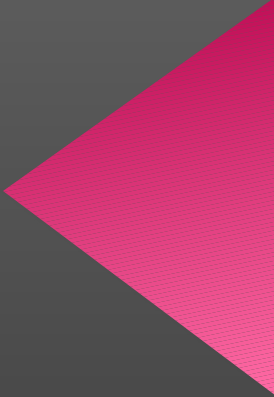


ΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

Κοντοστεργίου Ναυσικά
Επιμελήτρια β' Τμήματος Αιμοδοσίας
«Κωνσταντοπούλειο» Γ.Ν.Ν.Ιωνίας

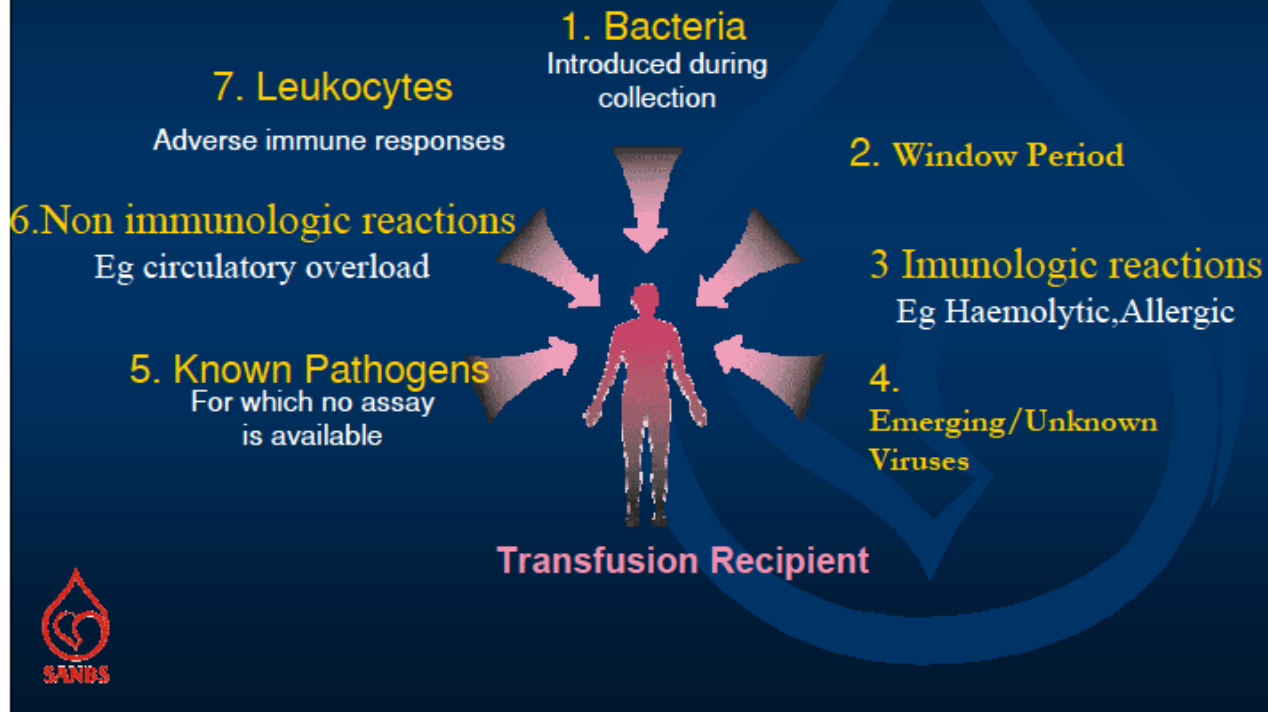


Ασφάλεια και μετάγγιση

- Η αιμοθεραπεία σήμερα είναι ασφαλέστερη από ποτέ και οι μεταγγίσεις σώζουν ζωές κάθε χρόνο. Παρόλα αυτά.... όπως **ΤΟ αίμα περιέχει κινδύνους.....**
- Υπάρχει πάντα η πιθανότητα μετάδοσης παθογόνων που είτε δεν γνωρίζουμε είτε δεν υπάρχει μέθοδος ανίχνευσης. Νέοι ιοί συνεχίζουν να εμφανίζονται με συχνότητα, ένας κάθε 2 - 3 χρόνια.

