

МЕТОДОЛОГИЯ

за въвеждане на молекулярна (NAT) технология за вирусологична диагностика на дарената кръв в Република България съгласно НАЦИОНАЛНА НАУЧНА ПРОГРАМА „Разработване на методология за въвеждане на NAT технология за диагностика на дарената кръв в трансфузионната система на Република България“

I. ОСНОВАНИЕ ЗА ВЪВЕЖДАНЕТО НА NAT ТЕХНОЛОГИЯТА В ТРАНСФУЗИОННАТА СИСТЕМА НА РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

Дейностите в трансфузионната система в България се извършват съгласно Закон за кръвта кръводаряването и кръвопреливането (ЗККК), приет през 2003 г. и Медицински стандарт “Трансфузионна хематология”, разработен и утвърден от Министерство на здравеопазването (МЗ) през 2006 г. ЗККК и наредбите, регламентирани от него са в пълно съответствие с **Директивите на ЕС:**

- 2002/98 за установяване на стандарти за качество и безопасност при събиране, диагностика, преработка, съхранение и разпространение на човешка кръв и кръвни съставки и в допълнение на Директива 2001/83/ЕС
- (2002)11 за ролята на болниците и клиницистите за оптималното използване на кръвта
- (2003)11 за започване на процедури за патогенната инактивация на кръвта
- 2004/ 33/, в изпълнение на директива 2002/98 и относно някои технически изисквания за кръвта и кръвните съставки
- (2004)18 за обучението по трансфузионна хематология на медицинските сестри
- 2005/61 относно изискванията за проследяване и съобщаване на сериозни нежелателни реакции и сериозни инциденти
- 2005/62 относно стандартите и спецификациите на Общността във връзка със система за качество за заведенията за трансфузионна хематология

Основополагащи документи в областта на трансфузионната система на ниво Европейски съюз са Директивите 2002/98/ЕО, 2004/33/ЕО, 2005/61/ЕО и 2005/62/ЕО за определяне на стандартите за качество и безопасност на човешка кръв и кръвни съставки. Привеждането на законодателството на страните – членки на ЕС в съответствие с директивите е основно изискване към тях.

В доклад от 2016 г. на Европейската комисия (ЕК) до Европейския парламент, Съвета на Европа и други комитети относно прилагането на посочените директиви са представени данни, че повече от 2/3 от страните-членки използват NAT диагностиката, (извън задължителните минимални серологични изследвания), вкл. и страни извън ЕС - Турция, Сърбия, Албания, Хърватска, Украйна, Швейцария.

Тенденцията е до края на 2019 г. NAT техниката да бъде включена към задължителните минимални изисквания за диагностика на дарената кръв във всички лаборатории на кръвните центрове в страните на ЕС.

Промените в Директива 2004/33 на ЕК дават възможност на държавите-членки, да приемат кръводарители, идващи от рисков район за особено опасни инфекции - Западнониленска треска, малария, Денга и Зика вирус, откриването на които се извършва само с NAT. Това се отнася и за България, тъй като има повишена заболяемост от някои от тези инфекции в страните, граничещи с нас.

В Проекта на медицински стандарт „Трансфузионна хематология“ 2018 г. са включени изискванията за изследване на инфекциозни маркери чрез NAT на всяка единица дарена кръв (съгласно разпоредбите на Директива (ЕС) 2016/1214 на ЕК от 25 юли 2016 година по отношение на стандарти и спецификации на системата за качество на кръвни центрове).

II. ОБХВАТ И ИКОНОМИЧЕСКА ЕФЕКТИВНОСТ

Диагностика на взета кръв и кръвни съставки за маркери на трансмисивни инфекции се извършва в центрове за трансфузионна хематология, съгласно правилата на Добрата лабораторна практика и при спазване на изискванията на съществуващото законодателство. За диагностика на взетата кръв се използват реагенти, които имат разрешение за употреба в Република България. Всяка новополучена партида тестове се придружава от сертификат за качество. Освен съществуващите задължителни серологични изследвания, на всяка единица взета кръв се извършва изследване чрез NAT за вирусите на HIV-1, HIV-2, Хепатит Б и Хепатит С. Изследванията се извършват на всички донорски проби в 5-те центъра по трансфузионна хематология в България, а именно Национален център по трансфузионна хематология /НЦТХ/, Регионален център по трансфузионна хематология Пловдив (РЦТХ Пловдив), Регионален център по трансфузионна хематология Стара Загора (РЦТХ Стара Загора), Регионален Център по Трансфузионна Хематология — Плевен (РЦТХ Плевен), Регионален център по трансфузионна хематология - Варна (РЦТХ- Варна).

В световен мащаб кръвопреливането е причината за заразяване с трансмисивни инфекции при между 10% и 15% от всички заболявания. В България, по данни от годишните анализи на остри заразни болести на НЦЗПБ за 2015 г., 2016 г. и 2017 г. (<https://ncipd.org>) заболяванията от Хепатит Б и Хепатит С вследствие кръвопреливане са средно 12 % от всички случаи, за които има установени данни за причинителя на заразяването (за 2015 г. те са 13 %, за 2016 г. – 14 %, за 2017 г. – 9 %). Тези данни потвърждават тенденцията на заболяемост в световен мащаб и доказват, че макар и в много случаи животоспасяващо, кръвопреливането крие рискове, които трябва да бъдат адресирани адекватно. NAT тестването на донорска кръв за трансмисивни инфекции е без алтернатива за повишаване безопасността на кръвта и кръвните съставки за преливане и на плазмата за производство на лекарствени продукти. Едновременно с това, методът води до значително спестяване на финансов ресурс.

На база на обобщените данни за финансовите средства, изразходвани за лечение на болни от Хепатит Б, Хепатит С, ХИВ/СПИН, на тези за реактиви за диагностика на Хепатит С и за производство на плазмени лекарствени продукти за 2018 г. и вземайки под внимание средния процент заболявания от Хепатит Б и Хепатит С вследствие кръвопреливане, може да бъде направен обоснован извод, че чрез въвеждането на NAT

технологията в трансфузионната система на страната ще бъдат спестени над 50 % от изразходваните до този момент средства от държавния бюджет за лечение на трансмисивни заболявания и свързаните с това допълнителни дейности. По отношение на безопасността и сигурността на диагностиката и получените кръвни продукти, методът няма алтернатива. Спасените човешки животи и повишаването на нивото на българското здравеопазване също не биха могли да бъдат оспорени.

III. СЪЩНОСТ И НАЧИН НА ИЗВЪРШВАНЕ НА NAT ТЕСТВАНЕТО

NAT представлява най-модерната технология за откриване наличието на вирусни нуклеинови киселини (ДНК или РНК), включително на едни от най-значимите вируси HIV 1/2 ,HBV,HCV в кръвната плазма, с помощта на която в кратък срок след заразяването се открива наличен вирус в кръвта на донора.

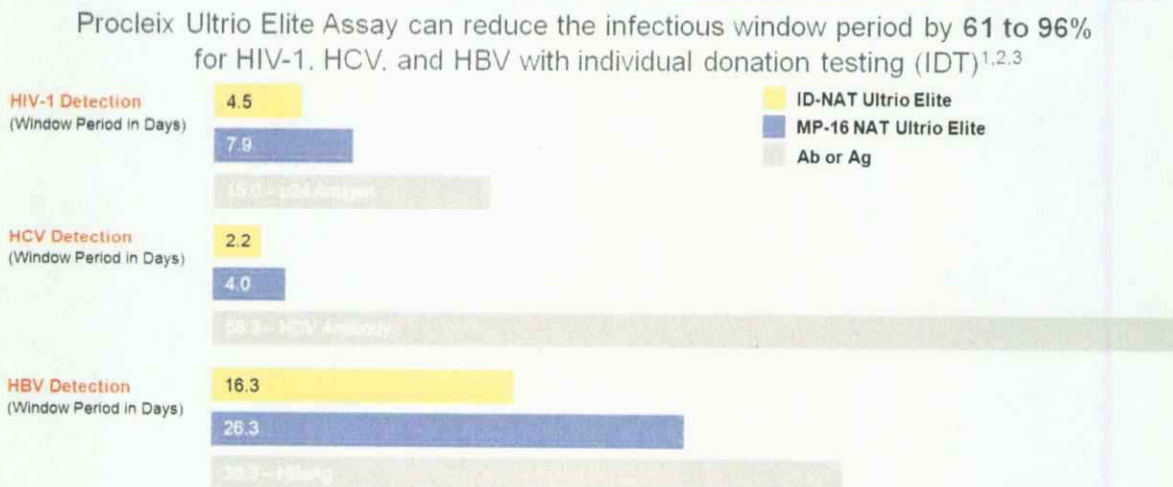
1. Предимства на NAT технология

- Висока чувствителност и специфичност
- Директно установяване на вирусната РНК или ДНК
- Скъсяване на прозоречния период обозначаващ времеви интервал от момента на заразяване с даден вирус до момента на образуване на антитела от имунната система в достатъчна степен, че те да бъдат установени чрез позитивиране с имуноензимен тест /ELISA/.
- Максимално гарантирано качество и безопасност на кръвта и кръвните продукти

В приложената по-долу схема се визуализира прозоречният период в дни за всеки един от вирусите с използваните тестове Procleix Ultrio Elite и ELISA.

