

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
Centrul Național de Sănătate Publică
Centrul de Prevenire și Control al Infecției HIV/SIDA

GHID NAȚIONAL
ÎN MANAGEMENTUL CALITĂȚII
INVESTIGAȚIILOR DE LABORATOR
LA INFECȚIA HIV/SIDA ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Chișinău, 2011

**Ghidul a fost elaborat în baza recomandărilor UNAIDS și OMS
de grupul de lucru al specialiștilor
Centrului Național de Sănătate Publică:**

Valeria DMITRIENCO, șef de laborator

Ștefan GHEORGHIȚA, vicedirector

Ala HALACU, șef de laborator

Maria VLASENCO, medic de laborator

Galina BACANCEA, medic de laborator

Tatiana EREMCIUC, medic bacteriolog

Irina MALANCO, medic de laborator

Scopul:

Ghidul are drept scop optimizarea și unificarea sistemului de management al calității investigațiilor de laborator la infecția HIV/SIDA efectuate în cadrul supravegherii epidemiologice, măsurilor profilactice și diagnosticului individual al acestei infecții și va contribui la elaborarea și implementarea unui sistem al managementului calității care corespunde cerințelor naționale și recomandărilor internaționale.

Ghidul furnizează cerințele și managementul pentru calitatea și competența în domeniul de diagnostic de laborator al infecției HIV/SIDA armonizate cu recomandările UNAIDS și OMS.

Utilizatorii:

Ghidul este destinat specialiștilor laboratoarelor și secțiilor de diagnosticare a infecției HIV/SIDA, laboratoarelor de diagnostic clinic care asigură testarea rapidă a gravidelor, specialiștilor implicați în activități de supraveghere epidemiologică de sentinelă și prezintă interes pentru specialiștii care activează în domeniul de diagnostic și profilaxie a acestei infecții.

Recenzenți:

- | | | |
|------------------|---|---|
| Valentin GUDUMAC | - | Specialist Principal al Ministerului Sănătății în medicină de laborator, d.h.ș.m., profesor universitar. |
| Lucia ANDRIEȘ | - | Șef de laborator Alergologie și Imunologie Clinică al USMF „Nicolae Testemițanu”, d.h.ș.m., profesor universitar. |

Grupul de lucru exprimă sincere mulțumiri colaboratorilor misiunilor UNAIDS și OMS în Republica Moldova, doamnei Gabriela IONAȘCU, doamnei Alexandrina IOVIȚA și domnului Silviu CIOBANU pentru acordarea suportului în elaborarea ghidului.

Introducere

Unul din principalele obiective ale Programului Națiunilor Unite în HIV/SIDA (UNAIDS) și Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) este coordonarea la nivel mondial a eforturilor de combatere a epidemiei HIV/SIDA și consecințelor acestei infecții, optimizarea și dezvoltarea continuă a asigurării și managementului calității în domeniul diagnosticului de laborator al infecției HIV/SIDA, armonizarea cerințelor în acest domeniu cu recomandările internaționale, stabilirea cerințelor care reiese din condițiile și particularitățile naționale de răspândire a infecției HIV/SIDA.

Un aspect important al activității acestor organisme internaționale prezintă elaborarea recomandărilor de realizare calitativă a diferitor activități în domeniul supravegherii epidemiologice, profilaxiei, diagnosticului, tratamentului, consilierii și testării voluntare, acordării suportului social și îngrijirilor paliative, care prezintă un sprijin important în elaborarea politicilor, cadrului legislativ și normativ-tehnic în domeniul infecției HIV.

Prezentul Ghid a fost elaborat în baza recomandărilor UNAIDS și OMS [1, 2, 3 etc.] și cerințelor Standardului Moldovean SM SR EN ISO/CE 15189/2010 [4]. Ghidul prezintă un act normativ pentru laboratoarele și secțiile de diagnosticare a infecției HIV, laboratoarele de diagnostic clinic care asigură testarea rapidă a gravidelor, precum și pentru specialiștii implicați în activități de supraveghere epidemiologică, inclusiv de sentinelă. Ghidul va servi baza pentru implementarea unui sistem al calității în realizarea activităților din cadrul supravegherii epidemiologice a infecției HIV/SIDA, măsurilor profilactice, diagnosticului individual și asigurării securității hemotransfuzionale conform cerințelor naționale și recomandărilor internaționale.

CUPRINS

	Pag.
Capitolul I. Scurt istoric privind testarea de laborator la infecția HIV în Republica Moldova	9
1.1. Scopul și obiectivele testării la infecția HIV	10
1.2. Infrastructura rețelei de laboratoare diagnostice HIV/SIDA	11
1.3. Supravegherea epidemiologică a infecției HIV/SIDA în Republica Moldova	14
1.4. Screeningul sîngelui donat la marcheri ai virusului HIV 1/2	14
Capitolul 2. Abordări metodologice la investigația populației la infecția HIV în scop de supraveghere epidemiologică	16
2.1. Recomandările UNAID/OMS în abordări metodologice în supravegherea serologică a HIV	16
2.2. Cerințele generale la organizarea studiului de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV în Republica Moldova	17
2.3. Contingentele de populație supuse testării și codificarea lor	18
Capitolul 3. Substraturi biologice testate la infecția HIV	21
3.1. Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la selectarea și testarea substraturilor biologice la marcheri ai HIV	21
3.1.1. Alegerea specimenelor	21
3.1.1.1. Avantajele și dezavantajele mostrelor de sînge, plasmă și ser	21
3.1.1.2. Avantajele și dezavantajele mostrelor de urină și salivă	22
3.1.2. Colectarea, prelucrarea și păstrarea mostrelor de sînge	23
3.1.2.1. Prelucrarea sîngelui colectat prin venepuncție	23
3.1.2.2. Stocarea serului și plasmei colectate prin venepuncție ..	23
3.1.2.3. Prelevarea și păstrarea mostrelor de sînge	24
3.1.2.4. Pregătirea și păstrarea picăturii uscate de sînge pentru testarea la prezența HIV	24
3.1.3. Mostre de urină și salivă	25
3.1.3.1. Colectarea și stocarea mostrelor de urină și salivă	25
3.1.3.2. Păstrarea mostrelor de urină și salivă.....	26

3.1.3.3.	<i>Marcarea și înregistrarea datelor</i>	26
3.1.3.4.	<i>Înregistrarea specimenelor</i>	26
3.2.	Selectarea și testarea substraturilor biologice la marcheri ai HIV în studii de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV în Republica Moldova	27
Capitolul 4. Tehnologiiile și strategiile de testare		28
4.1.	Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la tehnologiile și strategiile de testare	28
4.1.1.	Tehnologiile de testare	28
4.1.2.	Metoda imunoenzimatică (ELISA)	29
4.1.2.1.	<i>Caracteristica generală</i>	29
4.1.2.2.	<i>Caracteristica testelor ELISA</i>	29
4.1.2.3.	<i>Performanțele testelor ELISA</i>	30
4.1.3.	Teste rapide	31
4.1.3.1.	<i>Caracteristica generală a testelor rapide</i>	31
4.1.3.2.	<i>Utilizarea testelor rapide</i>	31
4.1.3.3.	<i>Efectuarea testării rapide</i>	33
4.1.4.	Strategiile de testare la HIV în scop de supraveghere	34
4.2.	Tehnologiile și strategiile de testare utilizate în Republica Moldova	36
4.2.1.	Tehnologiile de testare	36
4.2.2.	Cerințele la organizarea investigațiilor de laborator la infecția HIV	36
4.2.2.1.	<i>Statele de personal și calificare a specialiștilor</i>	37
4.2.2.2.	<i>Aparataj și utilaj necesar</i>	38
4.2.2.3.	<i>Pregătirea probelor de sânge pentru investigație la anticorpi anti-HIV</i>	39
4.2.2.4.	<i>Rebutarea probelor de sânge</i>	39
4.2.2.5.	<i>Înregistrarea</i>	39
4.2.3.	Metoda imunoenzimatică (ELISA)	40
4.2.3.1.	<i>Cerințele tehnice la testele ELISA utilizate în Republica Moldova</i>	40
4.2.3.2.	<i>Cerințele la realizarea lotului de lucru ELISA pe mostre de sânge (ser, plasmă)</i>	41
4.2.4.	Metoda de confirmare Imunoblot	45

4.2.4.1.	<i>Cerințele tehnice la testele Imunoblot utilizate în Republica Moldova</i>	45
4.2.4.2.	<i>Cerințele la realizarea lotului de lucru Imunoblot</i>	46
4.2.4.3	<i>Diagnosticul infecției HIV- infecției HIV la copiii până la vîrstă de pînă la 18 luni.....</i>	47
4.2.5.	<i>Cerințele la utilizarea testărilor rapide la infecția HIV în Republica Moldova</i>	48
4.2.5.1.	<i>Cerințele generale la organizarea testărilor rapide</i>	48
4.2.5.2.	<i>Cerințele la utilizarea testelor rapide în activități de prevenire a transmiterii verticale a infecției HIV</i>	50
4.2.5.3.	<i>Cerințele la utilizarea testelor rapide în activități de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV.....</i>	53
Capitolul 5. Selecția și evaluarea tehnologiilor de testare HIV folosite în supravegherea epidemiologică a infecției HIV		57
5.1.	Recomandările UNAIDS și OMS privind Selecția și evaluarea tehnologiilor de Testare HIV folosite în supravegherea HIV	57
5.1.1.	Cum se selectează testele	57
5.1.2.	Evaluarea testelor în țară	60
5.2.	Selectarea și evaluarea tehnologiilor de testare HIV folosite în supravegherea HIV în Republica Moldova	62
5.2.1.	Selectarea tehnologiilor de testare HIV pentru utilizarea în supravegherea epidemiologică în Republica Moldova	62
5.2.2.	Principiile de selectare a testelor	62
Capitolul 6. Asigurarea calității testărilor de laborator		64
6.1.	Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la asigurarea calității testărilor de laborator și securității biologice	64
6.1.1.	Asigurarea calității la nivel național	64
6.1.2.	Asigurarea controlului calității	65
6.1.2.1.	<i>Stadiul preanalitic</i>	65
6.1.2.2.	<i>Stadiul analitic</i>	66
6.1.2.3.	<i>Stadiul postanalitic</i>	66
6.1.3.	Proceduri de securitate	66
6.2.	Cerințele la asigurarea calității testărilor de laborator la infecția HIV/SIDA în Republica Moldova	67
6.2.1.	Asigurarea controlului intern al calității	67

6.2.1.1. Stadiul preanalitic	67
6.2.1.2. Stadiul analitic	71
6.2.1.3. Stadiul postanalitic	72
6.2.1.4. Managementul informației de laborator	73
6.2.2. Asigurarea controlului extern al calității	73
Capitolul 7. Diagnosticul infecției HIV/SIDA cu utilizarea tehnicilor de biologie moleculară	75
7.1. Structura și replicarea HIV	75
7.2. Diagnosticul de laborator PCR	76
7.2.1. Descrierea testelor	76
7.2.2. Obiectivele metodei.....	76
7.2.3. Metode de diagnostic al infecției HIV.....	77
7.2.4. Determinarea rezistenței HIV către preparatele ARV	77
7.2.5. Cerințele de organizare a laboratorului PCR	79
7.2.6. Prelevarea probelor	81
7.2.7. Preprocesarea probelor	82
7.2.8. Transportul probelor	83
7.2.9. Păstrarea probelor	83
7.2.10. Înregistrarea probelor	83
7.2.11. Rebutarea probelor	84
7.2.12. Realizarea investigației PCR	84
7.2.13. Asigurarea controlului de calitate	85
7.2.14. Furnizarea rezultatelor	85
Capitolul 8. Procedurile de securitate	87
8.1. Recomandările UNAIDS și OMS privind măsurile de siguranță	87
8.2. Cerințele la organizarea regimului antiepidemic în laboratoarele de diagnosticare a SIDA în Republica Moldova	88
8.2.1. Cerințele generale	88
8.2.2. Organizarea și amenajarea încăperilor laboratorului	89
8.2.3. Cerințele la organizarea regimului antiepidemic și măsurile de protecție personală în laboratoarele de diagnosticare a SIDA, hepatitelor și altor infecții virale	92
8.2.3.1. Măsurile generale de protecție	92
8.2.3.2. Măsurile de securitate personală	93
8.2.3.3. Regimul antiepidemic la locul de lucru la recepționarea mostrelor sanguine și pregătirea lor pentru investigație serologică	94
8.2.3.4. Regimul antiepidemic și măsurile de securitate	95

	<i>personală la locul de lucru la efectuarea investigației serologice</i>	
8.2.3.5.	<i>Metodele de dezinfectare și prelucrare a veselei de laborator, hainelor de protecție, încăperilor de lucru în laboratoarele de diagnosticare a SIDA</i>	96
8.2.4.	Măsurile la accidente	97
8.2.5.	Evidența medicală a personalului laboratoarelor diagnostice ..	99
	R e f e r i r i	100

Capitolul I

SCURT ISTORIC PRIVIND TESTAREA DE LABORATOR LA INFECȚIA HIV ÎN REPUBLICA MOLDOVA

Primele testări la infecția HIV/SIDA au fost lansate în aprilie 1987, când la baza laboratorului imunologic al Spitalului Clinic Republican au fost efectuate primele investigații cu utilizarea echipamentului ELISA și test-sistemelor de depistare a anticorpilor anti-HIV1 bazate pe antigene naturale virale HIV1 (prima generație de teste) produse în Rusia. În septembrie 1987 echipamentul a fost transferat la Stația Sanitaro-Epidemiologică Republicană, în cadrul căreia a fost creat primul laborator de diagnosticare a infecției HIV/SIDA. După șase ani de la descrierea primelor cazuri de SIDA în SUA și trei ani după descoperirea agentului etiologic al SIDA-ei au fost lansate primele testări la infecția HIV. Din start a fost introdusă testarea amplă a sîngelui donat în scopul asigurării inofensivității hemotransfuziilor și investigația persoanelor străine. În acest an pentru prima dată în țară au fost depistate primele opt cazuri cu infecția HIV, inclusiv la un cetățean al republicii Moldova.

Perioada anilor 1988-1995 a fost caracterizată prin detecția anuală a cazurilor sporadice în unele teritorii, preponderent în rîndurile studenților străini molipsiți pe cale sexuală. În acești ani au fost înregistrate și raportate în total 40 cazuri de HIV, din care 21 persoane străine și 19 – cetățeni ai Republicii Moldova. În anii 1996-2001 infecția HIV se extinde în teritorii cu răspîndirea preponderentă în rîndul utilizatorilor de droguri injectabile.

Anii 1996-2002 se caracterizează prin extinderea teritorială a infecției cu răspîndirea preponderentă în rîndul utilizatorilor de droguri intravenos (UDI). Începînd cu anul 2002 infecția se înregistrează în toate teritoriile administrative, inclusiv în teritoriile rurale. În structura căilor de transmitere începe a predomina cota de persoane infectate pe cale sexuală. În grupul persoanelor infectate permanent crește cota femeilor, inclusiv gravidelor.

Către finele anului 2010 în republică au fost înregistrate în total 6404 persoane infectate cu virusul HIV1, prevalență 155,94 la 100 mii populație [5], inclusiv 4363 – în teritoriile de pe malul drept al rîului Nistru (120,11 la 100 mii) și 2041 – în teritoriile de est (378,59 la 100 mii populație); prevalența HIV estimată în 2010 – 0,37%, iar în 2015 – 0,44%. În anul 2010 au fost înregistrate 704 cazuri noi de infecția HIV1, indicele de prevalență fiind 17,12 la 100 mii populație. Infecția se înregistrează în toate teritoriile administrative cu prevalență înaltă în mun. Bălți (860,99 la 100 mii), r. Rîbnița (609,61), or. Tiraspol (579,45), r. Slobozia (302,44), or. Bender (248,31), raioanele Grigoriopol – 210,35, Florești – 179,91, Glodeni – 150,16, Basarabeasca – 132,65, Sîngerei – 131,27 Fălești – 103,33 etc.

Infecția HIV prezintă o prioritate majoră de sănătate publică. În conformitate cu clasificarea OMS, actualmente infecția HIV/SIDA se află în stadiul de epidemie concentrată cu transmiterea preponderentă pe cale heterosexuale (tab. 1).

Tabelul 1. Trei stadii de desfășurare a epidemiei infecției HIV [6]

Epidemie de nivel jos	Nivelul epidemiei în țară în care HIV nu s-a răspândit la niveluri semnificative în orice subpopulație, deși infecția cu HIV există de mai mulți ani. Prevalența HIV nu a depășit în mod constant de 5%, în orice subpopulație definită.
Epidemie concentrată	Epidemia HIV s-a răspândit în țară rapid într-o subpopulație definită, dar nu este bine stabilită în populația generală. Prevalența HIV este în mod constant > 5% în cel puțin într-o subpopulație definită și este de <1% la femeile gravide în zonele urbane.
Epidemie generalizată	Epidemia în țară în care HIV este ferm răspândit în populația generală. Prevalența HIV este în mod constant >1% la femeile gravide.

