализ**. Кнопка **Анализ** становится активна при корректном заполнении всех таблиц.

4.4.2.1 Таблица «Планшет»

Таблица с назначением лунок ИФА-планшета по типам образцов (контрольные образцы разных концентраций, а также ОКО, Т-АНТИГЕН или ПКО для исследуемых образцов). Стандартный размер планшета по умолчанию - 8х12 лунок (Рис. 17).

В таблицу вносятся численные данные оптической плотности (в единицах о.е.), полученные в ИФА для образцов анализируемой плазмы крови. Исследуемые образцы разделяются на три вида:

- **Т-АНТИГЕН** – плазма после стимуляции специфическим антигеном. Этот образец обязательно должен присутствовать в постановке. Возможна постановка данного образца в повторах.
- **ОКО** – отрицательный контроль, плазма без стимуляции. Должен обязательно присутствовать в постановке, может быть в повторах. По разнице концентраций ИФН-γ в лунках с Т-АНТИГЕНОМ и ОКО (для одного и того же человека) определяется качественный результат исследования.
- **ПКО** – положительный контроль стимуляции, плазма крови того же человека, обработанная неспецифическим индуктором ИФН-γ. Используется только для определения наличия живых лимфоцитов в исследуемой крови. Значение оптической плотности (ОП) ПКО не используется в расчетах, но используется для оценки валидности отрицательного результата теста (см. ниже). ПКО может отсутствовать в постановке.

Величина ОП пропорциональна концентрации гамма-интерферона (ИФН-γ) в соответствующей ячейке (образце). Для выражения этой концентрации в принятых единицах измерения (пг/мл, пикограмм на миллилитр), в одной ИФА-постановке с анализируемыми образцами ставят стандартные контрольные образцы с известной концентрацией ИФН-γ.

Контрольные образцы – на рис. 17 обозначены как К200, К50, К12,5 и К3,125 пг/мл (соответствует концентрациям ИФН-γ) и К0 – нулевой контрольный образец (ИФН-γ отсутствует). Контрольные образцы рекомендуется ставить в парных повторах, однако это не является обязательным условием. Концентрации и количество контрольных образцов могут быть заданы произвольно (см. раздел 4.4.2.3), но по умолчанию будут совпадать с теми, что представлены на рис. 17.

На рис. 17 перечисленные в настоящем разделе исследуемые образцы (в «горизонтальном» порядке ОКО, Т-АНТИГЕН, ПКО) нанесены для 28 пациентов на одном планшете. Оставшиеся лунки заняты контрольными образцами.

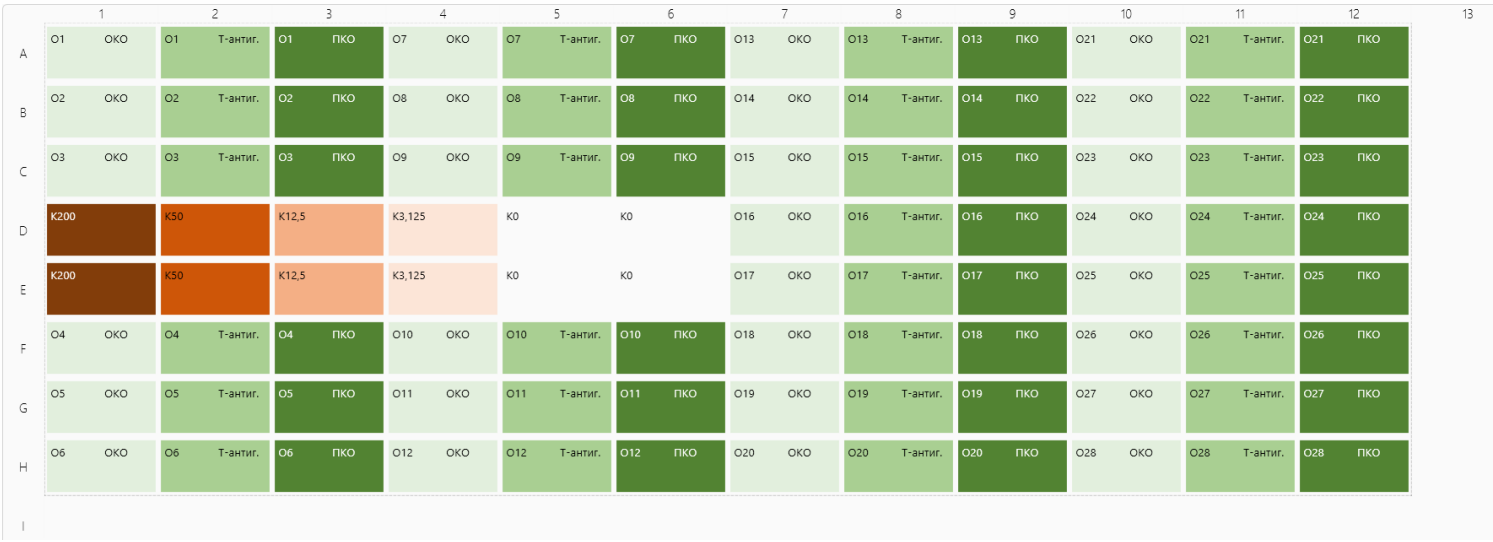

*Рис. 17. Таблица **Планшет** с форматом расположения ячеек по умолчанию.*

Несмотря на то, что стандартный иммунологический планшет имеет 12x8 лунок, как указано на рис. 17, таблица **Планшет** ПО ИГРА имеет более 12 столбцов и 8 строк, которые можно также использовать для внесения и хранения данных, прокручивая вниз и вбок аналогично таблицам MS Excel. Однако рабочей зоной, данные из которой анализируются, являются только 12x8 ячеек, выделенных цветом на Рис. 17.