Window Period

Reduce the risk of transfusion-transmitted infections



Видно е че при прилагане на NAT технологията с тестовете Procleix Ultrio Elite прозоречния период драстично се намалява. Прозоречния период при Хепатит Б се съкращава от 38,3 дни на 16,3 дни. За Хепатит С съкращението е още по-голямо съксявайки периода от почти 2 месеца на 2,2 дни. За ХИВ - от 15 дни на 4,5 дни.

С други думи въвеждането на NAT технологията в кръвните центрове цели да се подобри безопасността на кръвта при кръвопреливане чрез съкращаване на прозоречния период. През този период кръводарителите представляват потенциална опасност за заразяване на реципиенти чрез кръвопреливане.

2. Принципи на процедурата

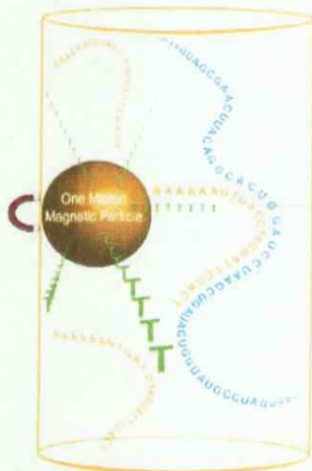
Тестът Procleix Ultrio Elite включва три основни стъпки, които стават в една епруветка:

1. Подготовка на пробата – целево улавяне със специфични олигонуклеотиди;
2. Транскрипционно медирана амплификация (ТМА).
3. Засичане на амплификационни продукти/ампликони/ чрез хибридизация на комплементарни олигонуклеотидни секвенции (сонда) с Hybridization Protection Assay (НРА).

- **Подготовка на пробата – целево улавяне**

По време на подготовката на пробата вирусните РНК и ДНК се изолират от пробите с помощта на целево улавяне.

Target Capture

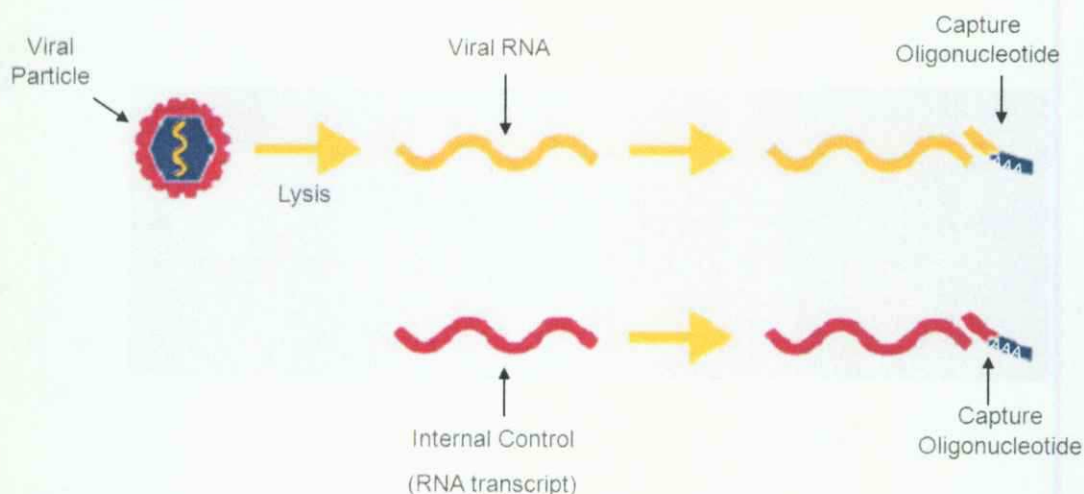


Poly-T oligomer bound
to magnetic particle

Capture oligonucleotide

Target sequence

Първоначално към всяка епруветка се прибавя 500µl серум и 400µl реагент за захващане на целта (TCR) с добавена Вътрешна контрола за мониторинг на работата на теста на всяка отделна проба.



Самото целево улавяне става във високотемпературен инкубатор на 64°C. Пробата се третира с детергент, който разтваря вирусната обвивка, денатурира протеините и освобождава вирусната геномна РНК или ДНК. Олигонуклеотидите (улавящите олигонуклеотиди), които са комплементарни на силно консервативните нуклеотидни секвенции в НК на HIV, HCV и HBV, хибридизират с HIV RNA, HCV RNA или HBV DNA, ако последната е налична в тестовата проба.

Хибридизират се поли-А секвенции от таргетната олигонуклеотидна секвенция с поли-Т улавяния олигонуклеотид, конюгиран към магнитната частица. Чрез поли-А секвенционен край се създава нова полинуклеотидна секвенция, наречена хващащ олигонуклеотид която съдържа силно консервативна нуклеотидна секвенция за прицелната вирусна НК, и осигурява нейната комплементарна хибридизация.

(**TER**) - целевия реагент се прибавя към всяка епруветка по 100 µl, за да предизвика преходна алкална среда, която повишава разрушаването на вирусните частици и денатурирането на нуклеиновите киселини. След добавяне на целевия реагент, хибридизираната полинуклеотидна верига се улавя на магнитни микрочастици, които след това се отделят от пробата в магнитно поле.

Следват стъпки на миене (Mag Wash) за отстраняване на нехибридизираните компоненти от образуваната реакционна смес.

След миенето към пробата се прибавя масло (**Oil**) 200 µl с цел намаляване на изпаряването през останалата част от процедурата на теста.

След приключване на този цикъл пречистената целева нуклеинова киселина е готова за амплифициране с Транскрипционно медирана амплификация.

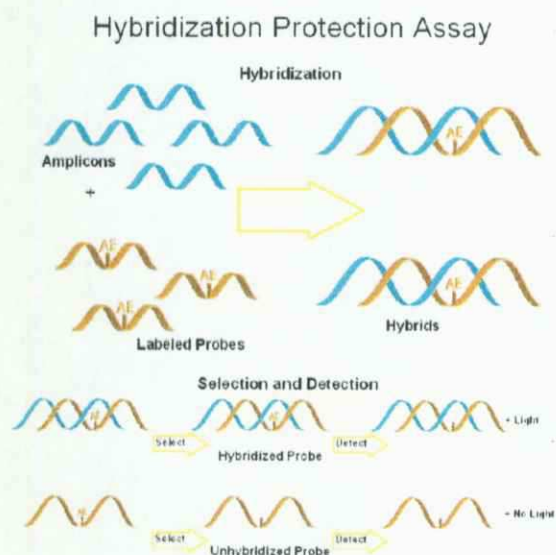
- **Транскрипционно медирана амплификация (ТМА)**

Целева амплификация настъпва чрез **ТМА**, което представлява метод на амплификация на нуклеинова киселина, основана на транскрипция с използване на два ензима - MMLV реверсивна транскриптаза и T7 RNA полимеразата. Реверсивната транскриптаза се използва за генериране на ДНК копие (съдържащо промоторна последователност за T7 RNA полимеразата) на целевата нуклеотидна последователност. T7 RNA полимеразата

създава множество едноверижни копия ДНК (сDNA) от РНК матрицата. Процесът на амплификация отнема един час.

Амплификационният реактив се пипетира към всяка епруветка по 75µl и след това се прехвърля във високотемпературния инкубатор за първоначална топлинна стъпка, която допринася за свързването на праймерите с целевата нуклеинова киселина.

След това се пипетира **Ензимния реактив по 25µl** и процесът продължава в инкубатора за амплификация на 42.7°C. Амплифицираната РНК, наричана ампликон е готова да бъде хибридиизирана с маркираната сонда нуклеинова киселина.