În republică au fost realizate 3 programe naționale de prevenire și control al infecției HIV. Actualmente este aprobată și se realizează a IV-lea program național de prevenire și control al infecției HIV/SIDA și infecțiilor cu transmitere sexuală pentru anii 2011-2015 [7].

1.1. Scopul și obiectivele testării la infecția HIV

În Republica Moldova testarea populației la infecția HIV/SIDA servește scopurilor evaluării situației epidemiologice în țară, în zonele geografice și teritoriile administrative pe verticală și orizontală, depistarea grupelor vulnerabile de populație pentru planificarea măsurilor de redresare a situației, de elaborare a politicilor și repartizarea resurselor umane și financiare în cadrul realizării programelor naționale de profilaxie și control, elaborării prognozelor, planificarea măsurilor de ajutoare sociale și paliative persoanelor infectate etc. Aceste activități se realizează în cadrul Angajamentelor Globale la Obiectivele de Dezvoltare a Mileniului, ale căror parte este și Republica Moldova. Conform PN 2011-2015, acest scop este stoparea răspândirii infecției HIV și redresarea tendinței actuale [5].

Obiectivele de bază ale testării diferitor contingente de populație sunt următoarele:

- Supravegherea epidemiologică a infecției HIV/SIDA în teritoriul țării;
- Asigurarea securității hemotransfuziilor;
- Profilaxia transmiterii materno-fetale;
- Diagnosticul individual al infecției în scopul acordării tratamentului specific cu preparate antiretrovirale (ARV), prestării serviciilor de îngrijiri și suport.

1.2. Infrastructura rețelei de laboratoare diagnostice HIV/SIDA

Testările de laborator sunt efectuate de 17 laboratoare și secții diagnostice acreditate în cadrul instituțiilor medico-sanitare respective. Toate laboratoarele și secțiile îndeplinesc testări de screening, deserving cu aceste investigații IMSP departamentale și private (tab. 2).

Tabelul 2. Structura și funcțiile laboratoarelor și secțiilor de diagnosticare a HIV/SIDA în Republica Moldova

Nr. d/o	Instituția medico-sanitară, denumirea laboratorului, secției	Profilul investigațiilor la infecția HIV/SIDA	IMSP deservite din teritorii:
1.	CNSP, Centrul de profilaxie și combatere a SIDA, laboratorul de diagnosticare a HIV/SIDA	1. Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	1) IMSP republicane dislocate în mun. Chișinău; 2) raioanele: Anenii Noi, Călăraș, Criuleni, Ialoveni, Nisporeni, Strășeni; 3) Instituții private
		2. Testările de confirmare a infecției cu HIV/SIDA.	Toate teritoriile republicii
2.	CSP mun. Chișinău	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP municipale Chișinău
3.	CSP mun. Bălți, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP mun. Bălți, raioanele: Drochia, Fălești, Florești, Glodeni, Rîșcani, Sîngerei, Telenești
4.	CSP r. Comrat, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele: Comrat, Ciadîr-Lunga, Taraclia, Basarabeasca;
5.	CSP r. Leova, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raionale Leova
6.	CSP r. Edineț, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele: Edineț, Briceni, Dondușeni
7.	CSP r. Orhei laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Orhei, Rezina, Șoldănești,
8.	CSP r. Hîncești, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Hîncești, Cimișlia;

9.	CSP r. Căușeni, laboratorul microbiologic, secția diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Căușeni, Ștefan Vodă
10.	CSP r. Soroca, laboratorul microbiologic, secția diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Soroca
11.	CSP r. Ungheni, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Ungheni
12.	CSP r. Ocnița, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Ocnița
13.	CSP r. Cahul, laboratorul microbiologic, secția de diagnosticare a HIV/SIDA	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP raioanele Cahul, Cantemir, Vulcănești
14.	CNTS, laboratorul de diagnosticare a infecțiilor hemotransmisibile	1) Testarea de screening ELISA a sîngelui donat 2) Testarea PCR HIV1 a sîngelui donat	IMSP cu secții de transfuzie a sîngelui, conform distribuirii CNTS (mun. Chișinău, raioanele: Anenii Noi, Cahul Cantemir Călăraș Căușeni, Cimișlia, Hîncești, Nisporeni, Orhei, Ștefan Vodă, Taraclia, Ungheni, Comrat, Ceadâr-Lunga
15.	CRTS mun. Bălți	1) Testarea de screening ELISA a sîngelui donat 2) Testarea PCR HIV1 a sîngelui donat	IMSP cu secții de transfuzie a sîngelui, conform distribuirii CNTS (mun. Bălți, raionale Drochia, Edineț, Soroca)
16.	Centrul de Profilaxie și Control al infecției HIV/SIDA și maladiilor infecțioase din or. Tiraspol	Testările de screening SE, profilactice și diagnostice	IMSP din teritoriile administrative din stînga rîului Nistru (mun. Tiraspol, Bender, raionale Camenca, Dubăsari, Grigoriopol, Rîbnuța, Slobozia)
17.	Centrul de Transfuzie a Sîngelui Tiraspol, laboratorul diagnosticare a infecțiilor hemotransmisibile	1) Testarea de screening ELISA a sîngelui donat 2) Testarea PCR HIV1 a sîngelui donat	IMSP din teritoriile administrative din stînga rîului Nistru (or. Tiraspol, Bender, Rîbnița)

Investigațiile molecularo-genetice prin metoda PCR sunt efectuate în 5 laboratoare:

- Laboratorul de referință în microbiologice din cadrul CNSP; (diagnosticare HIV/SIDA);
- Laboratorul din cadrul IMSP SCBI „Toma Ciorbă” (investigații PCR în scop de monitorizare a tratamentului ARV și diagnostic);
- Laboratoarele CNTS, CRTS Bălți - controlul sîngelui donat;
- Laboratorul Centrului SIDA Tiraspol (investigații PCR în scop de monitorizare a tratamentului ARV, diagnostic și controlul sîngelui donat).

În teritoriile din dreapta rîului Nistru funcționează 15 laboratoare și secții, inclusiv un laborator în cadrul CNSP, Centrului SIDA, 2 laboratoare – în cadrul centrelor de transfuzie a sîngelui (CNTS și CRTS mun. Bălți) și 12 secții activează în cadrul CSP municipale și raionale în cadrul laboratoarelor microbiologice.

În teritoriul din estul țării funcționează 2 laboratoare: în cadrul Centrului de Profilaxie și Combatere al infecției HIV/SIDA și maladiilor infecțioase din or. Tiraspol și Centrului de Transfuzie a Sîngelui Tiraspol. În anul 2011 se prevede deschiderea unui laborator nou în IMSP Spital Raional Rîbnița.

Laboratorul de diagnosticare a HIV/SIDA din cadrul CNSP, Centrului SIDA îndeplinește următoarele funcții de bază:

- Elaborarea proiectelor de acte normative, metodice, ordine și dispoziții ale MS și CNSP, instrucțiuni etc. în diagnosticul de laborator al infecției HIV/SIDA.
- Perfectarea permanentă a calificativului statelor de specialiști care activează în laboratoarele și secțiile SIDA (organizarea seminarelor de lucru, pregătirea la locul de muncă);
- Participarea în activități de achiziționare a testelor, echipamentelor, accesoriilor, consumabilelor pentru dotarea centralizată a laboratoarelor teritoriale prin evaluarea necesităților, înaintarea propunerilor în adresa MS și organizațiilor internaționale, pregătirea caietelor de sarcini, participarea la licitații publice, precum și repartizarea bunurilor achiziționate;
- Efectuarea vizitelor de evaluare a activității laboratoarelor și secțiilor teritoriale de diagnosticare a SIDA, inclusiv controlului calității testărilor la infecția HIV, regimului antiepidemic etc.;
- Prelucrarea statistică lunară a datelor privind contingentele de populație testate în luna de gestiune și de la începutul anului la HIV/SIDA în funcție de teritorii administrative, coduri de contingent, sexul, laboratoarele teritoriale și prezentarea acestor date în secția epidemiologie pentru utilizarea în activități de supraveghere epidemiologică și profilactice;
- Asigurarea testărilor de confirmare a infecției HIV1 și HIV2 pentru toate teritoriile administrative ale republicii.

Laboratoarele diagnostice ce activează în cadrul centrelor de hemotransfuzie asigură testarea sîngelui donat în scop de asigurare a

inofensivității hemotransfuziilor.

Laboratoarele din cadrul CSP efectuează testările în cadrul supravegherii epidemiologice a infecției HIV/SIDA, profilaxiei infectării materno-fetale și diagnosticului individual al acestei infecții.

1.3. Supravegherea epidemiologică a infecției HIV/SIDA în Republica Moldova

Supravegherea epidemiologică a infecției HIV/SIDA este parte organică în cadrul politicii naționale a sistemului de supraveghere a maladiilor infecțioase și prezintă elementul cheie în planificarea și realizarea programelor naționale și teritoriale de prevenire și control al acestei infecții în țară și în teritoriile administrative.

Supravegherea epidemiologică a infecției HIV/SIDA în teritoriul Republicii Moldova se efectuează de Serviciul de Supraveghere de Stat a Sănătății Publice în conformitate cu Lege Nr. 10 din 03.02.2009 privind supravegherea de stat a sănătății publice [8], „care reglementează organizarea supravegherii de stat a sănătății publice, stabilind cerințele generale de sănătate publică, drepturile și obligațiile persoanelor fizice și juridice și modul de organizare a sistemului de supraveghere de stat a sănătății publice”, inclusiv „supravegherea, prevenirea și controlul bolilor transmisibile”.

Activitățile în domeniul HIV/SIDA se reglementează de Lege cu privire la profilaxia infecției HIV/SIDA nr. 23-XV din 16.02.2007 [9]. Datele activităților realizate în cadrul supravegherii epidemiologice servesc baza pentru evaluarea nivelului de răspândire în teritoriu, depistarea grupelor vulnerabile de populație și planificarea măsurilor profilactice, pentru elaborarea politicii și repartizării resurselor necesare pentru realizarea programelor profilactice, de tratament și suport persoanelor infectate, prognosticarea situației epidemiologice etc.

Activitățile de supraveghere se efectuează de către organele de stat ale sănătății publice. Supravegherea se bazează pe colectarea informațiilor necesare pentru monitorizarea infecției. Sistemul utilizează mai multe date privind particularitățile răspândirii în țară și în diferite teritorii, datele privind factorii care acționează asupra caracterului răspândirii, rezultatele diferitor activități, cum ar fi consilierea și testarea voluntară, screeningul sîngelui donat, datele testărilor diagnostice etc.

Activitățile supravegherii epidemiologice a infecției HIV sunt expuse și se îndeplinesc în conformitate cu Protocolul Național în supravegherea epidemiologică de generația a II-a și manualul operațional în supravegherea epidemiologică a HIV/SIDA în Republica Moldova [10].

1.4. Screeningul sîngelui donat la marcheri ai virusului HIV 1/2

1.4.1. Testarea sîngelui donat se efectuează de trei laboratoare din cadrul centrelor de hemotransfuzie organizate și dotate cu echipamente

Asigurarea securității transfuzionale se efectuează în conformitate cu

cerințele stipulate în actele legislative și normativ-tehnice elaborate în baza recomandărilor OMS:

- Legea privind donarea și transfuzia sanguină nr. 241-XVI din 20.11.2008 [11];
- Programul Național „Securitatea transfuzională și autoasigurarea țării cu preparate sanguine pentru anii 2007-2011” aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 637 din 07.06.2007 [12];
- Algoritmii de testare a sîngelui donat , inclusiv „Algoritmii de testare a sîngelui donat la markerii infecției HIV prin metoda imunoenzimatică și de polimerizare în lanț, validarea unității de sînge/component recoltată și calificarea donatorului” [13].

1.4.2. În conformitate cu algoritmul aprobat [13], testării la markerii HIV se supune fiecare unitate a sîngelui donat care include:

- Testarea cu test-sisteme imunoenzimatică de tip „combo” destinat depistării concomitente a anticorpilor anti-HIV1 grup M și O, anti-HIV2 și antigenului al HIV1;
- Testarea amestecului din 10 mostre de plasmă pentru care au fost obținute rezultate negative la investigația imunoenzimatică prin metodă de polimerizare în lanț.

Complexul metodelor aplicate permite a exclude posibilitatea nimeririi sîngelui infectat în panelul de sînge donat și a exclude transmiterea infecției HIV 1/2 prin transfuzia sîngelui și a produselor de sînge.

Capitolul 2

ABORDĂRI METODOLOGICE LA INVESTIGAȚIA POPULAȚIEI LA INFECȚIA HIV ÎN SCOP DE SUPRAVEGHERE EPIDEMIOLOGICĂ

2.1. Recomandările UNAID/OMS în abordări metodologice în supravegherea serologică a HIV

În conformitate cu recomandările OMS/UNAIDS, selectarea metodei de testare la infecția HIV în scop de supraveghere depinde de mai mulți factori contextuali, cum ar fi politicile țării elaborate reieșind din stadiul și particularitățile epidemiei, posibilitățile de a alege și a organiza testarea diferitor grupe de populație, infrastructura serviciului de laborator [1].

Testare neasociată anonimă se desfășoară de obicei în condițiile clinice unde mostrele de sânge se colectează în mod regulat pentru alte scopuri (de exemplu, sifilis etc.). În acest caz testare anonimă la HIV se efectuează fără consimțământul informat al persoanei (tab. 3).

Testare asociată, este mai preferabilă și constă în furnizarea serviciilor de consiliere și testare voluntară, consimțământul informat al persoanei. Aceasta abordare este preferată în cazul în care mostrele sunt colectate exclusiv pentru testarea HIV, de exemplu, supravegherea HIV în populațiile mai greu accesibile prin intermediul clinicilor (de exemplu, grupuri de populație greu accesibile – UDI, LSC, BSB și unele alte.).

Tabelul 3. Testarea asociată și neasociată la infecția HIV [11]

Testare neasociată anonimă (fără consimțământ informat)	• Testarea mostrelor neasociate prelevate pentru alte scopuri • Nu se indică careva date care ar putea servi sursa de identificare a persoanei, inclusiv după nume, nu se furnizează consimțământ informat și consiliere • Codificarea specimenului
Testare neasociată anonimă (cu consimțământ informat)	• Testarea mostrelor neasociate prelevate numai în scop de supraveghere • Consimțământul informat • Nu se indică care va date care ar putea servi sursa de identificare a persoanei, inclusiv după nume, nu se furnizează consilierea • Codificarea specimenului
Testare asociată confidențială (cu consimțământ informat)	• Consimțământ informat cu consiliere pre- și post testare • Persoana se identifică sau este numită • Codificarea specimenului; codul este legat de informații personale de identificare
Testare asociată anonimă (cu consimțământ informat)	• Consimțământ informat cu consiliere pre- și post testare • Persoana nu se identifică, inclusiv după nume • Codificarea specimenului; codul se comunică pacientului astfel încât pacientul va putea a lega codul său cu rezultatul testării mostre cu codul relevant

Consimțământul informat necesită să fie obținut înainte de testare a mostrei la HIV, conform politicii relevante a țării.

Fiecare mostră destinată testării la infecția HIV se codifică. Codul servește trasabilității fiecărui specimen în timpul testării de laborator. Codul este unic pentru fiecare specimen. El poate sau nu să fie legat de informații personale de identificare (de exemplu, numele, numărul fișei de observație clinică), în funcție de faptul dacă testarea HIV este asociată sau neasociată. La testarea asociată codul poate fi legat de date demografice, vîrstă, gen, starea civilă, zona geografică de reședință, precum și de informații de risc comportamental.

2.2. Cerințele generale la organizarea studiului de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV în Republica Moldova

În conformitate cu recomandările OMS/UNAIDS expuse, la organizarea investigațiilor de supraveghere serologică a infecției HIV în Republica Moldova se utilizează diferite modele de organizare a studiilor, reieșind din scopurile studiilor planificate.

Organizarea studiilor de supraveghere epidemiologică de sentinelă în Republica Moldova se efectuează în conformitate cu cerințele Protocolului Național în supraveghere epidemiologică de generația a II-a și manualul operațional în supraveghere epidemiologică a HIV/SIDA în Republica Moldova [10].

