

Розділ 8

ДІАГНОСТИКА ІНФЕКЦІЙНИХ АГЕНТІВ, ЩО ПЕРЕДАЮТЬСЯ ЧЕРЕЗ КРОВ

ЗМІСТ

8.1. Загальні принципи	265
8.1.1. Первинні аналізи	265
8.1.2. Підтверджувальні, або верифікаційні дослідження	266
8.1.3. Взяття зразків крові для аналізів	266
8.2. Серологічні аналізи.....	266
8.2.1. Алгоритми дій: загальні принципи для первинних серологічних аналізів на віруси і на сифіліс... 266	
8.2.2. Принципи виконання серологічних аналізів на віруси	267
8.2.3. Первинні аналізи на предмет зараження сифілісом	267
8.3. Підтвердження аналізів зразків, що дали позитивні результати у серологічних тестах.....	267
8.3.1. Передача зразків на підтверджувальні аналізи	267
8.3.2. Антиген гепатиту В.....	268
8.3.3. Антитіла анти-НСV.....	268
8.3.4. Антитіла анти-ВІЛ	269
8.3.5. Сифілітичні антитіла	270
8.4. Аналізи з використанням методик молекулярної біології	270
8.4.1. Первинні аналізи NAT в окремих донаціях	271
8.4.2. Первинні аналізи NAT на матеріалі об'єднаних у пул зразків багатьох донорів.....	271
8.4.3. Загальні принципи організації роботи лабораторії молекулярної біології.....	272
8.4.4. Вимоги до приміщення та обладнання лабораторії аналізів плазми методами молекулярної біології (якщо аналізи виконуються мануальними або напівавтоматичними методами)	272
8.4.5. Матеріал для аналізів NAT	272
8.4.6. Проведення молекулярних аналізів: підготовчі дії.....	273
8.4.7. Постійний зовнішній контроль якості	273
8.4.8. Підтверджувальні аналізи для донорів без серологічних маркерів із позитивними результатами тестів NAT	273

8.1. Загальні принципи

До обов'язків ЗСК у сфері діагностики інфекційних агентів входить проведення у донорів і кандидатів у донори аналізів на маркери вірусного гепатиту типу В і С (HBV та HCV), вірусів імунодефіциту людини (ВІЛ-1 та ВІЛ-2), а також маркери сифілісу. На підставі результатів цих аналізів від здачі крові мають бути відсторонені ті особи, кров яких може бути джерелом зараження реципієнтів крові та її компонентів. Тому вищезазначені аналізи проводяться для кожного донора під час кожного взяття крові та її компонентів.

Для визначення маркерів вищезгаданих збудників захворювань слід застосовувати тести, що зареєстровані в Україні, а також пройшли у відповідному органі експертизу на предмет їх придатності для досліджень (відповідна чутливість, специфічність тощо).

Якщо лабораторія, в якій проводяться аналізи донорів, виконує також і діагностичні аналізи, то з огляду на велику кількість високореактивних позитивних зразків крові, діагностичні аналізи повинні бути відокремлені у часі від скринінгових аналізів донорів.

Аналітична чутливість тест-системи DIA-HBV згідно з рекомендаціями 2-го Міжнародного стандарту HBsAg (NIBSC Велика Британія, кд 00/588) має складати 0,12 МО/мл; аналітична чутливість тест-системи DIA-HIV-Ag/Ab за 1-м Міжнародним стандартом антигену HIV 1 р 24 (NIBSC, кд 90/636) має складати 0,7 МО/мл, за антигеном HIV 1 р 24 (ABI, США) — 2,5 пкг/мл. Діагностична чутливість тест-систем для тестування донорської крові на гепатити В, С, ВІЛ-1, ВІЛ-2, сифіліс має становити 100%. Специфічність тест-систем при тестуванні на стандартних панелях негативних сироваток повинна становити 100%. Аналізи мають проводитися згідно з інструкцією, що додається до набору реактивів.

Виробник тестів повинен надати сертифікат якості та документи, які містять результати контрольних аналізів даного тесту.

Перед застосуванням усі тести мають пройти випробування згідно з їх призначенням. Крім того, випробування має пройти усе обладнання й апаратура, яку періодично слід калібрувати та обов'язково залучати до її огляду представників сервісної служби. Усі нові методики та їх модифікації також мають пройти випробування перед їх упровадженням у повсякденну роботу.

Особливу увагу слід приділяти питанням підготовки персоналу, оцінці компетентності осіб, які ці навчання проводять. Особливо важливим є моніторинг умов зберігання тестів та інших матеріалів, необхідних для виконання аналізів. Дотримання цих умов має бути підтверджене відповідними документами.

