

# **MEDYCZNE ZASADY POBIERANIA KRWI, ODDZIELANIA JEJ SKŁADNIKÓW I WYDAWANIA, OBOWIĄZUJĄCE W JEDNOSTKACH ORGANIZACYJNYCH PUBLICZNEJ SŁUŻBY KRWI**

## **Diagnostyka czynników zakaźnych przenoszonych przez krew**

### 1.1 Zasady ogólne

Do obowiązków RCKiK w zakresie diagnostyki czynników zakaźnych należy badanie u krwiodawców i kandydatów na krwiodawców znaczników wirusowego zapalenia wątroby typu B i C (HBV i HCV), ludzkich wirusów upośledzenia odporności (HIV-1 i HIV-2) oraz znaczników zakażenia kiłą. Na podstawie wyników tych badań eliminuje się dawców, których krew może być źródłem zakażenia chorych - biorców krwi i jej składników. Dlatego wyżej wymienione badania przeprowadza się u każdego krwiodawcy podczas każdego pobrania krwi i jej składników.

Dawców wielokrotnych, którzy nie oddawali krwi przez okres ponad 2 lata należy traktować jak dawców pierwszorazowych.

#### 1.1.1 Badania przeglądowe

Badania przeglądowe przeprowadza się technikami serologicznymi i technikami biologii molekularnej (NAT – Nucleic Acid Tests).

1. Nosicieli wirusa HBV identyfikuje się poprzez wykrycie antygeny HBs (HBsAg) lub/i DNA HBV.
2. Nosicieli wirusa HCV identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał anti-HCV lub/i RNA HCV.
3. Nosicieli wirusa HIV identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał anti-HIV1/2 lub/i RNA HIV.
4. Osoby zakażone kiłą identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał do antygenów krętka bladego.

Badania przeglądowe technikami serologicznymi wykonywane są we wszystkich Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa.

Badania przeglądowe technikami NAT mogą być wykonywane przez RCKiK po uzyskaniu od IHiT odpowiedniego zaświadczenia.

### 1.1.2 Badania weryfikacyjne markerów wirusowych

Dodatnie lub wątpliwe wyniki badań przeglądowych podlegają weryfikacji poprzez wykonywanie badań potwierdzających ich swoistość lub badań uzupełniających pozwalających na dokładniejsze określenie statusu wirusologicznego dawcy.

Zakres badań weryfikacyjnych jest różny dla poszczególnych markerów. Może on ulegać zmianie w zależności od stanu wiedzy na temat zakażenia danym wirusem. O zakresie badań weryfikacyjnych wykonywanych u dawcy decyduje laboratorium referencyjne i prowadzi je tak by były wystarczające do podjęcia decyzji co do dalszych losów dawcy.

Weryfikację wyników badań przeglądowych prowadzi się:

1. u dawców z dodatnimi wynikami serologicznych testów przeglądowych:
  - u dawców wielokrotnych z dodatnimi wynikami testu HBsAg (badania prowadzi RCKiK lub laboratorium referencyjne w IHiT, jeśli RCKiK tak zdecyduje)
  - u dawców wielokrotnych z przeciwciałami anti-HCV (badania prowadzi laboratorium referencyjne w IHiT)
  - u dawców wielokrotnych i pierwszorazowych z przeciwciałami anti-HIV (badania prowadzi laboratorium referencyjne w IHiT)
2. u dawców pierwszorazowych i wielokrotnych bez markerów serologicznych, u których wyniki testu NAT w kierunku DNA HBV, RNA HCV, RNA HIV są dodatnie (badania prowadzi IHiT).

### 1. 1. 3 Pobieranie krwi na badania

Próbki krwi do badań czynników zakaźnych muszą być pobierane z tego samego wkłucia, z którego pobierana jest donacja, w trakcie lub po zakończeniu donacji, do nowych, uprzednio nie używanych, jednorazowych probówek. Objętość materiału musi być wystarczająca do wykonania wszystkich badań wirusologicznych i do przygotowania próbek archiwizacyjnych. Należy przechowywać po dwie próbki archiwizacyjne z każdej donacji, tak aby końcowa objętość wynosiła przynajmniej 1 ml z możliwością ich pełnej identyfikacji i szybkiego odszukania w zamrażarkach. Należy dążyć do tego by próbki były tak przechowywane, aby w przypadku wyjęcia jednej z nich pozostałe nie uległy rozmrożeniu. Zamrożone próbki powinny być przechowywane przynajmniej 10 lat w temp  $-25^{\circ}\text{C}$  w zamrażarkach podlegających systematycznej walidacji. Archiwizować należy wszystkie

donacje, także te z dodatnimi wynikami testów serologicznych. Próbkę osocza do badań NAT i do badań weryfikacyjnych w IHiT powinny być pobierane i dostarczane w probówkach próżniowych z EDTA i żelem separującym przeznaczonych do badań wirusologicznych technikami biologii molekularnej. Probówki powinny posiadać dokumenty zawierające wyniki badań potwierdzające, że ich użycie zapewnia stabilność materiału genetycznego wirusa przez 5 dni w temperaturze od +4 do +8°C od momentu pobrania.

Jeżeli od dawcy wymagającego wykonania badań weryfikacyjnych z różnych względów nie pobrano materiału do właściwej próbki lub jeśli nie można jej wykorzystać do tego typu badań, należy ponownie wezwać dawcę, pobrać 2 próbki krwi (w tym jedna do próbki z żelem) i ponownie wykonać testy przeglądowe.

#### 1.1.4 Algorytmy postępowania

##### 1.1.4.1 Przeglądowe badania serologiczne

Po uzyskaniu dodatniego wyniku testu przeglądowego należy następnego dnia (jeżeli próbki są świeże) lub tego samego dnia w drugim nastawieniu (jeżeli próbki są „odstane”) ponownie wykonać ten sam test, z tej samej próbki krwi dawcy, w dwóch powtórzeniach. Uzyskanie w obu powtórzeniach ujemnego wyniku kwalifikuje dawcę do grupy bez markera serologicznego, a próbkę jego osocza trzeba zbadać techniką NAT. Uzyskanie w jednym lub w obu powtórzeniach wyniku dodatniego wymaga potwierdzenia obecności markera wirusowego w preparatach otrzymanych z danej donacji. Należy w tym celu wykonać taki sam test przeglądowy z próbki pobranej z segmentu drenu. Otrzymanie dodatnich wyników z segmentów drenów potwierdza, że w pojemnikach znajdują się składniki otrzymane z krwi dawcy, u którego podejrzewa się nosicielstwo wirusa. W przypadku otrzymania ujemnych wyników z segmentów drenów pochodzących z pojemników oznaczonych tym samym numerem donacji co próbka krwi, w której stwierdzono wyniki dodatnie, można sądzić, że nastąpiła pomyłka w numerowaniu próbek krwi lub pojemników. Taka sytuacja obliguje do wykonania testu przeglądowego z segmentów drenów wszystkich preparatów krwiopochodnych otrzymanych w danym dniu. Jeżeli badania w segmentach wszystkich drenów dały wyniki ujemne, wszystkie składniki uzyskane z pobrań w danym dniu można dopuścić do użytku. Jeżeli w którymś z segmentów drenów uzyskano wynik dodatni, to tę donację należy traktować jako dodatnią i wdrożyć postępowanie wyjaśniające przyczynę pomyłki. Dawców, u których stwierdzono rozbieżność wyników uzyskanych w próbce krwi / osocza i w próbce z drenu należy ponownie zbadać.