Управление данными в таблице **Планшет** осуществляется следующим образом:

- данные могут быть внесены в таблицу с использованием привычных инструментов копирования/вырезания/вставки, в том числе – через контекстное меню или с использованием сочетаний клавиш **Ctrl-C/Ctrl-X/Ctrl-V** (аналогично MS Excel). Данные для внесения можно копировать при помощи перечисленных инструментов либо из таблиц Excel, либо из соседних ячеек таблицы **Планшет**;
- копирования, удаление и т.д. можно осуществлять не для единичных ячеек, а для диапазона значений (аналогично MS Excel). Для выделения диапазона нужно отметить какую-либо ячейку, зажав ее курсором мыши (при нажатой левой кнопке), а затем, не отпуская левой кнопки мыши, растянуть диапазон на нужное количество ячеек. Ту же операцию можно выполнить, зажав на клавиатуре кнопку **Shift** и выделяя нужный диапазон стрелками курсора;
- если в буфере обмена находится единственное численное значение, то при вставке оно будет скопировано во все ячейки выделенного диапазона;
- данные могут быть внесены вручную в любую ячейку. Тип данных для таблицы **Планшет** – только число, имеющее до 4 знаков после запятой;
- перемещение по ячейкам осуществляется или стрелками курсора (в любую сторону), или мышью, или нажатием **Enter** с переходом в ячейку *справа* (или первую левую ячейку после последней правой ячейки строки). Ввод чисел производится в той ячейке, которая выделена. Десятичные дроби будут распознаваться корректно и с точкой, и с запятой в качестве разделителя. Если в ячейке уже содержится число, то мышью курсор можно поставить к любому знаку и тем самым исправить его, не вводя заново все число;
- имеется функция отмены последнего действия по нажатию **Ctrl-Z** или специальной иконки на панели инструментов (это относится ко всем таблицам рабочего стола, введению, удалению, перемещению и редактированию любых данных – в том числе между таблицами).

У ячеек в таблице **Планшет** есть формат. Он задается через кнопки разделов **Формат планшета**, **Контрольные образцы** и **Расположение образцов** панели форматирования планшета (см. раздел 4.4.2.4), и не меняется в данной ячейке при изменении, удалении и внесении в нее численных данных оптической плотности. Формат обозначает тип образца: контрольные образцы различных концентраций, или ОКО, Т-АНТИГЕН, ПКО для исследуемых образцов, а также номер самого образца в постановке (О1, О2 и т.д., см. Рис. 17). Формат ячейки (тип образца в лунке) отображается цветом ячейки, а также указан мелким шрифтом в ее углу (например, О1 ОКО).

4.4.2.2 Таблица «Образцы»

В таблицу **Образцы** вносится информация о пациентах. Включает кликабельный номер образца (для отметки на планшете, выделен голубым на рис. 18), поля идентификатора, даты сдачи крови, дополнительной информации. Все поля данной таблицы являются текстовыми. Внесение данных и управление ими (выделение, копирование и т.д.) осуществляются теми же способами, что и для таблицы **Планшет** (см. предыдущий раздел).

Для установки формата образца на планшете необходимо выбрать образец в столбце **Номер образца** таблицы **Образцы** нажатием на ячейку. В результате выбранный образец будет подсвечен, как показано на рисунке ниже.

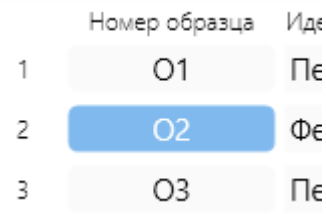

Рис. 18. Выбор образца перед внесением данных ОП на планшет.

При последующем выборе кнопок управления на панели **Расположение образцов** и нажатии на ячейки таблицы **Планшет** им будет назначен выбранный пациент и формат (подробнее см. раздел 4.4.2.4). После установки формата происходит переключение на следующий номер образца. Таким образом переключение образцов происходит автоматически.

Количество пациентов в одной постановке (количество строк в таблице **Образцы**) не ограничено, однако по умолчанию составляет 28. Количество пациентов в таблице **Образцы** можно увеличивать или уменьшать кнопками внизу таблицы:

Это сделано для реализации такой ситуации, когда список образцов состоит из нескольких десятков пациентов, а в конкретном ИФА проставлены только некоторые из них (при том, что всю рабочую сессию вместе со списком можно сохранять, загружать и анализировать заново).

Поля ФИО, дата и дополнительная информация таблицы **Образцы** не являются обязательными для заполнения.

4.4.2.3 Панель «Контрольные образцы»

В панели расположены кнопки управления для произвольной установки формата контрольных образцов в таблице **Планшет,** а также устанавливаются значения концентрации контрольных образцов (панель **Контрольные образцы** – **Изменить**).

