

Diagnostyka czynników zakaźnych przenoszonych przez krew*

Diagnostics of blood transmitted infectious agents

Maria Mikulska, Piotr Grabarczyk, Ewa Brojer, Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Zasady ogólne

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

Do oznaczeń markerów wyżej wymienionych czynników zakaźnych należy używać testów do diagnostyki *in vitro* (IVDU), posiadających znak CE, ocenionych przez odpowiedni organ, pod kątem przydatności w krwiodawstwie (odpowiednia czułość, swoistość itp.). Test do oznaczeń HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) powinien wykrywać przynajmniej 0,5 j.m./ml antygenu powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B. Badania powinny być wykonywane zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu odczynników.

*Praca ta stanowi zaktualizowany Rozdział 8 publikacji „Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi” pod red. M. Łętowskiej, Warszawa 2006

Producent testów powinien dysponować autoryzowanym certyfikatem jakości i przedstawić dokumenty zawierające wyniki badań kontrolnych dla danego testu. Przed użyciem wszystkie testy powinny zostać poddane walidacji zgodnie z ich przeznaczeniem. Ponadto walidacji podlegać powinien cały sprzęt i aparatura, które okresowo należy kalibrować i serwisować w celu utrzymania dobrego stanu technicznego. Wszystkie nowe techniki i ich modyfikacje również powinny zostać poddane walidacji przed wprowadzeniem ich do rutynowej praktyki.

Szczególny nacisk należy położyć na szkolenie personelu, kompetencje osób szkolących, monitorowanie warunków przechowywania testów i innych materiałów potrzebnych do wykonania badań. Spełnienie wyżej wymienionych warunków powinno zostać potwierdzone odpowiednimi dokumentami.

Równie istotne jest przestrzeganie kryteriów ważności testu. Kontrole: negatywna i pozytywna, wchodzące w skład zestawu odczynników należy nastawiać wraz z każdą płytką lub serią oznaczeń. Powinny one spełniać kryteria podane w ulotce.

Donacje, których wyniki badań były wstępnie reaktywne należy zbadać powtórnie tym samym testem w dwóch powtórzeniach, chyba że producent w ulotce zaleca inne postępowanie lub inaczej stanowią „Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi” w odniesieniu do danego badania. Jeśli któryś

Adres do korespondencji: dr n. przyr. Maria Mikulska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, e-mail: mmikulska@ihit.waw.pl

z wyników powtórnego badania jest oceniony jako reaktywny, donację taką należy uznać za powtarzalnie reaktywną i próbkę pochodzącą z tej donacji przesłać do odpowiedniego laboratorium wykonującego badania weryfikacyjne w celu potwierdzenia wyniku powtarzalnie reaktywnego. Donacja taka nie może być użyta do transfuzji. Próbki z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testu przeglądowego muszą być poddane dalszym badaniom mającym na celu potwierdzenie lub wykluczenie zakażenia. Testy potwierdzające zakażenie powinny wykazywać nie mniejszą czułość niż testy przeglądowe, lecz muszą cechować się większą swoistością. Niestety, niektóre testy przeglądowe mają wyższą czułość niż odpowiadające im testy potwierdzenia. Laboratorium wykonujące badania potwierdzające powinno starać się według własnego uznania dobrać takie algorytmy badań potwierdzających, by jak największa liczba wyników pozwalała jednoznacznie potwierdzić/wykluczyć zakażenie u krwiodawcy. Gdy wynik badania donacji powtarzalnie reaktywnej został potwierdzony w badaniu weryfikacyjnym, dawca powinien zostać wezwany w celu pobrania od niego następnej próbki. Zbadanie tej próbki ma na celu wykluczenie możliwości pomyłki wynikającej z zamiany próbek przy poprzednim badaniu. Laboratorium wykonujące badania weryfikacyjne, potwierdzające lub wykluczające zakażenie, powinno interpretować wyniki badań weryfikacyjnych w następujący sposób:

- dodatni, co oznacza zakażony lub po przebytych zakażeniu,
- ujemny, czyli niezakażony,
- nieokreślony, co oznacza, że nie można postawić diagnozy (zwykle taki dawca wymaga ponownego badania w późniejszym okresie).

Zaleca się, aby dane dotyczące wyników powtarzalnie reaktywnych w teście przeglądowym oraz potwierdzonych jako dodatnie były zbierane wraz z danymi epidemiologicznymi i monitorowane przynajmniej na poziomie kraju jako część systemu czuwania nad bezpieczeństwem krwi. Postępowanie takie pozwoli w przyszłości na porównanie danych epidemiologicznych w skali międzynarodowej.

1. Badania przeglądowe

Badania przeglądowe wykonuje się technikami serologicznymi i technikami biologii molekularnej (NAT, *Nucleic Acid Testing*).

1. Nosicieli wirusa HBV identyfikuje się poprzez wykrycie antygenu HBs (HBsAg) i/lub DNA HBV.
2. Nosicieli wirusa HCV identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał anty-HCV i/lub RNA HCV.

3. Nosiciele wirusa HIV identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał anty-HIV1/2 i/lub RNA HIV.
4. Osoby zakażone kiłą identyfikuje się poprzez wykrycie przeciwciał do antygenów krętka błędnego. Badania przeglądowe technikami serologicznymi wykonywane są we wszystkich Centrach Krwiodawstwa.

Badania przeglądowe technikami NAT mogą być wykonywane przez Centrum Krwiodawstwa po uzyskaniu od Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) odpowiedniego zaświadczenia.

2. Badania weryfikacyjne

Powtarzalnie reaktywne wyniki badań przeglądowych podlegają weryfikacji poprzez wykonywanie badań potwierdzających ich swoistość lub badań uzupełniających pozwalających na dokładniejsze określenie statusu dawcy. Badania takie należy wykonywać zarówno u krwiodawców pierwszorazowych, jak i wielokrotnych.

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

Weryfikację wyników badań przeglądowych prowadzi się:

- 1) u wszystkich dawców z powtarzalnie reaktywnymi wynikami serologicznych testów przeglądowych wykrywających:
 - HBsAg
 - poprzez wykonanie testu neutralizacji i DNA HBV (badania prowadzi Centrum Krwiodawstwa i/lub laboratorium wykonujące badania weryfikacyjne w IHIT);
 - anty-HCV
 - poprzez wykrywanie RNA HCV (badanie prowadzi Centrum Krwiodawstwa lub laboratorium wykonujące badania weryfikacyjne w IHIT);
 - weryfikację swoistości przeciwciał testem typu Western Blot (badanie prowadzi laboratorium wykonujące badania weryfikacyjne w IHIT);
 - anty-HIV
 - poprzez wykrywanie RNA HIV i potwierdzanie swoistości przeciwciał testem typu Western Blot (badania prowadzi laboratorium wykonujące badania weryfikacyjne w IHIT);

- przeciwciała kiłowe
 - poprzez potwierdzenie swoistości przeciwciał (badania prowadzi laboratorium albo poradnia wenerologiczna na danym terenie lub ośrodek wskazany przez Konsultanta Krajowego w dziedzinie wenerologii);
- 2) u wszystkich dawców bez markerów serologicznych, u których wyniki testu NAT w kierunku DNA HBV, RNA HCV, RNA HIV są powtarzalnie reaktywne, a także, gdy w laboratorium wykonującym badania przeglądowe NAT nie udaje się ustalić, który wirus jest obecny w próbce (badania prowadzi IHiT).

3. Pobieranie próbek krwi do badań

Próbki krwi do badań czynników zakaźnych muszą być pobierane z tego samego wkłucia, z którego pobierana jest donacja, w trakcie donacji lub po jej zakończeniu, do próbek jednorazowego użytku. Objętość osocza musi być wystarczająca do wykonania wszystkich badań wirusologicznych i do przygotowania próbek archiwizacyjnych. Należy przechowywać po dwie próbki 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 przechowywane w taki sposób, aby w przypadku wyjęcia jednej z nich pozostałe nie uległy rozmrożeniu. Zamrożone próbki powinny być przechowywane przynajmniej 10 lat w temperaturze poniżej -25°C , w zamrażarkach podlegających systematycznej kontroli i walidacji. Należy archiwizować wszystkie donacje, także te z dodatnimi wynikami testów serologicznych. Probki osocza do badań NAT i do badań weryfikacyjnych w IHiT powinny być pobierane i dostarczane w próbkach próżniowych z EDTA i żelem separującym, przeznaczonych do badań wirusologicznych technikami biologii molekularnej. Probki muszą zapewniać stabilność materiału genetycznego wirusa przez 5 dni od momentu pobrania.

Jeżeli z różnych względów od dawcy nie pobrano materiału do właściwej próbki lub objętość materiału jest zbyt mała do wykonania wszystkich koniecznych badań, dopuszcza się wykorzystanie do badań czynników zakaźnych osocza lub surowicy z próbek pobranych na inne badania lub pojemników z osoczem. Można też ponownie wezwać dawcę, pobrać 2 próbki krwi (w tym jedną do próbki z żelem) i ponownie wykonać testy przeglądowe.

Badania serologiczne

1. Algorytmy postępowania — zasady ogólne dla przeglądowych badań serologicznych wirusów i kiły

Po uzyskaniu powtarzalnie reaktywnego wyniku testu przeglądowego wykrywającego markery wirusów, należy następnego dnia (jeżeli próbki są świeże) lub tego samego dnia (w drugim nastawieniu, jeżeli próbki pobrane były poprzedniego dnia) 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. Próbkę takiego osocza trzeba zbadać techniką NAT.