W przypadku kilkukrotnego wykonywania oznaczeń z tej samej próbki, dokumentacja powinna zawierać wyniki wszystkich oznaczeń oraz informację, który wynik uznano za ostateczny i przekazano dalej. Osobno należy odnotowywać wyniki oznaczeń wykonywanych z segmentów drenów.

Wyniki badań u dawców z powtarzalnie dodatnim wynikiem testu przeglądowego podlegają badaniom weryfikacyjnym zgodnie z zasadami opisanymi w punkcie 1.1.2.

Krew i jej składniki komórkowe oraz pojemniki z osoczem od dawców pierwszorazowych z dodatnimi wynikami testu przeglądowego powinny zostać zniszczone. U dawców wielokrotnych należy zniszczyć pełną krew i składniki komórkowe, a pojemniki z osoczem oznakować „nie do transfuzji anty-HCV+” lub „anty-HIV+” lub „HBsAg+” i zabezpieczyć tak by nie mogły być pomyłkowo wykorzystane do przetoczenia. Od dawców wielokrotnych, u których po raz pierwszy wykryto markery serologiczne, należy przesłać do IHiT próbki osocza (pobrane przy obecnej i poprzednich donacjach) oraz wyniki badań. Należy dołączyć informację o pojemnikach z osoczem zabezpieczonych w RCKiK. Jeśli próbki są niedostępne należy przesłać pojemniki z osoczem oraz wyniki badań. Jeżeli w badaniu weryfikacyjnym wykryto materiał genetyczny wirusa lub wynik testów RIBA lub WB jest dodatni, do IHiT należy przysłać pojemnik z osoczem z poprzedniej donacji. W innym przypadku osocze należy zniszczyć.

#### 1.1.4.2 Przeglądowe badania NAT prowadzone w pojedynczych donacjach

Po uzyskaniu dodatniego wyniku testu Multiplex w kierunku RNA HCV, RNA HIV i DNA HBV należy dwukrotnie powtórzyć badanie. Jedno powtórzenie może być wykonane z segmentu drenu. Dopuszcza się też wykonanie testów różnicujących w kierunku HCV, HBV oraz HIV i traktowanie ich jako jednego powtórzenia badania. Jeśli wyniki badań powtórnych są ujemne pierwotny wynik uznać za fałszywie dodatni. Gdy przynajmniej jeden z wyników badań powtórnych jest dodatni wykonać testy różnicujące w kierunku każdego z badanych wirusów (o ile nie były wykonane). Dodatni wynik testu różnicującego dla danego wirusa przy ujemnym wyniku dla pozostałych wskazuje na to, że dawca jest zakażony tym wirusem. Jeśli dawca zakażony jest dwoma (trzema) wirusami, wyniki dwóch (trzech) testów różnicujących będą dodatnie, a jeden (żaden) ujemny. Jeśli wyniki testów różnicujących są ujemne przy dodatnich dwóch powtórzeniach testu Multiplex, wynik testu Multiplex należy uznać za dodatni. Dawcy z dodatnimi wynikami testu przeglądowego podlegają badaniom weryfikacyjnym zgodnie z zasadami opisanymi w rozdziale 8.1.2. Krew i składniki

komórkowe od dawców bez markerów serologicznych, a z dodatnimi/wątpliwymi wynikami testów NAT powinny zostać zniszczone lecz należy zabezpieczyć i odesłać do IHiT wszystkie próbki osocza i pojemniki z osoczem od tych dawców.

#### 1.1.4.3 Przeglądowe badania NAT wykonywane w zlanych w pule próbkach od wielu dawców

Po otrzymaniu dodatniego wyniku NAT w puli osocza należy zidentyfikować dodatnią donację poprzez wykonanie badań w „mniejszych pulach” złożonych z mniejszej liczby próbek, a następnie w pojedynczych donacjach. Jeśli badanie „mniejszych puli” daje wynik ujemny należy powtórzyć badanie puli. Jeśli wynik dodatni nie powtarza się – można zwolnić wchodzące w jej skład donacje. Jeśli wynik puli jest ponownie dodatni należy powtórzyć badania „mniejszych puli”, przesłać próbki i całą dokumentację do IHiT i do czasu wyjaśnienia wyniku zatrzymać wszystkie donacje.

Wyniki badań u dawców z dodatnimi lub wzbudzającymi wątpliwośći wynikami testów przeglądowych NAT należy poddać badaniom weryfikacyjnym zgodnie z zasadami opisanymi w punkcie 8.1. 2 i postępować jak w punkcie 8.1.4.2

#### 1.1. 5. Zawiadomienie dawcy o wynikach badań wirusologicznych

W przypadku uzyskania wyniku dodatniego lub wątpliwego któregośkolwiek z markerów wirusowych lekarz lub inna upoważniona osoba przesyła krwiodawcy listem poleconym wezwanie do stawienia się w RCKiK (wzór nr 1). Przy odbiorze wyników przez dawców wielokrotnych, u których badania weryfikacyjne prowadzono w RCKiK (HBsAg) należy pobrać i przesłać do IHiT próbkę osocza pobraną do próbki do badań metodami biologii molekularnej.

#### Wzór nr 1

Regionalne Centrum Krwiodawstwa

i Krwiolecznictwa

Adres:.....

Pani/Pan: Imię i nazwisko

Data urodzenia:.....

Adres:.....

Zwracamy się z prośbą o **niezwłoczne** zgłoszenie się do Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w .....

lub Terenowego Oddziału RCKiK w.....  
po odbiór wyników badań .

Krwiodawca otrzymuje od lekarza wynik badania, którego odbiór kwituje na kopii. Na wyniku badania powinna być nazwa odczynników (i producent), którymi wykonano badania oraz wartość S/CO (CORatio). Lekarz winien wytłumaczyć krwiodawcy co oznacza ten wynik. Wartość S/CO < 1 oznacza wynik ujemny; wartość S/CO > 1 oznacza wynik dodatni. Prawdopodobieństwo, że u dawcy wykryje się RNA HCV, gdy wartość S/CO w EIA anty-HCV wynosi 1-4 wynosi około 2%. Jeśli wartość S/CO jest > 4 prawdopodobieństwo wykrycia RNA HCV wynosi 60-80%. Podobne zależności (pomiędzy wartością S/CO, a prawdopodobieństwem wykrycia RNA HIV i przeciwciał w teście WB występują przy dodatnich wynikach EIA dla anty-HIV.

Krwiodawca, który został skreślony na stałe lub ma 2-letnią przerwę w oddawaniu krwi, odbierając wyniki powinien również otrzymać skierowanie do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej lub specjalistycznego zakładu ochrony zdrowia (patrz tabele 38-40). Jeżeli krwiodawca nie zgłasza się na wezwanie po odbiór wyników badań lub nie stawia się na dodatkowe badania należy dwukrotnie w odstępie 2 miesięcy, listem poleconym, wysłać zawiadomienia (wzory nr 1 lub 2 odpowiednio).