При нажатии кнопки **Изменить** панели **Контрольные образцы** открывается окно таблицы **Изменение контрольных образцов** следующего вида (Рис. 19):

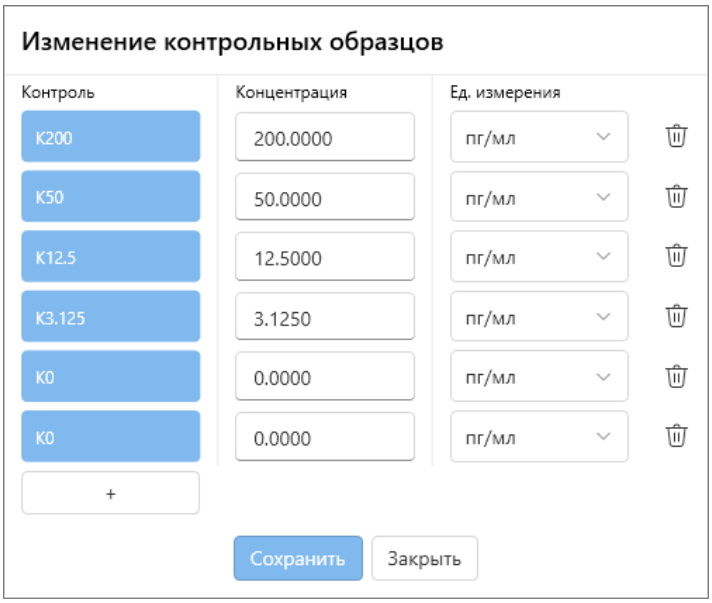

Рис. 19. Окно изменения контрольных образцов (по умолчанию).

Значения концентраций можно менять вручную. Количество контрольных образцов (включая нулевой) может быть произвольным, но не менее 4. Для увеличения числа контрольных образцов нажмите кнопку «+» внизу таблицы; для уменьшения – значок удаления рядом с ненужной строкой. При уменьшении количества строк контрольных образцов меньше 4 (включая нулевой) во вкладке Анализ появится сообщение о невалидности калибровочной кривой, при этом все расчеты будут все равно выполняться, а результаты – отображаться.

Имеется возможность редактирования единиц измерения (по умолчанию – пг/мл, с возможностью изменения на МЕ/мл (международные единицы/мл). Обратите внимание, что при выборе единиц измерения МЕ/мл в данной версии ПО ИГРА невозможна интерпретация качественного результата исследования (см. раздел 4.4.3.2).

Использование других кнопок панели **Контрольные образцы** описано в следующем разделе.

4.4.2.4 Панель форматирования планшета

Общий вид панели форматирования планшета представлен на рисунке 20:

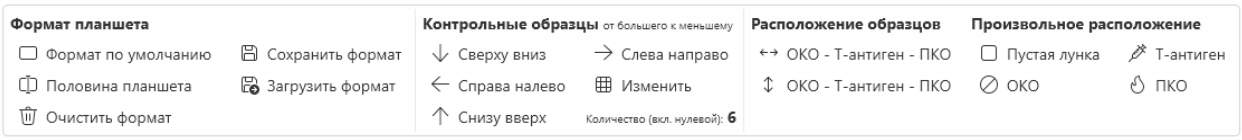

Рис. 20. Панель форматирования планшета.

Панель форматирования планшета состоит из трех частей, включающих кнопки:

1) Формат планшета

Формат по умолчанию – восстанавливает рекомендованное стандартное расположение лунок на планшете, представленное на рисунке 17.

Половина планшета - при нажатии устанавливается формат по умолчанию, но в пределах столбцов 1-6 (рис. 21):

Рис. 21. Половина планшета.

Очистить формат – при нажатии очищается формат всех лунок на планшете. Если выделен какой-то диапазон таблицы (см. раздел 4.4.2.1), очищается только он. Введенные данные при этом остаются без изменений.

Сохранить формат – сохранение установленного пользователем формата планшета в виде файла шаблона на компьютере для повторного использования.

Загрузить формат – загрузить ранее сохраненный шаблон с форматом планшета.

2) Контрольные образцы

Сверху вниз

При нажатии на кнопку «Сверху вниз» она отмечается цветом («утапливается»). Если после этого нажать левой кнопкой мыши в какую-либо ячейку таблицы планшета, то формат контрольных образцов будет назначен в ячейки, начиная с нажатой, по вертикали в направлении сверху-вниз:

К1

К2

К3

К4

К0

К0

Здесь и далее: если в таблице Изменение контрольных образцов, см. разд. 4.4.2.3 установлено другое количество контрольных образцов, то оно и будет отображаться при форматировании.

Справа налево

При нажатии на кнопку «Сверху вниз» она отмечается цветом («утапливается»). Если после этого нажать левой кнопкой мыши в какую-либо ячейку таблицы планшета, то формат контрольных образцов будет назначен в ячейки, начиная с нажатой, по горизонтали в направлении справа-налево (К0-К4-К3-К2-К1).

Снизу вверх

При нажатии на кнопку «Сверху вниз» она отмечается цветом («утапливается»). Если после этого нажать левой кнопкой мыши в какую-либо ячейку таблицы планшета, то формат контрольных образцов будет назначен в ячейки, начиная с нажатой, по вертикали в направлении снизу-вверх:

К0

К0

К4

К3

К2

К1

Слева направо

При нажатии на кнопку «Сверху вниз» она отмечается цветом («утапливается»). Если после этого нажать левой кнопкой мыши в какую-либо ячейку таблицы планшета, то формат контрольных образцов будет назначен в ячейки, начиная с нажатой, по горизонтали в направлении слева-направо: (К1-К2-К3-К4-К0-К0).

Изменить – открывает окно с таблицей «Контрольные образцы» для изменения значений калибраторов и выбора калибратора для произвольной установки в ячейки таблицы «Планшет» (см. предыдущий раздел).

Количество – индикатор количества строк в таблице «Контрольные образцы», включая нулевой контрольные образец.

