

**ОБЗОР НА МЕТОДИТЕ ЗА
ДИАГНОСТИКА НА
ТРАНСМИСИВНИ ИНФЕКЦИИ СЛЕД
ВЪВЕЖДАНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНАТА
НАТ - ТЕХНОЛОГИЯ
В РЦТХ –гр. ПЛОВДИВ**

Д-р Т. Николова, Д-р С. Данева

РЦТХ – гр. Пловдив

ВЪВЕДЕНИЕ

- ▶ Годишно милиони хора в света са кръвопреливани с кръв и различни кръвни съставки
- ▶ За осигуряване на безопасна кръв и кръвни продукти се инвестират много ресурси – финансови, технологични и интелектуални...
- ▶ Въпреки постоянно повишаващия се контрол на безопасността на трансфузиите, все още съществува потенциален риск от заразяване на реципиентите с трансмисивни инфекции (HBV, HCV, HIVи др.)
- ▶ За постигане на Националната стратегия по отношение на трансфузионната система и осигуряване на безопасна кръв, осъществяваме последователност от стъпки:
 - ▶ подбор и филтриране на донори;
 - ▶ освидетелстване на кръводарители;
 - ▶ скрининг на дарената кръв;
 - ▶ карантиниране на съмнителни единици кръв и/или плазмени продукти;
 - ▶ освобождаване на годни за преливане продукти и бракуване на негодните такива;
 - ▶ водене на регистри, трансфузионен надзор.

ВЪВЕДЕНИЕ



- ▶ Това се осъществява чрез непрекъснат процес на :
 - ▶ Планиране;
 - ▶ Организиране;
 - ▶ Реализиране;
 - ▶ Документиране;
 - ▶ Контрол;
 - ▶ Анализ;
 - ▶ Коригиране;
 - ▶ Вземане на своевременни решения.
- ▶ Основно място сред дейностите за обезпечаването на сигурността на кръвта по отношение на предпазване от трансмисивните инфекции – HIV, HBV, HCV, Sy има изследване на дарената кръв чрез прилагане на последователност от следните стъпки:
 - ▶ серологичен скрининг;
 - ▶ надграждане с NAT диагностика;
 - ▶ потвърждаване на резултатите.
- ▶ Всяка единица дарена кръв се изследва за носителство на HIV 1/2, HBV, HCV, Syphilis чрез серологични методи и за HIV 1/2, HBV, HCV - по NAT технология
- ▶ Диагностиката на дарената кръв и кръвни съставки за маркери на трансмисивни инфекции следва няколко етапа:

ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ

□□□□□□□□ □□□□□□□□ □□□□ в трансфузионната практика -

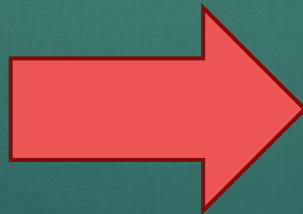
чрез тях се открива носителство на вируса на :

HIV1/2 – чрез тест за Ag/Ab

Хепатит В – чрез тест за HbsAg

Хепатит С – чрез тест за Ag/Ab

и причинителя на Сифилис (Treponema Pallidum)



ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ

ИМУНОЕНЗИМЕН - на апарати EVOLIS (BIO-RAD) - метод тип “сандвич” за откриване на Ag и/или Ab чрез отчитане със спектрофотометър на оптичката плътност на Ag-Ab свързаните комплекси.

- ❖ Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA – качествен имуноензимен тест за откриване на инфекция с вируса на Хепатит С, въз основа на откриването на анти-HCV антитела и капсиден антиген в серум или плазма
- ❖ Monolisa HbsAg ULTRA – едностъпков имуноензимен тест за откриване на повърхностния антиген на хепатит В вируса (HBV) в човешки серум или плазма
- ❖ Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab – качествен имуноензимен тест за откриване на антигена HIV p24 и антитела срещу HIV1 и HIV2 в човешки серум или плазма
- ❖ Syphilis Total antibody – тест за качествено и полуколичествено откриване на антитела срещу Treponema Pallidum