#### **Wzór nr 2**

Regionalne Centrum Krwiodawstwa  
i Krwiolecznictwa

Adres:.....

Pani/Pan: Imię i nazwisko

Adres:.....

Data badania:.....

Zawiadamiamy, że wyniki przeprowadzonych badań wskazują na konieczność powtórzenia ich. W związku z tym prosimy nie oddawać krwi do czasu przeprowadzenia dodatkowych badań specjalistycznych i zwracamy się z prośbą o zgłoszenie się do RCKiK w .....lub Oddziału Terenowego RCKiK w ..... w terminie..... w celu pobrania próbki do badań kontrolnych.

Każdy dodatni (niepotwierdzony) wynik testu przeglądowego powoduje czasowe odsunięcie krwiodawcy od oddawania krwi, aż do chwili wyjaśnienia wszystkich wątpliwości. Dawcy z dodatnim, ale nie potwierdzonym wynikiem testu przeglądowego, u których takie wyniki utrzymują się ponad 1 rok, mogą być skreśleni z listy krwiodawców na okres 2 lat, ale nie powinni być wpisywani na listę dawców skreślonych na stałe. Skreślenia może dokonać RCKiK lub może zaproponować je IHiT. Dawcy tacy powinni być również kierowani (wraz kompletem badań) do odpowiedniego lekarza/ placówki służby zdrowia, w celu wyjaśnienia nieprawidłowości. Po upływie 2 lat i ponownym zgłoszeniu się, dawcy tacy powinni być traktowani jak pierwszorazowi. Dopuszcza się również kontrolowanie dawcy raz w roku.

## **1.2 Badania serologiczne**

Badania metodami EIA przeznaczonymi do wykrywania poszczególnych znaczników należy wykonywać ściśle według instrukcji producenta używanych odczynników. Interpretacja wyników winna być również zgodna z instrukcją producenta.

Do każdej serii badań przeglądowych należy dołączać tę samą we wszystkich RCKiK wykonujących badania danym testem dodatnią kontrolę. Rodzaj kontroli będzie określać IHiT. Wyniki kontroli należy codziennie wprowadzać do programu komputerowego „Zewnętrzna kontrola jakości”.

### **1.2.1. ANTYGEN HBs**

Po otrzymaniu wyniku dodatniego w teście przeglądowym należy postępować tak, jak przedstawiono w tabeli 38. W celu potwierdzenia dodatniego wyniku należy wykonać badania przy pomocy specjalnego zestawu odczynników zwanego testem potwierdzenia. Interpretacja wyniku musi być zgodna z zaleceniami producenta. Dodatni wynik tego testu na stałe dyskwalifikuje dawcę. Jeśli w teście potwierdzenia antygen nie poddaje się neutralizacji to najprawdopodobniej reakcje otrzymane w teście przeglądowym były nieswoiste. Należy wykonać badanie DNA HBV (o ile nie było wykonane) i jeśli jego wynik jest dodatni to na stałe zdyskwalifikować dawcę; jeśli wynik jest ujemny to zdyskwalifikować dawcę na 6 miesięcy w oczekiwaniu na ustąpienie nieswoistych reakcji. W takiej sytuacji należy skierować do dawcy druk wg wzoru nr 2. Jeżeli nieswoiste reakcje utrzymują się dłużej, można dawcę kontrolować raz w roku lub skreślić zgodnie z zasadami wymienionymi w punkcie 1.1.5.

Dawca, u którego otrzymano dodatni wynik testu potwierdzenia powinien niezwłocznie zostać wezwany do RCKiK. W tym celu należy zastosować odpowiedni druk (wzór nr 1).

Testy potwierdzenia muszą być wykonywane u dawców wielokrotnych; u dawców pierwszorazowych mogą, ale nie muszą być wykonywane.

### **1.2.2. PRZECIWCIAŁA anty-HCV**

Dawcy pierwszorazowi, u których wykryto w teście przeglądowym przeciwciała anty-HCV powinni, po rozmowie z lekarzem działu krwiodawców, zostać skierowani do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej.

U dawców wielokrotnych należy przeprowadzić badania weryfikacyjne w laboratorium referencyjnym IHiT (tabela 39). Dodatnie wyniki badań RNA HCV wskazują, że dawca jest zakażony wirusem i należy go na stałe zdyskwalifikować we wszystkich placówkach krwi w Polsce. Listy dawców, u których wykryto RNA HCV muszą być wysyłane na bieżąco do wszystkich oddziałów terenowych podległych danemu RCKiK oraz działów zapewnienia jakości wszystkich RCKiK, a także do IHiT. Dawca, u którego wykryto RNA HCV powinien niezwłocznie zostać wezwany do RCKiK. W tym celu należy zastosować odpowiedni druk (wzór nr 1). U dawców, u których nie wykryto RNA HCV wykonuje się w IHiT badanie przeciwciał testem uzupełniającym RIBA. Potwierdzenie obecności przeciwciał w teście uzupełniającym (RIBA +), a nie wykrycie RNA HCV wskazuje, że dawca prawdopodobnie przebył zakażenie lecz aktualnie nie ma markerów czynnej replikacji wirusa. Dawca taki powinien zostać skreślony z rejestru na stałe i skierowany do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. W przypadku wątpliwego wyniku testu uzupełniającego, dawca wymaga dalszej obserwacji; do oddawania krwi można dopuścić dawcę wyłącznie w przypadku braku RNA HCV oraz braku przeciwciał anty-HCV wykrywanych testem przeglądowym i testem uzupełniającym. Dawcy z wątpliwymi wynikami testu uzupełniającego powinni zostać poinformowani za pomocą druku wg wzoru nr 2 o potrzebie wykonania dalszych badań i czasowym odsunięciu od oddawania krwi. Utrzymujące się dodatnie wyniki testów serologicznych i wątpliwe wyniki testu uzupełniającego, przy braku RNA HCV przez okres co najmniej 12 miesięcy, upoważniają RCKiK do skreślenia dawcy zgodnie z zasadami opisanymi w punkcie 1.1.5.



Ujemny wynik testu uzupełniającego pozwala sądzić, że dawca jest zdrowy, ale ze względu na obecność nieswoistych przeciwciał jego krew nie może zostać przeznaczona do celów leczniczych. W związku z tym dawca zostaje zdyskwalifikowany na okres 6 miesięcy (lub dłużej – aż do zaniku przeciwciał dających nieswoiste reakcje w teście przeglądowym). W takiej sytuacji należy zawiadamiając dawcę zastosować druk według wzoru nr 2.

### **1.2.3. PRZECIWCIAŁA anty-HIV**

Obowiązujące postępowanie w przypadku stwierdzenia dodatniego wyniku testu przeglądowego przedstawia tabela 40.

Po stwierdzeniu co najmniej dwóch dodatnich wyników testu przeglądowego, do IHiT należy przesłać próbkę krwi w celu wykonania badań potwierdzających zakażenie - test Western Blot (WB) lub/i RNA HIV).

Wykrycie RNA HIV lub/i dodatni wynik testu WB w próbce przesłanej do weryfikacji, wskazują na zakażenie wirusem HIV. Wątpliwy lub ujemny wynik testu WB przy dodatnim wyniku RNA HIV wskazuje na wczesny etap zakażenia.