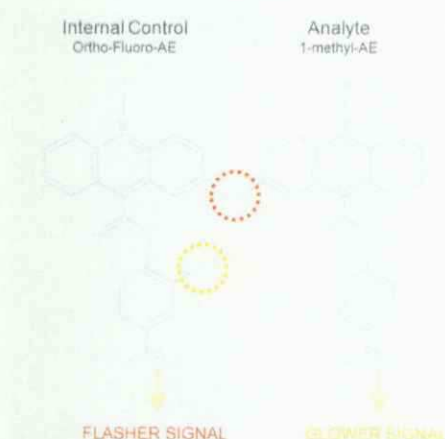


Засичането става посредством **НРА - Тест за хибридационна защита** с използване на сонди с едноверижна нуклеинова киселина с хемилуминисцентна маркировка, комплементарни на ампликона. Маркираните сонди, които са обозначени (белязани) с молекула АЕ (акридиниев естер), хибридизират с ампликона на базата на правилата за комплементарност на Уотсън-Крик (Аденин с Тимин и Гуанин с Цитозин). Процесът на хибридазация се извършва на температура, изчислена на базата на нуклеотидния състав в хибридиращите олигонуклеотидни сонди. След това се прибавя Селекционен **реагент 250µl** и епруветката се връща обратно във високотемпературния инкубатор за процеса на селекция. Селекционният реагент прави разграничение между хибридизираните и нехибридизираните сонди чрез деактивиране на маркирането (АЕ) на нехибридизираните сонди. По време на стъпката на засичане, хемилуминисцентният сигнал, произведен от хибридизираната сонда, се измерва с луминометър и се отчита в относителни светлинни единици (RLU). Неактивният АЕ не излъчва светлина по време на процеса на засичане.

След това се прибавят Auto detect 1 и Auto detect 2 към епруветката. Auto detect 1 и 2 образуват реакция с АЕ молекулата, излъчват фотон или светлинен сигнал.

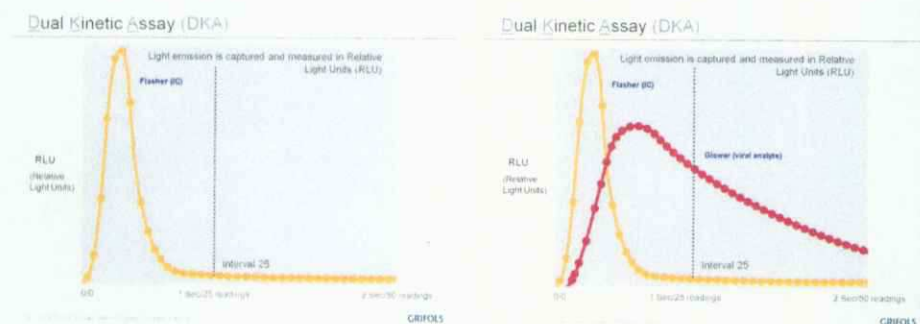
Луминометърът разчита светлинния сигнал, ако има такъв. След като луминометърът разчете АЕ молекулния сигнал в епруветката се прибавя натриев хипохлорит и буфер за деактивиране, за да унищожи всеки наличен ампликон. Остава се 15 минути за деконтаминиране. Накрая системата аспирира течностите в контейнера за течни

отпадъци и накрайниците за пипети и епруветките (MTU) в контейнера за твърди отпадъци.



Вътрешния ампликон, специфичен за контролата, се засича с използване на сонда с бързо излъчване на светлина (наричано “проблясващ сигнал”). Ампликонът, специфичен за HIV, HCV, HBV се улавя с помощта на сонда с относително по-бавна кинетика на излъчване на светлина (наричано “постоянен сигнал”).

Тестът с двойна кинетика (DKA) е метод, използван за диференциране между сигналите от проблясващия и постоянния сигнал. Когато се използва за едновременно засичане на HIV, HBV, HCV тестът Procleix Ultrio Elite прави разграничение между вътрешната контрола и комбинираните сигнали HIV, HBV, HCV, но не прави разграничение между отделните сигнали за HIV, HBV и HCV.



• Дискриминаторно (Дискриминационно) тестване

Пробите, които са образували реакция при теста Procleix Ultrio Elite, се пускат в отделни Procleix Ultrio Elite HIV, HBV и HCV дискриминаторни (дискриминаторни) тестове за установяване дали са положителни за HIV, HBV, HCV или комбинация от два или три вируса.

Дискриминаторните (дискриминаторните) тестове използват същите три основни стъпки като теста Procleix Ultrio Elite (подготовка на пробата- целево улавяне, ТМА и НРА). Спазва се същата процедура на теста с една разлика, че се използват HIV специфични, HBV специфични и HCV специфични реагенти за дискриминаторен тест. Дискриминаторният тест при проби, дали положителен резултат за HIV инфекция, не прави разграничение между HIV тип 1 и HIV тип 2.

3. Начин на извършване на тестването

NAT тестването се извършва съобразно описаните по-долу начин и последователност, а именно:

- **Получаване, съхранение и подготовка за използване на реактиви за NAT диагностика**

А.Получаване на набор реактиви

1. При получаване на реактивите се проверява:

1.1 Наличност на всички реактиви, системни течности и консумативи от комплекта в описаните в придружителния опис количества.

1.2 Съответствието на номера на мастер-партидата на реактивите и номера в придружителния опис.

1.3 Съответствието на температурните условия на транспорт:

- Вътрешните контроли, калибраторите, Реагентът на ензима, Реагентът на сондата и Сондите за дискриминаторни тестове се транспортират в добре изолирани контейнери със „сух“ лед, с обозначена горна страна и без нарушаване целостта на опаковката; тези реактиви трябва да са в замразено състояние при получаване;
- Реагентът, улавящ целта, се транспортира в добре изолирани контейнери с охладители с гел, с обозначена горна страна и без нарушаване на целостта на опаковката; този реактив трябва да е добре охладен при получаване;
- Ускоряващият целеви реагент, Селекционният реагент и системните течности се транспортират на стайна температура в добре уплътнени контейнери с обозначена горна страна и без нарушаване на целостта на опаковката.

2. Попълва се придружаващия документ Shipment Control Certificate за:

2.1 Съответствието на LOT на реактивите с LOT на описа с отметка Yes/No.

2.2 Съответствието на температурните условия на транспорт с отметка Yes/No.

2.3 Дата и час на получаване – реактивите трябва да бъдат доставени до 96 часа от датата и часа на тяхното изпращане (отбелязано от производителя в Shipment Control Certificate)

2.4 Подпис на служителя, получил реактивите.

2.5 Попълнената форма на Shipment Control Certificate се сканира и изпраща на представител на производителя, а оригиналът се съхранява в лабораторията.

Б. Съхранение на реактивите.

1. Реагенти на теста Procleix Ultrio Elite.

1.1 Реагент вътрешна контрола (IC).

Съхранявайте реагента неотворен на температура от -15° до -35°C до крайния срок на годност. След размразяване се добавя към целевия реагент (за получаване на Работен целеви реагент - wTCR) и се съхранява в хладилник на температура от 2° до 8°C до 30 дни. Стабилността в апарата е до 60 часа. **Не замразявай повторно!**

1.2 Реагент, улавящ целта (TCR).

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност в хладилник на температура от 2° до 8°C . Не замразявайте. Като Работен целеви реагент съхранявайте в хладилник на температура от 2° до 8°C до 30 дни. Стабилността в апарата е до 60 часа.

1.3 Реагент за амплификация (Amplification reagent).

Съхранявайте реагента неотворен във фризер на температура от -15° до -35°C до крайния срок на годност. След размразяване се съхранява до 30 дни на температура от 2° до 8°C . Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

1.4 Реагент на ензима (Enzyme reagent).

Съхранявайте реагента неотворен във фризер на температура от -15° до -35°C до крайния срок на годност. След размразяване се съхранява до 30 дни на температура от 2° до 8°C . Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

1.5 Реагент на сондата (Probe).

Съхранявайте реагента неотворен във фризер на температура от -15° до -35°C до крайния срок на годност. След размразяване се съхранява до 30 дни на температура от 2° до 8°C . Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

1.6 Селекционен реагент (Selection reagent)

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност и отворен до 30 дни в шкаф на стайна температура 15° до 30°C . Не слагай в хладилник. Стабилността в апарата е до 60 часа.

1.7 Ускоряващ целеви реагент (TER)

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност и отворен до 30 дни в шкаф на стайна температура 15° до 30°C . Не слагай в хладилник. Стабилността в апарата е до 60 часа.

2. Калибратори на теста Procleix Ultrio Elite.

2.1 Калибратор на отрицателната проба (C0).

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност във фризер на температура от -15° to -35°C , размразен - до 8 часа на температура от 15° до 30°C . Използва се еднократно.

2.2 HIV калибратор на положителната контрола (C1).

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност във фризер на температура от -15° to -35°C , размразен - до 8 часа на температура от 15° до 30°C . Използва се еднократно.

2.3 HCV калибратор на положителната контрола (C2).

Съхранявайте неотворен до крайния срок на годност във фризерна температура от -15° to -35°C , размразен - до 8 часа на температура от 15° до 30°C . Използва се еднократно.

2.4 HBV калибратор на положителната контрола (C3)

Съхранявайте до крайния срок на годност неотворен във фризер на температура от

-15° to -35°C, размразен -до 8 часа на температура от 15° до 30°C. Използва се еднократно.