Суттєвим є дотримання критеріїв придатності тесту. Негативний і позитивний контроль (ці реагенти входять до складу набору реактивів) слід використовувати для кожної пластинки або серії визначень. Результати контролю слід звіряти з критеріями, зазначеними у супровідній документації.

До зразків крові, результати аналізів яких на початку виявились реактивними, слід застосувати повторне двократне тестування тим самими методом (якщо тільки виробник у супровідній документації не рекомендує діяти інакше). Якщо якийсь із результатів повторного аналізу оцінений як позитивний, таку донорську кров слід визнати повторно-позитивною і зразок крові з цієї донорської крові необхідно передати для підтвердження в лабораторію, яка виконує підтверджувальні аналізи. Таку дозу крові або компонентів не можна використовувати для трансфузій.

8.1.1. Первинні аналізи

Первинні аналізи виконуються за допомогою серологічних методик та методик молекулярної біології (NAT — Nucleic Acid Test).

1. Носіїв вірусу гепатиту В ідентифікують шляхом виявлення HBsAg методами ІФА чи ІХЛА, та/або ДНК HBV.

2. Носіїв вірусу гепатиту С ідентифікують шляхом виявлення антитіл анти-HCV методами ІФА чи ІХЛА та/або РНК HCV.

3. Носіїв вірусу ВІЛ ідентифікують шляхом виявлення антитіл анти-ВІЛ-1, ВІЛ-2 методами ІФА чи ІХЛА та/або РНК ВІЛ.

4. Осіб, заражених сифілісом, ідентифікують шляхом виявлення антитіл до антигенів блідої спірохети методами ІФА або ІХЛА.

Первинні (скринінгові) аналізи з використанням серологічних методик в імуноферментному чи хемолюмінісцентному аналізах виконуються в усіх ЗСК.

Первинні аналізи з використанням методик NAT можуть виконуватися ЗСК за наявності необхідного обладнання та тест-систем.

8.1.2. Підтверджувальні, або верифікаційні дослідження

Позитивні результати первинних аналізів вимагають виконання досліджень, які б підтверджували специфічність цих результатів, або додаткових аналізів, та дозволили б точніше визначити статус донора. Такі аналізи слід проводити як для донорів резерву, так і для кадрових донорів.

Сфера підтверджувальних аналізів для різних окремих маркерів різна. Вона може змінюватися залежно від рівня медичних знань стосовно вірулентності цих збудників. Рішення щодо сфери підтверджувальних аналізів, які мають бути проведені для донора, ухвалює відповідна лабораторія і здійснює ці аналізи належним чином, щоб на їх підставі можна було вирішити подальшу долю донора.

Підтвердження результатів первинних аналізів здійснюють для всіх донорів із повторнореактивними результатами серологічних (первинних) тестів, що виявляють:

- HBsAg — шляхом виконання тесту нейтралізації та ДНК HBV (аналізи виконує ЗСК або інша профільна лабораторія);
- анти-HCV — шляхом виявлення РНК HCV (аналізи виконує ЗСК або інша профільна лабораторія);
- анти-ВІЛ — шляхом виявлення РНК ВІЛ та підтвердження специфічності антитіл тестом типу Western Blot (аналізи виконує лабораторія в ОЦПБС);
- сифілітичні антитіла — шляхом підтвердження специфічності антитіл (РІТ, РІФ, аналізи виконує референс-лабораторія ШВД).

8.1.3. Взяття зразків крові для аналізів

Зразки крові для аналізів інфекційних агентів мають братися з венепункції, з якої проводиться донація, під час або після її закінчення в одноразові пробірки. Об'єм плазми має бути достатнім для виконання всіх вірусологічних аналізів і для виготовлення архівних зразків. Слід зберігати по 1 зразку з кожної донації, щоб кінцевий об'єм становив щонайменше 1 мл; необхідно, щоб ці зразки могли бути легко ідентифіковані і швидко знайдені в морозильниках. Слід також прагнути зберігати зразки таким чином, щоб у випадку взяття одного з них, інші не розморозилися. Заморожені зразки мають зберігатися щонайменше 2 роки за температури від -30 до -40 °C у морозильних камерах, які систематично проходять контроль та випробування. Архівувати слід усі донації, що показали позитивні результати серологічних тестів. Зразки плазми для аналізів NAT та для підтвердження аналізів у ЗСК слід заготовляти у вакуумні пробірки з EDTA та розподільчим гелем і в них же доставляти на дослідження (такі пробірки спеціально призначені для вірусологічних аналізів за методиками молекулярної біології). Пробірки повинні забезпечувати стабільність генетичного матеріалу вірусу на період від моменту взяття до моменту закінчення аналізів. Лабораторія, що виконує вірусологічні аналізи, зобов'язана визначити і дотримуватись певних умов (час і температура), в яких мають зберігатися і транспортуватися зразки. Ці умови мають узгоджуватися з рекомендаціями виробників тестів, які застосовуються для виявлення генетичного матеріалу вірусів. Дотримання цих умов має підтверджуватися відповідними протоколами. Слід зазначити, що рекомендації стосовно зберігання і транспортування зразків, розроблені лабораторією молекулярної біології, можуть різнитися для окремих постачальників. Ці рекомендації залежать від відстані та способу транспортування і частоти доставки зразків. Слід уникати заморожування й розморозування зразків. Категорично заборонене багаторазове заморожування і розморозування зразків.