- 1) În stadiul de epidemie concentrată a infecției HIV în țară supravegherea epidemiologică se axează pe studii comportamentale în grupuri de risc sporit și datele supravegherii serologice de rutină.
- 2) Reieșind din particularitățile procesului epidemiologic, precum și în scop de evaluare a priorității diferitor grupe de populație în răspîndirea infecției HIV, pentru studiu pot fi alese diferite grupe de populație: UDI participanți la proiectele de profilaxie HIV în baza strategiei „Reducerea riscurilor”, UDI ce se află la evidența medicală la dispensarele narcologice, contingentul instituțiilor penitenciare, lucratori ai sexului comercial, clienți ai lucratorilor sexului comercial, gravidele, migranții, bolnavii cu maladii sexual transmisibile, bărbați care practică relații sexuale cu bărbați.
- 3) Organizarea și desfășurarea studiului se efectuează în baza dispoziției sau ordinului Ministerului Sănătății (la necesitate al altor ministere și departamente) în care se stipulează instituțiile medicale implicate în realizarea studiului, lista marcherilor serologici ai infecțiilor incluse în studiu (de obicei HIV, HV, sifilis), termenii de executare.
- 4) Studiul se desfășoară conform programului aprobat, care stabilește metoda care va fi utilizată în studiu în conformitate cu recomandările OMS/UNAIDS (asociată, neasociată), stipulează activitățile prevăzute, numite instituțiile și subdiviziunile antrenate, persoanele responsabile de executare, termenii de executare, metodele de cercetare, volumele de eșantioane incluse în studiu, substraturi biologice testate, metodele

de prelevare, păstrare, transportare și investigație de laborator a mostrelor prelevate, dezinfectare a mostrelor, precum și personalul implicat în diferite specii de lucru, metodele de asigurare a securității biologice la toate etapele de studiu etc. În program se descriu cerințele de codificare a mostrelor biologice care vor fi utilizate în studiu, lista persoanelor cu dreptul de prelevare și testare a mostrelor biologice, cerințele la organizarea locului de muncă pentru prelevarea mostrelor, metodele de prelevare, păstrare și transportare a mostrelor în laborator (sau în locul unde vor fi realizate testările), dezinfectare și nimicire a materialelor biologice la prelevare mostrelor de sânge din venă, altor substraturi biologice.

- 5) Toate activitățile se realizează utilizând formularele și blanchetele aprobate.
- 6) Investigațiile de laborator la marcherii maladiilor infecțioase se efectuează utilizând metodele unificate implementate în toate laboratoarele antrenate în studiu, în conformitate cu procedurile operaționale standard aprobate conform modului în vigoare.
- 7) La terminarea studiului se elaborează și se aprobă un raport de dare de seamă care va include descrierea amplă de realizare a tuturor activităților studiului, datele privind rezultatele obținute, concluzii etc.

2.3. Contingentele de populație supuse testării și codificarea lor

În conformitate cu recomandările UNAIDS/WHO [1], în țările cu epidemie concentrată testările populației în cadrul supravegherii epidemiologice a infecției HIV/SIDA se concentrează la grupele de populație cu risc înalt de infectare, cum ar fi femeile sex businessului, clienții lor, UDI, BSB etc. Aceste grupe se recomandă să fie alese pentru studii de supraveghere epidemiologică de sentinelă. În dependență de scopuri, în studii pot fi incluse și alte grupe de populație – recruți, migranți, grupe de risc sporit profesional etc.

Indicii de prevalență în cazul dat se calculează doar pentru caracterizarea acestui grup-țintă și nu poate fi aproximat la populația generală.

Toate mostrele de sânge prelevate în locurile aprobate pentru interviu se codifică cu coduri individuale, unice, pentru fiecare mostră de sânge, metodologia cărora se elaborează înainte de a începe studiul. De exemplu, în anul 2009 au fost elaborate coduri cu 9 semne, prin care au fost codificate locul desfășurării studiului și prelevării mostrei, numărul de rând al persoanei investigate, cod al contingentului (P – instituții penitenciare, M – Bărbați ce practică sex cu bărbați (BSB), L – lucrătorii sexului comercial (LCS), U – UDI, gen.

În afară de investigații de laborator efectuate în cadrul supravegherii epidemiologice, în țară se efectuează testări serologice la adresarea populației în cabinetele de consiliere și testare voluntară și în instituțiile medico-sanitare publice la inițiativa lucrătorilor medicali. În cazul dat probele de sânge se

expediază din centrele medicilor de familie, instituțiile medico-sanitare publice republicane, municipale, raionale, urbane, instituții medicale departamentale, private. Datele privind testarea diferitor grupe de populație se supun prelucrării statistice și se eau în considerație la analizarea situației epidemiologice.

În scopul asigurării confidențialității, pentru codificarea persoanelor din diferite contingente se utilizează coduri aprobate prin Ordinul Ministerului Sănătății nr. 314 din 31.07.2007 [14], după cum urmează:

Tabelul 4. Lista și cifrurile contingentelor populației examinate la marcherii serologici ai HIV 1/2

Cod contingent	Contingent de populație
100,4	Persoanele supuse hemodializei
100,18	Șoferi ce întreprind călătorii peste hotare
100,22	Cetățeni RM ce pleacă peste hotare
100,24	Persoanele care se adresează pentru oferirea cetățeniei
101	Persoanele cu contacte sexuale cu persoanele infectate cu HIV/SIDA
102	UDI
103	Homo- și bisexualii
104	Persoanele cu semne clinice ale infecțiilor cu transmitere sexuală
105	Persoanele care practică sex comercial și/sau vagabondaj sexual
105,1	Persoanele depistate ca contacte sexuale cu sifilis și gonoree
106	Persoanele care revin de peste hotare după un termen >3 luni (la solicitare)
107	Donatori de organe, țesuturi, spermă
108	Donatori de sânge, plasmă (donări)
109,151	Femeile gravide – prima testare, la luarea la evidență
109,152	Femeile gravide – a doua testare, în a doua perioadă de sarcină
109,17	Femeile gravide trimise la avort
110	Recepienții de sânge și a preparatelor din sânge (peste 6 luni de transfuzie)
110,1	Recepienții de sânge și a preparatelor din sânge – testare înainte de hemotransfuzie
111	Recipienții organelor, țesuturilor, măduvei osoase, pielii
112	Contingentul instituțiilor penitenciare
112,1	Persoanele fără domiciliu, vagabonzii, reținuți în izolatoare de detențiune, în centrele de triere
113	Persoanele examinate conform indicațiilor clinice - mături
113tb	Persoanele care se află la evidență cu tub
113tb1	Persoanele cu tuberculoză - cazuri primare și recidivante
114	Persoanele examinate anonim
115	Persoanele care au fost în contact medical cu lichidele biologice ale bolnavilor de SIDA sau ale persoanelor infectate cu HIV
116	Lucrătorii medicali care lucrează cu virusul HIV, asigură diagnosticarea, tratarea, îngrijirea și supravegherea nemijlocită a bolnavilor de SIDA și persoanelor infectate cu HIV
117	Persoanele examinate conform indicațiilor clinice - copii
117tb	Persoanele care se află la evidență cu tub - copii
117tb1	Pers-le cu tuberculoză – cazuri primare și recidivante - copii
118	Copii spitalizați în secții de reanimare, oncologie, toractice și hematologice

119	Copiii spitalizați de repetate ori ce au fost supuși unui tratament intensiv parenteral
120	Persoanele examinate repetat la intervenirea laboratoarelor SIDA
121	Persoanele înainte de căsătorie – la solicitare
125	Copii născuți din mame HIV pozitive
130	Alte persoane
201	Cetățenii străini care au avut contacte sexuale cu bolnavul de SIDA sau cu persoane infectate cu HIV
207	Persoanele sosite în RM pe un termen mai mare de 3 luni
213	Persoanele străine examinate conform indicațiilor clinice – mături

Codul contingentului se indică pentru fiecare persoană investigată în formularele de însoțire (f. SIDA Nr 1/e „Îndreptarea probelor de sânge la investigația la anticorpi anti-HIV 1/2” și f. SIDA Nr 2/e Îndreptare pentru investigația sîngelui la HIV/SIDA (individuală).

Laboratoarele diagnostice efectuează prelucrarea datelor statistice privind contingentele populației testate la infecția HIV, utilizînd formularul de evidență respectiv (f. SIDA Nr 4 /e Datele despre contingentele examinate la HIV/SIDA) și programul EXCEL, dezagregînd persoanele testate în funcție de gen, codul contingentului (tab. 4), codul teritoriului administrativ și lunar prezintă aceste date în laboratorul de diagnosticare a HIV/SIDA al CNSP, Centrului SIDA. În acest laborator se efectuează prelucrarea statistică datelor lunare, utilizînd programul EXCEL, care se termină cu generarea tabelor după formele aprobate (Formularele SIDA Nr 7/e „Darea de seamă despre contingentele examinate la SIDA”, Nr 8 /e „Datele acumulate despre contingentele examinate la SIDA în Republica Moldova (nr. probe de sânge)” și Nr 9/e „Datele cumulative despre contingentele examinate la SIDA (nr. probe de sânge) în laboratorul de diagnosticare al SIDAei). Datele generalizate sunt utilizare la analizarea situației în țară, în teritorii administrative și la planificarea măsurilor profilactice și de redresare a situației epidemice.

Capitolul 3

SUBSTRATURI BIOLOGICE TESTATE LA INFECȚIA HIV

3.1. Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la selectarea și testarea substraturilor biologice la marcheri ai HIV

În activități de supraveghere a infecției HIV pot fi utilizate diferite substraturi biologice: sânge integral, plasmă, ser, fluide orale, urină. Alegerea tipului specimenelor colectate depinde de logistică, populațiile și eșantioanele selectate, precum și de strategia de testare HIV. Metodele de colectare, testare și stocare a probelor trebuie să fie unificate în scopul obținerii unor rezultate veridice și valide.

Pentru activitățile de supraveghere epidemiologică, speciamentele sunt colectate și stocate, de obicei, înainte de testare care va fi realizată la un laborator regional sau național. Serul, plasma și picăturile uscate de sânge pot fi stocate, apoi testate. Cerințele la stocare depind de tipul de probe colectate. Probele netestate la nivel local va trebui să fie transportate la un laborator regional sau național pentru testare. Metodele prin care mostrele sunt transportate depind de infrastructura țării.

3.1.1. Alegerea specimenelor

3.1.1.1. Avantajele și dezavantajele mostrelor de sânge, plasmă și ser. Sângele integral, serul și plasmă, care pot fi colectate prin venepuncție sau din deget, au următoarele avantaje și dezavantaje în testarea HIV:

Avantajele

- Concentrația mai înaltă de anticorpi anti-HIV decât în urină și salivă;
- Posibilitatea efectuării unor investigații suplimentare, de rutină (de exemplu, a markerilor hepatitelor virale, sifilisului etc.);
- Posibilitatea efectuării unor investigații speciale (de exemplu, sero – sau genotipizarea HIV, rezistența antiretrovirală, încărcătura virală sau monitorizarea terapiei);
- Comoditatea prelevării probelor din venă în condiții clinice;
- Comoditatea prelevării probelor din deget în condițiile non-clinice.

Dezavantajele

- Necesitatea utilizării tehnicii invazive;
- Necesitatea antrenării unui personal calificat pentru prelevarea probelor de sânge și obținerea serului și a plasmei;
- Necesitatea asigurării cu materiale sterile (ace, capilare, eprubete, lanțete), necesitatea asigurării cerințelor securității biologice;

- Incomoditatea prelevării probelor în condițiile non-clinice dacă este necesară venepuncție;
- În comparație cu altele substraturi biologice, riscul înalt pentru sănătatea personalului medical și tehnic în caz de expunere accidentală, în legătură cu concentrația înaltă a agentului patogen în sânge și utilizarea dispozitivelor ascuțite de colectare.

3.1.1.2. Avantajele și dezavantajele mostrelor de urină și salivă. Pentru testare la HIV, în afară de mostre de sânge, pot fi utilizate și alte substraturi biologice. Pentru testări asociate, în cazul în care trebuie să fie obținut consimțământul informat, pot fi utilizate fluide orale. Urina este singurul specimen (în afară de sânge), colectate în unele clinici în cazul în care ar putea fi desfășurată testarea neasociată anonimă.

Avantajele

- Nu este nevoie de un tehnician calificat pentru prelevarea și prelucrarea probelor;
- Se exclude contactul cu materiale de laborator eventual contaminate, cum ar fi ace sau lancete folosite;
- Probele de salivă pot fi prelevate în diferite condiții, inclusiv în condițiile non-clinice;
- Prelevarea probelor de salivă poate fi mai acceptabilă pentru contingentele de populație greu accesibile din punct de vedere al colectării de specimene care necesită venepuncție sau înghimpirea degetului. Prin urmare, un procent mai mare din populația țintă au acces la testate.

Dezavantajele

- Tehnicile ELISA pentru urină sunt mai puțin sensibile și specifice decât cele destinate testării mostrelor de sânge;
- Specimenele urinei trebuie să fie testate la un laborator (ELISA);
- Colectarea fluidului oral poate necesita unele echipamente speciale;
- Tehnologiile disponibile în prezent pentru testarea acestor specimene sunt limitate;
- Testele sunt mai costisitoare decât cele folosite pentru ser sau plasmă.
- Poate fi solicitată o mostră suplimentară (de exemplu, sânge) pentru confirmare;
- Nu pot fi utilizate pentru testarea suplimentară în studii speciale (de exemplu, cercetare la HIV-1 sau la HIV-2, serotipare HIV, rezistentă la antiretrovirale);
- La moment nici un test rapid pentru urină nu este disponibil.

Recomandare. Sânge (sânge integral, ser, plasmă) este substratul preferat pentru testare, deoarece are o concentrație mai mare de

anticorpi anti-HIV decît urină sau fluidele orale. De asemenea, permite testarea de rutină suplimentară, inclusiv sifilis, hepatita B și hepatita C, precum și studii speciale de stabilire a tipului HIV, subtipurilor și a efectua studii pe rezistență la antiretrovirale.

3.1.2. Colectarea, prelucrarea și păstrarea mostrelor de sînge.

Sîngele integral, serul și plasma de sînge necesare pentru testare la HIV pot fi obținute prin venepuncție sau din deget (sînge integral).

3.1.2.1. Prelucrarea sîngelui colectat prin venepuncție. Sîngele din venă se prelevă prin venepuncție, urmărind procedură aprobată la nivel local, respectînd cerințele securității biologice. Pentru prelucrarea sîngelui colectat prin venepuncție se recomandă [15]:

- 1) A preleva pînă la 10 ml de sînge din venă într-un tub steril de 10 ml. Pentru obținerea serului, sîngele se colectează într-un tub fără anticoagulant. Pentru obținerea plasmei, sîngele este colectat într-un tub cu anticoagulant, de exemplu, cu EDTA. Din motive de siguranță, se recomandă utilizarea unui sistem cu vacuum de colectare a sîngelui (de ex., sistem de vacutainer). (Notă: prelevarea unui tub suplimentar de sînge în timpul colectării de sînge de rutină numai în scopul testării anonime necuplate este considerat lipsit de etică și nu este recomandată). În cazul în care proba de sînge poate fi procesată imediat (de ex., nu este disponibilă centrifugă), sîngele se colectează într-un tub cu EDTA, se lasă cel puțin pe 20-30 de minute, apoi se elimină plasma cu grijă cu ajutorul unei pipete, astfel încît să nu se obțină prea multe eritrocite. Aceasta procedură se efectuează în timp de pînă la 24 de ore pentru a evita hemoliză. De asemenea poate fi pregătită o picătură de sînge uscată, utilizînd în acest moment sînge cu anticoagulant.
- 2) Proba se centrifughează pentru a separa serul (fara EDTA) sau plasmă (cu EDTA). În cazul în care sîngele este colectat pentru obținerea serului, sîngelei se lasă cel puțin pe 20-30 minute în scop de formare a cheagului înainte de centrifugare. De obicei, mostra se centrifughează la 1.200 - 1.500 rpm timp de 10 minute.
- 3) După ce mostră este centrifugată sau a trecut timpul necesar pentru separarea serului, se utilizează o pipetă curată (nu se toarnă!) pentru a colecta de pe stratul superior o alicotă de ser în volum de 0,5-2,0 ml. Serul se transferă într-un alt tub steril etichetat (de plastic, nu de sticlă) sau într-un criotub (1,5-2,0 cu dop filetat) și se închide bine capacul. Mostra este gata pentru depozitare și/sau testare.

3.1.2.2. Stocarea serului și plasmei colectate prin venepuncție. Pentru a stoca serul și plasma:

- Convingeți-vă, că tubul plastic sau criotubul este bine închis cu capac (nu se recomandă utilizarea tuburilor de sticlă pentru depozitarea probelor). Plasați criotuburile într-o cutie de carton cu cuiburi pentru

fiecare criotub.