ХЕМИЛУМИНИСЦЕНЦИЯ - на апарат Architect (Abbott) – Combo тест за детекция на HIV Ag/Ab, Anti-HCV, HCV-Ag, HBsAg, Syphilis TP – имуноанализ с микрочастици за качествено определяне на Ab /количествено за HCV Ag/ в човешки серум или плазма чрез отчитане на генериран светлинен сигнал от свързаните коюгати т.е. Ag-Ab комплекси

Пробите дали положителен резултат подлежат на потвърдителна диагностика:

- ❖ HCV и HIV – референтни лаборатории
- ❖ HBV – Monolisa HbsAg ULTRA Confirmatory на място
- ❖ Syphilis – TPHA на място в РЦТХ

ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ

- ▶ Посочените методи са чувствителни и специфични, но прозоречният период е по-дълъг и насочеността им е спрямо различни субстрати от вируса
- ▶ Това е една от причините за въвеждане на молекулярната NAT технология
- ▶ В края на 2019 г. в РЦТХ гр.Пловдив се въведе молекулярна (NAT) технология за вирусологична диагностика на дарена кръв
- ▶ От 10.02. 2020г. всяка единица дарена кръв се изследва по NAT(Nucleic Acid Testing) за HIV1/2, HBV, HCV чрез Procleix Ultrio Elite - Panther System /Grifols/
- ▶ За целта се взема допълнителна моновета с кръв, подходяща само за нуждите на това изследване
- ▶ Позитивните проби се маркират, съхраняват и се включват в дискриминаторните тестове Procleix Ultrio Elite HIV, HCV и HBV, с цел уточняване вида на инфекцията

ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ

Молекулярен метод NAT - технология за откриване наличието на ДНК или РНК на едни от най-значимите вируси HIV1/2, HBV, HCV и др.

- ❖ Procleix Ultrio Elite (Panther System) - тест с двойна кинетика за засичане на хемилуминисцентен сигнал: “пробляскващ” за вътрешната контрола и “постоянен” за специфичния ампликон
- ❖ Три етапа на процедурата:
 - ✓ Подготовка на пробата - целево улавяне със специфични нуклеотиди
 - ✓ Транскрипционно медирана амплификация (ТМА)
 - ✓ Засичане на амплификационни продукти /ампликони/ чрез хибридизация посредством сонди
 - Ultrio Elite-едновременно засичане на комбиниран сигнал- HIV1/2 ,HBV, HCV
 - dNAT- разграничаване между отделните сигнали за HIV1/2, HBV, HCV /специфичните ампликони са диференцирани/

МОЛЕКУЛЯРЕН МЕТОД - NAT

Предимства на NAT технология:

- Висока чувствителност и специфичност
- Директно установяване на вирусната РНК или ДНК
- Откриване на ранна инфекция в максимално кратък срок:
скъсяване на “прозоречен период”- HIV на 4.5 дни, HBV на 16.3 дни, HCV на 2.2 дни
- Редуциране на потенциалния риск от заразяване на реципиенти при кръвопреливане
- Максимално гарантирано качество и безопасност на кръвта и кръвните продукти
- Най-висок стандарт към момента в световен мащаб

РЕЗУЛТАТИ

По отношение на методите :

- припокриват се – серология и NAT дават еднаква резултатна характеристика
т.е. пробите са позитивни или негативни по двата метода
- NAT /+/ позитивни, серология /-/ негативни
- серология /+/ позитивни, NAT /-/ негативни

По отношение на брака :

РЕЗУЛТАТИ

ИНФЕКЦИЯ/РЕЗУЛТАТИ 2020г.	NAT(+) серология(+)	NAT(+) серология(-)	NAT(-) серология(+)	NAT(-) серология(-)
HBV	127	37	25	33397
HCV	29	4	9	33544
HIV	5	0	0	33581

РЕЗУЛТАТИ

ИНФЕКЦИЯ/РЕЗУЛТАТИ 2021г.	NAT(+) серология(+)	NAT(+) серология(-)	NAT(-) серология(+)	NAT(-) серология(-)
HBV	155	34	4	36977
HCV	26	0	1	37143
HIV	7	0	2	37161