Jeżeli wynik badania RNA HIV próbki przysłanej do weryfikacji jest ujemny, należy postępować według wskazówek IHiT, który określa termin ponownego przysłania próbki krwi w celu powtórzenia badania RNA HIV i WB. W takim przypadku obowiązuje czasowa dyskwalifikacja dawcy (wzór nr 2). Jeżeli wyniki testów WB i RNA HIV są ujemne i nie ma zaleceń ze strony IHiT, dawca może oddawać krew, gdy wynik testu przeglądowego przeprowadzonego po minimum 3 miesiącach od ostatniej donacji, jest ujemny. Jeżeli po tym okresie wynik testu przeglądowego jest w dalszym ciągu dodatni, należy nadal kontrolować dawcę co 6 miesięcy lub skreślić z listy tak jak to podano w punkcie 1.1.5. Jeśli nie wykryto RNA HIV, a wyniki badań testem WB są wątpliwe, dawca powinien podlegać kolejnym badaniom co 6 miesięcy (licząc od pierwszego pobrania lub ostatniej weryfikacji) lub zastosować się do zaleceń IHiT. Przesyłanie próbek częściej, niż to zaleca IHiT zwiększa koszty badań weryfikacyjnych, a nie jest uzasadnione. Uzyskanie wątpliwego wyniku WB w dwóch kolejnych badaniach, przy ujemnych wynikach RNA HIV upoważnia RCKiK do skreślenia dawcy z Rejestru lub RCKiK może kontynuować badania do uzyskania ujemnych wyników wszystkich testów. Dawcę można dopuścić do oddawania krwi po uzyskaniu ujemnych wyników testów: przeglądowego, RNA HIV i WB.

Jeżeli nie ma kontaktu z dawcą, RCKiK wysła listem poleconym zawiadomienie o konieczności pobrania od niego próbki krwi. W zawiadomieniu nie wolno podawać

przyczyny wezwania (wzór nr 2).

Po uzyskaniu dodatniego wyniku testu potwierdzenia techniką WB lub/i dodatniego wyniku RNA HIV, RCKiK wzywa krwiodawcę listem poleconym do zgłoszenia się (wzór nr 1).

Dyrektor RCKiK lub upoważniony przez niego lekarz rozmawia z krwiodawcą informując go o wykrytym u niego zakażeniu wirusem HIV, udziela wskazówek dotyczących ochrony innych osób przed zakażeniem. Następnie przekazuje go pod opiekę ambulatoryjną placówki służby zdrowia, świadczącej opiekę ambulatoryjną dla osób zakażonych HIV i chorych na AIDS lub odpowiedniego oddziału szpitalnego (patrz koniec rozdziału).

Do IHiT należy przekazać informację, czy dawca, u którego stwierdzono zakażenie był dawcą honorowym czy płatnym, pierwszorazowym czy wielokrotnym oraz informację o losach krwi i jej składników z poprzednich donacji.

Pracowników RCKiK obowiązuje rygorystyczne przestrzeganie tajemnicy, to znaczy, że nie wolno udzielać żadnych informacji o stwierdzonym zakażeniu HIV ani krwiodawcy (robi to wyłącznie dyrektor lub upoważniony przez niego lekarz) ani innym osobom.

Instytut Hematologii i Transfuzjologii na podstawie dodatniego wyniku RNA HIV lub/ i testu WB, wysyła do wszystkich RCKiK zakodowaną informację, zawierającą dane personalne, o skreśleniu na stałe krwiodawcy z Rejestru. RCKiK mają obowiązek przekazywania tej informacji, również zakodowanej, do wszystkich swoich oddziałów terenowych. Działy rejestracji krwiodawców w RCKiK i w oddziałach terenowych są obowiązane do prowadzenia wykazu dawców skreślonych z rejestru i sprawdzania każdego dawcy zgłaszającego się do oddania krwi lub osocza, czy jego nazwisko nie znajduje się w tym wykazie.

### 1.3 BADANIA TECHNIKAMI BIOLOGII MOLEKULARNEJ

W placówkach polskiej służby krwi technikami biologii molekularnej (NAT) bada się obligatoryjnie obecność RNA HCV, RNA HIV i DNA HBV w osoczu. Badani muszą być:

1. Wszyscy dawcy, u których nie wykryto markerów serologicznych zakażenia HCV, HIV, HBV i kiły oraz z aktywnością ALT nie przekraczającą normy dla dawców. Badania wykonuje się w pulach osocza lub w pojedynczych donacjach. Jeżeli badania NAT wykonywane są w pojedynczych próbkach to można je wykonywać u wszystkich dawców bez względu na wyniki serologicznych badań przeglądowych i wyniki ALT. Jeśli w

serologicznych badaniach przeglądowych dodatni wynik nie potwierdza się, próbkę należy włączyć do badania w następnej puli.

2. Dawcy, u których wykryto przeciwciała anti-HIV w teście przeglądowym. Badania wykonuje się w pojedynczych donacjach.
3. Dawcy wielokrotni, u których wykryto przeciwciała anti-HCV. Badania wykonuje się w pojedynczych donacjach.
4. U dawców, których krwinki służą do immunizacji oraz w osoczu dawców immunizowanych, przeznaczonym do produkcji immunoglobulin anti-RhD i anti-HBs dodatkowo wykonuje się badania DNA Parwowirusa B19. Badania wykonuje się w pulach osocza.

Badania te wykonywane są:

- w zwalidowanych i nadzorowanych przez IHiT Pracowniach Biologii Molekularnej w RCKiK, w pojedynczych lub zlanych w pule próbkach osocza dawców;
- w laboratoriach referencyjnych IHiT.

Badania technikami biologii molekularnej wykonuje się przy użyciu testów, które zostały dopuszczone do użycia przez IHiT.

### 1. 3.1. Ogólne zasady organizacji pracowni biologii molekularnej

Wysoka czułość metod biologii molekularnej, wrażliwość kwasów nukleinowych (szczególnie RNA) na degradację oraz możliwość hamowania reakcji namnażania (amplifikacji) kwasów nukleinowych przez czynniki obecne w badanej próbce powodują, że w pracowniach biologii molekularnej konieczne jest przestrzeganie rygorystycznych zasad postępowania.

Badania muszą być przeprowadzane przez wysoko wykwalifikowany personel, nie dopuszczalne jest aby badania przeprowadzały osoby dochodzące z innych pracowni. W trakcie prowadzenia badania osoby je wykonujące nie mogą być odrywane do wykonania innych czynności. Wymagana jest specjalna organizacja pracowni. Wstęp do pracowni powinien być ograniczony tylko do zatrudnionego w niej personelu.

Ważna jest dbałość o jakość otrzymywanego do badań materiału, ponieważ już na etapie pobierania próbek istnieje zagrożenie zanieczyszczenia materiałem od innej osoby.