У разі заготівлі зразка у невідповідну пробірку або недостатнього об'єму, допускається взяти плазму або сироватку для аналізів інфекційних агентів із зразків, призначених для інших аналізів, або безпосередньо з контейнерів.

8.2. Серологічні аналізи

8.2.1. Алгоритми дій: загальні принципи для первинних серологічних аналізів на віруси і на сифіліс

Після отримання позитивного результату серологічного первинного тесту, який виявляє маркери вірусів, слід наступного дня (якщо зразки є свіжими) або в той самий день (якщо зразки були взяті

напередодні) знову провести той самий тест на матеріалі того самого зразка крові донора, у двох повтореннях. Якщо в обох повтореннях отримано негативний результат, донора слід зарахувати у групу без серологічних маркерів. Зразок такої плазми слід проаналізувати за методикою NAT.

Якщо результат хоча б одного з повторень первинного тесту дорівнює/перевищує значення *cutoff*, то його визначають як повторнореактивний. Результати досліджень таких донорів повинні бути направлені на підтвердження згідно з принципами, описаними нижче (пп. 8.3, 8.3.1–8.3.4, табл. 8.1–8.3).

Якщо визначення на матеріалі того самого зразка виконувалися багаторазово, то документація має містити результати всіх визначень, а також інформацію про те, котрий саме результат визнано остаточним, і опис подальших дій.

Кров та її клітинні компоненти, заготовлені від донорів із повторнореактивними результатами первинного тесту, мають бути знищені. У випадку донації з повторнореактивним результатом первинного тесту на сифіліс — плазму також необхідно знищити.

У разі підтвердження зараження вірусом ВІЛ за відсутності ідентифікаційного коду, слід вказувати також ім'я, по батькові та адресу донора.

8.2.2. Принципи виконання серологічних аналізів на віруси

Первинні аналізи з використанням серологічних методів, призначених для виявлення окремих вірусних маркерів, слід виконувати чітко за інструкцією виробника застосовуваних реактивів. Результати інтерпретувати також слід згідно з інструкцією виробника.

У усіх ЗСК, де проводяться вірусологічні аналізи з використанням цього тесту, всі серії первинних аналізів мають доповнюватися позитивним контролем. Лабораторія аналізів інфекційних агентів має мінімум двічі на рік брати участь у міжлабораторних програмах якості аналізів.

У серологічних аналізах маркерів вірусів методом ІХЛІА не діє «сіра зона». Усі зразки, у яких показник S/CO перевищує або дорівнює 1, слід визнати реактивними, тоді як зразки з показником S/CO < 1 слід визнати негативними.

8.2.3. Первинні аналізи на предмет зараження сифілісом

Первинні аналізи на предмет зараження сифілісом мають на меті виявлення в сироватці донорів антитіл, які свідчать про зараження блідою спірохетою. Такі аналізи роблять на матеріалі зразка, взятого під час донації.

Після отримання повторнореактивного результату первинного тесту кров, клітинні компоненти та плазму, що походять від донора з підозрою на зараження, слід знищити. Персональні дані донора слід надіслати до ШВД.

8.3. Підтвердження аналізів зразків, що дали позитивні результати у серологічних тестах

Підтвердження аналізів здійснюються для зразків плазми донорів із повторнореактивними результатами первинних тестів. Мета таких аналізів — підтвердження або виключення зараження. Для вірусу ВІЛ такі аналізи здійснює ОЦПБС. Для вірусів гепатиту С і гепатиту В допускається виконання підтверджувальних аналізів на РНК HCV та ДНК HBV у ЗСК та інших профільних лабораторіях. Підтверджувальні аналізи на предмет зараження сифілісом виконує серологічна лабораторія ШВД.

Вказівка «повторний контроль за 12 місяців» означає, що цей донор через 12 місяців має пройти контроль в ОЦПБС.