Jeżeli wynik przynajmniej jednego z powtórzeń testu przeglądowego jest równy/wyższy od wartości *cutoff*, określa się go jako powtarzalnie reaktywny. Dawcy z takimi wynikami podlegają badaniom weryfikacyjnym zgodnie z zasadami opisanymi poniżej.

Przy kilkakrotnym wykonywaniu oznaczeń z tej samej próbki dokumentacja powinna zawierać wyniki wszystkich oznaczeń oraz informację, który wynik uznano za ostateczny i przekazano dalej.

Krew i składniki komórkowe pochodzące od dawców z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testu przeglądowego powinny zostać zniszczone, a pojemniki z osoczem należy oznakować „nie do transfuzji: anty-HCV(+)” lub „anty-HIV(+)” lub „HBsAg(+)” i zabezpieczyć tak, aby nie mogły być pomyłkowo wykorzystane do przetoczenia. W przypadku donacji z powtarzalnie reaktywnym wynikiem testu przeglądowego w kierunku zakażenia kiłą, należy zniszczyć również osocze. Probki osocza pobrane przy obecnej (dawcy pierwszorazowi) oraz obecnej i poprzednich donacjach (dawcy wielokrotni, u których po raz pierwszy wykryto serologiczne markery czynników zakaźnych) wraz z uzyskanymi dotychczas wynikami badań należy przesłać do IHiT (badania wirusologiczne) lub do laboratorium wskazanego przez Krajowego Konsultanta w dziedzinie wenerologii (kiła). Ponadto do IHiT trzeba też przysłać dokumenty zawierające: dane osobowe dawcy, tj. imię, nazwisko, datę urodzenia, a jeśli nie podano to PESEL lub odpowiednik PESEL (w przypadku obcokrajowców), numer donacji, datę wykonania badania, nazwę testu, którym przeprowadzono oznaczenia i numer poprzedniej weryfikacji (jeśli taką wykonywano). W przypadku weryfikacji w kierunku zakażenia wirusem HIV, jeśli nie podano PESEL, należy jeszcze podać imię ojca oraz adres krwiodawcy.

Należy też poinformować IHiT o pojemnikach z osoczem zabezpieczonych w Centrum Krwiodawstwa. Jeśli próbki są niedostępne, do IHiT należy przesłać pojemniki z osoczem oraz wszystkie wymienione wyżej dane i wyniki badań.

2. Zasady wykonywania serologicznych badań wirusologicznych

Badania przeglądowe metodami serologicznymi przeznaczonymi do wykrywania poszczególnych znaczników wirusowych należy wykonywać ściśle według instrukcji producenta używanych odczynników. Interpretacja wyników winna być również zgodna z instrukcją producenta. Badania należy wykonywać za pomocą testów, które zostały dopuszczone do użycia przez IHiT.

We wszystkich Centrach Krwiodawstwa przeprowadzających badania wirusologiczne danym testem, do każdej serii badań przeglądowych należy dołączać tę samą kontrolę dodatnią. Rodzaj kontroli określa IHiT. Wyniki tej kontroli należy codziennie wprowadzać do programu komputerowego „Ciągła kontrola jakości”. Laboratorium badania czynników zakaźnych musi uczestniczyć w zewnątrzlaboratoryjnych programach jakości badań przynajmniej dwa razy w roku.

Przy walidacji nowej serii odczynników przeznaczonych do jakościowego oznaczania znaczników wirusowych, należy postępować w następujący sposób: gdy odczynniki starej serii kończą się, wybrać po 2 różne próbki dodatnie (najlepiej o niskiej i wysokiej wartości sygnału — S/CO lub stężenia antygenu) oraz ujemne, które oznaczone zostały starą serią odczynników i zbadać ich aktywność po wprowadzeniu nowej serii. Jeżeli dla obu serii próbki ujemne są ujemne, a dodatnie są dodatnie, to nowa seria odczynników została poddana walidacji z wynikiem pozytywnym. Do walidacji należy wykonać kontrole firmowe lub zarchiwizowane, potwierdzone testem potwierdzenia surowice dodatnie. Jeśli metoda oznaczeń na to pozwala, można równolegle wykonywać badania starą i nową serią.

W badaniach serologicznych markerów wirusów nie obowiązuje „szara strefa”. Wszystkie próbki, w których wartość S/CO ≥ 1 należy uznać za reaktywne, natomiast próbki z wartością S/CO < 1 należy uznać za ujemne.

3. Badania przeglądowe w kierunku zakażenia kiłą

Badania przeglądowe w kierunku zakażenia kiłą mają na celu wykrycie w surowicy krwiodawców przeciwciał wskazujących na zakażenie krętkiem błędym. Przeprowadza się je z próbki pobranej pod-

czas każdego oddania krwi. Badania przeglądowe można przeprowadzić za pomocą: testów kardioli-pinowych: USR (*Unheated Serum Reagin test*) i/lub VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory test*) lub innych testów immunodiagnostycznych. Testy należy wykonywać zgodnie z instrukcją producenta.

Po uzyskaniu powtarzalnie reaktywnego wyniku testu przeglądowego, krew i składniki komórkowe oraz osocze pochodzące od dawcy, u którego podejrzewa się zakażenie należy zniszczyć. Próbki surowicy wraz z wynikami oznaczeń i danymi personalnymi dawcy przesłać na badania weryfikacyjne. Badania takie można przeprowadzić w laboratorium lub poradni wenerologicznej na danym terenie lub w ośrodku wskazanym przez Krajowego Konsultanta w dziedzinie wenerologii. Dane osobowe krwiodawcy należy przesłać, tak jak to podano w dalszej części pracy, do Centralnej Kartoteki przy SANEPID, która prowadzi rejestr osób zakażonych. Należy też wypełnić i przesłać do SANEPID odpowiedni załącznik zgłoszenia choroby zakaźnej.

W celu wykluczenia pomyłki należy pobrać od dawcy nową próbkę i zbadać ją testem przeglądowym (co ma na celu potwierdzenie pierwotnego wyniku).

Badania weryfikacyjne w próbkach z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testów serologicznych

Badania weryfikacyjne prowadzone są w próbkach osocza dawców z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testów przeglądowych. Mają one na celu potwierdzenie lub wykluczenie zakażenia. Dla wirusa HIV badania takie prowadzone są w IHiT. Dla wirusa HCV i HBV dopuszcza się wykonywanie badań weryfikacyjnych RNA HCV i DNA HBV w Centrach Krwiodawstwa. Badania weryfikacyjne w kierunku zakażenia kiłą wykonuje laboratorium wenerologiczne wskazane przez Konsultanta Krajowego w dziedzinie wenerologii.

Jeśli na wyniku badań weryfikacyjnych znajdują się jakiegokolwiek zalecenia, należy się do nich stosować, ponieważ są one nadrzędne w stosunku do ogólnych zaleceń podanych w niniejszej publikacji. Polecenie „ponowna kontrola za 6 miesięcy” oznacza, że takiego dawcę należy skontrolować w IHiT po 6 miesiącach. Przysyłanie próbek częściej niż to zaleca IHiT zwiększa koszty badań weryfikacyjnych, a nie jest uzasadnione.

Jeśli na wyniku brak zaleceń, oznacza to, że nie ma przeciwwskazań, aby krwiodawca mógł oddawać krew, jeśli wynik badania przeglądowego przeprowadzonego minimum po 3 miesiącach od ostatniej

weryfikacji jest ujemny i jeśli ostatnie wyniki badań weryfikacyjnych (testy potwierdzenia metodami biologii molekularnej i metodami serologicznymi) były ujemne.

Jeżeli w badaniu weryfikacyjnym wykryto materiał genetyczny wirusa albo uzyskano dodatni wynik testów typu Western Blot, do IHiT należy przysłać pojemnik z osoczem z poprzedniej donacji. We wszystkich innych przypadkach osocze należy zniszczyć. Ponadto należy pobrać i ponownie zbadać nową próbkę w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy.

1. Przysyłanie próbek na badania weryfikacyjne

Centrum Krwiodawstwa powinno przysyłać próbki na badania weryfikacyjne w odpowiednich warunkach. Próbki powinny docierać do miejsca przeznaczenia zamrożone. Osoba odbierająca przesyłkę powinna na potwierdzeniu odbioru opisać stan, w jakim próbki zostały odebrane.

2. Antygen HBs

Po otrzymaniu wyniku powtarzalnie reaktywnego w teście przeglądowym należy postępować tak, jak przedstawiono w tabeli 1. W celu potwierdzenia powtarzalnie reaktywnego wyniku należy wykonać badania przy użyciu specjalnego zestawu odczynników, zwanego testem potwierdzenia. Interpretacja wyniku musi być zgodna z zaleceniami producenta. Jeśli w teście potwierdzenia antygen nie poddaje się neutralizacji, to najprawdopodobniej reakcje otrzymane w teście przeglądowym były nieswoiste. Należy wtedy wykonać badanie DNA HBV w pojedynczej donacji (o ile nie było wykonane) i jeśli jego wynik jest dodatni, to na stałe zdyskwalifikować dawcę; jeśli zaś wynik ten jest ujemny odsunąć dawcę od oddawania krwi na 6 miesięcy, w oczekiwaniu na ustąpienie nieswoistych reakcji. Dodatni wynik HBsAg, potwierdzony testem neutralizacji przy ujemnym wyniku DNA HBV, uzyskuje się u osób niereplikujących wirusa, gdy uległ on integracji z genomem gospodarza. Wynik taki może też być spowodowany niedawnym szczepieniem dawcy szczepionką zawierającą antygen HBs; reakcja taka powinna ustąpić po tygodniu. W takim przypadku po miesiącu należy wykonać ponownie badania HBsAg i DNA HBV w pojedynczej donacji. Do oddawania krwi można dawcę przywrócić po uzyskaniu ujemnych wyników testu przeglądowego i przeprowadzeniu weryfikacji w IHiT.