### 1.3.2 Wymagania lokalowe i sprzętowe pracowni badania osocza metodami biologii molekularnej

Ze względu na możliwość zanieczyszczenia fragmentami DNA lub RNA z innych reakcji, konieczne jest zapewnienie specjalnej organizacji przestrzennej pracowni i odpowiedniej organizacji pracy. Zaleca się, aby: pulowanie (jeśli bada się pule osocza), izolowanie materiału genetycznego i amplifikacja/detekcja odbywały się w oddzielnych pomieszczeniach. Wszystkie czynności należy wykonywać w jednorazowych rękawiczkach beztalkowych, gdyż talk jest doskonałym nośnikiem materiału genetycznego i enzymów degradujących kwasy nukleinowe. Żadne materiały, odczynniki i sprzęty nie mogą być przenoszone z pomieszczenia służącego do amplifikacji i detekcji materiału genetycznego do innych pomieszczeń. Zaleca się także stosowanie w każdym z pomieszczeń innych fartuchów.

Do czyszczenia powierzchni stołów i sprzętu należy używać codziennie, przed i po zakończeniu pracy 0.5% podchlorynu sodu. Dodatkowo można używać do czyszczenia powierzchni, sprzętu i aparatury odpowiednie płyny np. Aerodesin 2000, DNA-away. Pomieszczenia przed i po-amplifikacyjne muszą być sprzątane przy pomocy oddzielnego sprzętu.

### 1.3.3 Materiał do badań NAT

Badanym materiałem jest osocze uzyskane z pobranej próbki krwi do zawierającej EDTA próżniowej probówki z żelem separującym przeznaczonej do badań metodami biologii molekularnej. Dzięki zastosowaniu systemu zamkniętego unika się manipulacji związanych z oddzieleniem materiału do badania, które zwiększają ryzyko uzyskania wyników fałszywych. Materiałem zanieczyszczającym mogą być fragmenty naskórka, kropelki śliny itp., zarówno od innego dawcy jak i osoby opracowującej próbkę. Probówki z heparyną jako antykoagulantem nie mogą być używane, ponieważ hamuje ona proces namnażania kwasów nukleinowych.

Objętość osocza w probówce musi być dostosowana do wymogów testów używanych do badań NAT. Należy uwzględnić konieczność badań powtórnych oraz konieczność pozostawienia osocza do archiwizacji. Do czasu wykonania wszystkich badań przeglądowych NAT wyjściowe probówki należy przechowywać w chłodni.

Próbki do badań nie mogą być wielokrotnie zamrażane i rozmrażane; każde kolejne ich rozmrożenie powoduje spadek stężenia cząstek wirusa w osoczu. Fakt ten trzeba

uwzględnić przy planowaniu pracy, biorąc pod uwagę, że po uzyskaniu w puli osocza wyniku dodatniego konieczne jest wykonywanie czasochłonnych badań by zidentyfikować dodatnią donację. Badania należy zakończyć nie później niż w 5 dni po pobraniu próbki lub jeśli była ona po pobraniu zamrożona w ciągu 5 dni od rozmrożenia.

Pulę osocza przeznaczoną do badań NAT należy przechowywać w temperaturze +4 - +8°C do czasu wykonania badania i otrzymania wyniku, nie dłużej niż dwa dni. Dopuszcza się dłuższe przechowywanie w przypadku wykrycia obecności wirusa w wykonanej puli. W tym czasie należy dokonać identyfikacji dodatniej donacji.

### 1.3.4 Przeprowadzenie badań molekularnych

#### 1.3.4.1 Czynności przygotowawcze

Otrzymywane do badań próbki powinny być zaopatrzone w odpowiednią dokumentację, zawierającą datę sporządzenia dokumentów, liczbę próbek dostarczonych do badań, numery przysłanych próbek (odpowiadające numerowi donacji) i podpis osoby odpowiedzialnej za sporządzenie dokumentów. Należy sprawdzić i potwierdzić podpisem zgodność otrzymanych próbek z załączoną do nich dokumentacją.

Przyjęcie próbek do badań powinno być potwierdzone protokołem, zawierającym datę otrzymania próbek, ich liczbę, ewentualne uwagi i podpis osoby przyjmującej. Jeśli badanie lub pulowanie i badanie NAT nie będzie przeprowadzane od razu, w zależności od stanu osocza i planowanego terminu rozpoczęcia badań należy umieścić próbki w lodówce (temperatura od +4 do +8°C) lub zamrażarce (temperatura minimum -20°C). Jeśli próbki znajdują się w zamrażarce, to przed wykonaniem badań należy je rozmrozić (w lodówce lub w temperaturze pokojowej). Przed wykonaniem pipetowania osocze musi osiągnąć temperaturę pokojową.

Przed przystąpieniem do badań należy przygotować próbki z osoczem, dokonać wzrokowej kontroli ich stanu, wyglądu osocza i ułożenia bariery żelowej. Probówki źle odwirowane, z bardzo znaczną hemolizą należy wycofać z badań. Z probówek, w których są duże, widoczne skrzepy usuwa się je za pomocą jednorazowych pipetek (do każdej probówki oddzielna pipetka). Wszystkie zaobserwowane nieprawidłowości powinny być odnotowane w odpowiednim protokole.

#### 1.3. 4.2 Przygotowanie pul osocza

Bezpośrednio przed pulowaniem osocze w probówkach należy wymieszać. Probówki z próbkami dawców, probówki służące do przygotowania puli i płytki archiwizacyjne muszą być oznaczone kodami paskowymi by śledzić i archiwizować w bazie danych stacji pulującej przebieg procesu pulowania i identyfikacji dodatnich donacji.

Przygotowanie stacji pipetującej do pracy oraz konserwacja i przeglądy muszą odbywać się wg zaleceń producenta. Aparat powinien mieć aktywne funkcje detekcji poziomu płynu i detekcji skrzepu.

Instrukcje dotyczące pulowania muszą zawierać opis postępowania dla wszystkich funkcji.

W czasie pulowania obserwować należy dodawanie osocza do puli i na płytkę, a prawidłowość tego procesu musi być potwierdzona w protokole podpisem osoby wykonującej badanie. Należy także odnotowywać wszystkie zaobserwowane nieprawidłowości i protokołować sposób zastosowanego postępowania. Pożądane jest by prawidłowość procesu pulowania była monitorowana automatycznie przez odpowiedni detektor będący dodatkowym wyposażeniem stacji pulującej.

#### 1.3.4.2.1. Czynności po wykonaniu puli

Po zakończonym pulowaniu zamknięte korkami probówki z pulami, przenieść do pokoju izolacyjnego, do czasu wykonania badania przechowywać w temperaturze od +4 do +8°C. Płytki archiwizacyjne zabezpieczyć i przenieść do lodówki, zakres temperatur od +4 do +8°C. Przechowywać do czasu uzyskania wyniku badań NAT; dalsze postępowanie uzależnione jest od tego wyniku.

Wynik ujemny testów NAT dla puli pozwala na uznanie wszystkich donacji wchodzących w jej skład za ujemne.

Wynik dodatni testów NAT w puli nakazuje wykonać dalsze badania prowadzące do identyfikacji dodatniej donacji. Schemat procesu dochodzenia do identyfikacji dodatniej donacji musi zostać zaakceptowany przez IHiT i poświadczony odpowiednim zaświadczeniem wydanym na podstawie pozytywnych wyników badań walidacyjnych oraz analizy procedur operacyjnych i protokołów.