3. Procleix Ultrio Elite Реагенти за извършване на дискриминаторен тест

3.1 HIV Реагент за извършване на дискриминаторен тест (D1).

Съхранявайте реагента неотворен до крайния срок на годност на температура -15° до -35°C, размразен до 30 дни на температура от 2° до 8°C. Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

3.2 HCV Реагент за извършване на дискриминаторен тест (D2).

Съхранявайте реагента неотворен до крайния срок на годност на температура -15° до -35°C, размразен до 30 дни на температура от 2° до 8°C. Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

3.3 HBV Реагент за извършване на дискриминаторен тест (D3).

Съхранявайте реагента неотворен до крайния срок на годност на температура -15° до -35°C, размразен до 30 дни на температура от 2° до 8°C. Не замразявай повторно. Стабилността в апарата е до 60 часа.

4. Универсални течности на системата Procleix Panther System.

4.1 Auto Detect 1 (R1).

Съхранявайте в шкаф на температура от 15° до 30°C. Стабилността в апарата е до 60 дни.

4.2 Auto Detect 2 (R2).

Съхранявайте в шкаф на температура от 15° до 30°C. Стабилността в апарата е до 60 дни.

4.3 Разтвор за измиване (W).

Съхранявайте в шкаф на температура от 15° до 30°C. Стабилността в апарата е до 60 дни.

4.4 Масло (O).

Съхранявайте в шкаф на температура от 15° до 30°C. Стабилността в апарата е до 60 дни.

4.5 Буфер за течността за деактивиране (DF).

Съхранявайте в шкаф на температура от 15° до 30°C. Стабилността в апарата е до 60 дни.

За условията на съхранение виж долната таблица:

Реагенти/течности	Съхранение на неотворени реагенти	Стабилност на отворени/ размразени реагенти
Реагент вътрешна контрола	-15° до -35°C	8 часа на RT преди да се смеси с Реагент за захващане на целта
Реагент за захващане на целта	2° до 8°C	30 дни на 2° до 8°C 20 часа на RT (RPI 250 File 3)
Работен реагент за захващане на целта		30 дни на 2° до 8°C
Реагент за амплификацията	-15° до -35°C	30 дни на 2° до 8°C 20 часа на RT (RPI 250 File 3)
	-15° до -35°C	30 дни на 2° до 8°C

Реагент на ензима		20 часа на RT (RPI 250 File 3)
Сонди	-15° до -35°C	30 дни на 2° до 8°C 20 часа на RT (RPI 250 File 3)
Селекционен реагент	RT	30 дни на RT
Ускоряващ целеви реагент	RT	30 дни на RT
Калибратори	-15° до -35°C	8 часа на RT
Реагенти Auto Detect	RT	60 дни на RT
Буфер за течността за деактивиране	RT	60 дни на RT
Масло	RT	60 дни на RT
Разтвор за измиване (W)	RT	60 дни на RT

Забележки:

- RT - стайна температура е температурата от 15 до 30°C;
- 20 часа са приложими само за Procleix RPI 250 - File 3 (програма 3) при подготовка на предварителната подготовка на реагентите;
- Неотворените и съхранявани при посочените условия реактиви и универсални течности са годни до посочения върху опаковката срок на годност;
- Отворените реагенти трябва да се съхраняват при определените условия, когато не се използват. Ако реагентите са в системата Procleix RPI 250 или Procleix Panther System, те трябва да се поставят при подходящите условия за съхранение веднага след приключване на процеса;
- Procleix Panther System проследява броя часове в апарата за всеки реагент и течност и няма да започне анализ на проби, ако реагентите са с изтекъл срок на годност или е превишен срока за стабилност в апарата;
- За срока на стабилност в апарата виж долната таблица:

Реагент / течност	стабилност в апарата
Работен целеви разтвор, реагенти на сондата, реагентът на ензима, реагент за амплификацията, селекционен реагент, ускоряващ целеви реагент (TER)	60 часа
Разтвор за измиване, масло, буфер за течността за деактивиране, реагенти Auto Detect	60 дни

В. Подготовка за работа и използване на реагентите и универсалните течности.

1. Общи изисквания.

1.1 Не използвайте реагенти, използвани в друга система Procleix Panther, защото инструментът проверява нивото на реагента. Не смесвайте реактиви от различни набори, дори да са от една мастер-партида.

1.2 Всички използвани реагенти, калибратори и течности трябва да са от една и съща мастер-партида.

1.3 Проверете реагентите за крайния срок на годност, срока за стабилност след датата на отваряне/размразяване (30 дни) и срока на стабилност при зареждане в апарата (60 часа/60 дни). Апаратът няма да започне работа, ако сроковете за стабилност са изтекли.

1.4 Всички реактиви преди употреба трябва да се темперират до стайната температура 25-30°C. За целта се използва Термостат Procleix RPI 250 при работна температура 32°C, без да се надвишават 35°C. Реактивите трябва да са в непрекъснат режим на ротация за добро смесване.

ИНСТРУКЦИЯ ЗА РАБОТА С ТЕРМОСТАТ

1.Подгответе реактивите Amp, Enzyme, Probe и TCR за темпериране.	ВНИМАНИЕ! - проверете капачките на реактивите - пазете баркода от надраскване																						
2.Стартирайте термостата от бутона POWER и включете ROTATION на функция CONINUOUS .	 																						
3.Натиснете бутона  PAGE <u>бързо</u> два пъти.		На екрана се визуализира run list .																					
4.Натиснете бутона  SCROLL <u>веднъж</u> .		На екрана се визуализира текущата програма.																					
5.С бутоните НАДОЛУ и НАГОРЕ изберете желаната програма.		<table border="1"> <thead> <tr> <th>File/Program #</th><th>Storage Condition</th><th>Run Temp.</th><th>Run Time (hour:minute)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td><td>Frozen (-15 to -35°C)</td><td>32°C</td><td>1:00</td></tr> <tr> <td>2</td><td>Refrigerated (2 to 8°C)</td><td>32°C</td><td>0:30</td></tr> <tr> <td>3</td><td>Room Temperature</td><td>25°C</td><td>No Set Duration</td></tr> <tr> <td>4</td><td>Selection Recovery</td><td>60°C</td><td>0:45</td></tr> </tbody> </table>		File/Program #	Storage Condition	Run Temp.	Run Time (hour:minute)	1	Frozen (-15 to -35°C)	32°C	1:00	2	Refrigerated (2 to 8°C)	32°C	0:30	3	Room Temperature	25°C	No Set Duration	4	Selection Recovery	60°C	0:45
File/Program #	Storage Condition	Run Temp.	Run Time (hour:minute)																				
1	Frozen (-15 to -35°C)	32°C	1:00																				
2	Refrigerated (2 to 8°C)	32°C	0:30																				
3	Room Temperature	25°C	No Set Duration																				
4	Selection Recovery	60°C	0:45																				
6.Натиснете бутона RUN/HOLD <u>веднъж</u> .		Светещия надпис RUN сигнализира старта на програма.																					

За да спрете звуковата сигнализация за края на програмата, задръжте бутона **RUN** 3 секунди. След това изключете термостата!

Могат да се използват и:

- Водна баня с температура до 30°C и периодично леко размесване на реактивите; ако се използва водна баня, контейнерите трябва да са във вертикална позиция с капачката нагоре, след темпериране се подсушават добре;
- Поставяне на плота за реактиви на стайна температура и периодично леко размесване;
- Да не се надвишава времето от 20 часа, допустимо за престой на стайна температура по време на подготовка на реактивите.

1.5.Подготовката на реагентите трябва да се извършва на отделен лабораторен плот, предвиден само за това. Не се приготвят в близост до кръвни проби. Използват се ръкавици. Избягва се работа над вече отворени реактиви.

1.6.Отворените реагенти се инспектират за наличие на пяна и мехурчета и ако има такива, те се отстраняват със стерилни тампони или стерилни пипети. За всеки контейнер се използва нов тампон или пипета.

1.7. Не се използват реактиви с мътнини и преципитати. Да се осигури пълното разтваряне на преципитата.

1.8. При отваряне на нов комплект реагенти и универсални течности, на обозначеното място на етикета на всеки реагент се вписва датата на отваряне/размразяване/смесване.

2. Подготовка на реагентите, съхранявани на стайна температура между 15° и 30°C: Селекционният реагент, Ускоряващият целеви реагент и универсалните течности се изваждат от мястото на съхранение и се поставят на плота за реактиви или в апарата. Забележки:

- Ако Селекционен реагент не е правилно съхраняван на стайна температура, а погрешно е поставен на 2° до 8°C или температурата в лабораторията падне под 15°C, може да се образува преципитат. Ако има мътност или преципитат, възстановете Селекционния реагент в термостата Procleix RPI 250 - File 4 (програма 4) при температура 60° за 45 мин.;
- Ако по време на транспортиране или по време на съхранение температурите паднат под 15°C, в Разтвора за измиване и Ускоряващия целеви реагент могат да се формират преципитати. Осигурете преципитатите да бъдат разтворени преди употреба, като се поставят на стайна температура до 25-30°C. Не използвайте термостата Procleix RPI 250.