8.3.1. Передача зразків на підтверджувальні аналізи

ЗСК має направляти зразки на підтверджувальні аналізи з дотриманням відповідних умов. До місця призначення зразки мають доставлятися в замороженому стані. Особа, яка отримує надісланий матеріал на підтвердження результатів, у супровідній документації повинна описати стан, у якому одержані зразки.

8.3.2. Антиген гепатиту В

Після отримання позитивного результату в первинному тесті слід діяти згідно з рекомендаціями, викладеними в таблиці 8.1. Для підтвердження повторнореактивного результату слід виконати аналізи за допомогою спеціального набору реактивів, який називається тестом підтвердження. Результат інтерпретувати згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Якщо в тесті підтвердження антиген не вступає в реакцію нейтралізації, то, найімовірніше, в первинному тесті було отримано неспецифічні реакції. У такому разі слід провести аналіз ДНК HBV в окремій донації (якщо цього не було виконано); у разі позитивного результату — донор підлягає постійній дискваліфікації; якщо ж результат негативний — донора слід відсторонити від здачі крові на 12 місяців, доки не зникнуть неспецифічні реакції. Цей результат може бути обумовлений недавнім щепленням донора вакциною, яка містить антиген HBs; така реакція може негативуватись через тиждень, хоча тривалість перебування у кровообігу антигену HBs із вакцини на сьогодні остаточно не встановлена: вона може залежати від індивідуальних чинників щепленої людини, від різновиду вакцини тощо. Тому позитивні результати тесту HBsAg, що підтверджуються тестом нейтралізації, при негативних результатах аналізу ДНК HBV у донора, який нещодавно пройшов щеплення, слід завжди аналізувати індивідуально.

Якщо неспецифічні реакції тримаються довше — можна раз на рік здійснювати контроль досліджень цього донора.

Таблиця 8.1

Обов'язкові дії після виявлення в первинному тесті позитивного результату HBsAg

Аналізи у ЗСК		Підтверджувальні аналізи у ЗСК		Дії з донором
Результат повторного тесту	Дії з кров'ю та її компонентами	Вірусологічні аналізи	Результат	
Негативний/ Негативний	Допустити до використання		—	Донор не є носієм HBV, може здавати кров
Реактивний/ Реактивний або Реактивний/ Негативний	<ul style="list-style-type: none"> Знищити клітинні компоненти Помістити всі доступні зразки і контейнери з плазмою у безпечне місце до закінчення підтверджувальних дій або до дискваліфікації донора, після чого контейнери знищити Якщо результати підтверджувальних аналізів указують на зараження HBV — виконати аналіз ДНК HBV на матеріалі нинішньої та попередніх донацій 	Виконати тест підтвердження на матеріалі того самого зразка	Позитивний	Імовірно, донор є носієм HBV, якщо тільки не сталася помилка щодо донора або реактивний результат HBsAg не спричинений щепленням. З'ясувавши обидві ці можливості, якщо донор є носієм вірусу — ухвалити рішення про постійну дискваліфікацію
			Такий, що не піддається нейтралізації	Донор не є носієм HBV, оскільки в нього не виявлено ДНК HBV. Донор повинен бути відсторонений від здачі крові на 12 місяців. Після закінчення цього періоду слід виконати повторні аналізи HBsAg і ДНК HBV з окремої донації. До здачі крові донора можна допустити після отримання негативних результатів. Якщо позитивна реакція тримається мінімум 1 рік — ЗСК може виключити донора з Реєстру донорів, не вносячи його однак до списку осіб із підтвердженим зараженням

8.3.3. Антитіла анти-HCV

Для донорів, у яких в первинному тесті виявлено антитіла анти-HCV, слід провести підтверджувальні аналізи. Позитивні результати аналізів РНК HCV свідчать, що донор заражений вірусом і повинен бути дискваліфікований на постійний термін у всіх ЗСК.

У випадку, коли додатковий тест дає сумнівний результат, донор потребує подальшого нагляду, який має проводитися кожні 12 місяців, та тимчасового відсторонення від здачі крові. У випадку

невиявлення РНК HCV і отримання упродовж 1 року повторнореактивних результатів серологічних тестів та/або сумнівних результатів додаткового тесту, ЗСК може дискваліфікувати донора.