Po przeprowadzeniu pulowania na stanowisku pracy należy przeprowadzić niezbędne czynności konserwacyjne, wypełnić odpowiednie protokoły konserwacji dziennej i tygodniowej.

#### 1.3.4.2.2. Dokumentacja pracy stacji pipetującej

Wyniki badań NAT w puli muszą być wpisywane z protokołu izolacji do protokołu pulowania i programu stacji pipetującej niezależnie przez dwie osoby (potwierdzone podpisem na protokole osoby wpisującej) lub mogą być przesyłane bezpośrednio z aparatu Cobas do stacji pipetującej. Wynik drukowany ze stacji pipetującej musi zawierać numery wszystkich donacji wchodzących w skład puli, odpowiadające im pozycje na płycie archiwizacyjnej, wyszczególnienie błędów podczas pipetowania (wpisywanie ręczne nr kodu, wykrycie skrzepu, zbyt małą objętość osocza), nazwę badania, wynik dla poszczególnych donacji, podpisy osoby wykonującej badanie i sprawdzającej zgodność wszystkich danych, pieczętą pracowni. Gdy badanie wykonywane jest dla innego RCKiK wyniki badań mogą być dodatkowo przesyłane drogą elektroniczną lub należy dołączyć wyniki na dyskietce.

#### 1.3.4.3 Wykrywanie materiału genetycznego wirusa HCV, HIV i HBV

Badanie można wykonywać przy pomocy testów NAT dopuszczonych do stosowania przez IHiT, stosując się do protokołów producenta. Każdego dnia należy wykonywać badania standardu/ów (tzw. „run control”) HCV, HBV i HIV których rodzaj będzie określony przez IHiT. Te same standardy powinny być używane przez wszystkie Pracownie Biologii Molekularnej. Wynik badań standardów należy codziennie wpisywać do programu komputerowego Zewnętrznej Kontroli Jakości.

Interpretacja wyników powinna odbywać się zgodnie z zaleceniami producentów, lecz wyniki wzbudzające wątpliwości należy traktować jak wyniki dodatnie.

#### 1.3.5. Walidacja badań technikami NAT

Badania NAT można wykonywać po otrzymaniu z IHiT zaświadczenia potwierdzającego, że Pracownia Biologii Molekularnej RCKiK uczestniczyła i uzyskała odpowiednie wyniki obowiązujących badań walidacyjnych. Zaświadczenie musi być wydawane raz w roku. Osoba nadzorująca pracę pracowni musi uzyskać z IHiT imienne zaświadczenie wydawane na podstawie sprawdzenia wiadomości teoretycznych i praktycznych.

Walidację badań należy wykonywać zgodnie z zaleceniem IHiT, z próbek osocza przesłanych przez IHiT.

##### 1.3.5.1 Walidacja badania NAT w pulach osocza obejmuje:

1/ Walidację metody dochodzenia do identyfikacji dodatniej donacji w puli osocza, która polega na wykonaniu badania pul osocza złożonych z próbek zawierających osocze ujemne i próbki osocza zawierającego materiał RNA HCV lub/i DNA HBV lub/i RNA HIV i identyfikacji donacji dodatnich. Zestaw badanych próbek jest przesyłany przez IHiT po otrzymaniu odpowiedniego zgłoszenia. Do IHiT należy przesłać wyniki badań wraz z kopiami protokołów ich wykonania. Walidację należy wykonywać zawsze gdy ulega zmianie schemat procesu pulowania, a jeśli proces pulowania nie zostaje zmieniony to jeden raz w roku.

2/ Określenie czułości metody izolacji i wykrywania materiału genetycznego wirusów poprzez badanie próbek osocza zawierających materiał genetyczny wirusa/wirusów o różnych koncentracjach i próbek osocza nie zawierającego wirusów. Badanie należy wykonać zawsze, gdy następuje zmiana metodyki wykrywania materiału genetycznego wirusów, a jeśli nie ma zmian w metodyce to jeden raz w roku.

#### 1.3.5.2 Walidacja badań NAT w pojedynczych próbkach obejmuje:

1/ określenie czułości metody izolacji i wykrywania materiału genetycznego wirusów poprzez badanie próbek osocza zawierającego materiał genetyczny wirusa/wirusów o różnych koncentracjach i próbek osocza nie zawierającego wirusów. Badanie należy wykonać zawsze gdy następuje zmiana metodyki wykrywania materiału genetycznego wirusów, a jeśli nie ma zmian w metodyce to raz w roku.

#### 1.3.5.3 Zewnętrzna, ciągła kontrola jakości

Pracownie badające krwiodawców techniką NAT muszą stale monitorować wyniki i jakość swojej pracy, poprzez:

1/ dołączanie do każdej serii badań wyznaczonej przez IHiT kontroli dodatniej tej samej we wszystkich RCKiK pracujących daną metodą (tzw. „run control”) i wpisywanie wyników jej badań do programu komputerowego „Zewnętrznej Kontroli Jakości”,

2/ analizę wyników fałszywie dodatnich i nieważnych,

3/ wykaz potwierdzonych wyników dodatnich wraz z wynikami innych badań wykonanych u tych dawców,

Wyniki tych analiz muszą być odnotowywane w odpowiednich protokołach i przesyłane do IHiT co miesiąc.



1.3.6 Postępowanie z dawcami bez markerów serologicznych, u których wyniki testów NAT są dodatnie lub wzbudzają wątpliwości.

Po wykryciu materiału genetycznego wirusów u dawcy bez markerów serologicznych i potwierdzeniu tego wyniku przez IHiT należy:

1. wezwać dawcę, zawiadomić go o uzyskanym wyniku, pobrać próbki osocza do dwóch probówek z żelami separującym. U dawcy wykonać komplet przeglądowych badań serologicznych i ALT. Wyniki tych badań wraz z próbkami należy przesłać do IHiT,
2. na stałe zdyskwalifikować dawcę we wszystkich placówkach służby krwi w Polsce,
3. przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, dawca taki jest w okienku serologicznym i najprawdopodobniej uległ zakażeniu w ciągu ostatnich 6 miesięcy,
4. do IHiT (do Pracowni Badań Metodami Biologii Molekularnej) należy przysłać też wszystkie dostępne próbki, a jeśli nie są dostępne, to pojemniki z osoczem oraz wypełniony formularz dotyczący tego dawcy (Ankieta 1,2 lub 3)

1.3.7 Badania weryfikacyjne u dawców bez markerów serologicznych z dodatnimi wynikami testów NAT

Zakres badań weryfikacyjnych u dawców bez markerów serologicznych z dodatnimi lub wzbudzającymi wątpliwośći wynikami testów NAT

Wirus	Badania wykonywane w IHiT*		Cel badań
	Próbki badane	Zakres badań	
HCV	Próbka pobrana z pojemnika z osoczem z donacji RNA HCV +/-anty HCV (-)	RNA HCV	Potwierdzenie wyniku i wykluczenie pomyłki co do dawcy
	Próbka pobrana po wezwaniu dawcy	RNA HCV i przeciwciała anti-HCV EIA i RIBA	
HIV	Próbka pobrana z pojemnika z osoczem z donacji RNA HIV +/-anty HIV (-)	RNA HIV	Potwierdzenie wyniku i wykluczenie pomyłki co do dawcy
	Próbka pobrana po wezwaniu dawcy	RNA HIV i przeciwciała anti-HIV EIA, WB	
HBV	Próbka pobrana z pojemnika z osoczem z donacji DNA HBV +/-HBsAg (-)	DNA HBV	Potwierdzenie wyniku i wykluczenie pomyłki co do dawcy
	Próbka pobrana po wezwaniu dawcy	DNA HBV, HBs Ag, anti-HBc	

\* do IHiT należy przysłać pojemniki z osoczem, w którym nie wykryto markerów serologicznych, a wykryto materiał genetyczny wirusa.