РЕЗУЛТАТИ

ИНФЕКЦИЯ/РЕЗУЛТАТИ 2022г.	NAT(+) серология(+)	NAT(+) серология(-)	NAT(-) серология(+)	NAT(-) серология(-)
HBV	150	42	11	38499
HCV	29	2	1	38670
HIV	6	0	0	38696

РЕЗУЛТАТИ

NAT – положителни маркери

	NAT					СЕРОЛОГИЯ			
	UE	dHCV	dHBV	dHIV	d/-/отр	HCV	HBV	HIV	/-/отр
2020г	233	33	164	5	31	29	127	5	72
2021г	296	26	189	7	76	27	159	9	101
2022г	323	32	192	6	99	29	161	8	125

РЕЗУЛТАТИ

Положителни маркери за трансмисивни инфекции – общ брак

ИЗСЛЕДВАНИ	2020г. 33 627		2021г. 37 246		2022г. 38 801	
HIV	33	0,1%	50	0,1%	97	0.25%
HBV	181	0,5%	207	0,6%	186	0.5%
HCV	58	0,2%	65	0,2%	74	0.2%
SYPH	46	0,1%	53	0,1%	73	0.2%
NAT	64	0,2%	95	0,3%	122	0.3%
Общ брак:	382	1,1%	470	1,3%	552	1,5%

ОБСЪЖДАНЕ

- ▶ Наблюдението обхваща 3 годишен период и 109 674 кръводарители
- ▶ В този анализ наблюдаваме съответствие на резултатите при HIV позитивни донори, които са потвърдени с потвърдителен тест и NAT тест
- ▶ При Хепатит В и С броя на позитивните проби е увеличен за сметка на NAT диагностиката – това е инфекция в “прозоречен период” или окултна инфекция

ОБСЪЖДАНЕ

NAT /+/ □□□□□□□□, □□□□□□□□ **/-/** □□□□□□□□

предимства на NAT технологията

NAT /-/ □□□□□□□□, □□□□□□□□ **/+/** □□□□□□□□

- ▶ фалшиво положителен резултат
- ▶ грешка в работния протокол
- ▶ наличие на антитела
- ▶ случайна детекция на много нисък вирусен товар /под лимита на детекция на теста/ - това е представено при еднократно положителна проба в теста Ultrio Elite и отрицателна при повторение и/или dNAT
- ▶ окултни /скрити/ инфекции

ОБСЪЖДАНЕ

Окултна инфекция в острия период

Вирусна ДНК в пресероконверсия няма.

Най-ранен „прозоречен период“, редуцира се до 96% с NAT теста

- ▶ HBV – преди 16 дни
- ▶ HCV – преди 2-3 дни
- ▶ HIV – преди 4-5 дни

ОБСЪЖДАНЕ



Вирусна ДНК/РНК няма или е много малко – нисък вирусен товар – HIV, HCV, HBV

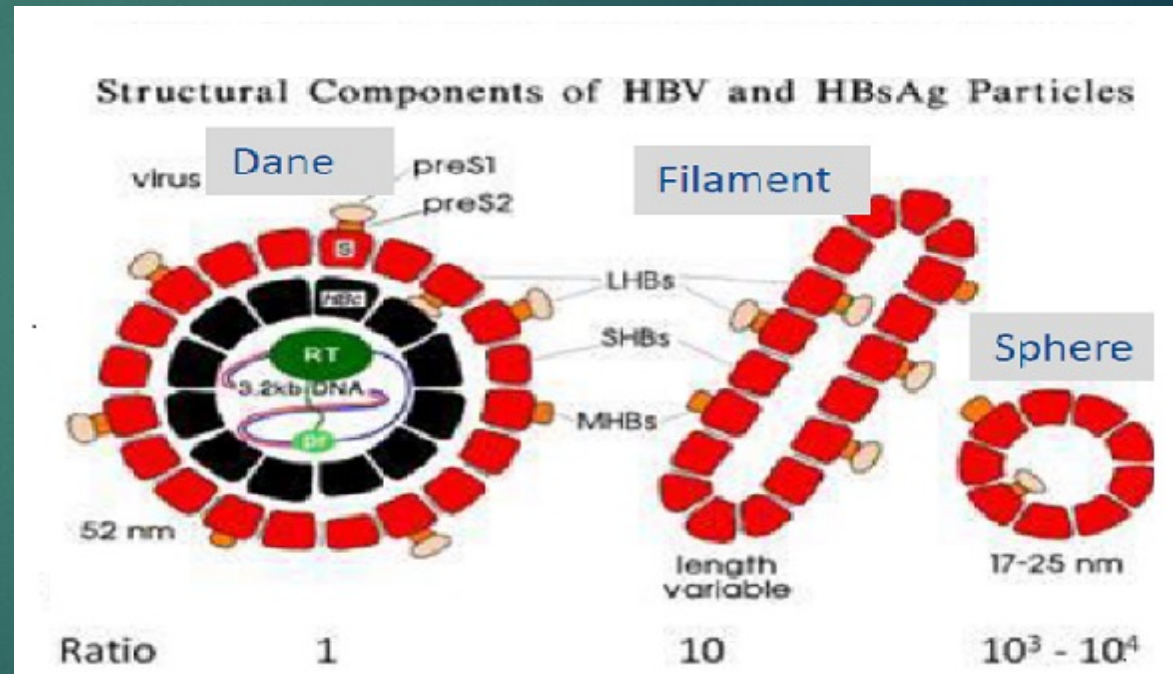
За HBV:

- ▶ при мъже над 50год. в 90%
- ▶ при вирусен товар под 20 U/ml
- ▶ флукуиращи нива на вирусната ДНК
- ▶ мутации на вирусната ДНК
- ▶ констелация:

HBV DNA (+) / HbsAg(-)

Anti-HBc (+) > 90%

Anti-HBc + Anti-Hbs (30-50%)



ОБСЪЖДАНЕ

- ▶ В нашия протокол не се изследват допълнителни показатели, за това е трудно да твърдим дали това е окултна /късна/ или ранна инфекция
- ▶ Пробите, които са дали положителен резултат на Procleix Ultrio Elite, но на Discriminatory тест – отрицателен, показват несъответствие в резултата.

Тези проби са трудни за интерпретация.

ОБСЪЖДАНЕ

- ▶ Постоянна тенденция за намаляване на бракуваните единици кръв до 2020г - АИС и регистри
- ▶ Въвеждане на NAT увеличава брака с 0,3% - след 2020г.
- ▶ Общо задържане нивото на брак след въвеждане на NAT
- ▶ Доказателства за необходимостта от прилагане на серологичните тестове
- ▶ Доказателства за необходимостта от прилагане на NAT тестовете

ПРОБЛЕМИ - ТЕКУЩИ

- ▶ Затруднен обмен на данни с НАИС за управление на резултатите от диагностиката
- ▶ Актуализиране на нормативната уредба – въвеждане на алгоритъм
- ▶ Липса на дублираща апаратура или резервен план при повреда на апарата
- ▶ Трудности при уточняване статуса на дарителите
- ▶ Трудности при проследяване статуса на дарителите
- ▶ Повишени изисквания към квалификацията на персонала - възраст на персонала, икономически фактор...

ИЗВОДИ

- 1) NAT технологията демонстрира по-висока чувствителност в сравнение със серологичните методи за диагностика на трансмисивни инфекции
- 2) Възможност за диагностициране на инфекции в ранна фаза
- 3) Намалява нивото на неустановени вирусни инфекции в прозоречния период
- 4) Задържане с тенденция намаляване на бракувани Е кръв

ИЗВОДИ

- 5) Намалява риска от ятрогенна инфекция
- 6) Медицинска ефективност - намаление на потенциалния риск от пренасяне на инфекция

/Е х...няколко продукта/
- 5) Серологията има място в диагностиката на трансмисивни инфекции
- 6) Паралелното прилагане на серологичните и NAT методи при тестване на донорската кръв подобрява скрининговата точност и ефективност при установяване носителството на трансмисивни инфекции при кръводарители

ИЗВОДИ

- 9) Социална полза
- 10) Повишава безопасността на кръвта и кръвните продукти
- 11) Единни критерии по отношение качество и надеждност на резултатите
- 12) Надеждността на дарена кръв по отношение диагностика на трансмисивни инфекции е подобрена и благоприятства за постигане на мотото “100% безопасна кръв”



БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!