3. Подготовка на замразените реагенти, съхранявани на температура от -15° до -35°C.

3.1 Реагентът на ензима, Реагентът за амплификация и Реагентите на сондите се изваждат от фризера и се темперират в термостата Procleix RPI 250 File 1 (програма 1) за 60 мин. на средна температура 32° ± 2°C без да се надвишават 35°C, след което се поставят на съответните места във носача за реактиви. Реагентите на сондите са светлочувствителни и трябва да се предпазват от светлина при съхранение и подготовка.

Забележки:

- Ако след размразяването в Сондите все още има преципитат, може да ги инкубирате допълнително в термостата Procleix RPI 250 File 3 (програма 3 на температура 25 °C) или на водна баня до 30°C, за да улесните цялостното разтваряне на преципитата;

3.2 Калибраторите и Вътрешната контрола се изваждат от мястото на съхранение от –15° до –35°C и се темперират на плота за реактиви на стайна температура от 15° до 30°C. Епруветките са за еднократна употреба. Внимателно миксирайте калибраторите с леко завъртане, за да избегнете образуването на пяна.

Забележки:

- Калибраторите и Вътрешната контрола не се темперират в термостата Procleix RPI 250;
- Ако са желирани, гелът трябва да се разтвори преди използването. За тази цел се оставят на лабораторния плот до разтваряне на гела при периодически внимателно миксиране. За да се ускори разтварянето на гела, може да се затоплят на 25° до 30°C на водна баня.

4. Подготовка на реагентите, съхранявани в хладилни условия на температура от 2° до 8°C:

Реагентът на ензима, Реагентът за амплификация и Сондите, които са били размразени и вече са били използвани в апарата и след това са съхранявани в хладилник, както и Реагентът за улавяне на вирусната НК, който винаги се съхранява в хладилни условия, се темперират до стайна температура в термостата Procleix RPI 250 File 1 (програма 1) на работна температура 32°C за 30 мин, след което се поставят на съответните места във носачто за реактиви или в апарата.

Забележки:

- Непосредствено след изваждането на Реагента за улавяне на вирусната НК от хладилните условия, веднага хомогенизирайте енергично с минимум 10 обръщания;
- В размразените Реагенти на сондите може да се образува преципитат при съхраняването им на температура от 2° до 8°C. Преципитатът се разтваря при темперирането в термостата Procleix RPI 250 File 1.

5. Приготвяне на Работния целеви реагент (wTCR):

5.1 За темпериране на Вътрешната контрола и Реагентът за улавяне на вирусната НК виж т.3.2. и т. 3.4.

5.2 Излейте целия реагент на вътрешната контрола в контейнера с Реагент за улавяне на целта (TCR). Това е Работният реагент за захващане на целта (wTCR).

5.3 Смесете внимателно.

5.4 Запишете датата на добавяне на реагента за вътрешната контрола, срокът на валидност на wTCR (датата на добавяне на реагента на вътрешната контрола плюс 30 дни) и партидния номер (LOT), в полето на шишето TCR.

5.5 Задръжте епруветката от Вътрешната контрола, за да сканира системата баркода на етикета.

Г. Съхранение на реактивите след изваждането им от апарата

1. След приключване на процеса, ако е изразходен целият брой тестове, празните опаковки се изхвърлят.
2. Ако не е изразходен целият брой тестове, реактивите се съхраняват, както следва:
 - Контейнерите на всички реагенти се затварят внимателно с нови капачки;
 - Работният целеви разтвор, Реагентът на ензима, Реагентът за амплификация и Сондите се поставят в хладилник на температура от 2 до 8°C;
 - Селекционният реагент и Ускоряващият целеви реагент се поставят на стайна температура от 15 до 30°C.
3. Универсалните течности остават в апарата до 60 дни.
4. Калибраторите се използват еднократно.

• **Вземане и предоставяне на проби от дарена в ЦТХ кръв за изследване чрез NAT технология**

1. Операторът (оторизирано медицинско лице за вземане на кръв) по време на всяко кръводаряване взема вакутейнер с антикоагулант (K2EDTA, K3EDTA или вакутейнер Becton-Dickinson EDTA) и го поставя в адаптора на сателитното сакче за кръвни проби.
2. Проба за NAT диагностика се взема отделно от другите проби.
3. Пълни с кръв вакутейнера в обем, достатъчен за отделяне на 2 мл. серум след центрофугиране, като леко го разклаща.
4. Етикетира вакутейнера с уникален баркод номер, идентичен с този на кръводарителската карта, системата от сакове с дарена кръв и останалите вакутейнери с кръвни проби за другите видове изследвания на дарена кръв.
5. Подрежда вакутейнерите с кръвни проби за NAT диагностика на отделен статив;
6. Кръвните проби се съхраняват до предаването им в „Скрининг лаборатория за маркери на трансмисивни инфекции в дарена кръв“ за центрофугиране при следните условия:
 - на „стайна температура 22 °C - до 24ч. преди центрофугиране;
 - на „температура 2 - 8 °C. - до 72ч. преди центрофугиране.
7. Предава вакутейнерите с кръвни проби на представител на „Скрининг лаборатория за маркери на трансмисивни инфекции в дарена кръв“.

Вземане и предоставяне на проби от дарена в ОТХ (Отделение по трансфузионна хематология) кръв за изследване чрез NAT технология

1. Операторът (оторизирано медицинско лице за вземане на кръв) по време на всяко кръводаряване взема вакутейнер с антикоагулант и го поставя в адаптора на сателитното сакче за кръвни проби.
2. Пълни с кръв вакутейнера в обем, достатъчен за отделяне на 2 мл. серум след центрофугиране, като леко го разклаща

3. Етикетира вакутейнера с уникален баркод номер, идентичен с този на кръводарителската карта, системата от сакове с дарена кръв и останалите вакутейнери с кръвни проби за другите видове изследвания на дарена кръв.
4. Поддържа вакутейнерите с кръвни проби за NAT диагностика на отделен статив
5. Вакутейнерите се центрофугират за 10мин. на 1000 до 3000 об. :
 - до 24-я час при съхранение на стайна температура 22 °С.
 - до 72-я час при съхранение на температура от 2 до 8 °С.
- 7 След центрофугиране се съхраняват до предаването им за транспорт до „Скрининг лаборатория за маркери на трансмисивни инфекции в дарена кръв” към РЦТХ – Плевен при температура от 2 до 8 °С

- **Рутинен режим на работа с Procleix Panther System за изследване на проби от дарена кръв за маркери на трансмисивни инфекции с тестовете Procleix Ultrio Elite и Procleix Ultro Elite HIV, HCV и HBV дискриминаторни тестове**

А. Включване на апарата и стартиране на системния софтуер

1. Анализаторната система се включва от белия бутон на лявата странична част на апарата, след което се включва системният компютър, намиращ се в долния панел на апарата.

Забележка: Апаратът задължително се включва преди включване на компютъра, за да се избегнат грешки в комуникацията между тях.

2. На екрана се появява икона с име “Panther”. След кликане върху нея се появява поле, изискващо парола и изображение на клавиатура. Вписва се паролата “panther”. Софтуерът на системата се стартира автоматично.
3. След зареждане на системния софтуер се появява Екран за вписване (Login), изискващ име на потребител и парола. В полето “User name” се вписва име на потребител “admin” и в полето “Password” се вписва парола “pantherx”. Изчаква се пълната инициализация на апарата и зареждане на системния софтуер.
4. Отваря се работен екран
 - В горната част на работния екран е Лентата с менюта за навигиране в системния софтуер
 - В долната част е Лентата на състоянието, даваща информация за наличността на консумативи и системни течности, състоянието на отделението за отпадъци, температурата в инкубаторите, връзка с принтера и информационната система, вакуумното налягане на помпите, състоянието на вратите на различните отделения на апарата.
5. Системата преминава в режим на готовност “Ready”, когато вътрешния модул достигне необходимите температури.

Б. Дейности на оператора за подготовка на апарата за анализ на проби

1. Зареждане на апарата с консумативи, реагенти и универсални течности
 - 1.1 Маркира се бутона “Tasks” от Лентата с менюта, след което се отваря Екран със задачи. Бутоните на задачите, които трябва да се изпълнят, за да започне

анализаторната система работа, са обградени с червена светлинна мигаща рамка. Апаратът автоматично отчита нуждата от поддръжка, зареждане с консумативи и системни течности, отстраняване на отпадъците, предварително миене, зареждане с реактиви и проби. За да се приведе апаратът в режим на работа, всички предстоящи задачи трябва да се изпълнят успешно, което се визуализира на Екрана със задачи с постоянно светеща зелена рамка на всички бутони от екрана.