Ankieta nr 1

Informacje dotyczące donacji dodatniej RNA HCV

W donacji o numerze: ..... stwierdzono obecność .....

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko: .....

Adres: .....

Wiek: .....

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery dodatnie i wcześniejszych donacji, poziom ALT i informacja które preparaty zostały przetoczone:

Donacja RNAHCV dodatnia: data..... ALT.....

Donacje poprzednie:

data.....ALT..... Co przetoczono.....

data.....ALT..... Co przetoczono.....

.....

.....

.....

.....

Dane z wywiadu dotyczące ewentualnych źródeł zakażenia się dawcy:.....

.....

Podpis lekarza

Ankieta nr 2

Informacje dotyczące donacji dodatniej DNA HBV

W donacji o numerze: ..... stwierdzono obecność .....

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko: .....

Adres: .....

Wiek: .....

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery dodatnie i wcześniejszych donacji, poziom ALT i informacja które preparaty zostały przetoczone:

DonacjaDNA HBV dodatnia: data..... ALT.....

Donacje poprzednie:

data.....ALT..... Co przetoczono.....

data.....ALT..... Co przetoczono.....

.....

.....

.....

.....

.....

Dane z wywiadu dotyczące ewentualnych źródeł zakażenia się dawcy:.....

.....

Czy dawca był szczepiony w kierunku HBV tak/nie kiedy..... jaką szczepionką

Czy dawca miał podaną immunoglobulinę anty-HBs tak/nie; kiedy.....

Podpis lekarza:

Ankieta nr 3

Informacje dotyczące donacji dodatniej RNA HIV

W donacji o numerze: ..... stwierdzono obecność .....

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko: .....

Adres: .....

Wiek: .....

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery dodatnie i wcześniejszych donacji, poziom ALT i informacja które preparaty zostały przetoczone:

Donacja RNA HIV dodatnia: data..... ALT.....

Donacje poprzednie:

data.....ALT..... Co przetoczone.....

data.....ALT..... Co przetoczone.....

.....

.....

.....

.....

Dane z wywiadu dotyczące ewentualnych źródeł zakażenia się dawcy:.....

.....

Podpis lekarza

#### 1.4. SERODIAGNOSTYKA KIŁY

Badania przeglądowe mają na celu wykrycie w surowicy krwiodawców przeciwciał wskazujących na zakażenie kiłą. Przeprowadza się je z próbki pobranej podczas każdego oddania krwi. Badania przeglądowe można wykonywać przy pomocy:

testów kardiolipinowych: USR (unheated serum reagin test) i / lub VDRL (veneral disease research laboratory test) lub immunoenzymatyczną metodą ELISA.

##### 1.4.1. Przygotowanie materiału

Próbki krwi pozostawić w temperaturze pokojowej, a po ich wykrzepieniu, wirować przez 10 min., przy 607 g (2000 obr./min.). Do badań używać surowice.

##### 1.4.2. TEST USR

Antygen do testu USR jest modyfikacją antygeny używanego w teście VDRL. Oprócz antygeny kardiolipinowy zawieszony w 10% roztworze chlorku cholin, zawiera 0,465%

EDTA-Na<sub>2</sub> oraz 0,4% thiomersal. Antygen do testu, w postaci gotowej do użycia, umożliwia badanie surowic nie poddanych wcześniej cieplnej inaktywacji.

#### 1.4.2.1. Kontrola antygenu kardiolipinowego

Należy ją wykonywać zgodnie z techniką podaną poniżej, każdego dnia i z każdej otwartej ampułki wobec surowic kontrolnych dających reakcję dodatnią (o nasileniu 2+) i wątpliwą (o nasileniu ±).

#### 1.4.2.2. Wykonanie testu

Antygen i surowice (o ile były przechowywane w chłodni) doprowadzić do temperatury pokojowej. We wgłębieniach przejrzystej płytki plastikowej lub szklanej albo szkiełek podstawowych z wgłębieniem w postaci łożki umieścić po 50 µl badanych surowic. Dołączyć próbki kontrolne: po 50 µl znanych surowic kontrolnych, dających wyniki: dodatni, wątpliwy i ujemny. W ostatnim wgłębieniu umieścić 50 µl roztworu NaCl (kontrola jednorodności antygeny). Wszędzie dodać po 22 µl antygeny. Umocować płytkę lub szkiełka na wstrząsarce, która porusza je ruchem kolistym o średnicy 5 cm z prędkością 120-150 obr./min. w ciągu 5 minut. Odczytać wyniki mikroskopowo lub używając lupy, dającej 8-krotne powiększenie obrazu.

#### 1.4.2.3. Ocena wyników

Wynik ujemny (-): cząsteczki antygeny są równomiernie rozproszone w polu widzenia, a ich obraz (kształt i wielkość) jest taki, jak antygeny w kontrolnej surowicy ujemnej lub w roztworze NaCl.

Wynik wątpliwy (±): poza drobnymi cząstkami antygeny obserwuje się nieliczne, drobne kłaczkę.

Wynik słabo dodatni (+): liczniejsze kłaczkę różnej wielkości i nieliczne drobne cząstki niezwiązanego antygeny.

Wynik dodatni (2+): liczne kłaczkę wyraźnie widoczne.

Wynik silnie dodatni (4+): kłaczkę łączą się w duże skupiska, poza którymi nie obserwuje się drobnych cząstek niezwiązanego antygeny i drobnych kłaczek.

*W przypadku uzyskania wyniku dodatniego lub wątpliwego należy powtórzyć badanie tej samej próbki surowicy w celu wyeliminowania błędów technicznych.*

#### 1.4.3. TEST VDRL

Antygen do testu VDRL zawiera 0,03% kardiolipiny, 0,9% cholesterolu i 0,3% lecytyny.

Jest przygotowywany i używany tylko w dniu badania.

#### 1.4.3.1. Przygotowanie antygeny

Do kolbki z płaskim dnem o pojemności 30 ml wkropić 0,4 ml roztworu NaCl z ampulki dołączonej do antygeny. Do roztworu NaCl dodać kroplami w ciągu 6 sekund 0,5 ml antygeny., wykonując kolbką ruchy koliste na powierzchni stołu. Kontynuować w ten sam sposób mieszanie zawartości kolbki w ciągu 10 sek. Dodać 4,1 ml roztworu NaCl, zamknąć kolbkę korkiem i mieszać w wyżej podany sposób przez 10 sek.