Κίνδυνοι και μετάγγιση

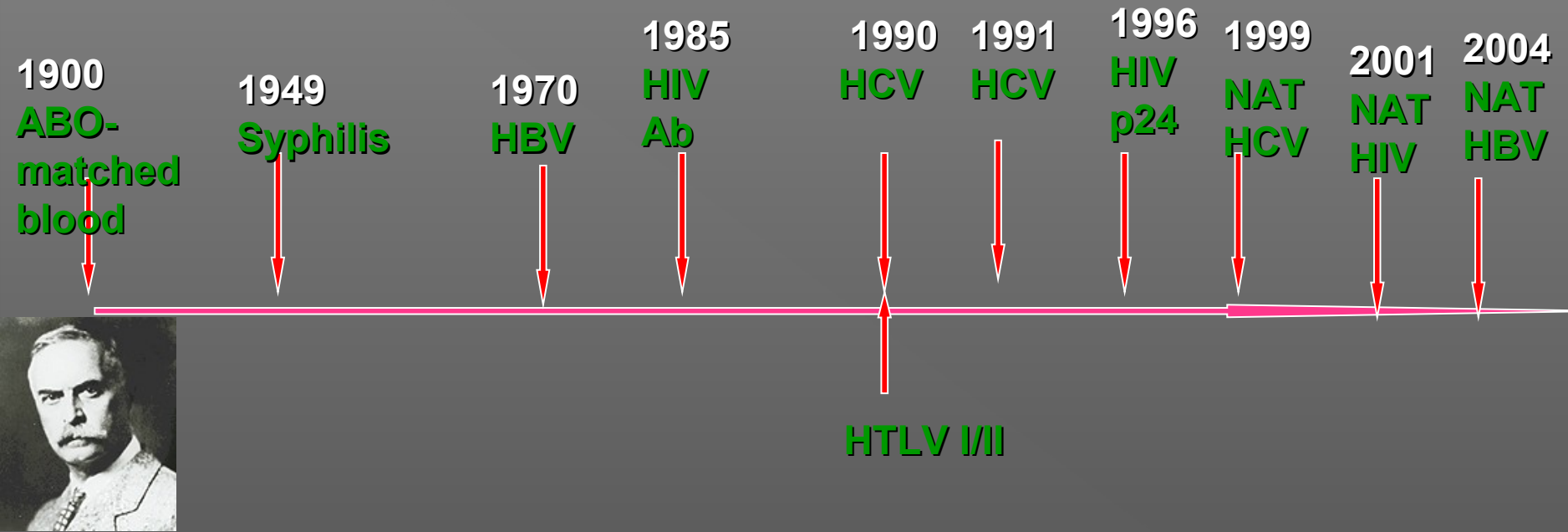
Risks Exist for Blood Transfusion



Μεταδιδόμενα με το αίμα νοσήματα

- ❖ HIV
- ❖ HCV
- ❖ HBV
- ❖ HTLV
- ❖ Σύφιλη
- ❖ Ελονοσία
- ❖ HAV
- ❖ Λοίμωξη Q
- ❖ Dengue virus
- ❖ Parvovirus B19
- ❖ HGV-Orphan virus
- ❖ Ανθρώπιος ερπητοϊός HHV - 8
- ❖ Borrelia burgdorfeii
- ❖ Simian foamy virus
- ❖ Banta disease virus
- ❖ Βακτηριακές λοιμώξεις
- ❖ HHV-6
- ❖ CMV
- ❖ nvCJD agent
- ❖ SEN – V Sendai Virus
- ❖ TTV Virus
- ❖ Chagas disease
- ❖ Chikungunya
- ❖ Babesiosis
- ❖ SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)
- ❖ H5N1 (Avian Influenza)
- ❖ Λοίμωξη Δυτικού Νείλου (WNV)
- ❖ Νέα γρίπη Α (H1N1)

Διαχρονική δυνατότητα ελέγχου



Έτος αρχής ανίχνευσης στην Ελλάδα

- 1959 Ab για Tr. Pallidum (σύφιλη)
- 1975 HBsAg
- 1985 Αντι - HIV 1 / 2
- 1992 Αντι - HCV
- 2002 Αντι - HTLV I/II
- 2009 Μοριακός έλεγχος NAT HBVDNA, HCVRNA, HIVRNA
- 2010 Πιλοτικός προκαταρτικός ορολογικός και μοριακός έλεγχος σε πληγείσες περιοχές NAT WNV

Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος στην Ελλάδα

Δοκιμασία διαλογής - ανοσοενζυμικές τεχνικές (elisa)
τεχνικές χημειοφωταύγειας (EIA-MEIA-CLIA)

Επιβεβαιωτικός έλεγχος - w.blot /RIBA / INNOLIA /FTA /TPHA

Μοριακός έλεγχος - NAT(nuclear acid technique)
HIV RNA/HCV RNA/HBV DNA
NAT/TMA
NAT/RT-PCR

Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος στην Ελλάδα

ΣΥΦΙΛΗ

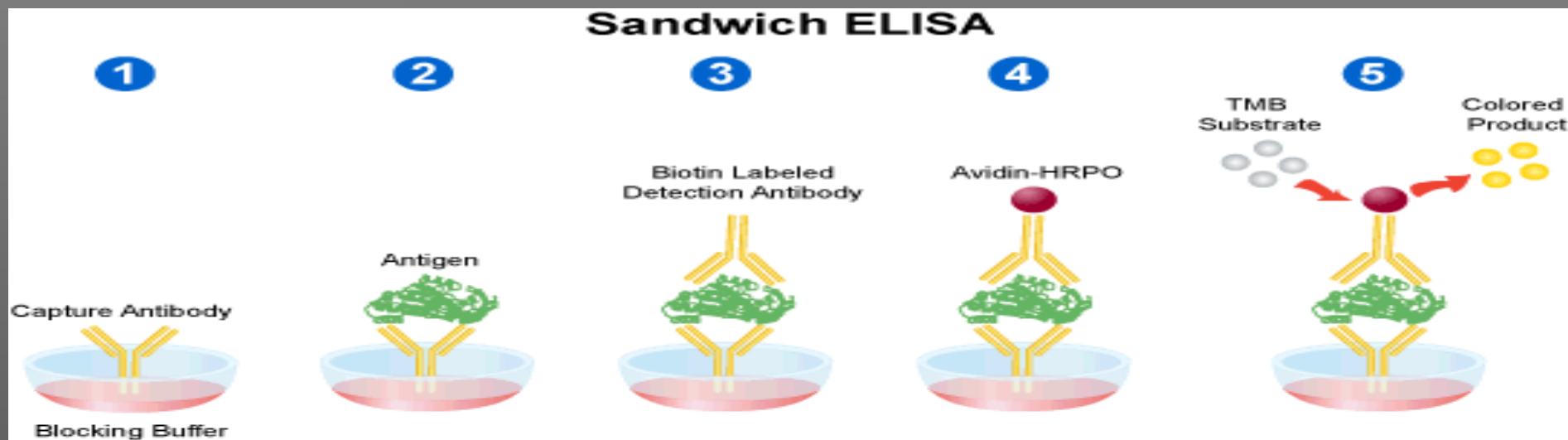
- ❖ Δοκιμασία καρδιολιπίνης (INNO LIA)
- ❖ Με αιμοσυγγόληση (TPHA)
- ❖ Με Elisa
- ❖ Με φθορίζοντα αντισώματα (FTA)