- În cazul în care probele vor fi transportate în laborator pentru testare, imediat plasați cutia în poziție verticală într-un container izotermic care conține dispozitive pentru a produce o temperatură de 4 °C. Dacă dispozitive de răcire nu sunt disponibile, probele de ser pot rămâne la temperatura camerei timp de până la 3 zile (conform cerințelor instrucțiunii la trusa utilizată). Păstrarea serului mai mult de 3 zile la temperatura camerei poate duce la proliferarea bacteriană și defalcarea specimenului.
- Dacă mostrele sunt ținute în locuri de prelevare mai mult de 3 zile înainte de expediere în laborator, ele se congelează la -20 °C la un congelator care nu se decongelează în mod automat. Pentru depozitare pe termen lung, în mod ideal, probele ar trebui să fie congelate la -70 °C la congelator care nu se decongelează în mod automat.
- Numărul de cicluri de congelare-decongelare se limitează până la 5 cicluri, deoarece poate duce la afectarea titrelor de anticorpi și, prin urmare, rezultatelor testării.

3.1.2.3. Prelevarea și păstrarea mostrelor de sânge. Sângele prelevat din deget poate fi investigat nemijlocit cu ajutorul unui test rapid, sau din el se prepară o picătură uscată pe hârtie absorbantă specială. Mostrele uscate de sânge pot fi preferate în setările rurale și condițiile non-clinice, care adesea nu au specialist pregătit în flebotomie instruiți și nu dispun de echipament adecvat de laborator (de ex., centrifugă).

- 1) Pentru a obține un specimen de sânge, degetul (de preferință, mijlociu sau inelarul) trebuie masat, ceea ce va determina acumularea sângelui la vârful degetului.
- 2) Pernuța degetului se prelucurează cu alcool etilic sau izopropilenic de 70%, surplusul de alcool se îndalătură cu un tampon steril de vată;
- 3) Înțeparea pernuței degetului se efectuează cu un scarificator steril. Prima picătură se șterge cu un tampon steril de vată și apoi se prelevă următoarea picătură care se depune în dispozitivul testului rapid sau pe hârtia de filtru pentru pregătirea picăturii uscate. Dacă prima înțepătură nu este reușită, înțepătura repetată se face în alt loc al aceluiași deget sau pe un alt deget, nici într-un caz în același loc. Se va evita comprimarea locului înțepăturii și stoarcerea picăturii de sânge, deoarece aceasta poate conduce la hemoliza eritrocitelor și, ca urmare, la rezultate incorecte ale testării.

3.1.2.4. Pregătirea și păstrarea picăturii uscate de sânge pentru testarea la prezența HIV. Pregătirea și păstrarea ușoară, transportarea fără respectarea lanțului rece sunt avantajele principale ale picăturii uscate de sânge. Deși obținerea mostrei de sânge prin înțeparea degetului este metoda cea mai tipică, picătura uscată poate fi pregătită din doza de sânge

prelucrată cu anticoagulant.

- 1) O bucată de hîrtie absorbantă specială (de filtru, Schleicher and Schuell Grade 903 Filter Paper or Whatman BFC 180 paper) se apropie nemijlocit de picătura de sînge de pe deget sau se utilizează o pipetă sterilă. Pe hîrtie poate fi trasat din timp un cerc cu un diametru ce corespunde aproximativ la 100 μ l de sînge cînd el se va îmbiba în totalitate. Dacă cercul nu a fost trasat din timp, pe hîrtie se trece un volum de sînge care va forma un cerc cu diametru de cca 1,5 cm. Așteptați pînă cînd sîngele va îmbiba hîrtia și v-a umple cercul. Dacă hîrtia nu îmbibă sîngele, ea nu trebuie folosită;
- 2) După ce sîngele se va îmbiba, notați locul picăturii cu un cod special;
- 3) Picăturile de sînge îmbibate pe hîrtie absorbantă se usucă la aer. Pentru uscarea fișiiilor de hîrtie există stativ comercial special. Acestea pot fi uscate și între două cărți, fixînd capetele fișiei cu panglică lipicioasă de cărțile aflate pe masa din laborator astfel, încît sectorul de hîrtie cu picătură să nu se atingă de suprafața mesei sau a cărților. Convingeți-vă că panglica lipicioasă nu se atinge de picătura de sînge;
- 4) Picătura de sînge se lasă să se usuce la temperatura camerei c-ca 4 ore (sau 24 ore la o umiditate sporită). Nu se admite uscarea picăturii de sînge prin încălzire;
- 5) După ce picătura de sînge a fost uscată cu respectarea condițiilor enumerate, înveliți hîrtia de filtru într-o foiță de staniol sau plastic, fiecare picătură aparte;
- 6) Mostrele astfel împachetate se așează într-o pungă din polietilenă cu desicant sau indicator de umiditate. Într-o pungă se pot depozita pînă la 20 mostre. Pungile se păstrează la temperatura camerei pînă la 30 zile sau la temperatura de 4 °C - pînă la 90 de zile, după care trebuie păstrate la -20 °C, la care mostrele se păstrează stabile pînă la 2 ani. Pungile se vor transporta în ambalaj rezistent la transportare.

3.1.3. Mostre de urină și salivă

3.1.3.1. Colectarea și stocarea mostrelor de urină și salivă. Prelevarea mostrelor de urină și de lichid oral se efectuează, respectînd instrucțiunile la test, precum și procedurile locale de laborator.

Urină. Deși o varietate de protocoale de ELISA există pentru utilizarea specimenelor de urină, cu toate acestea, testele rapide nu sunt disponibile la acest moment pentru a fi utilizate pe specimene de urină.

La prelevarea mostrelor de urină se iau în considerație cîteva momente importante:

- De obicei, un volum de minim de 200 μ l pentru urină este necesar pentru testare cu un kit pe urină bazat pe ELISA.
- Probele pot fi colectate în orice moment al zilei.
- Pentru păstrare, în mostra poate fi adăugat un conservant, cu toate că

aceasta procedură nu este necesară.

Lichid oral (salivă). Lichidul oral poate fi investigat atât cu teste ELISA modificate cât și cu teste rapide. Testele rapide folosite pentru investigația salivei în prezent se află în curs de evaluare.

Se întreprind următorii pași generali pentru a colecta un specimen de salivă:

- 1) Folosiți un tampon absorbant tratat special atașat pe un dispozitiv de plastic (de obicei, furnizat de către producătorul kitului de testare).
- 2) Plasați dispozitivul în gura persoanei investigate pe partea inferioară a obrazului pe o durată de timp specificată în instrucțiunea producătorului. Apoi, dispozitivul se plasează într-o fiolă specială care conține soluție conservantă (de obicei, furnizată de către producătorul, dotînd kitul de testare).

Datorită complexității de testare, fluidele orale colectate pentru ELISA sunt trimise la un laborator național de analiză.

3.1.3.2. *Păstrarea mostrelor de urină și salivă.* Mostrele de urină se plasează în criotuburi plastice care conțin un conservant, pot fi păstrate pînă la un an la 4 - 8 °C. Mostrele destinate testării la HIV nu trebuie să fie congelate.

Specimenele de lichid oral pot fi stocate la 4 - 37 °C timp de maximum 21 de zile (inclusiv timpul necesar pentru reansportare și testare. Probele de salivă în timpul transportului ar trebui să fie plasate la frigider. Probele pot fi congelate (la -20 °C) pentru o perioadă limitată de timp (aproximativ 6 săptămîni). Odată decongelate, acestea pot fi recongelate doar o singură dată. Validați testul utilizat înainte de utilizare pentru mai multe informații de stocare specifice.

3.1.3.3. *Marcarea și înregistrarea datelor.* Criotubele sau hîrtie de filtru care conține mostra destinată investigației trebuie să fie marcate cu un cod în momentul de colectare și de prelucrare. Eticheta cu codul respectiv se plasează pe partea laterală a tubului, nu pe capac. Coordonatorii studiului de supraveghere ar trebui să ofere personalului din teren responsabil pentru recoltarea de probe o serie de etichete sau markere permanente, precum și codurile care trebuie folosite. La testarea anonimă neasociată, codul nu conține informații de identificare a persoanei (testare nedefinitivă anonimă).

3.1.3.4. *Înregistrarea specimenelor.* Probele destinate investigației de laborator se înregistrează într-un registru special, în care se introduce codul fiecărei probe și rezultatul testării. Acest registru ar trebui să fie accesibil doar personalului de laborator și de supraveghere și să păstrează într-un sertar blocat sau cabinet cînd nu este utilizat pentru a asigura confidențialitatea rezultatelor testelor persoanelor incluse în studiul de supraveghere.

Pentru testarea anonimă nedefinitivă, în registrul se introduc doar

codurile probelor respective și rezultatele testării la HIV; nu se înregistrează nici o informație cu caracter personal de identificare cu privire la pacienții ale căror mostre au fost incluse în studiu. Rezultatele testării la HIV pot fi suplimentate cu informația demografică abstractă prevăzută anterior. Codul mostrei poate fi suplimentat cu un cod de informații demografice captat anterior pe formularul de supraveghere (testare nedefinitivă anonimă).

3.2. Selectarea și testarea substraturilor biologice la marcheri ai HIV în studii de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV în Republica Moldova

Studiul de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV se organizează în baza ordinului (dispoziției) Ministerului Sănătății, sau, la participare a instituțiilor din cadrul altor ministere (departamente) – ordinului semnat de toate ministerele (departamentele) incluse în studiul. În ordinul se specifică:

- Instituțiile participante;
- Instituția responsabilă pentru organizarea, monitorizarea studiului, colectarea datelor, realizarea investigațiilor de laborator etc.
- Termenii de realizare a studiului

Instituția responsabilă pentru organizarea studiului organizează:

- Elaborarea Programului de realizare a studiului în baza recomandărilor OMS/UNAIDS (compartimentul 3.1.) în care se specifică grupele de populație incluse în studiu; substraturi biologice supuse testării; spectrul investigațiilor efectuate; modalitatea de codificare a mostrelor supuse testării; metode de testare, elaborarea și aprobarea formularelor necesare la diferite etape de lucru (instrucțiuni de colectare a mostrelor, registre de evidență, fișe de interviu etc.), lista preparatelor diagnostice utilizate în studiu;
- Monitorizarea completitudinii și calității lucrărilor efectuate la toate etapele și nivelurile de lucru;
- Analizarea datelor obținute în studiu și elaborarea raportului final privind rezultatele studiului.

Laboratorul care efectuează investigații:

- elaborează și aprobă proceduri operaționale standard (POS) pentru fiecare metodă (test-sistem) utilizată în studiu conform cerințelor sistemului de management al calității al instituției;
- Asigură testarea calitativă a mostrelor biologice în termenii în vigoare stabiliți, controlul calității investigațiilor realizate, confidențialitatea tuturor datelor operate.

Capitolul 4

TEHNOLOGIILE ȘI STRATEGIILE DE TESTARE

4.1. Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la tehnologiile și strategiile de testare

4.1.1. Tehnologiile de testare

Tehnologiile actuale de testare la infecția HIV au posibilitate de a depista:

- Anticorpi anti-HIV (de ex., ELISA, teste rapide, Western blot, teste de imunofluorescență, aglutinare de particule)
- Antigene specifice HIV (de ex., ELISA, testarea la antigen)
- Acizi nucleici virali HIV (de ex., prin reacție de polimerizare în lanț sau alte tehnici)
- Izolarea virusului HIV în culturi celulare.

Pentru supraveghere, precum și în scopuri de diagnosticare tehnologiile care identifică antigenul HIV, acizii nucleici virali sau destinate depistării însuși virusului pentru țările în curs de dezvoltare sunt scumpe, dificile din punct de vedere tehnic, ceea ce provoacă erori de laborator. În majoritatea țărilor industrializate, procedurile actuale de diagnostic de testare utilizează o metodologie ELISA pentru screeningul specimenului și, dacă este reactiv, rezultatul este confirmat prin testarea specimen cu un test Western blot. Cu toate acestea, studiile au arătat că cea mai recentă generație de ELISA și testele rapide sunt la fel de performante pentru confirmare ca și Western blot. În plus, comparativ cu Western blot, ELISA și testele rapide sunt mai puțin costisitoare, nu necesită un nivel mai ridicat de expertiză tehnică pentru a efectua și interpreta rezultatele, și produc mai puține rezultate nedeterminate. Prin urmare, UNAIDS și OMS recomandă strategii alternative de testare, folosind combinații de ELISA sau teste rapide pentru a confirma testele inițial pozitive. Primul test (test de screening) ar trebui să fie extrem de sensibil pentru a oferi detectare sigură a anticorpilor într-o probă. Al doilea test (testul de confirmare) ar trebui să fie foarte specific pentru a confirma că mostra cu adevărat conține anticorpi specifici anti-HIV [18].

Majoritatea ELISA și testelor rapide conțin antigene ale ambilor tipuri de HIV - HIV-1 și HIV-2 și, prin urmare, pot detecta anticorpi la ambele tipuri de HIV. Cu toate acestea, majoritatea testelor nu fac discriminare între HIV-1 și HIV-2. ELISA și testele rapide sunt recomandate atât pentru supravegherea HIV, cât și în scopuri diagnostice, deoarece acestea sunt cele mai eficiente din punct de vedere cost-eficiență. UNAIDS și OMS au definit patru categorii de complexitate pentru ELISA și testelor rapide: (1) nici un echipament suplimentar sau de experiență de laborator nu sunt necesare; (2) nu este necesară pregătirea reactivilor sau utilizarea unui proces tehnologic cu mai multe etape; (3) nu sînt necesare aptitudini specifice, cum ar fi diluarea

mostrei și (4) Echipament de laborator și tehnicieni calificați nu sunt necesare.

Recomandare. *Tehnologiile de testare disponibile, ELISA și teste rapide sunt cele mai exacte din punct de vedere cost/eficiență atât pentru scopuri de supraveghere, cât și în scop diagnostic.*

4.1.2. Metoda imunoenzimatică (ELISA)

4.1.2.1. Caracteristica generală. Testele ELISA se bazează pe o interacțiune primară între antigen-anticorp și pot utiliza întregul lisat viral al HIV sau unul sau mai multe antigene virale. Testele ELISA de primele generații produceau mai multe rezultate fals-pozitive a anticorpi anti-HIV decât generațiile actuale. Acestea au fost legate în fond de reacții de cros-reactivitate cu componentele celulei gazdă (celulele din linii celulare limfocitare în care virusul a fost cultivat). Prin urmare, speciemenele găsite inițial ca reactive în ELISA, întotdeauna necesitau un test de confirmare Western blot. Cu toate acestea, testele ELISA de a doua și a treia generație au arătat o îmbunătățire marcată prin sporirea specificității, precum și sensibilității, făcându-le candidați pentru testare de confirmare. Utilizarea de proteine recombinante și peptide sintetice a îmbunătățit, de asemenea sensibilitatea, prin reducerea perioadei de „fereastră serologică negativă”, o perioadă după infectare inițială cu HIV, și a permis depistarea precoce a infecției HIV. Majoritatea testelor ELISA HIV conțin antigene ale HIV-1 și HIV-2 și au fost optimizate pentru detectarea anticorpilor la ambele tipuri ale HIV.

4.1.2.2. Caracteristica testelor ELISA. Testele ELISA sunt cele mai preferate pentru utilizarea la un laborator regional sau național, deoarece au nevoie de tehnicieni de laborator bine instruiți și echipamente tehnologice avansate (incubatoare, spălătoare și spectrofotometre pentru plăci), care necesită întreținere și o sursă constantă de energie electrică. ELISA sunt cele mai eficiente pentru laboratoare când se lucrează cu un număr mare de probe (100 sau mai multe) pe zi sau pentru testarea loturilor care sunt comune în activități de supraveghere de santinelă HIV. În dependență de concepția testelor, ele nu sunt nici adecvate nici rentabile pentru testarea unui număr mic de specimene. Cu toate acestea, în cazul în care un laborator procesează cel puțin 50 mostre în fiecare zi în mod regulat, testele ELISA pot fi încă mai adecvate decât testele rapide. Deoarece de multe ori laboratoarele colectează un lot de specimene pentru testarea lor concomitentă, rezultatele testării sunt disponibile peste 2-3 săptămâni după colectare. În timpul ce această întârziere ar putea fi de interes pentru scopuri de diagnosticare, aceasta nu este un dezavantaj pentru testarea anonimă neasociată, deoarece rezultatele nu sunt furnizate înapoi la persoana testată și eliberarea rezultatului în aceeași zi ar putea duce la identificarea persoanei testate. Deoarece testările ELISA sunt de obicei efectuate la nivel regional sau național, măsurile de control al calității trebuie să fie puse în aplicare în doar câteva laboratoare ELISA,

această aplicare fiind în setările rurale, unde infrastructura și echipamentele de laborator pot fi insuficiente.