3) Расположение образцов

Кнопка **↔ ОКО - Т-антиген - ПКО**

По умолчанию кнопка нажата (подсвечена голубым).

Данная кнопка работает при нажатой (подсвеченной голубым) кнопке выбора образца в таблице **Образцы** (см. раздел 4.4.2.2 и Рис. 18). После того, как нажаты обе кнопки – нужного образца (например, **О1**) и **↔ ОКО - Т-антиген - ПКО**, нажмите левой кнопкой мыши в нужную ячейку таблицы **Планшет.** При этом формат образцов для выбранного пациента из таблицы «Образцы» будет назначен в ячейки, начиная с нажатой, по горизонтали данном порядке (слева-направо: **ОКО→Т-антиген→ПКО**). Пока нажата кнопка **↔ ОКО - Т-антиген - ПКО**, можно повторно устанавливать формат образцов аналогичным образом, при этом при каждом новом нажатии будет выбираться следующий образец (например, **О1**, **О2**, **О3** и т.д.) Таким способом можно заполнить весь планшет образцами из таблицы **Образцы**, проставляя для них ОКО, Т-АНТИГЕН и ПКО в нужном порядке. Для того, чтобы при нажатии курсором мыши на ячейку таблицы **Планшет** она не форматировалась, а просто выбиралась (например, для внесения в нее численных данных), нужно отжать либо «подсвеченную» кнопку образца в таблице «Образцы», либо все кнопки на панели Расположение образцов.

ВНИМАНИЕ: изменение формата ячеек планшета не может быть отменено нажатием Ctrl-Z!

Кнопка ↕ **ОКО - Т-антиген - ПКО**

Работает полностью аналогично кнопке ↔ **ОКО - Т-антиген – ПКО** (см. выше), с тем изменением, что при одновременной активации кнопок нужного образца и ↔ **ОКО - Т-антиген – ПКО**, формат ячеек для данного образца проставляется в таблице **Планшет** в вертикальном порядке (начиная с выбранной ячейки):

ОКО

↓

Т-антиген

↓

ПКО

4) Произвольное расположение

Содержит кнопки, предназначенные для установки форматов образцов в ячейках по отдельности. Данные функции особенно полезны при анализе части образцов в повторах.

Для их использования нужно выбрать необходимый номер образца в таблице **Образцы** (он станет подсвечен голубым, см. см. раздел 4.4.2.2 и Рис. 18). Далее нажать на кнопку **ОКО, Т-антиген, ПКО или Пустая ячейка**, при этом она также подсветится голубым. Затем нажать левой кнопкой мыши в ячейку таблицы планшета – формат образца и выбранный пациент из таблицы «Образцы» будет назначен в выбранную ячейку. Пока нажата кнопка, можно повторно устанавливать формат ячейки для выбранного номера образца аналогичным образом (переключения на следующий номер образца не происходит).

Если форматирования таблицы Планшет не требуется, «отожмите» все кнопки на **Панели форматирования планшета** (или в таблице **Образцы**).

4.4.3 Вкладка «Анализ»

Вкладка **Анализ** активируется после корректного заполнения вкладки **Данные** (см. выше) и нажатия кнопки **Анализ** внизу вкладки **Данные**. На открывшейся после этого вкладке расположены обработанные результаты проведенного исследования.

4.4.3.1 Порядок проведения анализа

Программа обрабатывает численные данные ИФА-анализа, выражаемые в единицах оптической плотности (о.е.), внесенные в ячейки таблицы **Планшет** – в том числе, полученные для образцов анализируемой плазмы крови, а также стандартных контрольных образцов с известной концентрацией ИФН-γ (рис. 18).

Для примера, таблица ОП в лунке, полученная по итогам измерения половины планшета, изображенного на рис. 21 (столбцы 1-6), будет иметь примерно такой вид (таблица 2):

Таблица 2. Пример данных, полученных при измерении ОП в лунках планшета (стрипы 1-6). Расположение образцов соответствует таковому на рисунке 21: A1-A3 – образец 1 (в порядке ОКО - Т-АНТИГЕН – ПКО), B1-B3, C1-C3 и так далее – то же самое для образцов 2, 3 и т.д.; строки D и E заняты контрольными образцами в повторах (слева направо – от 200 пг/мл до 0 пг/мл в двух или четырех повторах).

	1	2	3	4	5	6
A	0,053	0,5114	NoCalc	0,0572	0,1652	2,5929
B	0,0616	0,5889	3,743	1,856	2,1872	2,8085
C	0,0654	0,5845	3,0659	0,0622	1,78	1,1118
D	2,0631	0,6211	0,2023	0,0933	0,0505	0,0488
E	2,0685	0,6111	0,2008	0,0876	0,0512	0,0485
F	0,0939	0,7612	NoCalc	0,0889	0,2626	NoCalc
G	0,0981	1,734	1,0969	0,0969	0,2103	NoCalc
H	0,1068	0,1263	1,853	0,1065	0,1825	0,2000

ПРИМЕЧАНИЕ: **NoCalc** – таким образом некоторые приборы, который измеряют оптическую плотность (планшетные фотометры), обозначают выход сигнала за верхнюю границу динамического диапазона измерений. Для разных приборов он разный, обычно от 3,5 до 4,5 о.е. (единиц оптической плотности). В случае, если в ячейки таблицы Планшет внесены любые нечисловые данные, при нажатии кнопки Анализ будет появляться окно следующего вида (Рис. 22):