Jeżeli nieswoiste reakcje utrzymują się dłużej, można dawcę kontrolować raz w roku lub postępować zgodnie z zasadami wymienionymi w częściach „Badania weryfikacyjne w próbkach z powtarzalnie

reaktywnymi wynikami testów serologicznych” i „Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły” (zob. też tab. 1).

Dawca z dodatnim wynikiem testu potwierdzenia powinien niezwłocznie zostać wezwany do Centrum Krwiodawstwa (druk wg Wzoru nr 1) i po rozmowie z lekarzem działu krwiodawców, zostać skierowany do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Lekarz lub osoba upoważniona informująca dawcę o wynikach badań wskazujących na zakażenie HBV powinna także przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz formularz dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej. W trakcie wywiadu lekarz powinien także wyjaśnić, czy wykrycie HBsAg nie wynika z niedawnego szczepienia dawcy. Jeśli dawca jest zakażony wirusem HBV, należy pobrać od niego nową próbkę, zbadać ją testem przeglądowym w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy. Dawca taki powinien zostać zdyskwalifikowany na stałe, a jego dane personalne powinny być automatycznie dostępne wszystkim placówkom służby krwi za pośrednictwem bazy danych Krajowego Rejestru Dawców Krwi (KRDK). Jeśli nie ma możliwości przekazania informacji o wykrytym zakażeniu poprzez KRDK, to należy o nim poinformować wszystkie Centra Krwiodawstwa oraz inne podmioty, jak to opisano poniżej. Gdy wynik testu przeglądowego okaże się ujemny, próbkę należy przesłać do IHiT, aby wykonać dodatkowe badania potwierdzające. Wyniki badań, które otrzyma dawca powinny zawierać nazwę testu.

3. Przeciwciała anti-HCV

U dawców, u których w teście przeglądowym wykryto przeciwciała anti-HCV, należy przeprowadzić badania weryfikacyjne (patrz tab. 2). Dodatnie wyniki badań RNA HCV wskazują, że dawca jest zakażony wirusem i należy go na stałe zdyskwalifikować we wszystkich placówkach służby krwi w Polsce. Dane personalne dawców, u których wykryto RNA HCV powinny być automatycznie dostępne wszystkim jednostkom organizacyjnym służby krwi za pośrednictwem bazy danych KRDK, a jeśli to nie jest możliwe, muszą być wysyłane na bieżąco do wszystkich Oddziałów Terenowych podległych danemu Centrum Krwiodawstwa, działów zapewnienia jakości wszystkich innych Centrów Krwiodawstwa oraz do IHiT. Dawca, u którego wykryto RNA HCV powinien niezwłocznie zostać wezwany do Centrum Krwiodawstwa. W tym celu należy użyć odpowiedniego druku (Wzór nr 1). Lekarz lub osoba upoważniona informująca dawcę o wynikach badań wskazujących na zakażenie HCV

Tabela 1. Postępowanie obowiązujące po stwierdzeniu w teście przeglądowym powtarzalnie reaktywnego wyniku HBsAg
Table 1. Obligatory procedures following repeatedly reactive HBsAg results

Wynik powtórnego testu przeglądowego	Badania w Centrum Krwiodawstwa		Badania weryfikacyjne w Centrum Krwiodawstwa lub IHIT		Postępowanie z krwiodawcą
	Krew i jej składniki	Badania wirusologiczne	Badania wirusologiczne	Wynik	
Ujemny/Ujemny Reaktywny/Reaktywny i/lub Reaktywny/Ujemny	Dopuszczyć do użycia Zniszczyć składniki komórkowe Zabezpieczyć wszystkie dostępne próbki i pojemniki z osoczem do czasu zakończenia postępowania weryfikacyjnego lub wykluczenia dawcy, potem zniszczyć pojemniki Jeśli wyniki badań weryfikacyjnych wskazują na zakażenie HBV, wykonać badanie DNA HBV z aktualnej i wcześniejszych donacji	- Wykonać test potwierdzenia z tej samej próbki	- Dodatni	- Dodatni	Nie jest nosicielem HBV, nadal może oddawać krew Prawdopodobnie jest nosicielem HBV, o ile nie nastąpiła pomyłka co do dawcy lub reaktywny wynik HBsAg nie jest spowodowany zszepieniem. Po wyjaśnieniu obu ewentualności, jeśli jest nosicielem, zdykwalifikować na stałe — szczegóły w tekście. Pobrać nową próbkę i zbadać ją testem przeglądowym. Gdy wynik testu przeglądowego okaże się ujemny, próbkę przesłać do IHIT, aby wykonać dodatkowe badania potwierdzające. Skierować do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Wypełnić ankietę epidemiologiczną i formularz dla SANEPID Nie jest nosicielem HBV, o ile nie wykryto u niego HBV DNA. Wykluczyć na 6 miesięcy. Po tym okresie wykonać ponowne badania HBsAg i HBV DNA w pojedynczej donacji. Do oddawania krwi dopuścić po uzyskaniu wyników ujemnych. Jeżeli dodatnia reakcja utrzymuje się minimum rok, upoważnia to Centrum Krwiodawstwa do dyskwalifikacji dawcy bez wpyisywania na listę osób z potwierdzonym zakażeniem
				Niepoddający się neutralizacji	

powinna także przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz formularz dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej.

Ponadto od takiej osoby należy pobrać nową próbkę i zbadać ją testem przeglądowym, w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy (tab. 2).

U dawców z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testów przeglądowych anty-HCV, u których nie wykryto RNA HCV, wykonuje się w IHIT badanie przeciwciał testem uzupełniającym typu Western Blot, na przykład RIBA (*recombinant immunoblot assay*). Potwierdzenie obecności przeciwciał w teście uzupełniającym, a niewykrycie RNA HCV wskazuje, że dawca prawdopodobnie przebył zakażenie, lecz aktualnie nie ma markerów czynnej replikacji wirusa. Z dawcą takim należy postępować analogicznie jak z dawcą, u którego wykryto RNA HCV (patrz wyżej).

W przypadku wątpliwego wyniku testu uzupełniającego, dawca wymaga dalszej obserwacji. Dawcy z wątpliwymi wynikami testu uzupełniającego powinni zostać poinformowani pisemnie za pomocą druku według Wzoru nr 2 o potrzebie wykonania dalszych badań, przeprowadzanych co 6 miesięcy i czasowym odsunięciu od oddawania krwi. Utrzymujące się powtarzalnie reaktywne wyniki testów serologicznych i/lub wątpliwe wyniki testu uzupełniającego, przy braku RNA HCV przez okres co najmniej roku, upoważniają Centrum Krwiodawstwa do dyskwalifikacji dawcy zgodnie z zasadami opisanymi poniżej.

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. W takiej sytuacji zawiadamiając dawcę, należy zastosować druk według Wzoru nr 2. Jeśli nieswoiste reakcje utrzymują się dłużej, należy kontrolować dawcę co 6 miesięcy i postępować jak opisano w części „Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły”. Do oddawania krwi można dopuścić dawcę wyłącznie w przypadku braku RNA HCV oraz braku przeciwciał anty-HCV wykrywanych testem przeglądowym i testem uzupełniającym.

4. Przeciwciała anty-HIV

Obowiązujące postępowanie w przypadku stwierdzenia powtarzalnie reaktywnego wyniku testu przeglądowego przedstawia tabela 3.

Po stwierdzeniu co najmniej dwóch reaktywnych wyników testu przeglądowego, do IHIT nale-

Wzór nr 1

Centrum Krwiodawstwa

Adres:

Pani/Pan: Imię i nazwisko

Data urodzenia:

Adres:

Zwracamy się z prośbą o niezwłoczne zgłoszenie się do Centrum Krwiodawstwa w

.....

lub Terenowego Oddziału Centrum w

po odbiór wyników badań.

Wzór nr 2

Centrum Krwiodawstwa

Adres:

Pani/Pan: Imię i nazwisko

Adres:

Data badania:

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

ży przesłać próbkę krwi w celu wykonania badań potwierdzających zakażenie testem Western Blot (WB) i/lub RNA HIV.

Wykrycie RNA HIV i/lub 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. Od dawców z takimi wynikami testów weryfikacyjnych, po okresie około 2–4 tygodni należy pobrać nowe próbki i wykonać test przeglądowy w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy. Podobne postępowanie obowiązuje w przypadku dawców z dodatnimi wynikami WB i/lub RNA HIV.

Jeśli nie wykryto RNA HIV, a wyniki badań testem WB są wątpliwe i/lub wyniki testu przeglądowego są powtarzalnie reaktywne, dawca powinien podlegać kolejnym badaniom co 6 miesięcy (licząc od pierwszego pobrania lub ostatniej weryfikacji) lub zastosować się do zaleceń IHiT. W takim przypadku obowiązuje czasowa dyskwalifikacja dawcy (Wzór nr 2).