Costul unui test ELISA este c-ca 1-2 USD. Atunci când se analizează atât costurile directe și indirecte (tehnologie, resurse umane, precum și cerințele de echipamente), costul real poate să depășească 15-20 USD per test [16]. Cu toate acestea, în cazul în care costurile directe și indirecte sunt partajate în toate programele (screeningul de sânge, diagnosticul și supraveghere), un cost mult mai realist pentru activitățile de supraveghere ar fi de 4-6 USD.

Recomandare. Testele ELISA sunt eficiente pentru laboratoarele în care se procesează un număr mare de mostre de zi cu zi, cum este de obicei atunci când se realizează investigații în cadrul supravegherii epidemiologice de e sentinelă HIV.

4.1.2.3. Performanțele testelor ELISA. Testare ELISA poate fi efectuată pe ser, plasmă, urină, fluide orale sau picături uscate de sânge (diluare o singură dată). Testare ELISA poate să dureze de la 2 până la 4 ore (inclusiv pregătirea și diluarea specimenelor), precum și 3-4 ore suplimentar dacă un rezultat de screening trebuie să fie confirmat. Testarea se efectuează conform cerințelor instrucțiunii producătorului testului utilizat.

Etapele generale de realizare ELISA includ:

- 1) Specimenul se diluează cu un tampon de diluare a specimenelor și se pune într- un godeu al microplăcii care deja conține antigenul HIV capturat.
- 2) Placa se incubează conform protocolului și apoi se spală în conformitate cu indicațiile.
- 3) Se adaugă conjugatul imunoglobulină antihumană cuplată cu enzimă, care va reacționa cu anticorpii anti-HIV specifici, dacă acestea sunt prezenți.
- 4) Incubarea.
- 5) Placa se spală, se adaugă substrat enzimatic și se incubează conform indicațiilor.
- 6) Se adaugă o soluție de stopare a reacției enzimatice, și absorbanta lichidului din fiecare godeu se citește cu ajutorul unui spectrofotometru.

O reacție pozitivă care a avut loc în cazul în care în godeul cu specimenul s-a modificat culoarea sau conținutul godeului a devenit colorat indică prezența de anticorpi anti-HIV specifici în specimen. Reacția este cel mai bine citită cantitativ cu un spectrofotometru ELISA pentru microplăci.

Următoarele momente sunt critice pentru succesul de efectuare a testării ELISA:

- Utilizarea de kituri de testare care nu au expirat
- Calibratea și întreținerea bună a echipamentelor;

- Respectarea cerințelor instrucțiunii producătorului la timpul de incubare și de diluție a specimenelor;
- Utilizarea apei deionizate
- Utilizarea unui spectrofotometru pentru a citi rezultatele precis și obiectiv;
- Trainingul personalului în tehnologiile utilizate;
- Sursă permanentă de alimentare electrică, fără întreruperi care ar afecta depozitarea reactivilor sau funcționarea echipamentelor.

4.1.3. Teste rapide

4.1.3.1. Caracteristica generală a testelor rapide. Interesul în dezvoltare a metodelor de depistare a anticorpilor anti-HIV, care oferă rezultate în aceeași zi și nu necesită reactivi sau echipamente speciale, care nu sunt dependente de seturi disponibile în prezent reprezintă testele rapide HIV. Testele rapide curente sunt bazate pe patru principii imunologice: aglutinare de particule, imunodot (punct), imunofiltration (filtrare prin intermediul unui dispozitiv) și immunochromatography (flux lateral), [18]. Majoritatea testelor rapide HIV sunt bazate pe antigene ale HIV-1 și HIV-2 și permit a depista anticorpi dirijați contra ambelor virusi. Un rezultat pozitiv al testului este exprimat prin aglutinare, un punct, sau o bandă, în funcție de formatul testului. Sensibilitatea și specificitatea testelor rapide de ultima generație sunt similare cu cele de tip ELISA. Actualmente multe teste rapide sunt în curs de evaluare sau sunt utilizate în prezent în țările în curs de dezvoltare pentru screening, diagnostic și în scopuri de supraveghere.

4.1.3.2. Utilizarea testelor rapide. Testele rapide sunt utile pentru laboratoarele mici care efectuează de obicei mai puțin de 100 de teste HIV pe zi, pentru laboratoare fără energie electrică sau echipamente, precum și pentru zonele geografice cu infrastructura de laborator limitată. În unele cazuri, chiar în cazul în care un laborator efectuează peste 100 de teste pe zi, dar numai într-o perioadă limitată pe parcursul anului, testele rapide pot fi mai adecvate decât ELISA. Un rezultat poate fi obținut, de obicei, în mai puțin de 45 de minute și este ușor de interpretat. Cu toate acestea, este necesară pregătirea personalului pentru asigurarea realizării și interpretării testului. Trusele de testare conțin, în general, toți reactivii necesari pentru a rula testul și nu sunt necesari reagenți sau echipamente adiționale. Multe teste rapide nu necesită curent electric, echipamente speciale, frigidere sau congelatoare, sau personal cu înaltă calificare, deși unele necesită refrigerare pentru reactivi sensibili la căldură.

Testele rapide pot fi adecvate pentru testarea confidențială asociată a persoanelor din populații greu accesibile (de ex., UDI, LSC) sau populațiilor îndepărtate geografic. În aceste populații, oportunitățile pentru comunicarea rezultatelor testării poate fi limitată; prin urmare, testarea (de screening și de confirmare), poate fi necesară să fie efectuate în locul desfășurării studiului în

ziua prelevării probelor [19]. În cazul în care rezultatele testelor HIV trebuie să fie comunicate persoanei testate, un test de confirmare este necesar (de ex., un alt test rapid sau ELISA).

Testele rapide, în general, costă în limită de 1-3 USD, un cost puțin mai mare decât un test ELISA. Cu toate acestea, testele rapide pot fi mai rentabile decât ELISA în cazul în care costurile suplimentare de efectuare a unei testări ELISA sunt luate în considerare (de ex., costul echipamentelor, infrastructura de laborator, tehnician de formare). Deoarece există foarte puțini pași în realizarea unui test rapid, există mai puține șanse de eroare decât cu ELISA. În plus, majoritatea testelor rapide includ un control intern al calității. Cu toate acestea, atunci când se utilizează teste rapide, asigurarea calității și măsurile de control externă al calității trebuie să fie dezvoltate și puse în aplicare la toate site-urile care le utilizează.

Recomandare. Testele rapide sunt utile în cazul în care testările ELISA nu sunt raționale și în zone geografice cu infrastructura de laborator limitată. Testele rapide pot fi adecvate pentru lucrul cu populații greu accesibile (de ex., UDI, LCS) sau în localitățile îndepărtate, pentru care rezultatele testului HIV pot fi necesare în ziua prelevării probelor.

Tabelul 5. Compararea tehnologiei imunoenzimatică și testelor rapide

Tehnologia testare HIV	Mostre	Avantaje	Limitări	Cost * (USD)	Complexitatea ^b
ELISA	Ser, plasmă, picături uscate de sânge, salivă, urină	• Trebuie să fie în serie ≥ 100 mostre concomitent • Necesită automatizare • QA/QC în laboratoarele de nivel național și regional mai ușoară • Costul unui test mai mic față de test rapid • Identificarea seroconversiei recente: sensibilitatea înaltă cu reducerea perioadei non-reactive	• Nu este flexibilă • Necesită personal calificat și traininguri pentru realizarea și citirea rezultatelor • Necesită ≥ 2 ore până la obținerea rezultatului (dacă este necesitate de testare ELISA dublă, >5 ore) • Necesită echipamente speciale • Necesită mentenanță a echipamentului • Necesită păstrarea reagenților în frigider	1-2	4

Rapid test	Ser, plasmă, Sînge integral, salivă ^C	• Sunt bine venite la testare a 1-100 mostre concomitent • Necesită minimul de reagenți și echipamente • Poate fi realizat în clinice (testare pe loc) • Nu necesită calificare înaltă a personalului • Interpretarea foarte ușoară a rezultatelor • Obținerea rezultatului peste <min. • Trusele pot fi păstrate la temperatura camerei (stabilitatea sporită)	• Nu este bine venit pentru testarea concomitentă cantităților de >100 specimene • Realizarea QA/QC în mai multe locuri: necesită mai multe controale • Costul mai mare la testare individuală față de ELISA • Strategia aleasă de testare poate solicita cantități mai mari de specimene • Variabilitatea citirii testului poate oferi rezultate contradictorii la utilizarea unor formate de test (de ex., particule aglutinare)	1-3	Pentru testele bazate pe imunocromatografie – 1 Bazate pe tehnologii immuno dot (punct) și immuno filtration – 2 Agglutinare - 3
------------	--	--	---	-----	--

* Costul tehnologiei de testare poate fi afectat prin costurile directe și indirecte.

^bUNAIDS / OMS au specificat patru categorii de complexitate pentru testele de depistare a anticorpilor anti-HIV: (1) Nici un echipament suplimentar sau experiență de laborator nu sunt necesare; (2) pregătirea reactivilor sau a unui proces de lucru cu mai multe etape este necesar; (3) aptitudini specifice, cum ar fi diluarea sunt necesare; și (4) echipamente și instruirea tehnicianului de laborator sunt necesare [18].

^C Testele rapide folosind fluide orale sunt în curs de evaluare; QA / QC, asigurarea calității / controlul calității.

4.1.3.3. Efectuarea testării rapide. Testul rapid poate fi realizat pe ser, plasmă, sînge integral și fluide orale. Teste rapide destinate salivei sunt în curs de evaluare. În prezent nu este nici un test rapid disponibil pentru urină. Pentru unele teste rapide, pregătirea specimenului poate dura 10-20 de minute, unele teste rapide mai simple nu necesită pregătirea specimenului. Astfel, confirmarea rezultatului poate fi obținută în mai puțin de 45 de minute la utilizarea dispozitivului sau benzii. Instrucțiunea producătorului furnizată la trusă utilizată, necesită să fie respectată. Majoritatea rezultatelor sunt ușor de citit în baza apariției aglutinării, punctului, liniei, în funcție de formatul trusei utilizate.

Succesul realizării testului rapid depinde de respectarea următoarelor cerințe:

- Utilizarea trusei de testare în limitele termenului de valabilitate (nu expirată)
- Pregătirea specialistului în domeniul tehnologiei utilizate
- Respectarea cerințelor instrucțiunii producătorului
- Interpretarea corectă a rezultatului testului de către persoană care îl citește.

4.1.4. Strategiile de testare la HIV în scop de supraveghere

UNAIDS și OMS recomandă trei criterii pentru alegerea unei strategii de testare HIV (selectarea corespunzătoare a tehnologiilor de testare sau a unei combinații de teste) [17]:

- 1) Obiectivul testului (de supraveghere, screeningul sau diagnostic);
- 2) Sensibilitatea și specificitatea testului;
- 3) Prevalența HIV în rândul populației testate.

După aceste trei criterii se selectează o strategie de testare HIV care poate mărimaximiza sensibilitatea și specificitatea testărilor și minimizează costurile. Mai jos sunt prezentate cele trei strategii de testare HIV recomandate de UNAIDS și OMS (figura 4).

Strategia I:

- Necesită o testare
- Pentru testarea în scop diagnostic în populațiile cu o prevalență HIV >30% în rândul persoanelor cu semne clinice sau simptome ale infecției cu HIV;
- Pentru screeningul sîngelui pentru toate nivelele de prevalență;
- Pentru utilizare în testarea de supraveghere în populațiile cu o prevalență HIV >10% (de ex., testarea nedeterminată definitivă anonimă pentru supravegherea în rândul femeilor gravide la clinicile prenatale). Rezultatele nu sunt furnizate.

Strategia II:

- Necesită pînă la două teste.
- Pentru utilizare în teste de diagnosticare în populațiile cu o prevalență HIV $\leq 30\%$ în rândul persoanelor cu semne clinice sau simptome de infecție cu HIV sau >10% în rândul persoanelor asimptomatice
- Pentru utilizare în testarea de supraveghere în populațiile cu o prevalență HIV $\leq 10\%$ (de ex., testarea nedeterminată definitivă anonimă pentru supravegherea în rândul pacienților clinicilor prenatale sau clinicilor de boli infecțioase cu transmitere sexuală). Rezultatele nu se furnizează.

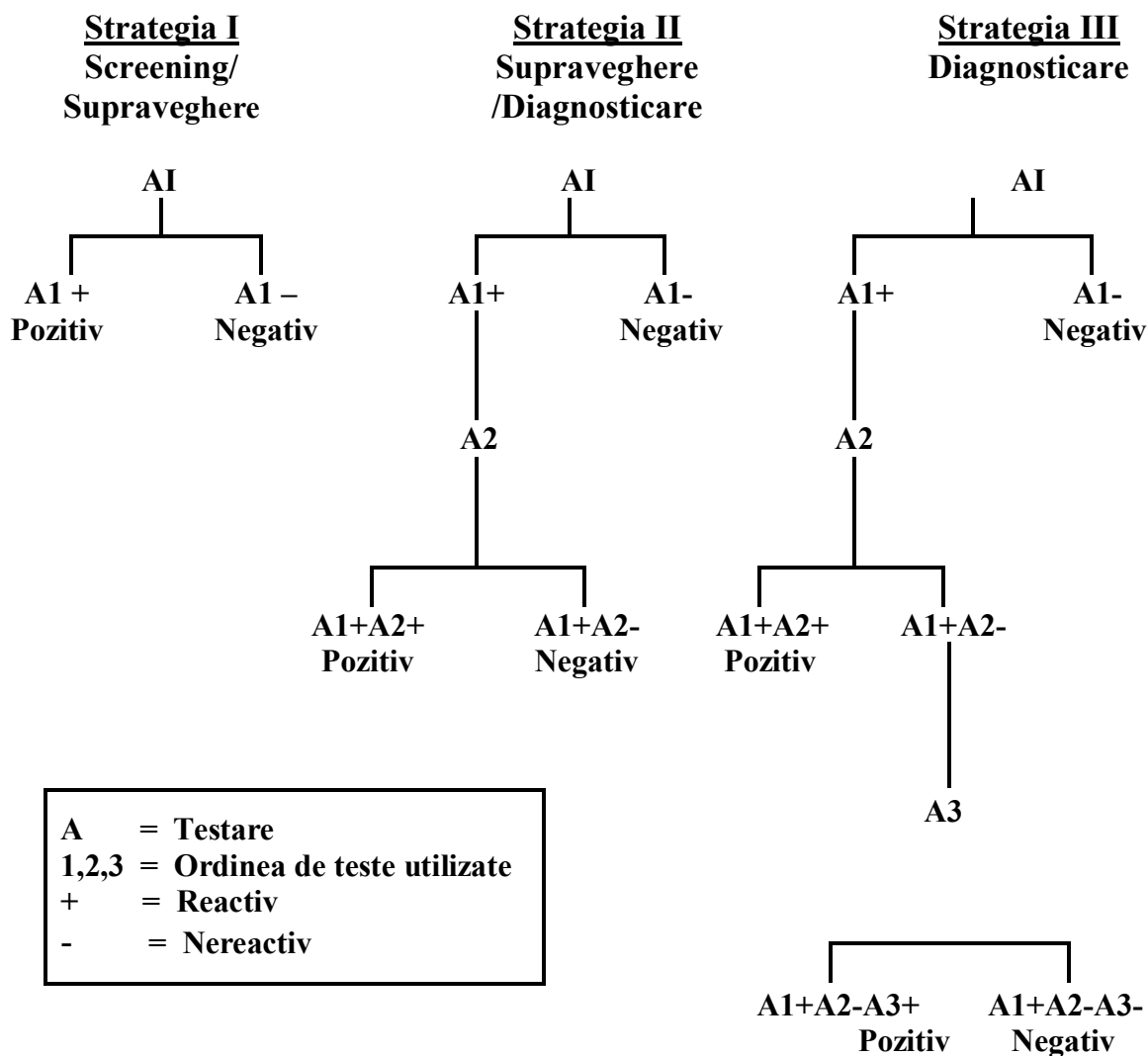
Strategia III:

- Necesită pînă la trei teste.

- Pentru utilizare în scop de diagnosticare în populațiile cu o prevalență HIV $\leq 10\%$ în rândul persoanelor asimptomatice.