Таблиця 8.2

Обов'язкові дії після виявлення в первинному тесті позитивного результату анти-HCV

Аналізи ЗСК		Підтверджувальні аналізи в ЗСК		Дії з донором
Результат повторного тесту	Дії з кров'ю та її компонентами	Результат тесту РНК HCV	Результат додаткового тесту	
Негативний/ Негативний	Допустити до використання	–		Донор не є носієм HCV, може здавати кров
Реактивний/ Реактивний або Реактивний/ Негативний	<ul style="list-style-type: none"> Знищити клітинні компоненти Помістити всі доступні зразки і контейнери з плазмою у безпечне місце — до закінчення підтверджувальних результатів або до дискваліфікації донора, після чого контейнери знищити Якщо результати підтверджувальних аналізів негативні — знищити збережені контейнери з плазмою 	Позитивний	Не виконується	Донор є носієм HCV. Має бути дискваліфікований постійно і направлений до лікаря-терапевта
		Негативний	Позитивний	Має бути дискваліфікований постійно і направлений до лікаря-терапевта
			Сумнівний	Можливо, донор є носієм HCV. Слід дискваліфікувати його на 12 місяців, після чого повторити первинний тест. Якщо реактивний результат цього тесту та/або сумнівний результат додаткового тесту виявляється упродовж 1 року — ЗСК може вилучити донора з Реєстру донорів
Негативний	Найімовірніше, донор не є носієм HCV. Якщо реактивний результат первинного тесту (при негативному результаті додаткового тесту) виявляється упродовж 1 року — ЗСК може вилучити донора з Реєстру донорів. До здачі крові донор може бути допущений після отримання негативних результатів тестів — первинного, РНК HCV та додаткового			

Негативний результат додаткового тесту дозволяє зробити висновок, що донор є здоровим, але з огляду на наявність неспецифічних антитіл його кров не може використовуватися в лікувальних цілях. З огляду на це донор має бути дискваліфікований на 12 місяців. У такій ситуації слід для інформування донора використати бланк за Зразком №8.2. Якщо неспецифічні реакції виявляються й надалі — слід кожні 12 місяців проводити нагляд. До здачі крові донор може бути допущений виключно за умови відсутності в нього РНК HCV, а також невиявлення антитіл анти-HCV у первинному і додатковому тестах.

8.3.4. Антитіла анти-VІІ

Якщо виявлено мінімум 2 реактивні результати первинного тесту, то до ОЦПБС треба надіслати зразок крові для виконання аналізів, які мають підтвердити зараження в тесті Western Blot (WB) та/або РНК ВІІ.

Виявлення РНК ВІІ та/або позитивний результат тесту WB у зразку, надісланому для підтвердження, вказують на зараження вірусом ВІІ.

Якщо РНК ВІІ не виявлено, а результати WB є сумнівними та/або результати первинного тесту є повторнореактивними — донор має проходити контрольні аналізи кожні 12 місяців (починаючи від першого взяття або останніх підтверджених аналізів); приймати рішення стосовно слід відповідно рекомендацій ОЦПБС.

Якщо два наступні аналізи WB, проведені в межах року, дають сумнівні результати, ЗСК може дискваліфікувати донора на постійний термін.

Обов’язкові дії після виявлення в первинному тесті позитивного результату анти-ВІЛ-1, ВІЛ-2

Аналізи у ЗСК		Аналізи в ОЦПБС	Дії з донором
Результат повторного тесту	Дії з кров’ю та її компонентами	Результат Western Blot та/або РНК ВІЛ	
Негативний/ Негативний	Допустити до використання	–	Донор не є носієм ВІЛ, може здавати кров
Реактивний/ Реактивний або Реактивний/ Негативний	<ul style="list-style-type: none"> Знищити всі доступні зразки і контейнери з плазмою і клітинними компонентами 	РНК ВІЛ позитивний / Western Blot негативний, сумнівний або позитивний	Донор є носієм ВІЛ. Має бути дискваліфікований на постійний термін
	<ul style="list-style-type: none"> Якщо результат укаже на зараження ВІЛ — надіслати зразки з попередніх донацій до ОЦПБС Якщо результат підтверджувальних тестів виявиться негативним — знищити всі збережені контейнери та зразки Якщо результат підтверджувальних тестів буде сумнівним — зразки і контейнери слід знищити 	РНК ВІЛ негативний / Western Blot сумнівний або негативний	Найімовірніше, результат первинного тесту — неспецифічний. Діяти слід згідно з рекомендаціями. Якщо реактивний результат оглядового тесту або сумнівний результат тесту Western Blot втримується упродовж 1 року — ЗСК може вилучити донора з Реєстру донорів. Після отримання негативного результату первинного тесту (виконаного щонайменше через 12 місяців після останніх підтверджувальних аналізів) донор може здавати кров (при повторному підтвердженні аналізів в ОЦПБС), якщо тільки результати попередніх аналізів РНК ВІЛ та Western Blot були негативними

Якщо результати тестів WB та РНК ВІЛ є негативними, донор може здавати кров за умови, якщо результат первинного тесту, проведеного ОЦПБС щонайменше через 12 місяців після останньої донації, є негативним. Якщо після цього терміну результат первинного тесту й досі є повторнореактивним, цього донора слід вилучити з Реєстру донорів (п. 8.5). До здачі крові донор може бути допущений після отримання негативних результатів тестів — первинного, РНК ВІЛ та WB.