Μετάδοση κατά την μετάγγιση είναι σπάνια λόγω της καταστροφής του *T.Pallidum* μετά από 24-48 ώρες ψύξης του αίματος

Χρησιμοποιείται ως δείκτης επικίνδυνης συμπεριφοράς των αιμοδοτών

Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος στην Ελλάδα

Ανοσοενζυμικός έλεγχος



- 1** a.) Plate is coated with a suitable capture antibody. b.) Blocking buffer is added to block remaining protein-binding sites on plate.
- 2** Sample is added to plate and any antigen present is bound by the capture antibody.
- 3** A suitable biotin labeled detection antibody is added to the plate and also binds to any antigen present in well.
- 4** UltraAvidin™-HRPO (*Leinco Prod. No. A106*) is added and binds the biotin labeled detection antibody.
- 5** TMB substrate (*Leinco Prod. No. T118*) is added and converted by HRPO to a detectable form.

Diagram 1: Illustration of Sandwich ELISA method.

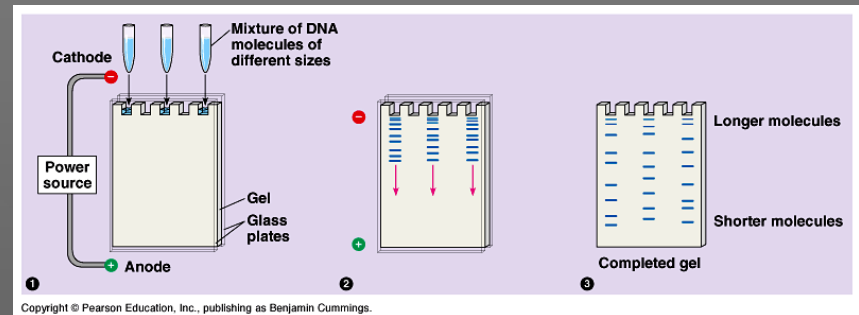
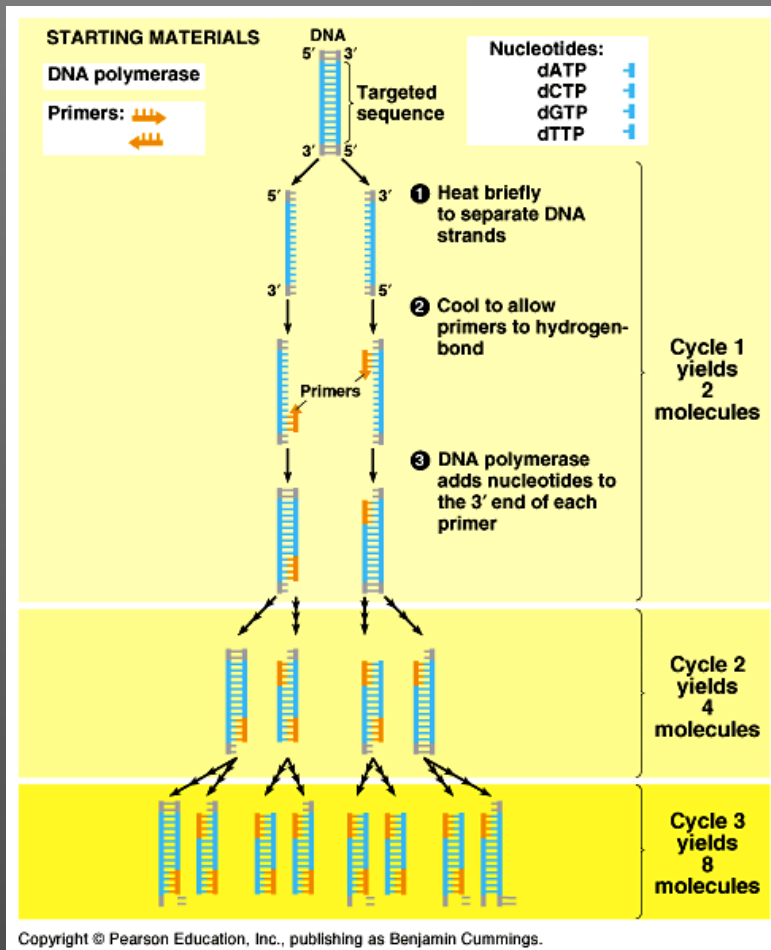
Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος στην Ελλάδα