Uzyskanie wątpliwego wyniku WB w dwóch kolejnych badaniach przeprowadzonych minimum

w ciągu roku, przy ujemnych wynikach RNA HIV, upoważnia Centrum Krwiodawstwa do stałej dyskwalifikacji dawcy; ewentualnie Centrum Krwiodawstwa może kontynuować badania do uzyskania ujemnych wyników wszystkich testów. Podobnie należy postąpić, jeśli powtarzalnie reaktywne wyniki testu przeglądowego utrzymują się przez okres minimum roku, przy ujemnych wynikach RNA HIV i WB.

Jeżeli wyniki testów WB i RNA HIV są ujemne i nie ma zaleceń ze strony IHiT, dawca może oddawać krew bez ponownej weryfikacji w IHiT, 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 powtarzalnie reaktywny, należy nadal kontrolować dawcę co 6 miesięcy, a po upływie roku można skreślić go z listy w taki sposób, jak to podano w części „Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły”. Dawcę można dopuścić do oddawania krwi po uzyskaniu ujemnych wyników testów: przeglądowego, RNA HIV i WB.

Jeżeli nie ma kontaktu z dawcą, Centrum Krwiodawstwa jest zobowiązane wysłać listem poleconym

Tabela 2. Postępowanie obowiązujące po stwierdzeniu w teście przeglądowym powtarzalnie reaktywnego wyniku anty-HCV**Table 2.** Obligatory procedures following repeatedly reactive anti-HCV results

Badanie w Centrum Krwiodawstwa		Badania weryfikacyjne w IHiT		Postępowanie z krwiodawcą
Wynik powtórnego testu przeglądowego	Postępowanie z krwią i jej składnikami	Wynik testu RNA HCV	Wynik testu uzupełniającego	
Ujemny/Ujemny	Dopuszczyć do użycia	–	–	Nie jest nosicielem HCV, może nadal oddawać krew
Reaktywny/Reaktywny lub	Zniszczyć składniki komórkowe	Dodatni	Nie wykonuje się	Jest nosicielem HCV (o ile nie nastąpiła pomyłka co do dawcy) Zdyskwalifikować na stałe. Skierować do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Wypełnić ankietę epidemiologiczną i formularz dla SANEPID. Pobrać nową próbkę i wykonać oznaczenie testem przeglądowym w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy
Reaktywny/Ujemny	Zabezpieczyć wszystkie dostępne próbki i pojemniki z osoczem, do czasu zakończenia postępowania weryfikacyjnego lub wykluczenia dawcy; potem zniszczyć pojemniki Jeśli wyniki badań weryfikacyjnych wskazują na zakażenie HCV, przesłać do IHiT próbkę z aktualnej i wcześniejszych donacji Gdy wyniki weryfikacji są ujemne, zniszczyć zabezpieczone pojemniki z osoczem	Ujemny	Dodatni	Prawdopodobnie przebył zakażenie (o ile nie nastąpiła pomyłka co do dawcy). Skierować do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Wypełnić ankietę epidemiologiczną i załącznik dla SANEPID. Pobrać nową próbkę i wykonać oznaczenie testem przeglądowym w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy
			Wątpliwy	Może być nosicielem HCV. Wykluczyć na 6 miesięcy, powtórzyć test przeglądowy i przesłać próbkę osocza do IHiT. Utrzymywanie się reaktywnego wyniku testu przeglądowego i/lub wątpliwego wyniku testu uzupełniającego przez okres minimum roku, upoważnia Centrum Krwiodawstwa do dyskwalifikacji dawcy (bez wpisywania na listę osób z potwierdzonym zakażeniem). Do oddawania krwi dopuścić po uzyskaniu ujemnych wyników testów: przeglądowego, RNA HCV i uzupełniającego
			Ujemny	Prawdopodobnie nie jest nosicielem HCV. Utrzymywanie się przez okres minimum 1 roku reaktywnego wyniku testu przeglądowego przy ujemnym wyniku testu uzupełniającego upoważnia Centrum Krwiodawstwa do dyskwalifikacji dawcy (bez wpisywania na listę osób z potwierdzonym zakażeniem). Do oddawania krwi dopuścić po uzyskaniu ujemnych wyników testów: przeglądowego, RNA HCV i uzupełniającego

Tabela 3. Postępowanie obowiązujące po stwierdzeniu w teście przeglądowym powtarzalnie reaktywnego wyniku anty-HIV1, 2

Table 3. Obligatory procedures following repeatedly reactive ant-HIV results

Badania w Centrum Krwiodawstwa		Badania w IHiT	Postępowanie z krwiodawcą
Wynik powtórnego testu przeglądowego	Postępowanie z krwią i jej składnikami	Wynik WB i/lub RNA HIV	
Ujemny/Ujemny	Dopuszczyć do użycia	–	Nie jest nosicielem HIV, może nadal oddawać krew
Reaktywny/Reaktywny lub Reaktywny/Ujemny	Zniszczyć składniki komórkowe Zabezpieczyć wszystkie dostępne próbki i pojemniki z osoczem do czasu uzyskania wyniku z IHiT: — jeśli wynik wskaże na zakażenie HIV, przestać próbki z poprzednich donacji do IHiT z informacją jakie pojemniki z osoczem są zabezpieczone — jeśli wynik testów potwierdzenia będzie ujemny, zniszczyć przechowywane pojemniki i próbki — jeśli wynik testów potwierdzenia będzie wątpliwy, to próbki i pojemniki przechować do czasu uzyskania kolejnych wyników weryfikacji lub do stałej dyskwalifikacji dawcy	RNA HIV dodatni/WB ujemny, wątpliwy lub dodatni RNA HIV ujemny/WB wątpliwy/ujemny	Jest nosicielem HIV (o ile nie nastąpiła pomyłka co do dawcy). Zdyskwalifikować na stałe z Rejestru Dawców. Skierować do placówek służby zdrowia dla osób zakażonych HIV. Wypełnić ankietę epidemiologiczną i formularz dla SANEPID. Pobrać nową próbkę i wykonać oznaczenie testem przeglądowym w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy Prawdopodobnie wynik testu przeglądowego jest wynikiem nieswoistym. Postępować zgodnie z zaleceniami IHiT. Utrzymywanie się dodatniego wyniku testu przeglądowego lub wątpliwego wyniku testu WB przez minimum rok, upoważnia Centrum Krwiodawstwa do dyskwalifikacji dawcy (bez wpisywania na listę osób z potwierdzonym zakażeniem). Po uzyskaniu ujemnego wyniku testu przeglądowego (wykonanego przynajmniej po 3 miesiącach od ostatniej weryfikacji), dawca może oddawać krew (bez ponownej weryfikacji w IHiT), jeśli wyniki RNA HIV i WB z poprzedniego badania były ujemne

za pokwitowaniem odbioru 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 i/lub dodatniego wyniku RNA HIV, Centrum Krwiodawstwa powinno wezwać krwiodawcę listem poleconym za pokwitowaniem odbioru do zgłoszenia się (Wzór nr 1).

Dyrektor Centrum Krwiodawstwa lub upoważniony przez niego lekarz musi przeprowadzić rozmowę z krwiodawcą, informując go o wykrytym u niego zakażeniu wirusem HIV i udzielić wskazówek dotyczących ochrony innych osób przed zakażeniem. Lekarz lub osoba upoważniona powinna przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz załącznik dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej. Następnie należy przekazać krwiodawcę do placówki świadczącej opiekę ambulatoryjną dla osób zakażonych HIV i chorych na AIDS lub odpowiedniego oddziału szpitalnego (wykazy podano na końcu pracy).

Jeśli bliższe informacje o dawcy zakażonym wirusem HIV nie są dostępne za pośrednictwem bazy danych KRDK, Centrum Krwiodawstwa, w którym był on zarejestrowany powinno przekazać do IHiT informację, czy osoba ta była dawcą honorowym czy płatnym, pierwszorazowym czy wielokrotnym oraz informację o losach krwi i jej składników z poprzednich donacji.

Pracowników Centrum Krwiodawstwa obowiązują rygorystyczne przestrzeganie tajemnicy. Nie wolno udzielać żadnych informacji o stwierdzonym zakażeniu HIV ani krwiodawcy, ani innym osobom (robi to wyłącznie dyrektor lub upoważniony przez niego lekarz).

Dodatnie wyniki testów weryfikacyjnych wykonanych w IHiT zostaną automatycznie umieszczone w bazie danych KRDK i będą dostępne dla wszystkich jednostek organizacyjnych służby krwi. Jeśli nie jest to możliwe, IHiT jest zobowiązany do przesłania wszystkim Centrum Krwiodawstwa zakodowanej informacji o stałej dyskwalifikacji dawcy, zaś Centra Krwiodawstwa mają obowiązek przekazywania tej informacji (również zakodowanej) do wszystkich swoich Oddziałów Terenowych.

5. Przeciwciała kiłowe

Weryfikacje w kierunku zakażenia krętkiem kiły przeprowadza się w laboratorium wenerologicznym na danym terenie lub w ośrodku wskazanym przez Krajowego Konsultanta w dziedzinie wenerologii, swoistymi testami krętkowymi. O wyborze testu decyduje jednostka wykonująca badanie. Zaleca

się, aby powtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego potwierdzić jednym z następujących testów: TPHA, FTA albo WB.