Забележка: Зареждане на консумативи, реагенти и универсални течности може да се извършва, както в режим на готовност на апарата, така и в работен режим. За текущото им ниво се следи от Лентата на състоянието в долната част на монитора. Апаратът сигнализира при достигане на критичното им ниво и позволява добавяне/подмяна.

1.2. Зареждане на универсални течности

1.2.1. С маркиране на бутон "Load Universal Fluids" от Екрана със задачи се отваря Екран за панел „Универсални течности“ който показва информация за текущия инвентар – количества, срок на годност и валидност на кита за заредените универсални течности.

1.2.2. Отваря се Отделението за системни течности в долния панел на апарата.

1.2.3. Тубите (Контейнерите), които трябва да се сменят или липсват, са оцветени в червено на графичното изображение на панела „Универсални течности“. Когато не е нужна подмяна, всички туби са оцветени в зелено.

1.2.4. Зареждане или подмяна на универсални течности

- Тубите (контейнерите) със съответните системни течности се поставят в определените гнезда. Те имат определена големина, и цветово и символно означение.
- Стрелката върху етикета на тубата трябва да се постави срещу стрелката върху гнездото. Чрез разчитане на фотодиодните пластинки на етикета системата разпознава съответната системна течност и светва зелен диод на схемата за разположение на течностите в задната част на отделението.
- Контейнерите с течности се затварят с капачките с фитинги за свързване с апарата.
- Ако отделението е заключено от апарата по време на работа не се отваря насилствено. Отваря се само софтуерно когато системата го позволи. След всяко отваряне на отделението за системни течности апаратът изисква миене.

1.3. Зареждане с електропроводими наконечници за пипетиране, които са част от кита

1.3.1. С маркиране на бутон "Load Tips" от Екрана със задачи се отключват последователно отделенията за зареждане на връхчета (наконечници) в горния панел на апарата. Над отключеното отделение светва зелен светодиод (когато е заключено светодиода свети в червено).

1.3.2. Поставят се нови плаки с пълен брой връхчета (наконечници) на местата, на които връхчетата са напълно изразходени и са изобразени на монитора като обградени с червена рамка.

1.3.3. Плаките с частично изразходени връхчета не се подменят, не се размества позицията им в отделението или позициите на отделните връхчета в плаката.

Апаратът пази информация за местоположението им. Плаките с частично изразходени връхчета на графичното изображение на екрана са обградени с жълта рамка.

1.3.4. Плаки, от които не са изразходвани връхчета, не се подменят или разместват.

1.3.5. След зареждане на връхчетата, отделенията се затварят, маркира се бутон “Асерт” и апаратът заключва отделениято и отчита броя им.

1.3.6. В процеса на работа апаратът отчита количеството на оставащите връхчета и при достигане на критично ниво съобщава за нуждата от добавяне.

Забележка: Да не се отварят отделенията за връхчета насилствено. Отделенията за връхчета се отключват само чрез системния софтуер.

1.4. Зареждане със свързани епруветки, в които протича процесът на анализ

1.4.1. С маркиране на бутон “Load MTUs” от Екрана със задачи се отключва отделениято за зареждане на свързани епруветки в средния панел на апарата.

1.4.2. Поставят се заедно с картонената опаковка, която постепенно леко се изважда назад.

Забележка: Да се избягва пипането им (физически контакт) с ръка.

1.4.3. След поставяне се инспектира (проверява наличието на наконечник с малък обем) има ли малко връхче до всяка епруветка. То е нужно за етапа на магнитното миене в процеса на анализа на проби. Дефектните свързани епруветки се отстраняват

1.4.4. В процеса на работа апаратът отчита количеството на оставащите свързани епруветки и при достигане на критично ниво съобщава за нуждата от добавяне.

Забележка: Да не се отваря отделениято за свързани епруветки насилствено. Отделенията за връхчета се отключват само чрез системния софтуер.

2. Зареждане на реагентите.

2.1. С маркиране на бутон “Load Assay Reagents” от Екрана със задачи се отваря Екран за панел „Реактиви на теста“ с графично изображение на четири *писти за носачтата* с реактиви и TCR-барабана с четири позиции за зареждане.

2.2. На носачто за реактиви се поставят Селекционният реагент, Реагента на ензима, Реагента за амплификация и Реагента на сондата. Всяко гнездо от носачто има ивица, оцветена в същия цвят като ивицата на етикета на реагента. Барковете трябва да са свободно видими в съответните прозорчета на *носачто*.

2.3. Носачто се поставя на първата писта за реактиви в Отделениято за реактиви в горния панел на апарата.

2.4. В TCR-барабана в горния панел на апарата се поставят Работният целеви реагент и Усилващият целеви реагент. Двата реагента са с различни размери и се поставят в съответните гнезда. Номерът на гнездото в барабана трябва да съответства на номера на пистата, на която е заредено и носачто с реактиви. Барковете трябва да са свободно видими в съответните прозорчета на гнездата на барабана.

2.5. Маркира се бутон “Асерт”. Апаратът разчита барковете и при успешно зареждане графичното изображение на съответната писта за реактиви и място в барабана от Екрана за зареждане на реактиви се оцветява в зелено.

2.6. Отделенията за зареждане на реактиви се отварят свободно и по всяко време на работния процес могат да се заредят нови китове с реактиви.

2.7. Набор с изразходени реактиви не се отстранява до пълното приключване на процеса.

Забележка: При зареждане на реактиви от нова мастер-партида се сканира баркод-номера на мастер-партидата, както и баркодовете на партидните номера на отделните реактиви, течности и калибратори от листовката, която се намира във всяка опаковка.

3. Отстраняване на твърдия и течен отпадък

3.1. С маркиране на бутон "Empty Waste" от Екрана със задачи се отключва Отделението за отпадъци в долния панел на апарата.

3.2. Тубата с течен отпадък се повдига, изпразва се от санитар и се връща на място.

3.3. Пликът за твърди отпадъци заедно с капака на контейнера се затварят, изхвърлят и подменят с нови.

3.4. Затваря се отделението за отпадъци.

Забележка: Отстраняването на отпадъците може да става само в режим на готовност, но не и в режим на процес в ход. По време на процеса на анализ на проби системата не позволява отстраняването на отпадъците и при достигане на капацитета им не се пипетират нови проби. За оставащия капацитет на контейнерите за отпадъци се следи от Лентата на състоянието в долната част на монитора. Ако контейнерите имат достатъчен за броя изследвани проби капацитет може да не се подменят/изхвърлят.

4. Дейности по поддръжка на апарата

4.1. С маркиране на бутон "Perform Maintenance" от Екрана със задачи се отваря Екран дейности по поддръжка със състоянието на различните дейности – кога са извършени и дали срокът им е изтекъл.

4.2. С маркиране на съответната поддръжка и бутон "Start" започва съответната процедура по поддръжка.

4.3. За дейността по поддръжка "Clean Mag Wash" (Почистване на устройството за магнитно миене) е необходимо предварително зареждане на разтвор "Advanced washing solution" в определеното гнездо на Отделението на TCR барабана, както и консумативи и системни течности.

4.4. Дейностите по поддръжка на апарата могат да се извършват преди или след работа. Апаратът няма да започне работа ако някоя от поддръжките е изтекла и/или не е преминала успешно.

4.5. Миене на апарата

- Задължително се извършва преди работа на апарата, дори ако иконата му в Екрана със задачи не е маркирана с червена рамка.
- С маркиране на бутон "Prime Instrument" от Екрана със задачи автоматично се стартира миене на апарата. За да протече успешно миенето, трябва да има заредени връхчета за пипетиране, свързани епруветки и системни течности.
- Процедурата има пълен и съкратен вариант. Те се провеждат на определени времеви интервали, които се следят автоматично от системата. Операторът задава миенето на апарата, а системата извършва нужното в момента миене.
- Миенето на апарата може да се извършва по всяко време, включително и по време на процеса на анализ на проби, когато възникне нужда (например при пипетиране на фибрин/съсирек от пробата).

5. Зареждане на проби и калибратори

5.1 Зареждане на калибратори

5.1.1 Калибратори задължително се зареждат при всяко:

- Зареждане с нов набор реактиви,
- Използване на набор реактиви, който е вече бил в апарата, изваждан е от него и отново е зареден в текущия процес на работа,
- Добавяне на нов набор реактиви в процеса на работа, ако тестовете във вече заредения набор са недостатъчни за броя проби за анализ.