Працівники ЗСК зобов’язані суворо дотримуватися правила про збереження таємниці. Не можна надавати жодної інформації про виявлене зараження ВІЛ ані донорові, ані іншим особам (це робить виключно ОЦПБС).

8.3.5. Сифілітичні антитіла

Повторнореактивний результат первинного тесту рекомендовано підтверджувати одним із таких тестів: РІТ, РІФ, ТРНА, ФТА або WB.

Після отримання негативних результатів підтверджувальних аналізів і після виключення хворобливого стану — неспецифічно реактивних результатів слід періодично повторювати аналізи. Донор може здавати кров після отримання негативних результатів первинних тестів, якщо раніше він не переніс зараження сифілісом.

8.4. Аналізи з використанням методик молекулярної біології

У ЗСК бажано методами молекулярної біології (NAT) здійснювати аналізи на наявність РНК ВІЛ, РНК HCV та ДНК HBV у плазмі.

Первинні аналізи:

– аналізи на РНК ВІЛ, РНК HCV та ДНК HBV здійснюють для всіх донорів, у яких не виявлено серологічних маркерів зараження HBV, HCV, ВІЛ та сифілісом (аналізи виконують у пулах

плазми або в окремих доніаціях; якщо аналізи NAT виконуються в окремих зразках, то можна їх робити для всіх донорів, не зважаючи на результати серологічних аналізів і на результати АІАТ). Аналізи можна виконувати за допомогою тестів типу Multiplex, які виявляють одночасно генетичний матеріал кількох вірусів. На наступному етапі аналізів установлюють, який саме вірус присутній у зразку.

Молекулярні аналізи також проводять для підтвердження результатів визначень серологічних маркерів анти-ВІЛ, анти-НСV та НВsAg. Такі аналізи завжди виконують в окремих зразках.

Допущені до використання тести повинні мати таку чутливість, щоб застосовувана система молекулярних аналізів виявляла у плазмі донора принаймні 5000 МО РНК НCV/мл і 10000 МО РНК ВІЛ/мл. Випробування чутливості тесту мають бути здійснені за стандартами Всесвітньої організації охорони здоров'я.

Дослідження методами молекулярної біології, призначеними для виявлення окремих маркерів, та інтерпретацію результатів слід проводити, суворо дотримуючись інструкції виробника реактивів. У всіх ЗСК, які виконують аналізи за допомогою даного тесту, кожену серію первинних аналізів треба доповнювати одним і тим самим позитивним контролем.

8.4.1. Первинні аналізи NAT в окремих доніаціях

Якщо тест Multiplex на предмет РНК НCV, ДНК НВV та РНК ВІЛ у донорів, у яких не виявлено серологічних маркерів, дає реактивний результат — слід, по-перше, двічі повторити аналіз за допомогою цього самого тесту, а по-друге, — незалежно від результатів повторних аналізів виконати диференційні тести.

1. Якщо результат обох повторень первинного тесту і результати диференційних тестів є негативними — єдиний реактивний результат первинного тесту слід визнати хибним, а результат аналізу зразка — негативним (не виявлено ні РНК НCV, ні ДНК НВV, ні РНК ВІЛ-1). Компоненти крові цього донора можна кваліфікувати для використання в лікувальних цілях.

2. Донори з позитивними результатами тестів на ДНК НВV, РНК НCV та РНК ВІЛ мають бути дискваліфіковані на постійний термін. Кров та клітинні компоненти, взяті у донорів із позитивними результатами тестів NAT, мають бути знищені.

3. Якщо результати серологічних тестів є повторнореактивними — з донором слід чинити так, як описано у пп. 8.3, 8.3.1–8.3.4.

8.4.2. Первинні аналізи NAT на матеріалі об'єднаних у пул зразків багатьох донорів

Якщо отримано реактивний результат тесту Multiplex у пулі плазми — слід до з'ясування ситуації затримати всі доніації, які увійшли до складу пулу, доки не вдасться ідентифікувати реактивну доніацію й довести, що всі інші доніації, які входили до складу пулу, не містять маркерів інфекції. Після отримання цих відомостей негативні доніації слід передати у використання, а також установити, який саме вірус присутній у плазмі реактивної доніації.

З метою ідентифікування реактивної доніації слід здійснити аналізи окремих зразків за допомогою тесту Multiplex.