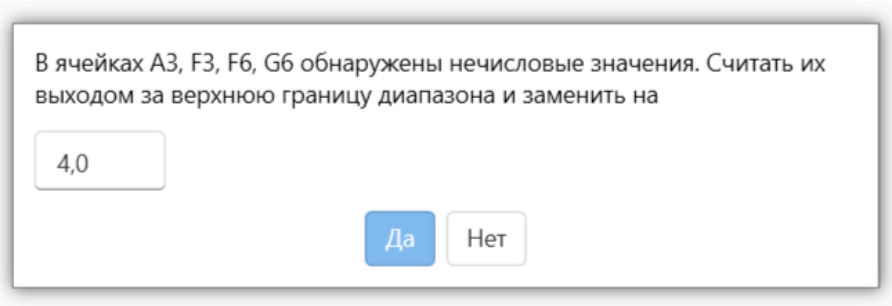

Рис. 22. Окно выбора верхней границы динамического диапазона фотометра.

При выборе варианта **Да** (рис. 22) произойдет автозамена всех нечисловых данных на значение 4.0 о.е. (или другое значение, которое может быть проставлено пользователем вручную в окне на рис. 22, исходя из реальной верхней границы диапазона измерений того фотометра, который имеется в лаборатории). При выборе варианта **Нет** нечисловые данные будет рассматриваться как некорректные и исключены из расчетов.

Далее рассчитываются средние значения ОП для контрольных образцов. В результате получаем таблицу 3:

Таблица 3. Пример средних значений ОП контрольных образцов для построения калибровочного графика.

Калибровочная кривая

Контроль	Концентрация ИНФ-γ	Ед. изм.	ОП ср.
K0,0	0.0	пг/мл	0.0498
K3,125	3.125	пг/мл	0.0905
K12,5	12.5	пг/мл	0.2016
K50,0	50.0	пг/мл	0.6161
K200,0	200.0	пг/мл	2.0658

На основе Таблицы 3, не включая нулевую точку, строится калибровочный график в линейных координатах, где по оси Y отложены концентрации ИФН-γ, а по оси X – соответствующие им значения ОП (Рисунок 23):

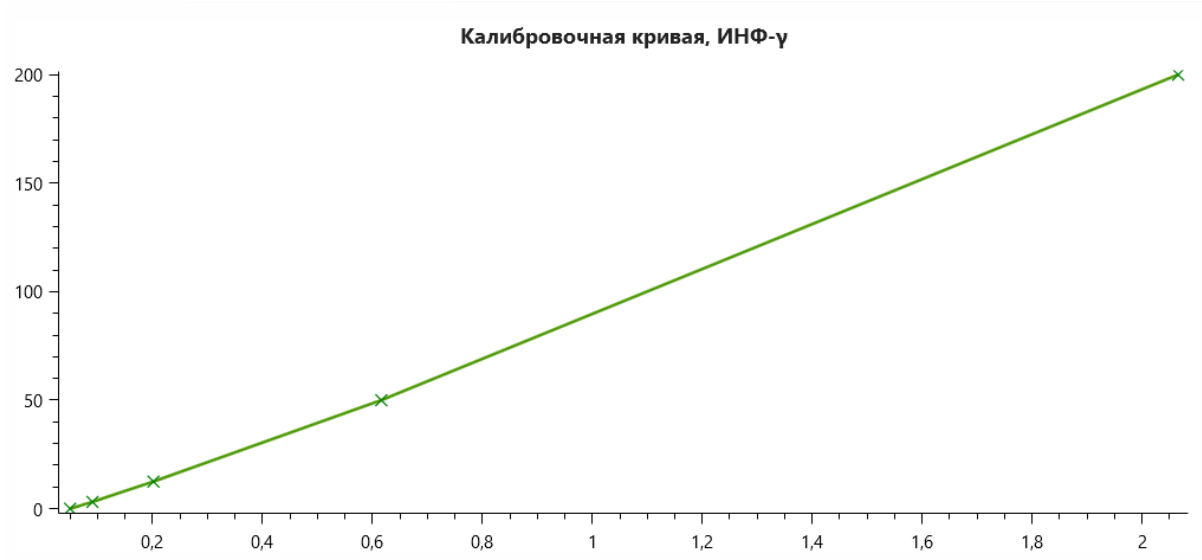

Рис. 23. Калибровочный график, построенный на основе данных таблицы 3. По оси X – оптическая плотность (о.е.), по оси Y – концентрация ИФН-γ (пг/мл)

График описывается кусочно-непрерывной функцией, каждому сегменту которой соответствует уравнение вида f(x) = ax + b. Если оптическая плотность образца больше или меньше таковой у «крайнего» калибратора (в примере выше – это калибраторы с концентрацией ИФН-γ более 200 и менее 3,125 пг/мл), то для расчета концентрации ИФН-γ в этом образце будет использовано ближайшее уравнение. Однако, следует помнить, что за границами калибровочного графика концентрация ИФН-γ не может быть определена точно, и формально ее следует учитывать как «более 200 пг/мл» или «менее 3,125 пг/мл».

4.4.3.2 Интерпретация результатов

На основе полученных уравнений калибровочного графика (Рисунок 23) и оптических плотностей исследуемых образцов (Таблица 2, данные взяты) определяются концентрации ИФН-γ в соответствующих лунках ИФА-планшета, получается следующая таблица:

Таблица 4. Пример результатов исследования.