Po otrzymaniu ujemnych wyników badań weryfikacyjnych i wykluczeniu tła chorobowego nieswoiście reaktywnych wyników testów przeglądowych, należy okresowo powtarzać badania. Dawca może oddawać krew po uzyskaniu ujemnych wyników testów przeglądowych, jeśli wcześniej nie przeszedł zakażenia kiłą.

W przypadku potwierdzenia zakażenia (dodatni wynik badania weryfikacyjnego) należy za pośrednictwem KRDK poinformować o tym wszystkie Centra Krwiodawstwa i inne podmioty jak podano to w rozdziale „Zawiadamianie innych podmiotów o wykrytym zakażeniu” i postępować zgodnie z zasadami podanymi w części „Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły”. Lekarz lub osoba upoważniona powinna przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz załącznik dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej. Dawcę należy skierować do poradni wenerologicznej, znajdującej się na danym terenie, a dane osobowe krwiodawcy należy przesłać do Centralnej Kartoteki przy SANEPID.

Od dawcy należy pobrać nową próbkę i zbadać ją testem przeglądowym, w celu wykluczenia pomyłki co do dawcy.

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.

Badania przeglądowe:

- RNA HCV, RNA HIV i DNA HBV bada się u wszystkich dawców, u których nie wykryto markerów serologicznych zakażenia HCV, HIV, HBV i kiły (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 AIAT. Badania mogą być wykonywane testami typu Multiplex, które wykrywają jednocześnie materiał genetyczny kilku wirusów. Na następnym etapie badań ustala się, który wirus jest obecny w próbce;
- DNA Parwovirusa B19 bada się u dawców, których krwinki służą do immunizacji oraz w osoczu dawców immunizowanych przeznaczonym do produkcji immunoglobulin anty-RhD i anty-HBs (badania wykonuje się w pulach).

Badania molekularne wykonywane są też w procesie weryfikacji wyników oznaczeń markerów serologicznych anti-HCV, anti-HIV i HBsAg. Badania te wykonuje się zawsze w pojedynczych próbkach.

Badania NAT można wykonywać w:

- poddanych walidacji i nadzorowanych przez IHiT Pracowniach Biologii Molekularnej w Centrach Krwiodawstwa, w pojedynczych lub zlanych w pulę próbkach osocza dawców,
- laboratoriach IHiT, wykonujących badania weryfikacyjne.

Dopuszczone do użycia testy muszą mieć taką czułość, aby zastosowany system badań molekularnych wykrywał przynajmniej 5000 j.m. RNA HCV/ml oraz 10 000 j.m. RNA HIV/ml. Walidacja czułości testu powinna być przeprowadzona wobec standardów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*). Badania metodami biologii molekularnej przeznaczonymi do wykrywania poszczególnych znaczników należy przeprowadzać ściśle według instrukcji producenta używanych odczynników. Interpretacja wyników winna być również zgodna z instrukcją producenta. Badania należy wykonywać za pomocą testów, które zostały dopuszczone do użycia przez IHiT. We wszystkich Centrach Krwiodawstwa wykonujących badania danym testem, do każdej serii badań przeglądowych należy dołączać tę samą kontrolę dodatnią. Rodzaj kontroli określa IHiT. Wyniki tej kontroli należy codziennie wprowadzać do programu komputerowego „Ciągła kontrola jakości”.

1. Przeglądowe badania NAT prowadzone w pojedynczych donacjach

Po uzyskaniu reaktywnego wyniku testu Multiplex w kierunku RNA HCV, DNA HBV i RNA HIV u dawców, u których nie wykryto markerów serologicznych, należy powtórzyć dwa razy badanie tym samym testem oraz niezależnie od wyniku powtórnych badań wykonać testy różnicujące.

1. Jeśli wynik obu powtórzeń testu przeglądowego oraz wyniki testów różnicujących są ujemne, wtedy niepowtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego należy uznać za fałszywy, a wynik badania próbki za negatywny (nie wykryto ani RNA HCV, ani RNA HIV-1, ani DNA HBV). Składniki krwi od tego dawcy należy zakwalifikować do celów leczniczych.
2. Jeśli wynik przynajmniej jednego z dwóch powtórzeń testu przeglądowego jest reaktywny, próbki z obecnej i z poprzednich donacji należy przesłać do IHiT, a pojemniki z osoczem zabezpieczyć.

Jeśli wyniki:

- a) testów różnicujących są ujemne, wtedy wynik testu przeglądowego należy uznać za reaktywny, krwi nie wolno zakwalifikować do użyciu klinicznego; krwiodawcę trzeba objąć dyskwalifikacją czasową do chwili wyjaśnienia; w zależności od wyników badań w IHiT dawcę przywrócić do oddawania krwi lub wykluczyć;
 - b) testu lub testów różnicujących jest/są dodatnie, należy uznać, że dawca jest zakażony danym wirusem [DNA HBV(+) i/lub RNA HCV(+) i/lub RNA HIV(+)]. Do IHiT należy przesłać próbki do weryfikacji;
 - c) obu powtórzeń testu przeglądowego są ujemne (mimo że wynik wstępny był dodatni!), ale któryś z wyników (lub wyniki) testów różnicujących jest dodatni (są dodatnie) należy próbki przesłać do IHiT do weryfikacji. Po otrzymaniu wyników z IHiT zdyskwalifikować na stałe (jeśli otrzymany wynik jest dodatni) lub wezwać na badanie kontrolne za około 8 tygodni (jeśli otrzymany wynik jest ujemny).
3. Dawcy z dodatnimi wynikami testów w kierunku HBV DNA, HCV RNA i HIV RNA muszą być na stałe zdyskwalifikowani. Krew i składniki komórkowe od dawców z dodatnimi wynikami testów NAT powinny zostać zniszczone. Próbki i pojemniki z osoczem z poprzednich donacji należy przesłać do IHiT i wszcząć procedurę śledzenia wstecz, zgodnie z odpowiednią instrukcją. Lekarz lub osoba upoważniona informująca dawcę o wynikach badań wskazujących na zakażenie powinna także przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz formularz dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej.
 4. Jeśli wyniki testów serologicznych są powtarzalnie reaktywne, należy postępować z dawcą jak opisano w części „Badania weryfikacyjne w próbkach z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testów serologicznych”.

2. Przeglądowe badania NAT wykonywane w zlanym w pulę próbek od wielu dawców

Po otrzymaniu reaktywnego wyniku testu Multiplex w puli osocza należy wstrzymać do wyjaśnienia wszystkie donacje wchodzące w skład puli, aż do zidentyfikowania reaktywnej donacji i potwierdzenia, że pozostałe donacje wchodzące w skład puli nie zawierają markerów zakażenia. Po uzyskaniu tych informacji donacje ujemne należy zwolnić do

użycia oraz ustalić, który z wirusów jest obecny w osoczu donacji reaktywnej.

W celu zidentyfikowania reaktywnej donacji należy wykonać testem Multiplex badanie pojedynczych próbek.

1. Jeśli wynik badania pojedynczych próbek jest ujemny i wyniki testów serologicznych są ujemne, należy pierwotny wynik uznać za fałszywie reaktywny.
2. Jeśli wynik testu Multiplex w pojedynczej próbce jest reaktywny, a wyniki testów serologicznych są ujemne, posiadane próbki tej donacji należy przesłać do IHiT, a pojemniki z osoczem zabezpieczyć. Trzeba dołączyć szczegółową dokumentację wszystkich powtórzeń, wszystkich badań tej donacji. W próbkach należy wykonać (w IHiT lub jeśli to możliwe w Centrum Krwiodawstwa) badania testami NAT, które pozwalają na identyfikację RNA HCV, DNA HBV i RNA HIV. Jeśli badania te zostały wykonane przez laboratorium przeprowadzające badania przeglądowe NAT, wyniki i dokumentację tych badań trzeba wysłać do IHiT wraz z próbką do weryfikacji.

Jeśli wyniki:

- a) testów różnicujących są ujemne zarówno w RCKiK, jak i IHiT, wtedy wynik testu przeglądowego należy uznać za reaktywny, składników krwi nie wolno zakwalifikować do użytku klinicznego; krwiodawcę objąć dyskwalifikacją czasową na okres około 8 tygodni. Po tym czasie wykonać badania serologiczne i molekularne badania przeglądowe w pojedynczej donacji w Centrum Krwiodawstwa i jeśli wyniki są ujemne, należy dopuścić dawcę do oddawania krwi.
- b) testu lub testów różnicujących jest/są dodatnie, należy przypuszczać, że dawca jest zakażony danym wirusem [DNA HBV (+) i/lub RNA HCV (+) i/lub RNA HIV (+)]. Do IHiT należy przesłać próbki do weryfikacji nowo pobraną, próbkę z obecnej donacji lub pojemnik z osoczem oraz próbki z poprzednich donacji.

Dawcy z potwierdzonymi dodatnimi wynikami testów w kierunku DNA HBV, RNA HCV i RNA HIV muszą być na stałe zdyskwalifikowani. Krew i składniki komórkowe od dawców z dodatnimi wynikami testów NAT powinny zostać zniszczone. Próbki i pojemniki z osoczem z poprzednich donacji od dawców bez markerów serologicznych należy przesłać do IHiT i wszcząć procedurę śledzenia wstecz, zgodnie z odpowiednią procedurą.

Lekarz lub osoba upoważniona informująca dawcę o wynikach badań wskazujących na zakażenie powinna także przeprowadzić wywiad epidemiologiczny, mający na celu ustalenie źródła zakażenia się dawcy i wypełnić ankietę epidemiologiczną oraz formularz dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej.