NAT

- Ταυτόχρονη ανίχνευση τριών ιών (HIV 1, HCV, HBV) με την τεχνολογία επιλεκτικής ενίσχυσης δια της μεταγραφής (TMA) και διαδικασίες προστασίας υβριδοποίησης (HPA) όπως επίσης και διπλής κινητικής (DKA)
- Ταυτόχρονη ανίχνευση (multiplexing PCR) πολλαπλών λοιμογόνων παραγόντων [HBV, HCV, HIV-1(M), HIV-1(O), HIV-2] σε μία μόνο αντίδραση με τεχνολογία αιχμής (Real time PCR)

Καθιερωμένος εργαστηριακός έλεγχος στην Ελλάδα

PCR



1. Με ηλεκτροφόρηση
2. Με μέθοδο χημιοφωταύφειας

- Συμβάλει ουσιαστικά στη διασφάλιση της ποιότητας της μετάγγισης
- Αποτελεί **επιπρόσθετο** βήμα του ιολογικού εργαστηριακού ελέγχου του αίματος
- **Δεν αντικαθιστά** τον καθιερωμένο ιολογικό εργαστηριακό έλεγχο του αίματος

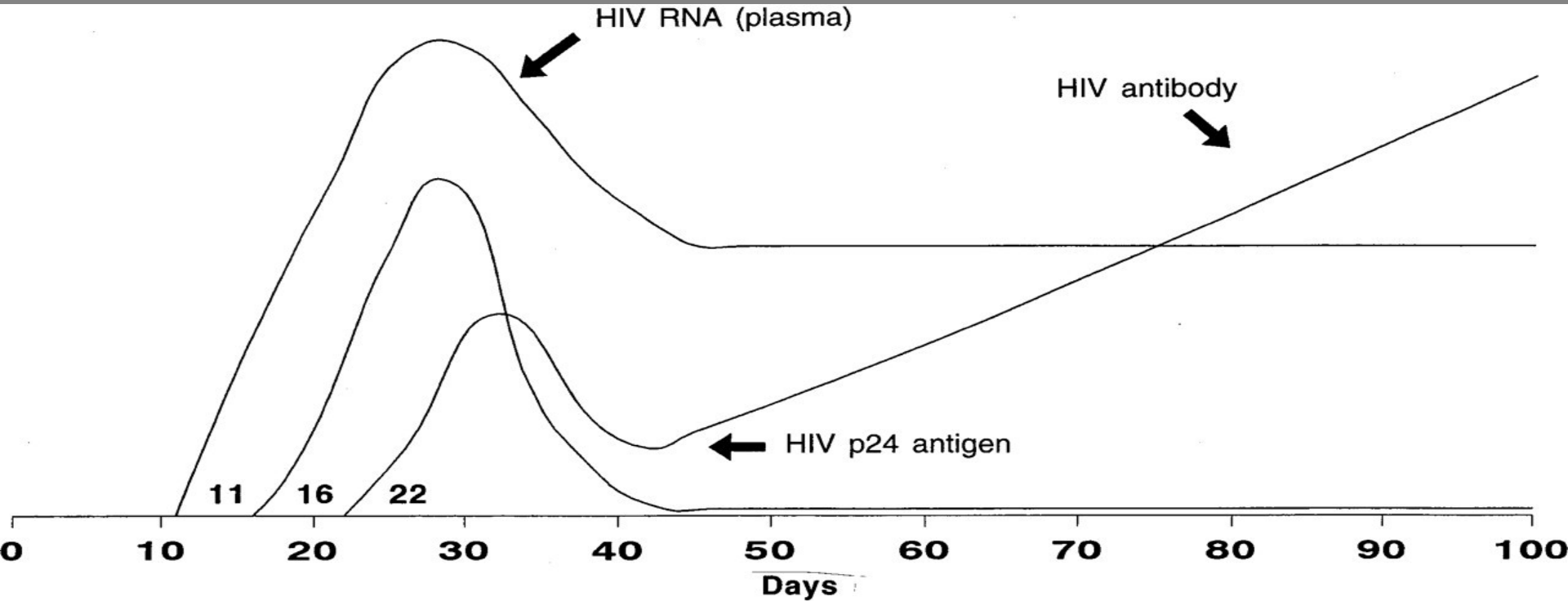
- Καινοτόμος , εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος που επιτυγχάνει επιλεκτική ενίσχυση και πολλαπλασιασμό νουκλεϊνικών οξέων (NAT/TMA, NAT/ Real Time PCR, In house NAT)
- Ενδυναμώνει την ασφάλεια του αίματος μειώνοντας τη φάση παραθύρου των λοιμώξεων HIV (11), HBV (34), HCV (10)
- Αλλάζει την αντίληψη και γνώση της διαχρονικής εξέλιξης της HBV λοίμωξης. Ανιχνεύει και ταυτοποιεί περιπτώσεις λανθάνουσας /occult HBV ή περιπτώσεις HBV σε περίοδο παραθύρου

Πλεονεκτήματα της NAT

Μείωση μεταξύ μόλυνσης και ανίχνευσης κατά 34 – 92%

Ιός	Ορολογικός έλεγχος (ημέρες)	NAT (ημέρες)
HIV-1	20.3 ή 22	11 (5.6)
HCV	58.3 ή 70-82	10 (4.9)
HBV	53.3 ή 56-59 εύρος (37-87)	34