5.1.2 Калибраторите са един за негативна контрола и три за позитивна контрола (за HCV, HIV, HBV).

5.1.3 Епруветките с калибратори се поставят във носач за проби със свободно видим баркод в прозорчето на носачто. Уместно е носачто с калибраторите да се зареди на първа позиция в панела за реактиви, т.к. апаратът няма да започне обработка на проби преди да разпознае и пипетира калибраторите. На графичното изображение на носачто с калибраторите, на мястото им в него се изписва символ "C".

5.1.4 Валидността на калибрацията за заредените реактиви е 24 часа. В този период могат да се зареждат проби без нова калибрация, ако те се обработват с тези реактиви. Добавянето на нов набор реактиви изисква отделна калибрация.

5.2 Зареждане на пробите

5.2.1 Епруветките с дарителските проби, подлежащи на анализ се поставят в гнездата на носачтата така, че баркодът да е свободно видим в прозорчето.

5.2.2 С маркиране на бутон "Load Samples" от Екрана със задачи се отваря Екран за панел „Проби“ с графично изображение на пистите за носачтата с проби.

5.2.3 Носачтата с проби се поставят на пистите в Отделението за проби в горния панел на апарата. Ако носачто и пробите в него са приети и разчетени от апарата, пробите се изобразяват графично на екрана в зелен цвят. В дясната част на екрана се изписват идентификационните номера на заредените проби.

5.2.4 Отделението за проби се отваря свободно и в процеса на работа на апарата могат да бъдат въвеждани и/или отстранявани носачта (въвеждане на нови проби, отстраняване на вече пипетирани от апарата проби).

6. Преминаване на апарата в режим "In Process" (работен режим, процес в ход)

Преминаването в работен режим става автоматично и без операторска намеса след:

- Зареждане на системата с консумативи, системни течности, реагенти,
- Валидност и успешно приключване на дейностите по поддръжка
- Отстраняване на отпадъците или достатъчен за броя обработвани проби капацитет на контейнерите
- Зареждане на калибратори и проби

В. Дейности на оператора по време на извършването на анализа на проби.

1. Следи за нивото на универсалните течности, капацитета на отделението за отпадъци, температурата в инкубаторите, наличността на консумативи и реагенти от Лентата на състоянието в долната част на монитора и в Екраните на съответните панели. Своевременно добавя нужните количества консумативи и реагенти.

2. С маркиране на бутон "Run Status" от Лентата с менюта в горната част на монитора отваря Екран за състояние на изпълнението. От него следи състоянието на реагентите и пробите – оставащи реагенти, оставащо време за валидността на калибрацията, брой зададени и чакащи проби, час на излизане на първи и последен резултат.

- Пробите, които в момента се пипетират, се оцветяват в жълто на графичното изображение на носачто с проби на съответното за пробата място;
- Пробите, които са зададени, но все още не са накапани, са оцветени в зелено;
- Пробите, които вече са пипетирани, се оцветяват в синьо;
- Пробите, които не могат да бъдат пипетирани или са в недостатъчно количество, се оцветяват в червено.

3. След като всички проби от носачто са пипетирани, светодиодът над него изгасва и носачто може да бъде отстранено и сменено с друго носач с проби. Светодиодът над носачто, от което се пипетират проби в момента свети в червено и не трябва да се отстранява. Светодиодът над носачто, в което пробите още не са пипетирани, свети в зелено и не трябва да се отстранява.

4. Проследява резултатите непосредствено след приключване на анализа на съответната проба.

С маркиране на бутон “Results” от Лентата с менюта в горната част на монитора се отваря Екран за резултати. Операторът проследява валидността и реактивността на калибраторите и пробите.

5. Следи съобщенията на апарата

- С маркиране на бутон “Messages” от Лентата с менюта в горната част на монитора се отваря лист със съобщения от работата на апарата;
- Предприема действия в зависимост от вида и естеството на съобщението.

• **Отчитане и интерпретация на резултати от скрининг на дарена кръв за наличие на маркери на трансмисивни инфекции с тестовете Procleix Ultrio Elite и Procleix Ultro Elite HIV, HCV и HBV дискриминаторни тестове**

1. Отчитане на резултатите

1.1 Резултатите от анализа се отчитат от лекар/биолог.

1.2 Текущите резултати в момента на тяхното излизане могат да се видят на монитора в меню “Results”.

1.3 Операторът задава Рапорт с резултати от системния софтуер. Рапортът не се принтира автоматично.

1.4 Достъп до Рапорт с резултати в системата Procleix Panther:

- Маркиране на бутона “Reports” от горната лента с менюта;
- В лявата част на монитора се появява списък с различни рапорти;
- Избира се опцията “Results Report”;
- На отворения нов екран се селектира избор на критерий за съставяне на рапорт;
- Критериите за съставяне на Рапорт с резултати могат да са: деня на извършване на анализа, идентификационен номер на проба, други опции от филтъра;
- Рутинно се използват опциите “Today” или “Yesterday” (за резултати от същия или предходния ден);
- Маркира се бутон “View” в долната част на екрана;
- На монитора се визуализира Рапорта с резултати от изследванията според избрания критерий.

1.5 С натискане на бутон "Print" Рапорта се принтира на хартиен носител.

1.6 Рапортът с резултати се съхранява в лабораторията.

1.7 Съдържание на Рапорта с резултати:

- Дата и час на анализа;
- Позиция на пробата с номер на носач за проби и позиция на пробата/калибратора в него;
- Идентификационен номер на пробата;
- Данни за резултата на вътрешната контрола на съответната проба/калибратор – абсолютна стойност на сигнала (в RLU) и валидност на вътрешната контрола;
- Данни за резултата на изследваната проба/калибратор - абсолютна стойност на сигнала (в RLU), съотношение на абсолютната стойност на сигнала спрямо граничната стойност (S/CO), резултат за пробата;
- Флагове.

1.8 Значение на символите в рапорта:

- „Valid” – калибраторът/вътрешната контрола са валидни;
- „Invalid” – калибраторът/вътрешната контрола / резултатът от пробата са невалидни;
- „Nonreactive” – изследваната проба е нереактивна;
- „Reactive” - изследваната проба е реактивна (изписва се с червен цвят);
- „p” – резултатът от пробата е невалиден поради грешка в протичане на процеса;
- „QNS” – резултатът от пробата е невалиден поради недостатъчно количество на пробата.

2. Преглед на рапорта с резултати от анализа.

Отчитащият лекар/биолог в Лаборатория "Скрининг за трансмисивни инфекции" преглежда Рапорта с резултати и интерпретира, приема или отхвърля резултатите съгласно долупосочените критерии

Критерии за приемане на резултатите.

2.1 Валидност на анализа:

- ✓ Анализът е валиден, ако минималният брой калибратори отговарят на критериите за приемане.
- За анализа на теста Procleix Ultrio Elite трябва да са валидни минимум седем от деветте репликата на калибраторите - минимум два от трите репликата на калибратора на отрицателната проба и пет от шестте репликата на калибратора на положителната контрола;
- За анализа на дискриминаторния тест Procleix Ultrio Elite HIV, HCV или HBV трябва да са валидни минимум два от трите репликата на калибратора на отрицателната проба и минимум два от трите репликата на калибраторите на положителната контрола за всяка инфекция;
- Критериите за приемане на калибраторите автоматично се проверяват от софтуера на системата Procleix Panther. Абсолютните стойности на сигнала на калибратора и на вътрешната контрола трябва да са в определени граници;

Забележка: Всяка проба (дарителска проба и/или калибратор) се изследва в една епруветка с вътрешна контрола с цел контрол на активността на реагентите, протичането на процеса и правилното функциониране на системата.

- Резултатът от анализа на пробата се интерпретира заедно с резултата за вътрешната контрола. Ако стойностите за вътрешната контрола не са в съответните граници, резултатът на пробата е невалиден.
- ✓ Ако са валидни по-малък брой от зададените калибратори, софтуерът на системата Procleix Panther автоматично обявява целия анализ за невалиден и резултатите за всички изследвани проби са невалидни.
- При валиден анализ, се изчисляват автоматично граничните стойности за вътрешната контрола и анализираната проба.аналита.

Обобщени данни за стойностите на калибраторите:

Критерии за приемане:

Калибратор на отрицателната проба	
Аналит	≥ 0 и $\leq 45,000$
Вътрешна контрола	$\geq 75,000$ и $\leq 375,000$
HIV калибратор на положителната контрола	
Аналит	$\geq 300,000$ и $\leq 1,800,000$
Вътрешна контрола	$\leq 475,000$
HCV калибратор на положителната контрола	
Аналит	$\geq 200,000$ и $\leq 1,400,000$
Вътрешна контрола	$\leq 475,000$
HBV калибратор на положителната контрола	
Аналит	$\geq 300,000$ и $\leq 1,800,000$
Вътрешна контрола	$\leq 475,000$

Забележки:

- Под анализ в горната таблица да се разбира калибратора;
- Стойностите са дадени в измерените от апарата RLU (релативни светлинни единици);
- Стойностите на калибраторите при провеждане на дискриминаторни тестове са същите.