1. Якщо результати аналізів окремих зразків є негативними і результати серологічних тестів є негативними також — початковий результат слід визнати псевдореактивним.

2. Якщо результат тесту Multiplex в окремому зразку є реактивним, а результати серологічних тестів є негативними — наявні зразки цієї доніації слід надіслати до ОЦПБС. Слід додати детальну документацію всіх аналізів цієї доніації з усіма повтореннями. У зразках слід виконати аналізи за допомогою тестів NAT, які дозволяють ідентифікувати РНК НCV, ДНК НВV та РНК ВІЛ. Якщо аналізи виконувала лабораторія, яка проводить первинні аналізи NAT, — результати і документацію цих аналізів слід надіслати до ОЦПБС разом зі зразком для підтвердження.

3. Донори з підтвердженими позитивними результатами тестів на ДНК НВV, РНК НCV та РНК ВІЛ мають бути дискваліфіковані на постійний термін. Кров та клітинні компоненти, взяті у донорів із позитивними результатами тестів NAT, мають бути знищені.

4. Якщо результати серологічних тестів є повторнореактивними — з донором слід чинити так, як описано у пп. 8.3, 8.3.1–8.3.4.

8.4.3. Загальні принципи організації роботи лабораторії молекулярної біології

Висока чутливість методів молекулярної біології, схильність нуклеїнових кислот (особливо РНК) до деградації, можливість уповільнення реакції ампліфікації нуклеїнових кислот агентами, наявними в аналізованому зразку, — ось ті причини, які диктують необхідність суворого дотримання чітких правил поведінки в лабораторії молекулярної біології.

Аналізи має виконувати висококваліфікований персонал; недопустимо, щоб аналізи робили працівники з інших лабораторій. Під час проведення аналізу працівників, які його виконують, не можна відривати від цієї роботи для виконання інших дій. Вхід до лабораторії має бути обмежений.

Важливо також дбати про якість матеріалу, який надходить на аналізи, бо вже на етапі взяття зразків існує ризик забруднення зразка чужим матеріалом.

Якщо аналізи виконуються мануальними методиками — слід дотримуватися спеціальних рекомендацій про умови щодо приміщення та організації роботи (п. 8.4.4).

8.4.4. Вимоги до приміщення та обладнання лабораторії аналізів плазми методами молекулярної біології (якщо аналізи виконуються мануальними або напівавтоматичними методами)

З огляду на ризик забруднення аналітичного матеріалу фрагментами ДНК або РНК, що залишилися з попередніх реакцій ПЦР або ТМА, необхідно виділити достатню площу у лабораторії та відповідним чином організувати роботу. Рекомендовано, щоб ізолювання генетичного матеріалу та ампліфікація/детекція відбувалися як мінімум у двох окремих приміщеннях. Усі дії слід виконувати в одноразових рукавичках без тальку, оскільки тальк є абсолютним переносником генетичного матеріалу та ензимів, які спричиняють деградацію нуклеїнових кислот. Жодні матеріали, реактиви й обладнання не повинні переноситися з приміщення для ампліфікації та детекції генетичного матеріалу до інших приміщень. Рекомендовано також у кожному приміщенні вдягати інший фартух.

Для обробки обладнання й поверхонь столів слід щоденно (перед роботою та після її закінчення) застосовувати 0,5% гіпохлорит натрію або інші дезінфектанти відповідно до вимог виробників. Додатково для очищення поверхонь, обладнання й апаратури можна застосовувати відповідні рідини, наприклад, Aerodesin 2000, DNA-away. Для прибирання приміщень, в яких матеріал перебуває до і після ампліфікації, використовують окремі інвентар.

Приміщення можна провітрювати, відкриваючи вікна, якщо тільки канали кондиціонування або вентиляції доампліфікаційних і післяампліфікаційних приміщень не розміщені поряд або в безпосередній близькості.

8.4.5. Матеріал для аналізів NAT

Матеріалом для аналізів є плазма, отримана зі зразка крові, взятого у вакуумну пробірку, спеціально призначену для аналізів методами молекулярної біології (пробірка має містити EDTA та сепаруючий гель). Застосування закритої системи дозволяє уникнути маніпуляцій, пов'язаних із відокремленням аналітичного матеріалу, адже такі маніпуляції підвищують ризик отримання хибних результатів. Забруднюючим матеріалом можуть бути фрагменти епідермісу, крапельки слини тощо, які можуть походити як від іншого донора, так і від лаборанта. Пробірки з гепарином у ролі антикоагулянту застосовуватися не можуть, оскільки гепарин уповільнює процес ампліфікації нуклеїнових кислот.