3. Jeśli wyniki testów serologicznych są powtarzalnie reaktywne postępować z dawcą jak opisano w części „Badania weryfikacyjne w próbkach z powtarzalnie reaktywnymi wynikami testów serologicznych”.

3. 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; niedopuszczalne jest, aby badania przeprowadzały osoby dochodzące z innych pracowni. W trakcie prowadzenia badania osoby je wykonujące nie mogą być odrywane do wykonania innych czynności. 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.

Jeśli badania wykonywane są technikami manualnymi, należy stosować się do specjalnych zaleceń dotyczących warunków lokalowych i organizacji pracy.

4. Wymagania lokalowe i sprzętowe pracowni badania osocza metodami biologii molekularnej wykonującej badania metodami manualnymi lub półautomatycznymi

Ze względu na możliwość zanieczyszczenia fragmentami DNA lub RNA powstałymi we wcześniejszej wykonywanych reakcjach PCR lub TMA, konieczne jest zapewnienie specjalnej organizacji przestrzennej pracowni i odpowiedniej organizacji pracy. Zaleca się, aby izolowanie materiału genetycznego i amplifikacja/detekcja odbywały się przynajmniej w dwóch 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-procentowego podchlorynu sodu lub postępować według zaleceń producentów. Dodatkowo można używać do czyszczenia powierzchni, sprzętu i aparatury odpowiednie płyny, na przykład Aerodesin 2000, DNA-away. Pomieszczenia przed- i poamplifikacyjne muszą być sprzątane przy użyciu oddzielnego sprzętu. Pomieszczenia mogą być wietrzone przez otwieranie okien, o ile kanały klimatyzacji lub wentylacji z pomieszczenia poamplifikacyjnego nie znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie.

5. Materiał do badań NAT

Badanym materiałem jest osocze, uzyskane z próbki krwi pobranej do próżniowej próbówki przeznaczonej do badań metodami biologii molekularnej (zawierającej EDTA i żel separujący). Dzięki zastosowaniu systemu zamkniętego, unika się manipulacji związanych z oddzieleniem materiału do badania, które zwiększają ryzyko uzyskania fałszywych wyników. 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 próbówce 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, próbówki wyjściowe 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 reaktywnego konieczne jest wykonywanie czasochłonnych badań nad zidentyfikowaniem dodatniej donacji. 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 2–6°C do czasu wykonania badania i otrzymania wyniku, nie dłużej niż dwa dni. Dopuszcza się dłuższe przechowywanie w przypadku wykrycia obecności wirusa w wyko-

nanej puli. W tym czasie należy dokonać identyfikacji dodatniej donacji.

6. Przeprowadzenie badań molekularnych — czynności przygotowawcze

Otrzymywane do badań próbki powinny być zapatrzone w odpowiednią dokumentację, zawierającą datę sporządzenia oraz informację o liczbie próbek dostarczonych do badań, numerach przysłanych próbek (odpowiadających numerowi donacji) i podpis osoby odpowiedzialnej za sporządzenie dokumentów. Należy sprawdzić zgodność otrzymanych próbek z załączoną do nich dokumentacją i potwierdzić to podpisem.

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 (temp. 2–6°C) lub zamrażarce (temp. min. –20°C). Jeśli próbki znajdują się w zamrażarce, to przed wykonaniem badań należy je rozmrozić (w lodówce lub w temperaturze pokojowej). Przed rozpoczęciem 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 próbek, w których są duże, widoczne skrzepy usuwa się je za pomocą jednorazowych pipetek (do każdej próbki oddzielna pipetka). Wszystkie zaobserwowane nieprawidłowości powinny być odnotowane w odpowiednim protokole.

7. Walidacja badań technikami NAT

Badania NAT można wykonywać po otrzymaniu z IHiT zaświadczenia potwierdzającego, że pracownia biologii molekularnej Centrum Krwiodawstwa uzyskała odpowiednie wyniki obowiązujących badań walidacyjnych. Zaświadczenie musi być wydawane raz w roku. Osoba nadzorująca działalność 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.

8. Ciągła kontrola jakości

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

Tabela 4. Zakres badań weryfikacyjnych u dawców bez markerów serologicznych, z dodatnimi lub wzbudzającymi wątpliwośći wynikami testów NAT**Table 4.** The range of verification tests in donors without serological markers, with reactive or doubtful NAT test result

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 anty-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 anty-HIV EIA, WB	
HBV	Próbka pobrana z pojemnika z osoczem z donacji DNA HBV(+)/HBsAg(-)	DNA HBV, a jeśli wynik dodatni to anty-HBc i ewentualnie anty-HBs	Potwierdzenie wyniku, wykluczenie pomyłki co do dawcy i różnicowanie okienka serologicznego i ukrytego zakażenia HBV DNA HBV, anty-HBc i ewentualnie anty-HBs
	Próbka pobrana po wezwaniu dawcy i próbki archiwalne		

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

- dołączanie do każdej serii badań kontroli dodatniej wyznaczonej przez IHiT, tej samej we wszystkich Centrach Krwiodawstwa pracujących daną metodą (tzw. *run control*) i wpisywanie wyników jej badań do programu komputerowego „Ciągła Kontrola Jakości”;
- analizę wyników fałszywie dodatnich i nieważnych;
- 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.

9. Badania weryfikacyjne u dawców bez markerów serologicznych, z dodatnimi wynikami testów NAT

Badania weryfikacyjne u dawców bez markerów serologicznych, z dodatnimi lub wzbudzającymi wątpliwośći wynikami testów NAT wykonuje IHiT. Ich zakres jest ustalany indywidualnie i obejmuje badania przedstawione w tabeli 4.

Celem badań weryfikacyjnych u dawców z wykrytym RNA HCV i u dawców z wykrytym RNA HIV, a bez wykrytych przeciwciał jest potwierdzenie w obecnej i w ponownie pobranej próbce obecności RNA wirusa oraz pojawienia się u dawcy odpowiednich przeciwciał. Badanie przeciwciał w kolejno pobranej próbce powinno być wykonane w Centrum

Krwiodawstwa i jego wynik powinien być dostarczony ze skierowaniem na badania weryfikacyjne.

Celem badań weryfikacyjnych u dawców z wykrytym DNA HBV, a bez wykrytego antygenu HBs jest potwierdzenie obecności DNA HBV oraz ustalenie statusu dawcy co do okresu zakażenia HBV. W tym celu należy wykonać badania DNA HBV w próbce wyjściowej, ponownie pobranej i w próbkach archiwalnych (jeśli są dostępne). Po potwierdzeniu wykrycia DNA HBV należy wykonać w IHiT badanie anty-HBc i ewentualnie anty-HBs.

Jeśli zakażenie wykryto w okienku serologicznym, to w próbce wyjściowej wykrywa się jedynie DNA HBV, a w próbkach kolejnych powinno się wykryć kolejne markery zakażenia (HBsAg, anty-HBc, anty-HBs). To, jakie markery zakażenia zostaną wykryte, zależy od tego, w którym okresie zakażenia pobrano próbkę. Każdy przypadek należy rozpatrywać indywidualnie.

Jeśli wykrycie DNA HBV, a nie wykrycie HBsAg wynika z tak zwanego ukrytego zakażenia HBV (definiowanego jako obecność HBV DNA u osoby bez HBsAg w okresie innym niż okienko serologiczne), to w próbce wyjściowej powinny być wykrywane przeciwciała anty-HBc. Mogą dodatkowo występować przeciwciała anty-HBs. Ukryte zakażenie u osoby bez tych przeciwciał jest mało prawdopodobne. Stan ukrytego zakażenia HBV może być stanem przewlekłym i wtedy wymienio-

Ankieta nr 1

Informacje dotyczące donacji dodatniej RNA HCV i/lub anty-HCV

W donacji o numerze: stwierdzono obecność:

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko:

Adres:

Wiek:

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery donacji dodatniej i wcześniejszych, poziom AlAT i informacja, które preparaty zostały przetoczone:

Donacja RNA HCV dodatnia: data..... AlAT

Donacje poprzednie:

data AlAT Przetoczony preparat

data AlAT Przetoczony preparat

.....

.....

Dane z wywiadu dotyczące ewentualnych źródeł zakażenia się dawcy:

.....

Podpis lekarza:

Data wypełnienia ankiety

ne markery zakażenia: DNA HBV i/lub anty-HBc i/lub anty-HBs będą wykrywane w próbkach archiwalnych i w kolejno pobranych. Stan ukrytego zakażenia może też występować w okresie zdrowienia z zakażenia HBV, w końcowej jego fazie. W takich przypadkach w kolejno pobranych próbkach powinny być wykrywane anty-HBc i anty-HBs, a niewykrywane DNA HBV.

Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły

Dawca, wypełniając przed oddaniem krwi kwestionariusz dla krwiodawców, powinien zobowiązać się w nim do terminowego odbioru wyników badań i stawiania się na wezwania do Centrum Krwiodawstwa. W kwestionariuszu powinna znaleźć się adnotacja, że po 3-krotnym powiadomieniu dawcy Centrum Krwiodawstwa uznaje, że został on poinformowany o konieczności odebrania wyników i Centrum Krwiodawstwa nie ponosi odpowiedzialności za dalsze konsekwencje spowodowane ich nieodebraniem. W adnotacji tej należy też poinformować dawcę, że wyniki badań zostaną przesłane do SANEPID.