Номер образца	Идентификатор	Дата сдачи крови	Доп. информация	ОП ОКО	ИНФ-у ОКО, пг/мл	ОП Т-АНТИГЕН	ИНФ-у Т-АНТИГЕН, пг/мл	ОП ПКО	ΔИНФ-у (Т-АНТИГЕН-ОКО), пг/мл	Интерпретация	Заключение о валидности
О1	Иванов А.А	11-04-24	муж	0,0530	0,2495	0,5114	40,5289	4,0000	40,2794	положительный	инфекция вероятна
О2	Петрова В.В.	11-04-24	жен	0,0616	0,9099	0,5889	47,5395	3,7430	46,6296	положительный	инфекция вероятна
О3	Бородина В.Ф.	11-04-24	жен	0,0654	1,2016	0,5845	47,1415	3,0659	45,9399	положительный	инфекция вероятна
О4	Федоров К.П.	11-04-24	муж	0,0939	3,4161	0,7612	65,0135	4,0000	61,5974	положительный	инфекция вероятна
О5	Аршавин А.А.	11-04-24	муж	0,0981	3,7705	1,7340	165,6688	1,0969	161,8983	положительный	инфекция вероятна
О6	Мухина Т.А.	11-04-24	жен	0,1068	4,5047	0,1263	6,1501	1,8530	1,6454	отрицательный	инфекция маловероятна
О7	Большой В.П.	11-04-24	муж	0,0572	0,5720	0,1652	9,4327	2,5929	8,8607	неопределенный	рекомендуется повторить анализ
О8	Горяев Л.А.	11-04-24	муж	1,8560	178,2921	2,1872	212,5612	2,8085	34,2691	невалидный	рекомендуется повторить анализ
О9	Сидорова О.В.	11-04-24	жен	0,0622	0,9559	1,7800	170,4284	1,1118	169,4725	положительный	инфекция вероятна
О10	Коровина М.М.	11-04-24	жен	0,0889	3,0060	0,2626	18,0226	4,0000	15,0166	положительный	инфекция вероятна
О11	Онопко В.С.	11-04-24	не указан	0,0969	3,6693	0,2103	13,2915	4,0000	9,6222	положительный	инфекция вероятна
О12	Ларин У.У.	11-05-24	муж.	0,1065	4,4794	0,1825	10,8925	0,2000	6,4131	невалидный	рекомендуется повторить анализ

ВАЖНО: «Интерпретация» результатов исследования, производимая ПО ИГРА, и описанная ниже в настоящем разделе, применима только к данным, получаемым в наборе реагентов «ИГРА-ТБ» производства Компании ЭЛТА (таблица 5). Обработка данных исследований, проводимых с использованием любых других наборов реагентов, основанных на технологии IGRA (например, QuantiFERON, TB-FERON) возможна, однако без автоматической интерпретации результатов. Для этих наборов рекомендуется сохранить данные исследования в таблицу Excel при помощи кнопки Сохранить в **Excel** вкладки **Анализ** затем применить к ним алгоритмы интерпретации, описанные в инструкциях к соответствующим наборам.

Основным значением, используемым для интерпретации результата, является разница концентраций ИНФ-γ в лунке после стимуляции образца (Т-АНТИГЕН) и без нее (ОКО) – она показывает, сколько интерферона выработалось (превысило базовый уровень) в ответ на микобактериальный антиген. Для этого, в соответствии с инструкцией к набору реагентов «ИГРА-ТБ», используется таблица интерпретаций:

Таблица 5. Интерпретация результатов анализа.

ΔИФН*, пг/мл	ИФН-γ (ОКО), пг/мл	ОП (Т-АНТИГЕН) / ОП (ОКО)	ОП (ПКО), о.е.	Интерпретация
≤ 8	≤100	любой	≥0,5	результат **отрицательный**, инфекция *M. tuberculosis* **маловероятна**
8-9	≤100	любой	≥0,5	«серая зона», результат неопределенный, рекомендуется повторить анализ, заново взяв кровь у пациента
≥ 9	≤100	≥1,25	любой	результат **положительный**, инфекция *M. tuberculosis* **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	

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

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%.

В соответствии с принципами, изложенными в таблице 5, результаты исследования, приведенного в качестве примера в таблицах 2-4, могут быть интерпретированы следующим образом (таблица 4, два крайних правых столбца):

- **Образцы О1-О5, О9-О11: положительные**, валидные. При этом образец О3 признается валидным положительным, даже несмотря на то, что для него не сработал положительный контроль (см. лунку С3 в таблице 2 и ср. с ПКО других образцов). Для положительных образцов низкий сигнал ПКО (менее 0,5) не является критерием невалидности.
- **Образец О6: отрицательный**, валидный (соответствуют всем критериям валидности таблицы 5). Отрицательные результаты при определении концентраций ИФН-γ вполне допустимы и не являются ошибкой эксперимента.
- **Образец О7 – неопределенный результат** (т.н. «серая зона»). Данные эксперимента соответствуют критериям валидности, но сама разница концентраций ИФН-γ между лунками Т-АНТИГЕН и ОКО (8,7 пг/мл) не настолько велика, чтобы отнести его к положительному, но все же достаточно велика, чтобы считать образец «сомнительным» (см. таблицу 5).
- **Образец О8 – невалидный результат**, поскольку расчетная концентрация ИНФ-γ в образце ОКО превышает 100 пг/мл (налицо неспецифическая выработка интерферона лимфоцитами). Кроме того, концентрация ИНФ-γ в лунке Т-антигена превышает концентрацию в лунке ОКО менее, чем на 25% (таблица 5).
- **Пациент 12 - результат невалидный**: значения в лунках ОКО и Т-АНТИГЕН соответствуют отрицательному результату, но ПКО показал слишком низкий сигнал (таблица 1, лунка F6), что является критерием невалидности для отрицательных образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ: если в постановке отсутствует ПКО (для конкретного образца или всех), то такая постановка не считается невалидной, это обстоятельство игнорируется.