Pentru strategiile de testare HIV în care pot fi necesare mai multe teste decât unu (strategiile II și III), selectarea tehnologiilor de testare și ordinea în care acestea vor fi utilizate (algoritmul de testare) sunt importante pentru obținerea unor rezultate precise de testare. În primul rând, testele ar trebui să conțină antigene diferite. În al doilea rând, primul test ar trebui să aibă o sensibilitate cât mai posibil înaltă, și al doilea test ar trebui să aibă o specificitate cât mai posibil înaltă. Primul test este testul de screening, de aceea este ideal să fie foarte sensibil pentru a depista toate mostrele pozitive. Deoarece vor fi obținute niște rezultate fals pozitive, al doilea test (testul de confirmare) trebuie să fie foarte specific pentru a confirma, că pentru toate mostrele cu adevărat negative vor fi obținute rezultate de testare negative. În plus, atunci când sunt utilizate Strategiile II sau III, sunt preferate testele care pot fi aplicate pe ser, plasmă sau picături uscate de sânge, astfel încât se recomandă efectuarea mai multor teste dintr-un singur exemplar de mostră, evitând colectarea de exemplare suplimentare.

Figura nr. 1. Strategiile de testare recomandate de UNAID și OMS



Pentru testele rapide pe salivă sau sînge integral prelevat din deget, specimenul este plasat direct pe dispozitivul de testare rapidă; astfel, un al doilea eșantion trebuie să fie colectat pentru confirmare în cazul în care primul test este reactiv. Prin urmare, pentru strategiile de testare II și III, se sugerează că, dacă este posibil, două teste rapide să fie efectuate simultan pe un tampon oral unic sau pe o mostră de sînge din deget și apoi analizate ca în cazul în care testarea a fost realizată secvențial.

Această situație de testare poate apărea atunci cînd se efectuează testarea asociată în rîndul populației greu accesibile. În această situație, există o singură ocazie în care să obțină consimțămîntul informat, se prelevă specimen, se ea interviu privind deprinderile comportamentale și imediat să comunice rezultatele și consiliere adecvate pentru persoana testată. Numai testele rapide permit a efectua screeningul la fața locului cu confirmare a rezultatului în aceeași zi. Dacă se prelevă specimen de sînge, poate fi preparată picătura uscată de sînge în scopuri de asigurare a calității [18].

Recomandare. Cînd se utilizează strategiile II sau III, se recomandă aplicarea testelor care pot folosi ser, plasmă sau picături uscate de sînge, astfel încît în cazul dat mai multe teste pot fi efectuate dintr-o singură mostră, evitînd prelevarea mostrelor suplimentare.

4.2. Tehnologiile și strategiile de testare utilizate în Republica Moldova

4.2.1. Tehnologiile de testare

În dependență de obiectivele investigației, În Republica Moldova se utilizează diferite tehnologii de testare la infecția HIV destinate depistării:

- Anticorpilor anti-HIV (teste ELISA, rapide, Western blot, de aglutinare de particule)
- Antigenelor specifice HIV (de ex., teste ELISA pentru depistare a antigenului p24 al HIV1);
- Acizilor nucleici ai HIV (de ex., prin reacție de polimerizare în lanț sau alte tehnici)

4.2.2. Cerințele la organizarea investigațiilor de laborator la infecția HIV:

- În conformitate cu Articolul 12 (2) al Legii cu privire la profilaxia infecției HIV/SIDA [9], testarea sîngelui la marcherii HIV se efectuează în laboratoarele instituțiilor medico-sanitare publice și în cele ale centrelor de sănătate publică ale Ministerului Sănătății acreditate în modul stabilit de lege.
- Laboratoarele și secțiile diagnostice se organizează în conformitate cu documentele directive în vigoare, asigurîndu-se respectarea regimului

antiepidemic, tehnicii securității și măsurilor de dezinfectie și sterilizare [4; 20, 21]. Toate activitățile (investigațiile de laborator, măsurile de dezinfectare etc.) se efectuează în conformitate cu Procedură Operațională Standard (POS) elaborată pentru fiecare procedeu de lucru în conformitate cu cerințele Manualului Calității instituției. În POS-urile privitoare la metodele de lucru (cu test-sisteme diagnostice, alte investigații) se introduce un compartiment special care prezintă traducerea metodei (instrucțiunii producătorului testului utilizat) în limba de stat.

4.2.2.1. Statele de personal și calificare a specialiștilor

- Statele de personal se constituie din următoarele unități: șef de laborator, medici-laboranți, felceri-laboranți, laboranți și infirmiere. În laboratoarele cu volum mare de investigații (peste 10 mii analize lunar) poate fi introdusă funcția de registrator medical.
- Numărul de unități de colaboratori titulari se planifică, reieșind din volumul analizelor și în conformitate cu normativele privitor la cheltuielile timpului de lucru al specialiștilor în vigoare pentru efectuarea cercetărilor la anticorpi anti-HIV și alte activități (lucrul organizatorico-metodic, participarea la seminare, iluminarea sanitară, efectuarea elaborărilor statistice etc.).
- Medicii de laborator necesită o pregătire specială în domeniul diagnosticului de laborator al infecției HIV/SIDA la începutul activității și ulterior în cadrul instituțiilor și a facultăților de perfecționare cu testarea nivelului profesional peste fiecare cinci ani. În afară de aceasta, medicii de laborator trec o pregătire specială înainte de a intra în exercițiul funcțiilor sale la locul de muncă în laboratorul de referință.
- Specialiștii cu studii medii necesită o pregătire specială pe diagnosticul de laborator al infecției HIV/SIDA în cadrul unor cicluri de perfecționare, organizate la școlile de perfecționare a lucrătorilor medicali cu studii medii cu atestarea nivelului profesional la fiecare cinci ani. Înainte de a-și începe activitatea, ei sunt instruiți la locul de muncă în laboratorul de referință sau nemijlocit în laboratorul în care vor activa, dacă există condiții respective (volum suficient de investigații, specialiști cu experiență de muncă și competenți). Acest lucru se efectuează sub conducerea șefului de laborator.
- Pregătirea specialiștilor la locul de muncă include problemele privind regimul antiepidemic și tehnica securității la efectuarea investigațiilor la SIDA, metodele de diagnostic de laborator al infecției HIV/SIDA aplicate în laboratorul dat, corespunzător, lucrul cu dosarele asigurarea controlului calității investigațiilor etc. Specialistul poate se lucreze de sine stătător după studierea aprofundată a metodelor de lucru și însușirea practică a măsurilor de asigurare a inofensivității.

- În caz de necesitate (implementarea unor metode noi, pregătirea insuficientă a specialistului, încălcările și greșelile comise etc.) specialistul corespunzător poate fi îndreptat pentru pregătire extraordinară în laboratorul Centrului SIDA.
- Fiecare lucrător al laboratorului activează în corespundere cu sarcinile și obligațiile stipulate în Fișa postului aprobată de conducătorul instituției.

4.2.2.2. Aparataj și utilaj necesar

- Laboratoarele și secțiile de diagnosticare a SIDAei se dotează cu spectrofotometre, aparate de spălare a plăcilor, incubatoare pentru plăci, dozatoare automate mono- și multicanale de diferit volum, termostate, frigidere, autoclav, dulap de sterilizare etc. Laboratorul de referință se dotează cu un șeiker pentru imunoblot. Toate aparatele se utilizează și se mențin conform cerințelor producătorului expuse în manual; se mențin sub supraveghere tehnică de către specialiștii corespunzători și sunt periodic verificate. Pentru protejarea de ardere, ieșirea din funcție a pieselor electronice ale aparatelor, precum și în scopul excluderii varierii indicilor aparatelor de măsurare, alimentarea cu energie electrică trebuie să fie permanentă. Se interzice de a utiliza aparatele fără împământare.
- **Dozatoarele automate** sunt instrumente de bază, deoarece orice incorectitudine influențează nefast asupra rezultatelor. Setul dozatoarelor trebuie să corespundă diapazonului de cercetări și să fie întărit după specialistul corespunzător. Ele sunt supuse verificării metrologice și calibrării semestriale. În timpul efectuării investigațiilor fiecare operațiune cu folosirea dozatorului este controlată vizual pentru de a ne sigura că nu s-au comis greșeli la măsurarea volumului serului de sânge sau reactivului (de exemplu, în legătura cu fixarea slabă a conului, pătrunderea în con a bulelor de aer etc.).
- ***Aparatajul pentru spălare.*** Spălarea insuficientă și necalitativă a plăcii poate duce la colorarea nespecifică a conținutului godeurilor cu obținerea unor rezultate falspozitive. Spălătoarele necesită o deservire profilactică oportună pentru a asigura calitatea spălării. După terminarea lucrului, pentru a evita depunerea sărurilor din soluțiile-tampoane folosite și pentru a exclude obturarea canalelor capului de spălare spălătorul trebuie să fie spălat zilnic și intensiv cu apa distilată. Uniformitatea spălării poate fi verificată prin folosirea substanțelor colorante.
- **Dosarele și registrele de evidență** se introduc conform nomenclatorului aprobat. Se utilizează forme de evidență medicală aprobate prin ordinul Ministerului Sănătății. Registrele pentru evidența investigațiilor efectuate se păstrează pe parcursul perioadei stabilite, ceea ce oferă posibilitatea de a deține date retrospective cu privire la orice pacient

examinat, precum și la tipul, lotul, data expirării test-sistemei folosite, tehnicianul, care a efectuat reacția, corectitudinea calculării indicilor reacției, cut-off-ului, corectitudinea evaluării rezultatului reacționării serului cercetat și alte condiții în care s-au efectuat investigațiile. Înregistrările se efectuează riguros și exact. Se interzice corectarea numerelor de înregistrare în raportul «Indicele densităților optice în reacția imunoenzimatică la anticorpi anti-HIV», precum și a indicilor densității optice înregistrate manual în registrele persoanelor examinate, a înregistrărilor rezultatelor investigațiilor efectuate. Dacă este necesar de a corecta aceste date, fiecare rectificare se aprobă de către șeful de laborator cu indicația «corectare verificată». Toate registrele sunt cusute, semnate de conducătorul instituției cu aplicarea ștampilei.

4.2.2.3. Pregătirea probelor de sînge pentru investigație la anticorpi anti-HIV. Recepția probelor de sînge se efectuează de către registrator medical sau felcer laborant. Registratorul medical controlează: corectitudinea completării formularului de însoțire, prezența datelor necesare despre persoanele examinate, data colectării sîngelui; corespunderea cantității și numerotației probelor sanguine datelor corespunzătoare din formularele de însoțire; corespunderea termenului de păstrare a probelor sanguine cerințelor în vigoare; calitatea probelor: lipsa creșterii bacteriene, hemolizei pronunțate, hillozei, volumul necesar (nu mai puțin de 2,5-3 ml de ser).

4.2.2.4. Rebutarea probelor de sînge. Se trec la rebut eșantioanele de sînge cu termenul expirat, cu creștere bacteriană, hemoliză și hilloză pronunțată, cu numere incorecte și scrise neclar, probele care nu sunt indicate în formulare și în alte cazuri de necorespondere a calității cerințelor pentru efectuarea investigației la testul ELISA. Toate cazurile de rebut se înregistrează în Registrul de evidență a rebutului (f. SIDA Nr 22/e Registru de înregistrare a rebutului). Încălcările depistate se aduc la cunoștința medicului-laborant care înregistrează cazul de rebut în registru și pregătește informația corespunzătoare pentru conducătorul instituției medicale respective (scrisoare de serviciu, notă de telefon etc.). Despre toate cazurile de rebut se familiarizează conducătorul instituției din care au fost expediate mostrele rebutate prin scrisoare oficială.

4.2.2.5. Înregistrarea. Fiecare lot de sînge însoțit de un formular de însoțire în două exemplare, se înregistrează în «Registru de evidență a îndreptărilor» (f. SIDA Nr 17/e Registrul de înregistrare a îndreptărilor probelor de sînge ale contingentelor de risc și altor contingente pentru investigație la anticorpi anti-HIV), prin dotarea fiecărei îndreptări cu cod special. Prima literă a codului poate să fie A, D, K. Litera „A” indică, că mostrele aparțin persoanelor în afară de donatori de sînge; litera „D” – donatori de sînge; litera „K” se utilizează în laboratorul Centrului SIDA pentru mostrele de sînge pozitive ELISA la anti-HIV expediate din laboratoarele diagnostice teritoriale. Cifra după litera A, D sau K prezintă numărul de ordin al îndreptării (de la începutul anului). În cazul cînd se

codifică îndreptarea comună pentru mai multe mostre de sânge, atunci acest cod se referă la toate mostrele din listă, iar pentru distingerea fiecărei mostre din lista, fiecare mostră se codifică cu codul comun pentru toată lista și, prin bară, cu numărul ei în lista respectivă, care este scris și pe eprubeta respectivă (de ex., nr. A-3455/6: cifra 3455 indică numărul îndreptării, iar cifra 6 – numărul de mostră în îndreptare cu codul 3455). Acest cod al fiecărei probei asigură confidențialitatea persoanelor testate. Numărul și data înregistrării se indică pe ambele exemplare, pe fiecare foaie și pe eprubete. Primul exemplar al îndreptării se păstrează în registrul corespunzător, iar al doilea se eliberează instituției respective cu rezultatul investigației. Loturile înregistrate ale probelor sanguine se instalează în suport cu 96 de godeuri, luând în considerare amplasarea probelor de control.

4.2.3. Metoda imunoenzimatică (ELISA).

Testele ELISA se utilizează în activității de supraveghere epidemiologică a infecției HIV/SIDA în teritoriul țării, asigurarea securității hemotransfuziilor, profilaxia transmiterii materno-fetale, diagnosticul individual al infecției.

4.2.3.1. Cerințele tehnice la testele ELISA utilizate în Republica Moldova. Testele ELISA utilizate în activități de supraveghere epidemiologică a infecției HIV/SIDA, asigurarea securității hemotransfuziilor, profilaxia transmiterii materno-fetale și diagnosticul individual al infecției trebuie să corespundă următoarelor cerințe:

- 1) Testul imunoenzimatic pentru depistarea simultană a anticorpilor anti-HIV1 (grupul M și O), anti-HIV2 și a antigenului HIV1 în ser sau plasmă umană;
- 2) Placă de microtitrare cu Format de microplacă 96 godeuri, demontabilă, divizată în 12 barete câte 8 godeuri.
- 3) Bazat pe metodă imunoenzimatică (ELISA)
- 4) Numărul de martori de control nu mai mult de 6 pentru fiecare lot de lucru;
- 5) Sensibilitate:
 - Pentru anticorpi anti-HIV 1/2 evaluată conform cerințelor CE: 400 mostre confirmate ca pozitive HIV1 - 100%; inclusiv 40 non-B subtipuri; reprezentând toate subtipurile HIV1; cel puțin trei mostre pentru fiecare subtip; 100 mostre confirmate ca pozitive HIV2 – 100%, precum și evaluată pe 20 paneluri standardizate de seroconversie);
 - Pentru antigenul p24 al HIV-1: până la 50 pg/ml.
- 6) Specificitate: cel puțin 99,9% evaluată pe donatori de sânge neselectați conform cerințelor CE (5000 donatori neselectați, 200 pacienți clinici, 100 mostre cu posibilă cros-reactivitate (RF+, cu markeri de virusi, femeile gravide, etc.);

- 7) Termenul de valabilitate: către ziua de recepționare de la furnizorul nu mai puțin de 90% de timp de la data de producere a testului indicată în certificatul analitic al producătorului până la expirarea termenului de valabilitate pentru fiecare lot (serie) de preparate;
- 8) Certificare: Certificat ISO pentru IVD, Certificat CE, marcă CE fiecare trusă și instrucțiune atașată la kit.
- 9) Preparatul diagnostic să fie înregistrat în Republica Moldova.
- 10) Prezentarea instrucțiunii originale la test cu traducere în limba de stat.

4.2.3.2. Cerințele la realizarea lotului de lucru ELISA pe mostre de sânge (ser, plasmă).

1) Efectuarea reacției ELISA.

- Reacția ELISA se efectuează zilnic de către laborant, felcer laborant. Lucrul se realizează sub controlul medicului de laborator (medic bacteriolog) care va evalua reacția. Lucrul se începe cu completarea formularului f. SIDA Nr 10/e „Raportul indicilor densității optice în reacția imunoenzimatică la anticorpi anti-HIV”.
- Mostrele de sânge care au fost congelate se supun centrifugării la 1000-1500 rpm timp de 5 min.
- Toate mostrele se investighează sub codul atribuit la înregistrarea. În fiecare pătrat al protocolului se înscrie codul serului cercetat. La completarea formularului laborantul controlează încă o dată calitatea fiecărei probe și, la necesitate, împreună cu medicul de laborator, trece la rebut probele necalitative.
- Toate etapele reacției se efectuează în strictă corespundere cu instrucțiunea la trusă. Este necesar de a monitoriza temperatura în salonul de lucru și în termostat (incubator) conform fișelor de evidență, corectitudinea pregătirii reactivelor și diluării probelor sanguine, de a respecta strict termenul de incubare la diferite etape, numărul spălărilor plăcii etc. Cu o atenție deosebită se efectuează procedura de transferare a serurilor sanguine în godeurile corespunzătoare ale plăcii, evitând pășirea unor godeuri sau distribuția dublă a eșantioanelor într-un godeu. Este necesar de a lucra cu atenție cu dozatoarele automate, evitând stropirea componentelor și nimerirea picăturilor mici în godeurile vecine. Se interzice folosirea reagenților din alte loturi de preparate diagnostice, mai ales din preparate de alt tip. Este obligatorie introducerea în fiecare lot de lucru a mostrelor martori (de control) din trusă utilizată, conform cerințelor instrucțiunii la test.
- După terminarea reacției, se efectuează citirea densității optice a fiecărui godeu cu ajutorul cititorului pentru plăci la lungimea de undă indicată în instrucțiune.