W przypadku gdy krwiodawca powinien zgłosić się po odbiór wyników badań, lekarz lub inna upoważniona osoba przesyła krwiodawcy listem poleconym za potwierdzeniem odbioru wezwanie do sta-

wienia się w Centrum Krwiodawstwa (Wzór nr 1). Jeśli dawca nie stawia się po odbiór wyników, należy 3-krotnie w odstępach nie dłuższych niż miesiąc wysłać kolejne zawiadomienia. Po doręczeniu trzeciego zawiadomienia i odczekaniu około 2 tygodni, należy przekazać wynik badania dawcy do SANEPID z adnotacją o niestawianiu się dawcy po odbiór wyników.

Lekarz lub upoważniona do tego osoba wydająca dawcy wyniki badań wskazujących na potwierdzone zakażenie HCV, HBV lub HIV powinien przeprowadzić z dawcą wywiad epidemiologiczny (wypełniając odpowiednią ankietę: Ankieta nr 1, 2 lub 3) w celu ustalenia prawdopodobnego źródła zakażenia się dawcy. Lekarz lub upoważniona do tego osoba wypełnia także formularz dla SANEPID o zgłoszeniu choroby zakaźnej. Ujednolicony sposób odpowiedzi na pytania zawarte w formularzu patrz część „Zawiadamianie innych podmiotów o wykrytym zakażeniu”. Po otrzymaniu od lekarza wyniku badania, krwiodawca powinien pokwitować jego odbiór na kopii. Wynik badania przeglądowego powinien zawierać nazwę odczynników (i nazwę producenta), którymi wykonano badania. Należy podać też takie wyniki testu, jak wartość S/CO lub CORatio lub stężenie antygeny wraz z podaniem stężenia, przy którym wynik uznaje się za dodatni. W wynikach badań potwierdzających lub uzupełniających należy podać nazwę użytego testu. Lekarz winien wytłumaczyć krwiodawcy, co oznaczają wydane wyniki.

Ankieta nr 2

Informacje dotyczące donacji dodatknej DNA HBV i/lub HBsAg

W donacji o numerze: stwierdzono obecność:

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko:

Adres:

Wiek:

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery donacji dodatknej i wcześniejszych, poziom AlAT i informacja, które preparaty zostały przetoczone:

Donacja DNA HBV dodatnia: data..... AlAT

Donacje poprzednie:

data.....AlAT..... Przetoczony preparat

data.....AlAT..... Przetoczony preparat

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 anti-HBs: tak/nie, kiedy

.....

.....

Podpis lekarza:

Data wypełnienia ankiety

Ankieta nr 3

Informacje dotyczące donacji dodatknej RNA HIV i/lub anty-HIV

W donacji o numerze: stwierdzono obecność:

Informacje dotyczące dawcy:

Imię i nazwisko:

Adres:

Wiek:

Pierwszorazowy Wielokrotny

Daty i numery donacji dodatknej i wcześniejszych i informacja, które preparaty zostały przetoczone:

Donacja RNA HIV dodatnia: data

Donacje poprzednie:

data Przetoczony preparat

data Przetoczony preparat

.....

.....

.....

Dane z wywiadu dotyczące ewentualnych źródeł zakażenia się dawcy:

.....

.....

.....

Podpis lekarza:

Data wypełnienia ankiety

Jeśli wykonane badania weryfikacyjne w kierunku zakażenia wirusami: HCV, HIV i HBV oraz kiłą nie potwierdzają zakażenia dawcy lub z różnych powodów badań weryfikacyjnych nie przeprowadzono, należy wydać wyniki testu przeglądowego i szczegółowo je objaśnić. Trzeba też poinformować dawcę, że powtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego może mieć charakter wyniku fałszywie reaktywnego. Nie wolno wydawać dawcy niepotwierzonego wyniku badania przeglądowego przeciwciał anti-HIV.

Krwiodawca, który został skreślony na stałe z powodu potwierzonego zakażenia, przy odbiorze wyników powinien otrzymać skierowanie do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej lub w przypadku zakażenia HIV specjalistycznego zakładu ochrony zdrowia (patrz: Placówki służby zdrowia świadczące opiekę ambulatoryjną dla osób zakażonych HIV i chorych na AIDS oraz Oddziały szpitalne dla zakażonych HIV i chorych na AIDS). Jeżeli krwiodawca nie zgłasza się na wezwanie po odbiór wyników badań lub nie stawia się na dodatkowe badania, należy postępować jak opisano powyżej.

Każdy powtarzalnie reaktywny, niepotwierdzony wynik testu przeglądowego powoduje czasowe odsunięcie krwiodawcy od oddawania krwi, aż do chwili wyjaśnienia wszystkich wątpliwości. Dawcy z powtarzalnie reaktywnym, ale niepotwierdzonym wynikiem testu przeglądowego, u których takie wyniki utrzymują się przez rok mogą być skreśleni z listy krwiodawców na stałe lub odsunięci od oddawania krwi na następny rok (łącznie 2 lata), ale nie powinni być wpisywani na listę dawców z potwierdzonym zakażeniem. Skreślenia może dokonać Centrum Krwiodawstwa lub może je zaproponować IHiT. Dawcy tacy powinni być również kierowani (wraz z kompletem badań) do odpowiedniego lekarza/placówki służby zdrowia, w celu wyjaśnienia nieprawidłowości.

Jeśli dawca oddał krew w miejscu czasowego pobytu (np. jednostce wojskowej) i po odbiór wyników nie zgłasza się z powodu zmiany miejsca zamieszkania, należy wysłać wyniki listem poleconym za pokwitowaniem odbioru do miejsca pobytu czasowego (np. do lekarza kierującego z jednostki wojskowej).

Zawiadamianie innych podmiotów o wykrytym zakażeniu

W przypadku potwierzonego zakażenia HIV, HBV, HCV i/lub kiłą, dane osobowe krwiodawcy oraz informacja o przyczynie dyskwalifikacji powinny zostać automatycznie przesłane do bazy danych KRDK i za jej pośrednictwem będą dostępne dla

wszystkich jednostek organizacyjnych służby krwi połączonych z KRDK. Jeżeli ten sposób przekazywania informacji o zakażonych dawcach nie jest możliwy, to Centrum Krwiodawstwa jest zobowiązane do przekazania informacji o zakażeniach wirusem HCV, HBV i kiłą do:

- Działów Zapewnienia Jakości wszystkich pozostałych Centrów Krwiodawstwa (w tym Wojskowego i MSWiA),
- Zakładu Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi w IHiT,
- lokalnych oddziałów SANEPID.

Obowiązek poinformowania wszystkich Centrów Krwiodawstwa o zakażeniu HIV spoczywa na laboratorium wykonującym badania weryfikacyjne w IHiT. O wykrytym zakażeniu wirusem HIV, IHiT zawiadamia również Państwowy Zakład Higieny, gdzie prowadzony jest rejestr osób zakażonych HIV. Z powyższych powodów dane personalne wszystkich zakażonych krwiodawców powinny zostać przekazane do IHiT, nawet gdy po wykryciu materiału genetycznego wirusa nie wykonywano testu WB HIV w laboratorium wykonującym badania weryfikacyjne.

Na potrzeby niepołączonych z KRDK Oddziałów Terenowych oraz ekip, Centrum Krwiodawstwa jest zobowiązane prowadzić systematycznie uzupełniany, alfabetyczny rejestr dawców zdyskwalifikowanych z przyczyn zakaźnych. Rejestr ten powinien zawierać dane personalne, tj. imię, nazwisko i PESEL lub odpowiednik PESEL (w przypadku obcokrajowców) oraz adres osób zdyskwalifikowanych z powodów zakaźnych w macierzystym Centrum Krwiodawstwa, w pozostałych Centrach Krwiodawstwa (w tym Wojskowym i MSWiA) oraz zgłoszonych przez SANEPID. Nie należy umieszczać w nim przyczyn dyskwalifikacji. Pracownik zajmujący się rejestracją ma obowiązek sprawdzania, czy nazwisko każdej osoby zgłaszającej się do oddania krwi/jej składników nie znajduje się w tym rejestrze.

Wszystkie listy osób zakażonych, zawierające dane osobowe powinny być przesyłane w podwójnej kopercie. Na kopercie wewnętrznej, w której znajdują się dane personalne zakażonych osób, należy umieścić adnotację: przesyłka zawiera dane osobowe, prawnie chronione.

Informacje o wykrytym zakażeniu, przeznaczone dla SANEPID, powinny być również wysyłane w podwójnej kopercie, jak opisano powyżej. Zawiadomienia te należy wysłać na odpowiednich formularzach dla SANEPID, po otrzymaniu dodatniego wyniku potwierdzającego zakażenie. W przypadku zmiany formularzy zgłoszeniowych należy postępować analogicznie jak podano niżej.

Jeśli badania weryfikacyjne nie będą z różnych powodów wykonywane, należy przesłać wypełniony formularz, zaznaczając w nim powtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego, określając: Czynniki chorobotwórcze „reaktywny w teście przeglądowym, np. HBsAg”. Jeśli wynik testu potwierdzenia jest ujemny lub wątpliwy, takich osób nie należy zgłaszać, podobnie jak osób z wątpliwym wynikiem testu potwierdzenia. Zgodnie z częścią „Zawiadamianie dawcy o wynikach badań wirusologicznych i kiły”, należy skierować taką osobę do lekarza pierwszego kontaktu, który w razie potwierdzenia zakażenia zgłosi ją do pionu epidemiologicznego.