Полученные результаты и их интерпретация отображается в виде:

a) Таблицы результатов;

b) Печатной формы заключения.

На рисунке 24 изображена вкладка **Анализ** с результатами исследования. На вкладке расположены:

- Калибровочная кривая;
- Таблица значений калибровочных образцов;
- Таблица критериев валидности;
- Таблица результатов исследования с результатами для образцов;
- Кнопка **Сохранить в Excel** с возможностью дальнейшей печати из Excel;
- Кнопка **Печатать заключение поименно** открывает страницу с формой печати результатов по каждому пациенту;
- Кнопка **Печатать заключение списком** открывает страницу с формой печати всех результатов в одной таблице.
- Кнопка **Назад** возвращает к вкладке Данные (аналогично можно переключаться между вкладками через значки в верхней части вкладки, см. рис. 17).

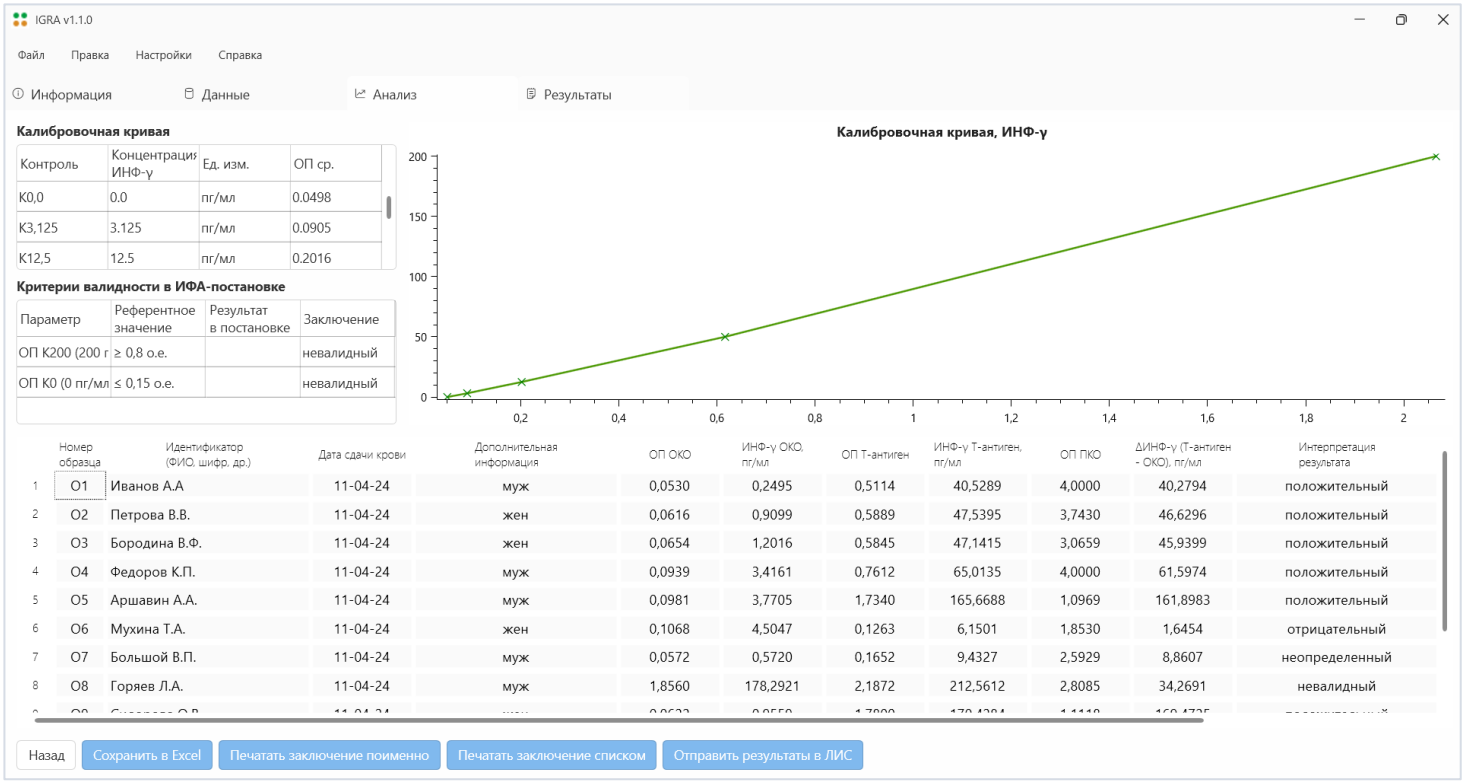

Рис. 24. Вкладка «Анализ» с результатами исследования

4.4.4 Вкладка «Результаты»

Во вкладке выводится шаблон документа с результатами исследования для сохранения в файл и дальнейшей распечатки.