2) Validarea reacției ELISA. Reacția imunoenzimatică este validată de către medic, care verifică corespunderea indicilor DO martorilor de control

cerințelor instrucțiunii la trusa folosită. Inițial, reacția fiecărui ser este evaluată vizual după prezența colorației godeului, ulterior, în mod obligatoriu - după indicii densității optice indicate de spectrofotometru. Reacția se apreciază ca validă, dacă sunt îndeplinite toate cerințele producătorului privind indicii de validare. Loturile de lucru care nu îndeplinesc cerințele de validare a producătorului se apreciază că neconforme, lotul de lucru se rebutează, investigația se repetă.

3) Evaluarea rezultatelor testării mostrelor de sânge cercetate. Rezultatul testării se evaluează conform cerințelor instrucțiunii la testul utilizat. Ea poate fi evaluată ca pozitivă (reactivă), suspectă sau negativă, în corespundere cu cerințele instrucțiunii la test-sistema aplicată. În cazul când în instrucțiune lipsește indicația despre «zona gree» (zona de reacționare suspectă), ea se apreciază cu 10% mai puțin decât cut-off-ul (pentru test-sistemele de tip concurent - corespunzător mai mult, decât cut-off-ul). Probele testate care se referă la «zona gri» se evaluează ca suspecte. Mostrele pozitive (reactive) și cele suspecte se supun testării repetate conform cerințelor instrucțiunii și algoritmului de testare (vezi mai jos).

4) Înregistrarea rezultatelor investigației și eliberarea lor. Rezultatele investigației probelor inițiale, precum și ale celor repetate, se înscriu de către medic în registrul corespunzător în care sunt atașate primele exemplare ale îndreptărilor de însoțire, indicându-se metoda și data efectuării investigației și se semnează. Rezultatele pentru probele sanguine nereactive (negative) se eliberează instituției respective. Se folosește exemplarul doi al îndreptării sau formularul individual. Rezultatele negative, în mod obligatoriu, se confirmă prin aplicarea ștampilei laboratorului care conține informația privind denumirea instituției, laboratorului, rezultatul testării (anticorpii anti-HIV 1/2 nu au fost depistați) data eliberării rezultatului, semnătura șefului laboratorului. Rezultatul se semnează de către șeful de laborator. Mostrele de sânge cu rezultate pozitive (reactive) și suspecte se supun investigației de triere conform cerințelor expuse mai jos.

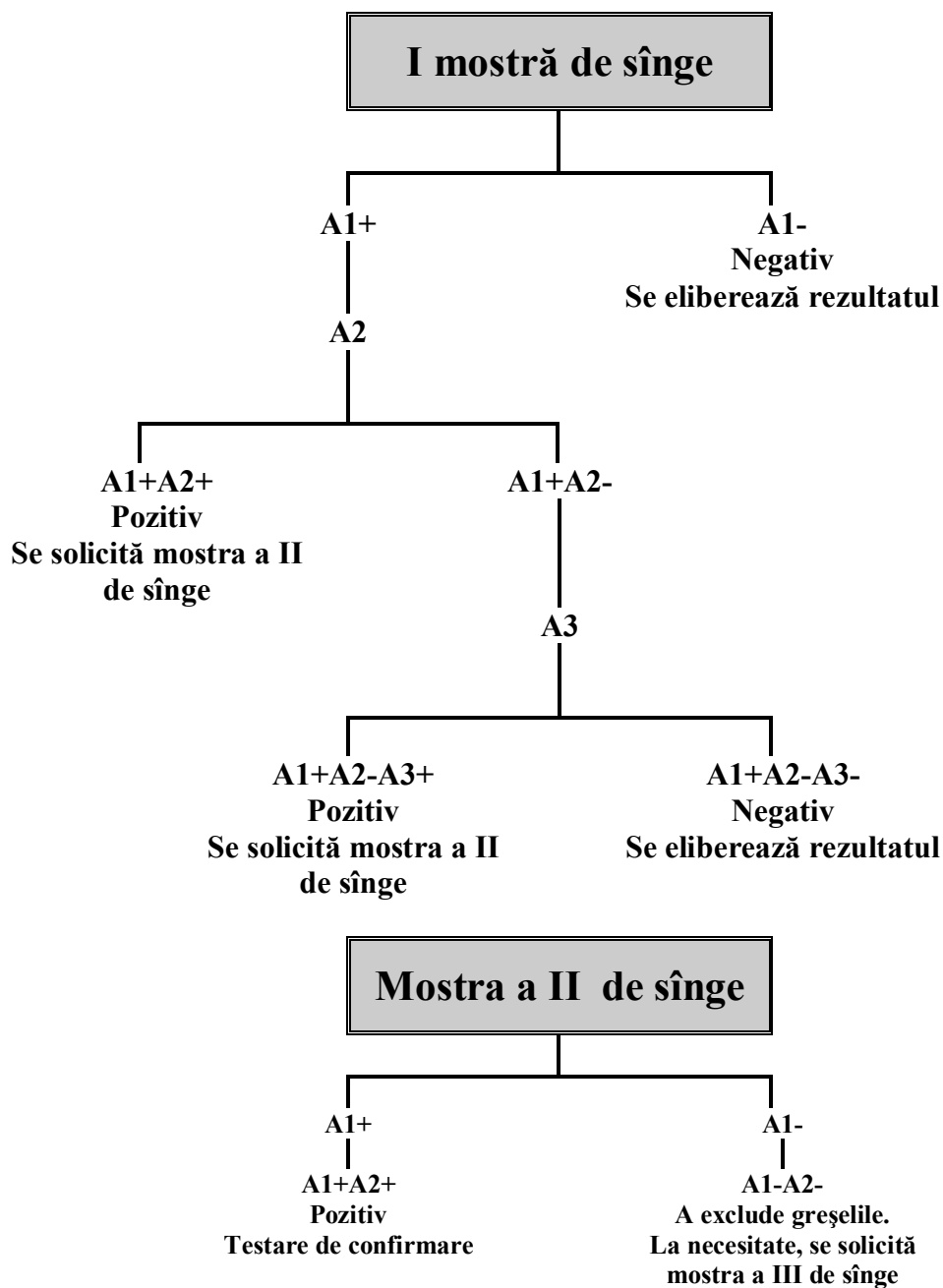
5) Cerințele la efectuarea investigației de triere și confirmare a infecției HIV 1/2 a probelor de sânge ELISA-pozitive și suspecte la anticorpi anti-HIV. Strategia și algoritmul testării. Investigația de triere a mostrelor de sânge inițial reactive (pozitive, suspecte) se efectuează în scopul excluderii rezultatului pozitiv obținut la testare inițială ELISA.

- Toate probele de sânge cu rezultat pozitiv și suspect la testarea inițială în ELISA se înregistrează în **f. SIDA Nr 20/e «Registrul de înregistrare a investigațiilor repetate la anticorpi anti-HIV»**.
- Testarea mostrelor de sânge la anticorpi anti-HIV se efectuează în conformitate cu Strategia nr. 3 recomandată de UNAIDS și OMS (fig. nr. 2). Luând în considerație, că infecția HIV în țară se află în stadiul

de epidemie concentrată, preponderent în grupele UDI, și este joasă în populația generală, pentru excluderea rezultatelor fals-pozitive obținute la testare ELISA, este obligatorie confirmarea infecției HIV1 sau HIV2 cu test de confirmare imunoblot.

- Testarea de triere și de confirmare se efectuează conform strategiei nr. 3 recomandate de UNAIDS și OMS (fig. Nr. 1) și algoritmului prezentat la figura nr. 2.
- Dacă eșantionul testat, cu reacția ELISA inițial pozitivă sau suspectă, aparține donatorului de sânge, atunci cu materialul biologic se procedează conform algoritmului aprobat [13].
- Dacă eșantionul aparține unei persoane din alt contingent, în exemplarul II al îndreptării destinate eliberării rezultatului se indică, că rezultatul testării se reține.
- Testarea ELISA continuă efectuarea conform cerințelor instrucțiunii producătorului test-sistemului utilizat. Dacă producătorul indică, că, la obținerea rezultatului inițial reactiv investigația se repetă în duplicat în același test-sistem, atunci la etapa „A1” testarea se repetă de două ori.
- Etapa „A2” se efectuează cu utilizarea testului ELISA „combo” alternativ (produs de alt producător).
- Dacă la etapa „A2” a fost obținut iarăși rezultat pozitiv (suspect), atunci mostra se evaluează ca ELISA-pozitivă (suspectă), se solicită mostra a II de sânge de la persoana respectivă.
- Dacă la testarea „A2” a fost obținut rezultat negativ, mostra se supune testării „A3” cu alt test-sistem (al treilea test „combo” ELISA, sau aglutinare pasivă, test rapid pe sânge). Dacă la aceasta testare iarăși a fost obținut rezultat pozitiv (suspect), atunci el se evaluează ca ELISA-pozitiv (suspect). Dacă la testarea a treia, ca și la cea de a doua, rezultatul a fost negativ, atunci acesta se evaluează ca negativ la anticorpi anti-HIV și acest rezultat se eliberează instituției corespunzătoare, conform legislației în vigoare [9].
- În cazurile neclare, la obținerea rezultatelor discrepante, la obținerea indicilor joase DOser/cutt off etc. se efectuează investigația ELISA la antigenul p24 al HIV1 și testarea molecularo-genetică (PCR). Concluzia privind rezultatul testării se efectuează în baza rezultatelor tuturor testărilor.
- Eșantioanele sanguine cu reacția ELISA inițial pozitivă sau suspectă se stochează la temperatura -20 °C și se păstrează pînă la definitivarea rezultatului testării la SIDA a pacientului dat. Instituției medicale corespunzătoare i se transmite următoarea informație: «Rezultatul investigației sîngelui la anticorpi anti-HIV se reține». În acest caz, se solicită proba a doua de sânge.
- Serurile de sânge confirmate ca pozitive se stochează în bancul serurilor confirmate ca pozitive și să păstrează permanent la -40 °C (și mai joase).

Figura nr. 2. Strategia și algoritmul testării mostrelor de sânge la anticorpi anti-HIV în scop de diagnosticare



A = Testare
 1,2,3 = Ordinea de testare cu diferite teste
 + = Reactiv
 - = Nereactiv

- Probele de sînge secundare se înregistrează conform ordinii stabilite. În afară de aceasta, în registrul de evidență a investigațiilor repetate f. SIDA Nr 20/e se indică «Proba a doua» (a treia, a patra). Testarea lor la anticorpi anti-HIV se efectuează de două ori în test-sisteme de diferit tip. La obținerea rezultatului pozitiv/suspect ele se înregistrează în registrul f. SIDA Nr 21/e „Registrul de înregistrare a investigațiilor de confirmare la anticorpi anti-HIV” și se supun investigației de confirmare. Obținerea rezultatului negativ la eșantioanele care aparțin persoanelor cu reacția ELISA pozitivă la proba inițială denotă că prima și cea de a doua probă aparțin diferitor persoane. E necesar de a exclude comiterea oricărei greșeli la diferite etape de lucru, începînd cu colectarea sîngelui și la toate etapele ulterioare. La necesitate se solicită proba a treia de sînge și din nou se testează nu mai puțin de două ori în test-sisteme de diferit tip.
- Proba a doua de sînge se solicită printr-o scrisoarea de serviciu în numele conducătorului instituției medicale corespunzătoare.
- Probele de sînge repetate solicitate de laboratoarele diagnostice se expediază din IMSP și alte instituții medico-sanitare însoțite de formularul SIDA Nr 3/e „Îndreptare repetată a serului de sînge pentru investigație la HIV/SIDA”.
- În laboratoarele teritoriale mostrele de sînge ELISA-pozitive (I și II) se stochează la temperatura -20°C (în congelator) și se transportă de urgență în laboratorul Centrului SIDA pentru investigația de confirmare însoțite de formularul SIDA Nr 11/e „Îndreptare în laboratorul de referință a probelor de sînge pozitive la anticorpi anti-HIV din laboratorul de diagnosticare a SIDAei”.

4.2.4. Metoda de confirmare Imunoblot

Testele de tip imunoblot se utilizează în cadrul diagnosticului individual pentru confirmarea-infirmarea diagnosticului de laborator al infecției HIV1 sau HIV2. Testul Imunoblot în Republica Moldova se efectuează în laboratorul de diagnosticare a HIV/SIDA al CNSP, Centrului SIDA.

4.2.4.1. Cerințele tehnice la testele Imunoblot utilizate în Republica Moldova. Testele Imunoblot trebuie să corespundă următoarelor cerințelor:

Test Imunoblot HIV1:

- Test imunoblot destinat confirmării infecției HIV1 prin detecția anticorpilor anti-HIV1 în ser sau plasmă sanguină umană
- Bazat pe proteine naturale lizate ale HIV1;
- Stripuri de nitroceluloză conținînd proteine constitutive ale HIV1 (p17/18, p24/25, p34, p40, gp41, p52, p55, p68, gp110/120, gp160);
- Kitul conține plăci (tăvițe) de unică folosință cu compartimente pentru fiecare strip de nitroceluloză pentru realizarea reacției, toți

reactivii necesari pentru utilizarea testului

- Control intern anti-Ig umane
- Sensibilitate: 99,5% evaluată conform cerințelor CE;
- Specificitate: 100% evaluată conform cerințelor CE;
- Termenul de valabilitate: către ziua de recepționare de la furnizor nu mai puțin de 90% de la data de producere a testului indicată în certificatul analitic al producătorului până la expirarea termenului de valabilitate pentru fiecare lot (serie) de preparate;
- Certificare: Certificat ISO pentru IVD, Certificat CE, marcarea CE fiecare trusă și instrucțiune atașată la kitul.
- Preparatul diagnostic să fie înregistrat în Republica Moldova.
- Prezentarea instrucțiunii originale la test și traducerea în limba de stat.

Test Imunoblot HIV2:

- Test-sistem imunoblot pentru detecția anticorpilor anti-HIV2 în ser sau plasmă sanguină umană;
- Bazat pe proteine naturale lizate ale HIV2;
- Stripuri de nitroceluloză conținând proteine constitutive ale HIV2 (gp140, gp105/125, p68, p56, gp36, p34, p26, p16);
- Kitul conține plăci (tăvițe) de unică folosință cu compartimente pentru fiecare strip de nitroceluloză pentru realizarea reacției
- Control intern anti-Ig
- Sensibilitate: Nu mai puțin de 99%; evaluată conform cerințelor CE;
- Specificitate: 100% evaluată conform cerințelor CE;
- Termenul de valabilitate:
- Către ziua de recepționare de la furnizorul nu mai puțin de 90% de timp de la data de producere a testului indicată în certificatul analitic al producătorului până la expirarea termenului de valabilitate pentru fiecare lot (serie) de preparate;
- Certificare: Certificat ISO pentru IVD, Certificat CE, marcarea CE fiecare trusă și instrucțiune atașată la kitul.
- Preparatul diagnostic să fie înregistrat în Republica Moldova.
- Prezentarea instrucțiunii originale la test și traduse în limba de stat.

4.2.4.2. Cerințele la realizarea lotului de lucru imunoblot

1) Efectuarea investigației Imunoblot

- Testările de confirmare se efectuează în laboratorul Centrului SIDA;
- Testării imunoblot se supun mostrele de sânge prelevate, la solicitarea laboratoarelor diagnostice, la persoanele pentru care au fost obținute rezultate pozitive la anti-HIV la testarea primei mostre de sânge.
- Investigația imunoblot se efectuează pe mostre nominale ale persoanelor pozitive ELISA la testare pe două mostre diferite de

sînge.