HIV



Theoretical Infectivity

HIV RNA

HIV p24 antigen

HIV antibody

Day 0

Day 11

Day 16

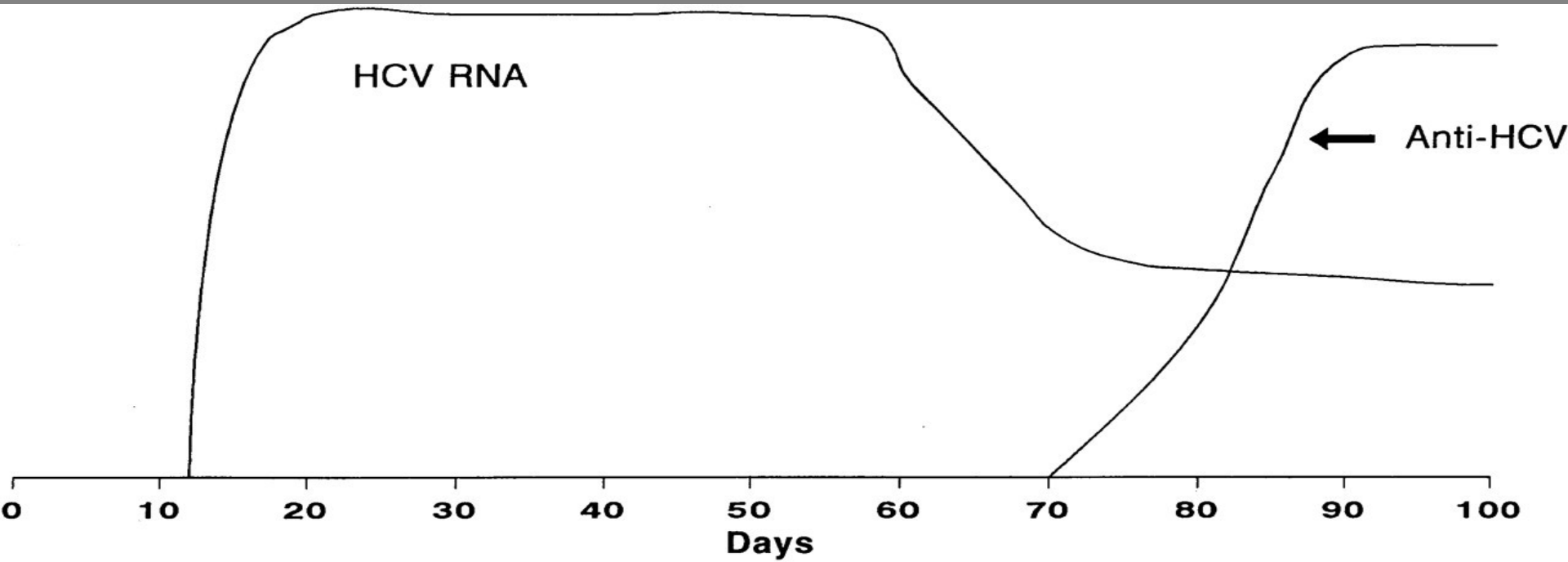
Day 22

5 Days

6 Days

11 Days

HCV

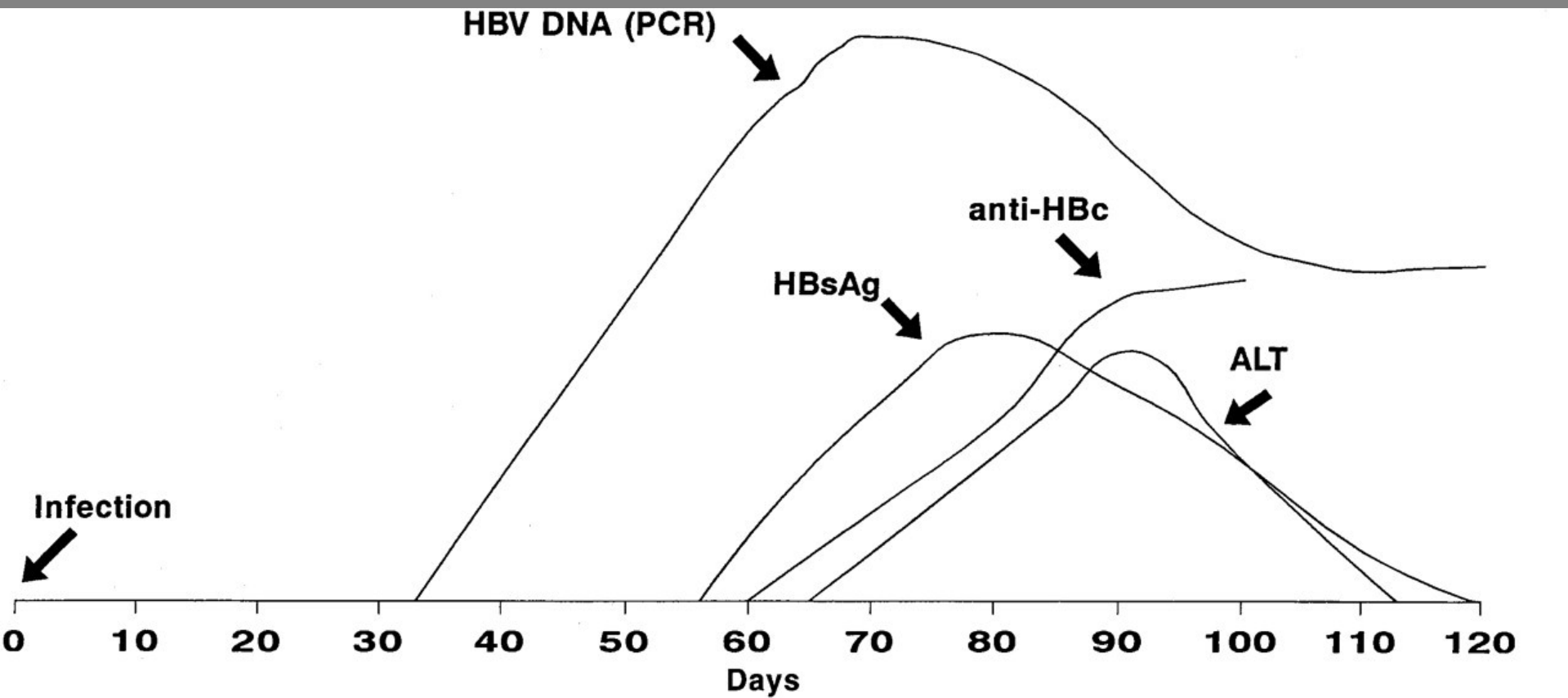


Infection Day 0

HCV RNA Day 12

HCV Antibody Day 70

HBV



Infection
HBV DNA
HBsAg

Day 0

Variable up to 23 days prior to HBsAg (average, 6-15 days)

Day 56; disappears Day 120

Κόστος / αποτελεσματικότητα NAT

- Η NAT τεχνική είναι μια διαδικασία που για την εφαρμογή της απαιτείται εξειδικευμένη εκπαίδευση, πανάκριβα αντιδραστήρια και ειδικός εξοπλισμός
- Η αξιολόγηση της NAT εκτιμάται με τη σχέση κόστους / όφελος, δηλαδή το κόστος για την αποφυγή ενός συμβάματος μετάγγισης (που μεταφράζεται σε κερδισμένα χρόνια ζωής με πλήρη ποιότητα ζωής) [QALY (quality-adjusted life years)]

Άλλες μέθοδοι περιορισμού μετάδοσης λοιμώξεων

- ❖ Λευκαφαίρεση πριν την φύλαξη των ερυθρών και των άλλων παραγώγων του αίματος