Sposób wypełniania zgłoszenia w sprawie wykrycia zakażenia wirusów HBV, HCV i HIV oraz kiły przedstawiono poniżej.

Wirus zapalenia wątroby typu B

W przypadku otrzymania powtarzalnie reaktywnego wyniku HBsAg:

W pkt. I. ROZPOZNANO p.pkt. 1. Czynniki chorobotwórcze, należy wpisać:

- **wirus zapalenia wątroby typu B**, jeśli wynik badania DNA HBV lub wynik testu potwierdzenia (neutralizacji) jest dodatni;
- **reaktywny w teście przeglądowym HBsAg**, jeśli wykonano tylko test przeglądowy.

System SPIN wpisze datę ostatniego wprowadzonego wyniku jako datę badania.

W metodach diagnostycznych należy zakreślić:

- X w kratce: badanie serologiczne, jeśli wynik potwierdzono testem neutralizacji i w rubryce „inne” wpisać **test neutralizacji dodatni**;
- X w kratce: badanie molekularne, jeśli wykonano badanie NAT i w rubryce „inne” wpisać **wykryto DNA HBV**.

W pkt. II 2. INNE INFORMACJE p.pkt. 2. Badana próbka pochodziła:

- zaznaczyć X w kratce: była badaniem przesiewowym;
- zaznaczyć X w kratce: została pobrana z innego powodu — **dawca krwi**.

W pkt. III 3. Jeśli wpisujemy wynik po weryfikacji, to:

- skreślić „będzie zweryfikowane” i wpisać „było zweryfikowane” oraz wpisać, kto wykonał badania weryfikacyjne;
- jeśli weryfikacji nie dokonano, to wpisać „dawcę skierowano do lekarza pierwszego kontaktu”.

Wirus zapalenia wątroby typu C

W pkt. I. ROZPOZNANO p.pkt. 1. Czynniki chorobotwórcze, należy wpisać:

- **wirus zapalenia wątroby typu C**, gdy wynik RNA HCV jest dodatni lub gdy wynik RNA HCV jest ujemny, a wynik testu uzupełniającego (RIBA lub inny) jest dodatni;
- **reaktywny w teście przeglądowym anty-HCV dodatni**, gdy wykonane zostało tylko badanie przeglądowe.

Dalej ankietę należy wypełnić jak w przypadku HbsAg.

Ludzki wirus upośledzenia odporności HIV

W pkt. I. ROZPOZNANO, należy wpisać:

- **zakażenie wirusem ludzkiego upośledzenia odporności HIV z zaznaczeniem**:
 - X w kratce: badanie serologiczne,
 - X w kratce: test potwierdzenia Western Blot.

W przypadku otrzymania wyniku RNA HIV zaznaczyć:

- X w kratce: badanie molekularne, a w rubryce inne wpisać: wykryto RNA HIV.

W pkt. III. INNE INFORMACJE p.pkt 2. Badana próbka pochodziła, zaznaczyć:

- X w kratce: była badaniem przesiewowym;
- X w kratce: została pobrana z innego powodu — **dawca krwi**

P.pkt. 3. Rozpoznanie skreślić „będzie”, a wpisać „zostało zweryfikowane” w **Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, 00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5.**

Zakażenie kiłą

W pkt. I. ROZPOZNANO p.pkt 1. Zakażenie drobnoustrojem przenoszonym drogą płciową, należy wpisać:

- krętek błady, gdy wynik testu potwierdzenia jest dodatni;
- reaktywny w teście przeglądowym w kierunku zakażenia krętkiem bładym, gdy wynik testu potwierdzenia nie został wykonany.

Dalej ankietę wypełnić analogicznie, jak ankietę dla HBV.

Postępowanie z dawcami, u których wyniki testów NAT są dodatnie lub wzbudzają wątpliwości

Po wykryciu materiału genetycznego wirusów u dawcy bez markerów serologicznych należy:

1. Wezwać dawcę, zawiadomić go o uzyskanym wyniku, pobrać próbki osocza do dwóch próbek z żelą separującym. Wykonać komplet przeglądowych badań serologicznych i AIAT. Wyniki tych badań wraz z próbkami przesłać do IHiT.
2. Na stałe zdyskwalifikować dawcę we wszystkich Centrach Krwiodawstwa w Polsce.

- Przeprowadzając wywiad epidemiologiczny, należy pamiętać, że taki dawca jest najprawdopodobniej w okienku serologicznym i uległ zakażeniu w ciągu ostatnich 6 miesięcy. Wypełnić formularz dla SANEPID dotyczący zgłoszenia choroby zakaźnej.
- Do IHiT (do Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej) 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). Ankiety przechowuje Centrum Krwiodawstwa. Do IHiT należy przysłać jej kserokopię.

Zasady dokumentacji wyników badań przeglądowych

Wyniki badań wykonywanych ręcznie muszą być wprowadzane do systemu komputerowego indywidualnie dla każdego dawcy. Protokoły badań (na nośnikach elektronicznych lub w postaci wydruków) powinny być przechowywane przez 30 lat. Zaleca się odnotowywanie wyników wszystkich badanych markerów wirusów i kiły w postaci jednego wydruku komputerowego z danego dnia.

W Centrum Krwiodawstwa, w którym wykonuje się badania dla Oddziałów Terenowych, obowiązuje przekazywanie wyników na piśmie lub w wersji elektronicznej. Wyniki należy umieszczać przy numerze donacji każdego dawcy.

Identyfikacja biorców krwi i jej składników (Procedura „LOOK BACK”) po otrzymaniu dodatnich wyników testów potwierdzenia obecności markerów czynników zakaźnych

Po otrzymaniu dodatnich wyników testów potwierdzających obecność antygeny HBs, DNA HBV, przeciwciał anti-HCV (powtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego oraz dodatni wynik testu uzupełniającego przy ujemnym wyniku RNA HCV), RNA HCV, przeciwciał anti-HIV-1, -2 (Western Blot), RNA HIV, Centrum Krwiodawstwa ma obowiązek identyfikowania biorców krwi i jej składników.

Placówki służby zdrowia świadczące opiekę ambulatoryjną dla osób zakażonych HIV i chorych na AIDS

- Białystok
Punkt AIDS przy Klinice Chorób Zakaźnych AM, ul. Żurawia 14, tel. (085) 741 69 29

- Bydgoszcz
Poradnia Profilaktyki i Leczenia Zakażeń Wirusowych, ul. Św. Floriana 12, tel. (052) 325 56 39
- Chorzów
Ośrodek Diagnostyki i Terapii AIDS, ul. Zjednoczenia 10, tel. (032) 241 32 55
- Gdańsk
Centrum Diagnostyki i Leczenia AIDS przy Klinice Chorób Zakaźnych, Oddział II, ul. Smoluchowskiego 18, tel. (058) 341 40 41, wew. 209, 247
- Kraków
Poradnia Nabytych Niedoborów Odporności, ul. Śniadeckich 5, tel. (012) 424 73 54
- Łódź
Poradnia Nabytych Zaburzeń Odporności, ul. Pogonowskiego 44/46, tel. (042) 633 13 14
- Poznań
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Wincentego 21, tel. (061) 877 36 71
- Szczecin
Poradnia Nabytych Niedoborów Immunologicznych, ul. Broniewskiego 12, tel. (091) 454 24 50
- Warszawa
Poradnia dla nosicieli HIV, ul. Leszno 17, tel. (022) 632 07 25
Klinika Chorób Zakaźnych Wieków Dziecięcego AM, ul. Wolska 37, tel. (022) 632 06 83, 631 05 31
- Wrocław
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Koszarowa 5, tel. (071) 325 52 42, 326 13 25
Dziecięcy Szpital Kliniczny Oddział Obserwacyjno-Zakaźny, ul. Bujwida 44, tel. (071) 328 60 28

Oddziały szpitalne dla zakażonych HIV i chorych na AIDS

- Białystok
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Żurawia 14, tel. (085) 741 69 29
- Bydgoszcz
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Św. Floriana 12, tel. (052) 322 48 70
- Chorzów
Ośrodek Diagnostyki i Terapii AIDS, ul. Zjednoczenia 10, tel. (032) 241 32 55
- Gdańsk
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Smoluchowskiego 18, tel. (058) 341 40 41
- Kraków
Klinika Chorób Zakaźnych CMUJ, ul. Śniadeckich 5, tel. (012) 424 73 56
- Łódź
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Kniaziewiczza 1/5, tel. (042) 659 52 22
- Poznań
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Wincentego 21, tel. (061) 877 36 71
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Dzieci, ul. Szpitalna 27/33, tel. (061) 849 12 00
- Szczecin
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Arkońska 4, tel. (091) 454 14 59
- Warszawa
Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych AM, ul. Wolska 37, tel. (022) 632 06 04
Wojewódzki Szpital Zakaźny, ul. Wolska 37, tel. (022) 632 34 11
Klinika Chorób Zakaźnych Wieków Dziecięcego AM, ul. Wolska 37, tel. (022) 632 06 83, 631 05 31
- Wrocław
Klinika Chorób Zakaźnych AM, ul. Koszarowa 5, tel. (071) 325 52 42, 326 13 25
Dziecięcy Szpital Kliniczny Oddział Obserwacyjno-Zakaźny, ul. Bujwida 44, tel. (071) 328 60 28