*UWAGA: w czasie wkraplania antygeny należy tak trzymać pipetę, aby jej wylot nie zanurzał się w roztworze NaCl, a spadające krople nie trafiały na ścianki kolbki.*

#### 1.4.3.2. Przygotowanie badanych surowic

Surowice umieścić w temp. 56°C na 30 min (inaktywacja cieplna).

*UWAGA: jeśli badanie wykonuje się lub powtarza następnego dnia, należy surowicę ponownie inaktywować w ciągu 10 min.*

#### 1.4.3.3. Wykonanie badania

Badanie przeprowadza się w identyczny sposób jak test USR, z zastosowaniem surowic kontrolnych dających w teście VDRL wyniki: dodatni, wątpliwy i ujemny. Inna jest tylko ilość dodawanego antygeny (17 µl) oraz czas mieszania na wstrząsarce (4 min.). Odczytywanie wyników i ich interpretacja, są takie same, jak w teście USR.

*W przypadku uzyskania dodatniego lub wątpliwego wyniku, należy powtórzyć badanie, a następnie wykonać test ilościowy.*

#### 1.4.3.4. Wykonanie testu ilościowego

Do szeregu składającego się z 5 probówek (rozcieńczenia surowicy 1/2 - 1/64) dodać po 0,2 ml roztworu NaCl. Do pierwszej probówki dodać 0.2 ml badanej surowicy i po wymieszaniu zawartości przenieść 0,2 ml do następnej probówki. W ten sam sposób postępować do końca szeregu. Do wgłębień na płytce lub szkiełkach podstawowych nanieść po 50 µl każdego z rozcieńczeń surowicy, zaczynając od największego. Dodać po 17 µl antygeny. Płytkę lub szkiełka umieścić na wstrząsarce i mieszać w ciągu 4 min. Odczytać wyniki określając miano w teście VDRL, czyli największe rozcieńczenie surowicy, w którym uzyskano reakcję dodatnią, określoną jako (+).

#### 1.4.4. TEST IMMUNOENZYMATYCZNY

Test ten służy do wykrywania swoistych przeciwciał w zakażeniu kiłą, reagujących z rekombinowanym antygenem *Treponema pallidum*. Jego zasada jest analogiczna jak w testach służących do wykrywania markerów wirusowych i może być on wykonywany za pomocą tej samej aparatury. Wykonanie testu musi być zgodne z procedurą podaną przez

producenta. Pomiary absorbancji są uwidaczniane na czytniku, a wyniki rejestrowane w postaci wydruku.

W przypadku uzyskania wyniku dodatniego, badanie należy powtórzyć następnego dnia z tej samej próbki.

*Używane mogą być tylko te testy enzymatyczne, które wcześniej uzyskały akceptację konsultanta krajowego w dziedzinie wenerologii.*

1.4.5 Postępowanie w przypadku uzyskania wyniku dodatniego w badaniach przeglądowych w kierunku kiły

1. Krew i jej składniki nie mogą służyć do celów leczniczych i muszą zostać zniszczone.
2. Weryfikację dodatnich wyników przeprowadza laboratorium wenerologiczne, do którego należy przesłać próbkę surowicy wraz z własnymi wynikami badań i danymi personalnymi dawcy.
3. Po otrzymaniu dodatnich wyników badań weryfikacyjnych, należy skierować dawcę do poradni wenerologicznej oraz przesłać zawiadomienie o dodatnich wynikach badań do centralnej kartoteki tej poradni. Krwiodawcę wyklucza się z Rejestru na stałe. Należy prześledzić losy krwi i jej składników pobranych od tego krwiodawcy w ciągu miesiąca poprzedzającego dodatnią donację.
4. Po otrzymaniu ujemnych wyników badań weryfikacyjnych i wykluczeniu tła chorobowego nieswoiście dodatnich wyników testów kardiolipinowych lub immunoenzymatycznych, należy u dawcy okresowo powtarzać badania. Może on oddawać krew po uzyskaniu ujemnych wyników testów przeglądowych.

1.5 Zasady dokumentacji wyników badań przeglądowych

Wyniki badań wykonywanych ręcznie muszą być wpisywane w systemie komputerowym indywidualnie dla każdego dawcy. Protokoły badań (na nośnikach elektronicznych lub w postaci wydruków) powinny być przechowywane przez 20 lat. Zaleca się odnotowywanie wyników wszystkich badanych markerów wirusów i kiły w postaci jednego wydruku komputerowego z danego dnia.

Jeżeli w RCKi K wykonuje się również badania dla oddziałów terenowych obowiązuje przekazywanie wyników na piśmie lub w wersji elektronicznej. Wyniki umieszcza się je przy numerze donacji każdego dawcy.

## 1.6 Postępowanie z krwią i jej składnikami po otrzymaniu dodatnich wyników testów przeglądowych

Po stwierdzeniu co najmniej dwóch dodatnich wyników serologicznego testu przeglądowego w kierunku HCV, HIV, HIV i kiły, należy zniszczyć wszystkie komórkowe składniki krwi uzyskane z donacji, której towarzyszyły te wyniki. Jeśli wyniki dotyczą HCV, HIV i HIV u dawcy wielokrotnego należy przesłać do IHiT próbki z obecnej i poprzednich donacji wraz z informacją czy dostępne są próbki i pojemniki z osoczem z poprzednich donacji. Należy odszukać i przechowywać w wydzielonym do tego celu miejscu wszystkie składniki, które wyprodukowano z krwi tego dawcy pobranej podczas wszystkich donacji, którym towarzyszyły ujemne wyniki testów przeglądowych. Osocze z poprzednich donacji można dopuścić do użycia, przy ujemnych wynikach badań weryfikacyjnych. Jeżeli wyniki badań weryfikacyjnych są dodatnie, pojemniki z osoczem należy przysłać do IHiT.

Po uzyskaniu wyników dodatnich przeglądowych testów NAT należy postępować według procedur opisanych w rozdziale 1.3: komórkowe preparaty krwi należy zniszczyć, a pojemniki z osoczem i dostępne próbki przesłać do IHiT. Należy odszukać i przechowywać w wydzielonym do tego celu miejscu wszystkie preparaty, które wyprodukowano z krwi tego dawcy pobranej podczas ostatniej donacji, której towarzyszyły ujemne wyniki testów przeglądowych i wszystkich poprzednich. Osocze z poprzednich donacji można dopuścić do użycia, jeśli wyniki badań weryfikacyjnych są ujemne; odesłać do IHiT jeśli wyniki badań weryfikacyjnych są dodatnie.

## 1.7 Śledzenie losów krwi i jej składników po otrzymaniu dodatnich wyników testów potwierdzenia obecności markerów czynników zakaźnych

Po otrzymaniu dodatnich wyników testów potwierdzających obecność antygeny HBs, DNA HBV, przeciwciał anti-HCV (dodatni wynik testu przeglądowego oraz dodatni wynik testu uzupełniającego przy ujemnym wyniku RNA HCV), RNA HCV, przeciwciał anti-HIV 1,2 (Western Blot), RNA HIV, Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa ma obowiązek prześledzenia losów krwi i jej składników, uzyskanych w przeszłości (w ciągu 6 miesięcy od stwierdzenia ostatniego ujemnego wyniku testu przeglądowego) z krwi tego dawcy.