2.2 Валидност на пробата:

При валиден анализ:

- ✓ Резултатът за пробата е валиден ако сигналът на вътрешната контрола е равен на или е над граничната стойност за вътрешна контрола;
- ✓ Резултатът за пробата е невалиден ако:
 - Сигналът на вътрешната контрола е по-нисък от този на граничната стойност на вътрешната контрола;
 - Сигналът на вътрешната контрола е по-висок от 650,000 RLU в теста Procleix Ultrio Elite или по-висок от 475,000 RLU за дискриминаторните тестове;
 - Грешки в работата на апарата;
 - Недостатъчно количество на пробата.

Изключение: проба със сигнал по-висок от или равен на граничната стойност на калибратора (т.е. S/CO на пробата е ≥ 1.00) се приема за валидна и при сигнал на вътрешната контрола по-нисък от граничната стойност за вътрешната контрола

2.3 Критерии за интерпретация на валидни резултати от изследваните дарителски проби при валиден анализ

В Рапорта с резултати сигналът на пробата, разделен на граничната стойност на контрола се съкращава с абривиатурата S/CO (сигнал на пробата/гранична стойност на контролата).

- ✓ Пробата се определя като нереактивна, ако:
 - сигналът на пробата е по-нисък от граничната стойност на контролата (т.е. S/CO е < 1.00)

и

- сигналът на вътрешната контрола е по-висок от или равен на граничната стойност на вътрешната контрола и по-нисък или равен на 650,000 RLU в теста Procleix Ultrio Elite или по-нисък или равен на 475,000 RLU за дискриминаторните тестове.

- ✓ Пробата се определя като реактивна, ако:
 - сигналът на пробата е по-висок от или равен на граничната стойност на контролата (т.е. S/CO на анализа е ≥ 1.00)

и

- сигналът на вътрешната контрола е по-нисък от или равен на 650,000 RLU за теста Procleix Ultrio Elite или по-нисък от или равен на 475,000 RLU за дискриминаторните тестове.

Изключение: проба със сигнал по-висок от или равен на граничната стойност на контролата (т.е. S/CO е ≥ 1.00) се приема за реактивна и при сигнал на вътрешната контрола по-нисък от граничната стойност за вътрешната контрола

Резюме на интерпретация на резултатите на изследваните проби

Интерпретация на пробата	Критерии за теста Procleix Ultrio Elite	Критерии за дискриминаторните тестове
нереактивна	S/CO е < 1.00 и вътрешната контрола е $\geq$ граничната	S/CO е < 1.00 и вътрешната контрола е $\geq$

	стойност на вътрешната контрола и вътрешната контрола е $\leq 650,000$ RLU	граничната стойност на вътрешната контрола и вътрешната контрола е $\leq 475,000$ RLU
реактивна	$S/CO \geq 1.00$ и вътрешната контрола е $\leq 650,000$ RLU	$S/CO \geq 1.00$ и Вътрешна контрола $\leq 475,000$ RLU
невалидна	вътрешната контрола е $> 650,000$ RLU или вътрешната контрола е $<$ граничната стойност на вътрешната контрола	вътрешната контрола е $> 475,000$ RLU или Вътрешна контрола $<$ граничната стойност на вътрешната контрола

3. Последващи действия на отчитания лекар/биолог.

3.1 Ако анализът е невалиден, резултатите за всички проби се отчитат като невалидни и всички проби трябва да се тестват отново. Установяват се причините, отстраняват се ако е възможно или се уведомява сервизния инженер/представител на производителя.

3.2 При валиден анализ и невалиден резултат за отделни проби се установяват причините, при възможност се отстраняват и невалидните проби се тестват отново.

Забележка: Възможни причини за невалидни анализи и резултати са: влошаване качеството на реагентите (неправилно транспортиране, съхранение и подготовка); изтекъл срок на годност на реагентите; неправилна поддръжка на апарата; използване на консумативи от друг производител; грешка на оператора и отклонение от процедурите за провеждане на анализа; неправилно функциониране на оборудването; неправилно взета, обработена и съхранена проба; малко количество проба; контаминация на реагентите и/или проби.

3.3 Подчертава с червен химикал идентификационните номера на реактивните и/или невалидни проби.

3.4 Подписва хартиения носител на Рапорта за резултати, вписва в него и името на лаборанта, участвал в различните етапи на анализа.

3.5 Описва в дневния рапорт идентификационните номера на пробите, които подлежат на повторно тестване (поради невалиден резултат) или дискриминаторни тестове (всички реактивни проби)

3.6. Контролира заделянето на описаните в дневния рапорт проби от лаборанта и поставянето им при подходящи температурни условия на съхранение.

3.7. Нанася и подписва всички резултати в описите, кръводарителските карти и в информационната система.

3.8. Осигурява съхранението на хартиения носител на Рапорта с резултати в лабораторията.

- **Потвърждаване на резултатите от изследването на дарена кръв чрез NAT технология в Националната информационна система**

След получаване на резултати от изследването на пробите, дежурният лекар в „Скрининг лаборатория за маркери на трансмисивни инфекции в дарена кръв“ нанася отрицателните за HIV, HCV и HBV резултати в Националната информационна система и ги потвърждава.

При положителен резултат от изследването с тест PROCLEIX ULTRIO ELITE, в Националната информационна система не се нанасят резултати до момента на провеждане на дискриминаторен тест.

След провеждането му, дежурният лекар нанася положителния за съответната инфекция резултат, както и отрицателните за другите инфекции резултати и ги потвърждава.

АВТОМАТИЧНО ВЪВЕЖДАНЕ

След завършване на първоначалните тестове, чрез използване на функция “Transfer” на апарата, резултатите се изпращат към информационната система. При трансфера на данни от автоматизирана диагностична система към ИС се извършва разпознаване на данните от апаратурата по предварително зададен алгоритъм и записването им в съответните полета.

Корекция на резултат

При резултат “Reactive”, след извършването на дискриминаторен тест, резултатите в съответните полета трябва да се променят ръчно, съответно на “положителен” и „отрицателен“. Коририра се и резултатът в съответното поле на ред „Окончателен резултат“

Потвърждаване на резултатите

След приключване на всички тестове резултатите се потвърждават чрез поставяне на маркер в поле потвърждение и се избира на един от бутоните <ЗАПИШИ> или <ЗАПИШИ И ОТПЕЧАТАЙ>.

Потвърждение	☐ Финализиране на данните	Виз. изобраз.
Запиши Запиши и отпечатай		

РЪЧНО ВЪВЕЖДАНЕ

След извършване на всички необходими тестове, окончателният резултат се въвежда ръчно в съответните полета на ред „Трансмисивни PCR“ и ред „Окончателен резултат“ чрез избор на съответния резултат.

Трансмисиони PCR	СПИН	▼	Хепатит В	Хепатит С	▼	Сифилис	▼
Окончателен резултат	СПИН	▼	Хепатит В	Хепатит С	▼	Сифилис	▼

След приключване на всички тестове резултатите се потвърждават чрез поставяне на маркер в поле „протвърждение“ и се избира на един от бутоните <ЗАПИШИ> или <ЗАПИШИ И ОТПЕЧАТАЙ>.

☐ Потвърждение
 ☐ Финализиране на данните

Очакваните резултати вследствие на въвеждането на NAT технологията в рутинната практика на трансфузионната система в България са:

1. Високото качество и сигурност на изследваната кръв и кръвни съставки
2. Скъсен „прозоречен период“ и ранно диагностициране на инфекцията
3. Намаляване на разходите за закупуване на реактиви за серологично изследване на антиген С при HCV инфекция
4. Предотвратяване на повторните изследвания чрез серологични методи (също със скъпи китове)
5. Предотвратяване на загубите от унищожаване на скъп преработен човешки продукт, получен чрез иновативни методи

6. Предотвратяване на заразяването на здрави лица с вирусни и бактериални инфекции, с последващо хронифициране, инвалидизиране или фатален изход (превенция на инфектирането)
7. Предотвратява се скъпоструващо продължително медикаментозно лечение на пациенти с трансмисивни инфекции

Настоящата методология е обсъдена и приета на работна среща на партньорите по Национална научна програма „Разработване на методология за въвеждане на NAT технология за диагностика на дарената кръв в трансфузионната система на Република България“, одобрена с Решение на Министерски съвет от 15.08.2018г., и е подписана от тях както следва:





.....