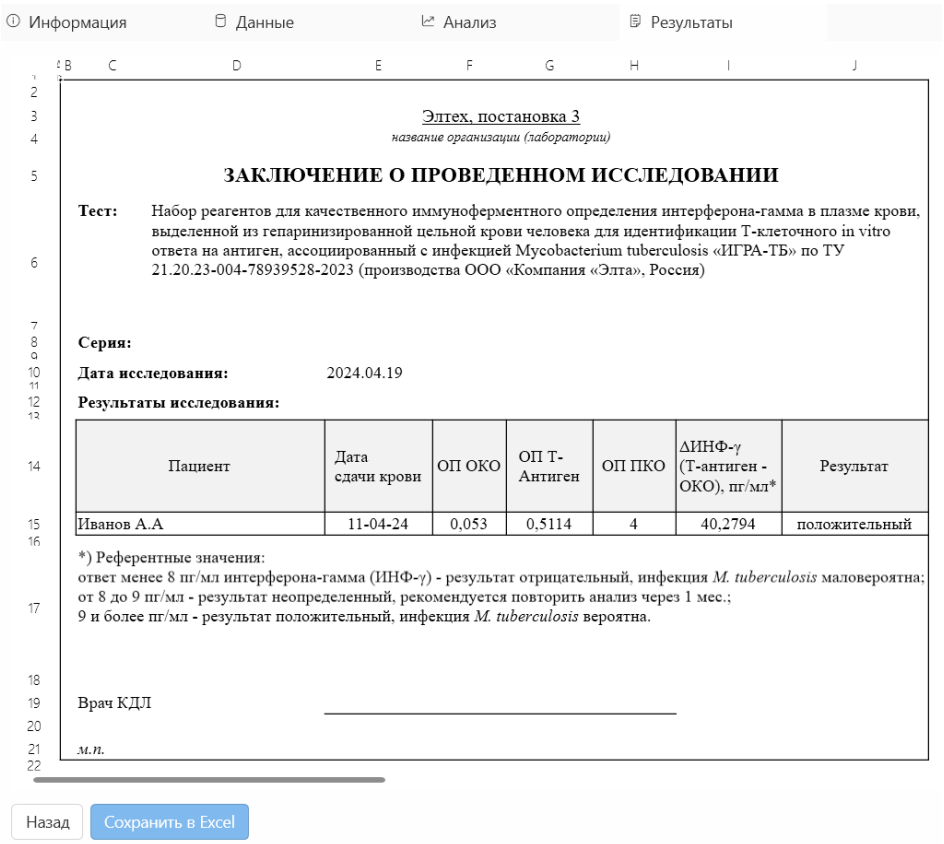

Рис. 25. Печать результатов поименно с возможностью сохранения в Эксель.

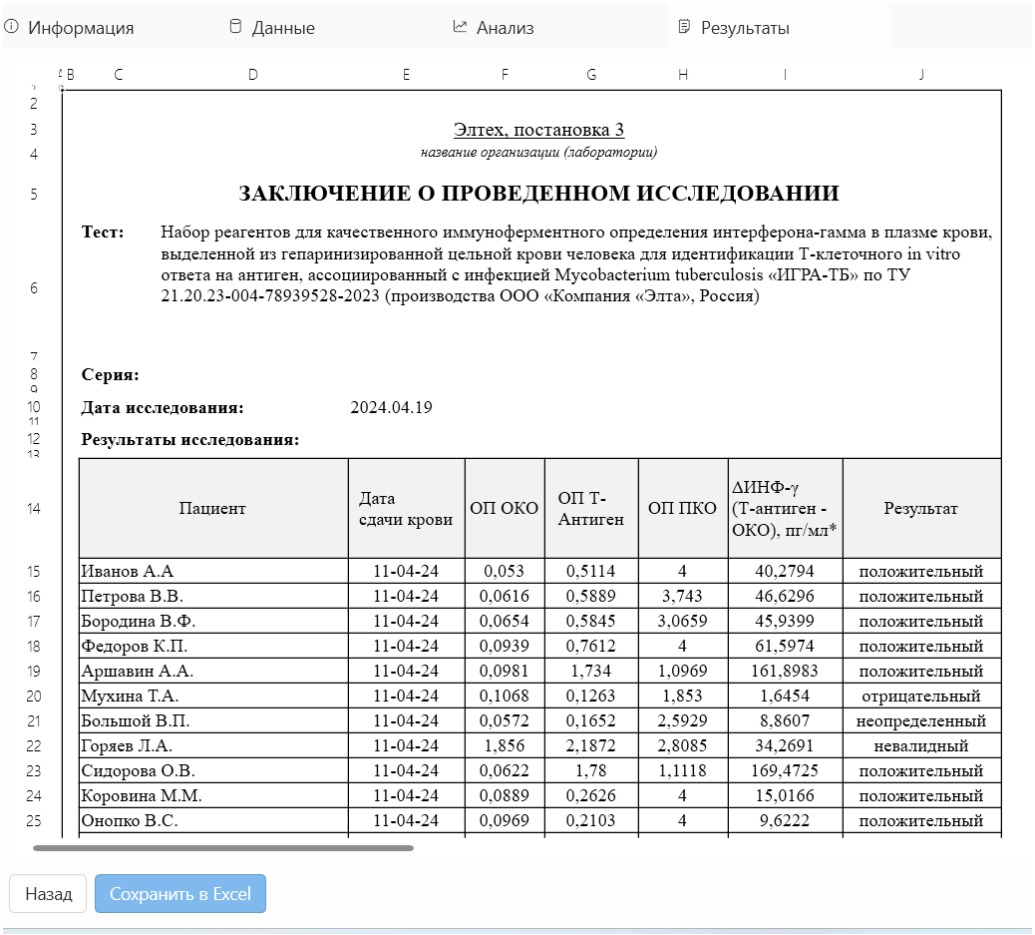

Рис. 26. Печать результатов списком с возможностью сохранения в Эксель.