Об'єм плазми у пробірці має відповідати вимогам тих тестів, які застосовуються в аналізах NAT. Слід також враховувати необхідність повторних аналізів та необхідність залишати плазму для архівування. До моменту виконання всіх оглядових аналізів NAT вихідні пробірки слід зберігати у холодильнику. Якщо зразки мають транспортуватися до місця, в якому буде здійснюватися визначення, — транспортування має відбуватися при температурі холодильника (2–6 °C) або ж у замороженому стані, якщо зразки були раніше заморожені. Транспортний контейнер слід обладнати термометром, для того щоб відповідальна особа, яка доставляє зразки, могла на супровідному формулярі зафіксувати початкову температуру, а відповідальна особа, яка зразки приймає, — кінцеву. Протоколи контролю температури під час транспортування зразків слід передати в архів.

Зразки для аналізів не повинні багаторазово заморожуватися і розморожуватися: кожне розморожування спричиняє падіння концентрації вірусу у плазмі. Цей факт слід враховувати, плануючи

роботу; треба також зважати, що у випадку отримання в пулі плазми реактивного результату неминучими будуть значні часозатратні аналізи для ідентифікації позитивної донації. Аналізи мають бути завершені не пізніше ніж через 5 днів після взяття зразка, а у випадку заморожування зразка після взяття — протягом 5 днів із моменту розмороження.

8.4.6. Проведення молекулярних аналізів: підготовчі дії

Зразки, що отримуються для аналізів, мають супроводжуватися відповідною документацією, яка містить дату їх виготовлення, інформацію про кількість зразків, доставлених для аналізів, номери надісланих зразків (вони мають відповідати номерам донацій) та підпис особи, відповідальної за документацію. Треба перевірити відповідність документації отриманим зразкам і, якщо все співпадає, підтвердити це підписом.

Прийом зразків на аналізи має бути підтверджений протоколом, який містить дату отримання зразків, їх кількість, можливі зауваження та підпис відповідальної особи, яка приймає зразки. Якщо аналізи або пулювання з подальшими аналізами NAT не планується проводити одразу, то, залежно від стану плазми і запланованого часу початку аналізів, зразки слід помістити в холодильник (температура 2–6 °С) або у морозильник (температура мінімум –20 °С). Якщо зразки перебувають у морозильнику, то перед виконанням аналізів їх слід розморозити у холодильнику або при кімнатній температурі. Перш ніж починати піпетування, треба довести плазму до кімнатної температури.

Пробірки з плазмою слід належним чином підготувати до аналізів: здійснити візуальний контроль їх стану, зовнішнього вигляду плазми, розташування гелевого бар'єра. Недостатньо відцентрифуговані пробірки і пробірки з вираженим гемолізом слід вилучити. Якщо у пробірці є великі видимі згустки — їх можна вилучити з пробірки за допомогою одноразової піпетки (для кожної пробірки — окрема піпетка). Усі помічені аномалії мають бути зафіксовані у відповідному протоколі.

8.4.7. Постійний зовнішній контроль якості

Лабораторії, що виконують для донорів аналізи за методикою NAT, повинні постійно моніторити результати і якість своєї роботи шляхом:

- використання в кожній серії аналізів позитивного контрольного зразка;
- заповнення списку підтверджених позитивних результатів, разом із результатами інших аналізів, проведених для цих донорів.

Результати цих аналізів слід заносити у відповідні протоколи.

8.4.8. Підтверджувальні аналізи для донорів без серологічних маркерів із позитивними результатами тестів NAT

Підтверджувальні аналізи для донорів без серологічних маркерів, із позитивними або сумнівними результатами тестів NAT на ВІЛ-1 виконує ОЦПБС.

Метою підтверджувальних аналізів у донорів із виявленою РНК ВІЛ, але без виявлених антитіл, є підтвердження у нинішньому зразку і в повторно взятому зразку наявності РНК вірусу, а також підтвердження появи в донора відповідних антитіл. Аналіз антитіл у черговому зразку має бути спершу виконаний у ЗСК, і результат його має супроводжуватися направленням на підтвердження цих аналізів.

Таблиця 8.4

Сфера підтверджувальних аналізів для донорів без серологічних маркерів, із позитивними або сумнівними результатами тестів NAT

Вірус	Аналізи, що виконуються в ОЦПБС*		Мета аналізів
	Аналізовані зразки	Сфера аналізів	
ВІЛ	Зразок, узятий з контейнера із плазмою з донації РНК ВІЛ(+)/анти-ВІЛ(-)	РНК ВІЛ	Підтвердження результату і виключення можливості помилки щодо донора
	Зразок, узятий після виклику донора	РНК ВІЛ та антитіла анти-ВІЛ: EIA, WB	