- ❖ Αδρανοποίηση –με θέρμανση και με χρήση χημικών διαλυτών (methylen blue) και ακτινοβολία ή psoralen και υπεριώδη ακτινοβολία

Αλγόριθμος εργαστηριακού ελέγχου του αίματος

Δοκιμασία διαλογής

θετικό επαναληπτικό αποτέλεσμα με δοκιμασία πρωτογενούς ελέγχου ή δοκιμασία NAT θετική



απόρριψη αιμοδοσίας και αποστολή δειγμάτων σε Εργαστήριο επιβεβαίωσης /αναφοράς → δέσμευση προϊόντων δότη → έλεγχος αρχείου δότη

Δοκιμασία Επιβεβαιωτική

1. Θετικό αποτέλεσμα : κοινοποίηση και αποκλεισμός δότη
2. Αρνητικό αποτέλεσμα : προαιρετική κοινοποίηση δότη και επανένταξη στη βάση των αιμοδοτών
3. Αμφίβολο αποτέλεσμα : κοινοποίηση και αποκλεισμός δότη . Προγραμματισμός επανεξέτασης μετά από τη μέγιστη περίοδο παραθύρου

Αλγόριθμος εργαστηριακού ελέγχου του αίματος

Αλγόριθμος επιβεβαίωσης ανίχνευσης δείκτη λοιμώδους νοσήματος

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένα παράδειγμα τέτοιου αλγόριθμου:

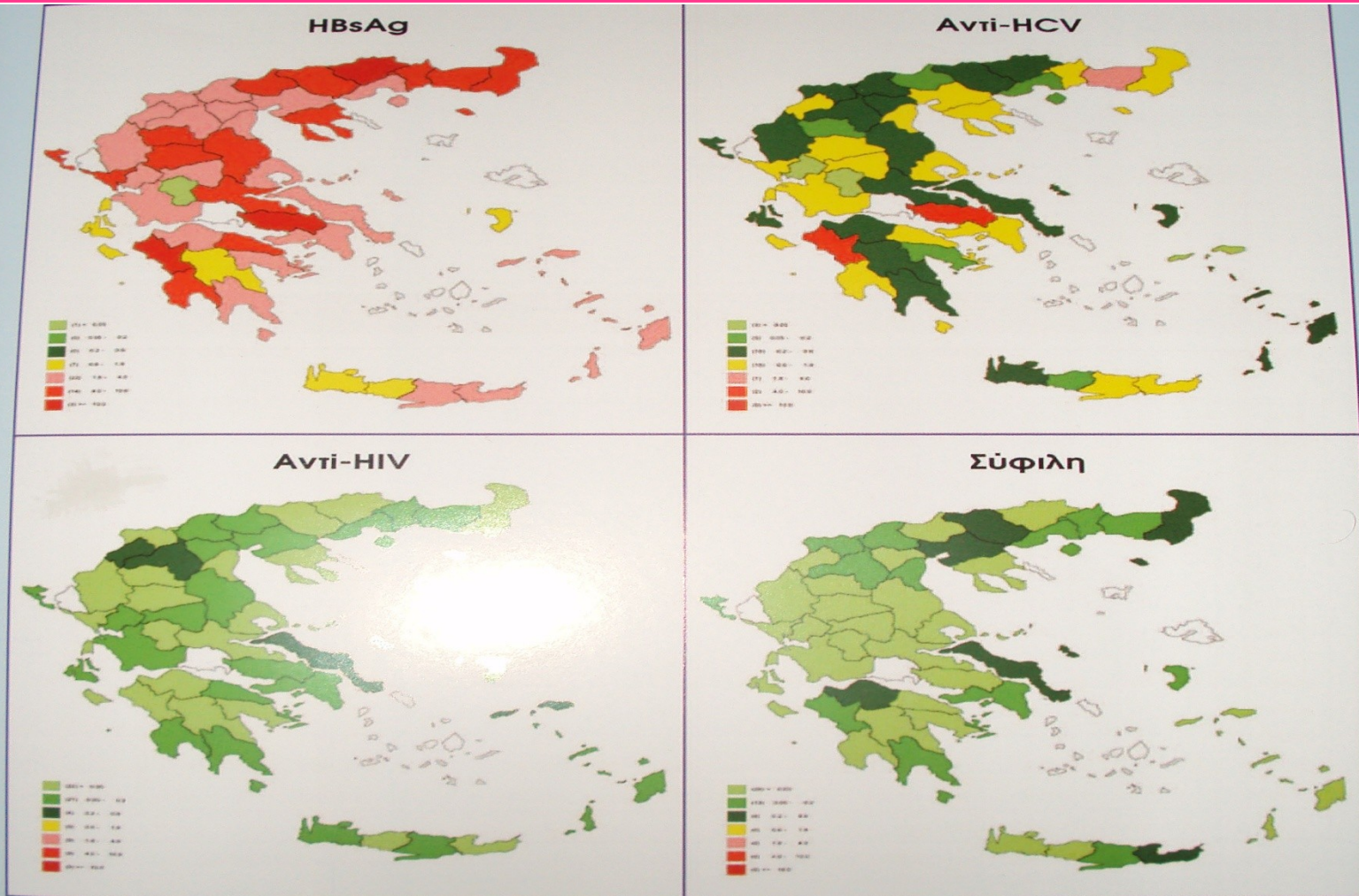
Επανελημμένως θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας διαλογής (1) →	Απόρριψη αιμοδοσίας → Αποστολή δειγμάτων της αιμοδοσίας σε εργαστήριο επιβεβαίωσης	Έλεγχος αρχείου δότη, για να διαπιστωθεί εάν έχει αναφερθεί θετικό αποτέλεσμα στο παρελθόν (3) Δέσμευση προϊόντων δότη
Εργαστήριο επιβεβαίωσης →	Θετικό αποτέλεσμα (2) →	Συμβουλευτική βοήθεια και αποκλεισμός δότη (5) Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων και ταυτότητας δότη σε νέο δείγμα
	→ Αρνητικό αποτέλεσμα (2) →	Προαιρετική κοινοποίηση στο δότη Επανεξέταση στη βάση των αιμοδοτών Καταχώρηση του θετικού αποτελέσματος στο αρχείο του δότη (3)
	→ Αμφίβολο αποτέλεσμα (2) →	Κοινοποίηση και αποκλεισμός δότη Προγραμματισμός επανεξέτασης μετά από τη μέγιστη περίοδο παραθύρου (3)
(3) Επανελημμένως θετικό αποτέλεσμα ελέγχου διαλογής σε δότη με θετικό αποτέλεσμα στο παρελθόν →	Απόρριψη αιμοδοσίας → Αποστολή δειγμάτων της αιμοδοσίας σε εργαστήριο επιβεβαίωσης	Δέσμευση προϊόντων δότη
Εργαστήριο επιβεβαίωσης →	Θετικό αποτέλεσμα →	Συμβουλευτική βοήθεια και αποκλεισμός δότη (5) Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων και ταυτότητας δότη σε νέο δείγμα
	→ Αρνητικό αποτέλεσμα →	Κοινοποίηση και αποκλεισμός δότη
	→ Αμφίβολο αποτέλεσμα (2) →	Κοινοποίηση και αποκλεισμός δότη Προγραμματισμός επανεξέτασης μετά από τη μέγιστη περίοδο παραθύρου εάν υποδεικνύεται από το εργαστήριο επιβεβαίωσης (2,4)

Ορολογικά Δεδομένα 2008-2009

- Οροεπικράτηση λοιμώξεων σε 7203951 ελεγχθείσες μονάδες ολικού αίματος και αιμοπεταλιοαφαίρεσης
- HBsAg → 0.38 %
- Anti HIV → 0.008 %
- Anti HCV → 0.09 %
- Anti HTLVΙ/ΙΙ → 0.001 %
- Σύφιλη → 0.017 %

Πηγή: ΣΚΑΕ, Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης Λοιμώξεων που μεταδίδονται με το αίμα (1996-2009), Αθήνα, 2010

Γεωγραφική κατανομή λοιμώξεων ανά 1000 μονάδες αίματος (01/01/2000 έως 31/12/2009)



ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΙΜΟΕΠΑΓΡΥΠΝΗΣΗΣ (ΣΚΑΕ)
ΚΕΝΤΡΟ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ (ΚΕΕΛΠΝΟ)
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΕΓΓΥΗΣ



Έλεγχος ποιότητας

- ◉ Έλεγχος ποιότητας εξοπλισμού (φυγόκεντροι, αυτόματες συσκευές πλύσεως κυττάρων, υδατόλουτρα , θάλαμοι επώασης, ψυγεία, καταψύκτες, αυτοματοποιημένες συσκευές καθορισμού ομάδων)
- ◉ Έλεγχος ποιότητας τεχνικών/ μεθοδολογιών (εσωτερικός και εξωτερικός συστηματικός έλεγχος) → ανίχνευση ανεπάρκειας αναλυτικής μεθόδου ή λειτουργικών σφαλμάτων
- ◉ Έλεγχος ποιότητας αντιδραστηρίων (ειδικές , λεπτομερείς διαδικασίες ελέγχου -Επικύρωση)

Εξασφάλιση ποιότητας στα προς έλεγχο δείγματα

- ◉ Σωστή ποσότητα
- ◉ Σωστό δείγμα στο σωστό σωληνάριο
- ◉ Σωστή σήμανση
- ◉ Τήρηση διαδικασιών συλλογής δειγμάτων
- ◉ Τήρηση διαδικασιών συντήρησης δειγμάτων
- ◉ Τήρηση διαδικασιών μεταφοράς δειγμάτων
- ◉ Αποφυγή επιμόλυνσης
- ◉ Σωστή διαδικασία φυγοκέντρησης και επεξεργασίας
- ◉ Τήρηση διαδικασιών φύλαξης δειγμάτων
- ◉ Καθημερινός έλεγχος των ψυγείων συντήρησης και καταψυκτών. Καθημερινή καταγραφή θερμοκρασιών

Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος ή εσωτερική ποιοτική αξιολόγηση

Θετικοί και αρνητικοί οροί ελέγχου (kits controls ή test controls)

Επιτυγχάνεται η επιβεβαίωση της δοκιμασίας (assay run) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας

Δεν αποτελούν αξιόπιστο δείκτη για παρακολούθηση της πορείας της δοκιμασίας .

Οροί ελέγχου (singles samples controls ή pooled samples controls):

Θετικοί , αρνητικοί , θετικοί αραιωμένοι σε αρνητικά δείγματα και θετικοί κοντά στο όριο διαγνωστικής σημαντικότητας που προέρχονται από το αρχείο δειγμάτων και είναι αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού που ελέγχουμε.

Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος ή Εξωτερική ποιοτική αξιολόγηση

- Επιλογή του εξειδικευμένου κέντρου , που διοργανώνει και διευθύνει τον εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο
- Γνωστοποίηση από το συμμετέχον εργαστήριο των χρησιμοποιούμενων μεθόδων διαλογής για λοιμώξεις.
- Οργάνωση ασκήσεων/ φάσεων από το εξειδικευμένο κέντρο ανά τακτά και προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα (συνήθως ανά τετράμηνο)
- Προσδιορισμός αληθών , αυθεντικών τιμών ή ορίων διαγνωστικής σημαντικότητας ή τιμών αναφοράς
- Ενημέρωση του εξειδικευμένου κέντρου προς το συμμετέχον εργαστήριο για την οργάνωση των ασκήσεων/φάσεων και αποδοχή του προγράμματος ποιοτικού ελέγχου

Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος ή εξωτερική ποιοτική αξιολόγηση

- Διανομή προτύπων δειγμάτων αναφοράς
- Διενέργεια άσκησης / πειράματος στο συμμετέχον εργαστήριο.
- Αποστολή απαντήσεων/αποτελεσμάτων στο εξειδικευμένο κέντρο
- Εκτίμηση , ανάλυση , αξιολόγηση και βαθμολόγηση των αποτελεσμάτων από το εξειδικευμένο κέντρο
- Ενημέρωση του συμμετέχοντος εργαστηρίου από το εξειδικευμένο κέντρο για τη βαθμολόγηση του ποιοτικού ελέγχου με επισημάνσεις ως προς αποκλίσεις , διακυμάνσεις , εγκυρότητα , αξιοπιστία . Αποστολή απαντήσεων υπό μορφή στατιστικών γραφημάτων
- Ανταλλαγή απόψεων , τελική συζήτηση , συμπεράσματα

Συμπεράσματα για ασφαλέστερη μετάγγιση

- ❖ Τακτική Εθελοντική Αιμοδοσία
- ❖ Εφαρμογή αυστηρών κριτηρίων επιλογής αιμοδοτών
- ❖ Εφαρμογή καινοτόμων τεχνικών (MEIA, CHLIA) για την ανίχνευση HBsAg και αντισωμάτων έναντι HIV, HCV, HTLV και σύφιλης
- ❖ Εφαρμογή μοριακού ελέγχου NAT
- ❖ Εφαρμογή λευκαφαίρεσης αίματος προ αποθήκευσης
- ❖ Ενίσχυση της εφαρμογής αυτόλογης μετάγγισης
- ❖ Εφαρμογή εναλλακτικών τρόπων αιμοθεραπείας
- ❖ Εφαρμογή τεχνικών απομάκρυνσης – αδρανοποίησης παθογόνων
- ❖ Εφαρμογή μεθόδων βακτηριακής διασφάλισης αίματος και παραγώγων
- ❖ Εφαρμογή των οδηγιών προμεταγγισιακών και μεταμεταγγισιακών ασφαλών διαδικασιών
- ❖ Εφαρμογή καραντίνας
- ❖ **Ορθολογική χρήση αίματος**
- ❖ Εφαρμογή των οδηγιών αιμοεπαγρύπνησης, ποιότητας και κανόνων Ορθής Πρακτικής
- ❖ Επαγρύπνηση για οικονομική πολιτική στην Αιμοδοσία



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