- Reacția Imunoblot se efectuează de către medic.
- Înainte de testare toate mostrele de sînge se centrifughează la 1000 rpm timp de 5 min.
- Lucrul se începe cu completarea formularelor f. SIDA Nr 13-1/e „Raportul investigației de confirmare a probelor de sînge la anticorpi anti-HIV-1 în testul western blot” și f. SIDA Nr 13-2/e „Raportul investigației de confirmare a probelor de sînge la anticorpi anti-HIV-2 în testul western blot”.
- Toate etapele reacției se efectuează în strictă corespundere cu instrucțiunea la trusă.
- Validarea lotului de lucru și citirea rezultatelor testării mostrelor de sînge testate se efectuează conform cerințelor instrucțiunii la test de 2 specialiști, de obicei, șef de laborator și medicul care a efectuat lotul de lucru. Evaluarea rezultatelor testului imunoblot se efectuează, utilizînd criteriul de pozitivitate recomandat de OMS.

2) Înregistrarea și eliberarea rezultatelor investigației de confirmare.

- Rezultatele testării de confirmare se introduc în registrul cu primele exemplare de îndreptare (f. SIDA Nr 1/e și 2/e).
- La obținerea rezultatului pozitiv imunoblot pentru persoana respectivă se completează formularul f. SIDA Nr 14-1/e „Raport cu privire la confirmare de laborator a unui caz nou de infecție cu virusul HIV-1” sau f. SIDA Nr 14-2/e „Raport cu privire la confirmare de laborator a unui caz nou de infecție cu virusul HIV-2” care se prezintă vicedirectorului instituției de profil.
- La obținerea rezultatelor nedeterminate sau negative datele privind persoane respective cu toate rezultatele investigațiilor de laborator se prezintă în secția epidemiologie SIDA al Centrului SIDA sau în secția de consiliere și testare voluntară (pentru persoanele consiliate înainte de testare în aceasta secție).
- Laboratorul nu eliberează datele privind rezultatele testării de confirmare persoanelor investigate.
- Persoanele cu rezultat nedeterminat la testare imunoblot se supun investigației cu utilizarea tehnicilor de biologie moleculară (PCR).

4.2.4.3. Diagnosticul infecției HIV-infecției HIV la copiii pînă la vîrstă de pînă la 18 luni.

- Diagnosticul infecției HIV-infecției HIV la copiii pînă la vîrstă de sub 18 luni se bazează pe depistarea structurilor molecularo-genetice ale HIV1 și a antigenului p24 al HIV1 conform cerințelor în vigoare [22]. Mostrele de sînge ale copiilor ≤ 18 luni expediate în laboratoarele diagnostice SIDA se supun testării cu un test ELISA de tip „combo” care depistează concomitent anticorpii anti-HIV 1/2 și

antigenul p24 al HIV1 cu sensibilitate analitică nu mai joasă de 50 pg/ml. Investigația se efectuează conform algoritmului descris în compartimentul 4.2.3.2 (testarea primei probe de sânge).

- La obținerea rezultatului pozitiv cu primul test ELISA investigația se petrece cu alt test ELISA. Paralel se efectuează testarea la antigenul p24 și PCR.
- Mostrele de sânge ale copiilor ≤ 18 luni expediate în laboratoarele de diagnostice SIDA teritoriale, care nu dispun de teste la Ag p24, se supun testării cu un test ELISA de tip „combo” care depistează concomitent anticorpii anti-HIV 1/2 și antigenul p24 al HIV1 cu sensibilitate analitică nu mai joasă de 50 pg/ml. Investigația se efectuează conform algoritmului descris în compartimentul 4.2.3.2 (testarea primei probe de sânge). La obținerea rezultatului pozitiv în primul test ELISA investigația se petrece în alt test ELISA. La obținerea rezultatelor pozitive la testare în ambele teste sau în unul din două confirmarea/infirmarea infecției HIV se efectuează prin metode de depistare a Ag p24 și secvenților molecularo-genetice caracteristice HIV (prin PCR).

4.2.5. Cerințele la organizarea testărilor rapide la infecția HIV în Republica Moldova

În Republica Moldova, în conformitate cu instrucțiune în vigoare,” [35], testele rapide se utilizează în următoarele activități:

1) Determinarea rapidă a stării HIV a gravidelor internate la naștere, care din anumite motive nu au fost examinate pe perioada sarcinii, în scop de luare a deciziei privind administrare urgentă a curei de terapie profilactice ARV;

2) Efectuarea investigațiilor în cadrul supravegherii epidemiologice de sentinelă la realizarea măsurilor prevăzute de „Programul Național de profilaxie și control al infecției HIV/SIDA și infecțiilor cu transmitere sexuală pe anii 2006-2010”;

3) Efectuarea testărilor în serviciul de consiliere și testare voluntară.

4.2.5.1. Cerințele generale la organizarea testărilor rapide

- Instruirea privind utilizarea metodelor rapide de testare la infecția HIV se realizează la baza laboratorului CNSP, Centrului SIDA. Instruirea se efectuează de către specialiști ai acestui laborator la seminarele respective, precum și la locul de muncă.
- Prelevarea și testarea mostrelor de sânge se efectuează de specialiști medicali. Prelevarea și testarea rapidă a mostrelor de salivă pot fi efectuate de către voluntari din organizații non-guvernamentale, pregătiți în mod special, inclusiv realizarea practică a testării, pe baza laboratorului de referință sus numit.
- Se instruiesc specialiștii din cadrul laboratoarelor și secțiilor de

diagnosticare SIDA, care realizează testările de laborator în scop de supraveghere epidemiologică, specialiști din laboratoarele de diagnosticare clinică din cadrul instituțiilor medico-sanitare publice republicane, municipale și raionale, în componența cărora funcționează secții obstetrice. Se instruiesc doi specialiști: unul - cu studii medicale superioare și unul - cu studii medicale medii.

- Voluntarii din ONG se instruiesc nemijlocit înainte de inițierea investigațiilor. Aceste instruirii se realizează de către specialiștii laboratorului al Centrului SIDA, CNSP; la necesitate - cu participarea specialiștilor din laboratoarele și secțiile teritoriale de diagnosticare SIDA. Programele de instruire includ compartimentele teoretic și practic. La seminare voluntarii fac cunoștință cu infecția HIV, căile de transmitere, măsurile de profilaxie, cerințele la organizarea regimului antiepidemic în lucrul care urmează să fie realizat și măsurile de securitate personală, precum ei studiază detaliat programul de organizare efectuării a investigației. La lecțiile practice voluntarii însușesc realizarea tehnică de testare a mostrelor biologice cu utilizarea preparatului diagnostic care va fi aplicat în studiul.
- Pentru testările rapide se utilizează testele omologate și înregistrate în Republica Moldova conform cerințelor în vigoare, achiziționate în mod centralizat din sursele bugetare sau din granturi respective. Volumele de preparate achiziționate din sursele bugetare sunt planificate anual (pentru anul viitor), reieșind din situația epidemică, sursele financiare alocate din buget și granturi, în conformitate cu planurile respective aprobate în mod stabilit pentru perioadă de cinci ani. Achizițiunile se realizează prin organizarea tenderilor în conformitate cu legislația în vigoare. Volumele anuale de preparate achiziționate de obicei se divizează în două sau mai multe tranșe, reieșind din termenii stabiliți de studii și termenii de valabilitate a kiturilor.
- Test-sistemele achiziționate sunt recepționate de către Centrul Național de Sănătate Publică, Centrul SIDA. Livrarea kiturilor se efectuează în baza repartizării aprobate de Ministerul Sănătății. Recepționarea preparatelor diagnostice se realizează de către instituțiile respective în conformitate cu cerințele în vigoare.
- Păstrarea preparatelor diagnostice se asigură de către instituțiile care le-au recepționat, în conformitate cu cerințele producătorului indicate pe ambalajul kiturilor și în instrucțiunea la test.
- Responsabilitatea pentru evidența, păstrarea și utilizarea preparatelor diagnostice în limitele termenilor de valabilitate o poartă instituția care le-a recepționat. Instituțiile care au recepționat testele prezintă trimestrial darea de seamă în adresa CNSP, Centrului SIDA despre utilizarea preparatelor în modul stabilit.

4.2.5.2. Cerințele la utilizarea testelor rapide în activități de prevenire a transmiterii verticale a infecției HIV

1) Responsabilități.

- Testarea rapidă a gravidelor internate la naștere în secțiile de obstetrică cu o stare HIV necunoscută se face pe probe de sânge în laboratoarele de diagnosticare clinică din cadrul instituțiilor medico-sanitare publice. Specialiștii, responsabili de organizarea și efectuarea investigațiilor, respectarea regimului antiepidemic și securitatea personalului sunt șefii secțiilor de obstetrică și laboratorului clinico-diagnostic, conform ordinului șefului instituției.
- Specialiștii laboratorului clinico-diagnostic trec o pregătire specială, inclusiv trainingul de efectuare a testului.
- Dacă gravida a fost internată la naștere în timpul zilei, testarea se va face în laboratorul clinico-diagnostic, dacă în timpul nopții sau în zilele de odihnă și de sărbătoare – în laboratorul secției de reanimare.

2) Organizarea lucrului în secția obstetrică. Înregistrarea gravidelor care se internează la naștere cu statusul HIV necunoscut se efectuează într-un registru special, în care se notează următoarele date din buletinul de identitate al gravidei: numele și prenumele gravidei, anul nașterii, adresa la domiciliu, precum și data prelevării mostrei de sânge pentru testare la infecția HIV, rezultatul testării, măsurile luate în cazul obținerii rezultatului pozitiv al testării, semnătura specialistului de gardă și a șefului de secție. Mostra de sânge se expediază în laboratorul clinico-diagnostic însoțită de formularul „SIDA Nr. 2/e” aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății nr. 139 din 28.05.2002. Faptul și rezultatele testării nu pot fi divulgate. Registrul se păstrează în safeu sau într-un dulap ce se încuie cu cheia.

3) Organizarea lucrului în laboratorul de diagnosticare clinică. Într-un registru asemănător, se notează datele privind numărul și data înregistrării mostrei de sânge, numele și prenumele, anul nașterii și adresa la domiciliu a gravidei, precum și denumirea, seria și termenul de valabilitate al preparatului folosit, rezultatul investigației (pozitiv, negativ, suspect), numele și prenumele, funcția și semnătura specialistului ce a efectuat investigația, numele, prenumele și semnătura medicului de serviciu, semnătura șefului de laborator. Faptul și rezultatele testării nu pot fi divulgate. Registrul se păstrează în safeu sau într-un dulap ce se încuie cu cheia. Testarea rapidă se efectuează imediat la recepționarea și înregistrarea mostrei de sânge, respectând cerințele securității biologice. Rezultatul se eliberează la terminarea testării, utilizând formularul „SIDA Nr. 26/e” aprobat prin Ordinul Ministerului Sănătății nr. 139 din 28.05.2002.

4) Cerințele generale la testarea gravidelor la markeri serologici ai HIV. Pentru testările rapide se utilizează testele rapide omologate și înregistrate în Republica Moldova, bazate pe depistarea anticorpilor anti-HIV1 și anti-HIV2 în mostre de sânge prelevate din deget sau din venă. Prelevarea mostrelor de sânge se realizează în conformitate cu cerințele generale pentru aceste proceduri.

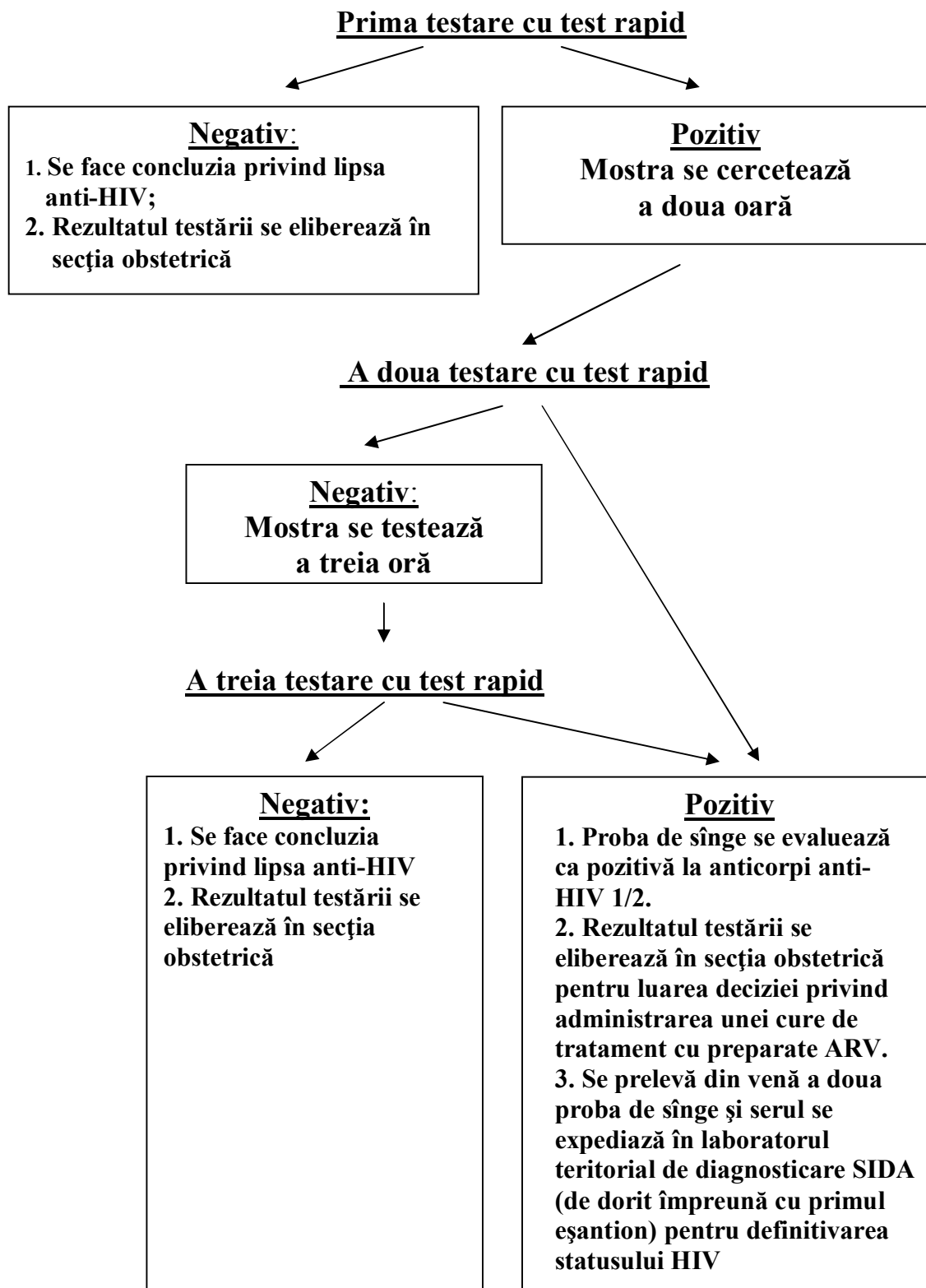
Seturile de diagnostic se păstrează în corespundere cu instrucțiunea anexată la kitul de la producător. În încăperile unde să păstrează kiturile și se efectuează testarea mostrelor sanguine este interzis accesul persoanelor străine.

Pentru excluderea manipulărilor parenterale repetate, se pot testa probele de sânge prelevate în ziua testării pentru alte investigații. Nu se admite încălzirea probelor de sânge destinate testării. Mostrele de sânge contaminate cu oricare reactivi chimici, cu semne de creștere bacteriană, hemoliză pronunțată, precum și cu termenii expirați de valabilitate nu pot fi supuse testării și se rebutează.

5). Algoritmul testării și evaluarea rezultatelor. Testarea sîngelui gravidelor se efectuează după următorul algoritm (fig. 3).

- La obținerea de rezultat negativ a testării primare, proba de sânge se evaluează ca neconținând anticorpi anti-HIV, acest rezultat se eliberează în secția obstetrică;
- La obținerea de rezultat pozitiv se face testarea a doua a sîngelui cu test rapid;
- Dacă rezultatul celei de-a doua testări este de asemenea pozitiv, proba de sânge se evaluează ca reactivă la prezența anticorpilor anti-HIV1 și anti-HIV2.
- Rezultatul se aduce la cunoștința șefului secției obstetrice pentru luarea deciziei privind administrarea curei profilactice de ARV conform protocolului aprobat (3). La gravida respectivă se prelevă din venă a doua mostră de sânge, serul fiind expediat în laboratorul teritorial de diagnosticare a SIDA, e de dorit, împreună cu prima mostră de sânge, pentru definitivarea statusului HIV. În laboratorul de diagnostic investigația la markeri serologici ai HIV se efectuează în conformitate cu algoritmul aprobat (5).
- Dacă rezultatul celei de-a doua testări este negativ, se face cea de-a treia testare cu test rapid. Dacă rezultatul este negativ, proba de sânge se evaluează ca neconținând anticorpi anti-HIV, rezultatul se comunică în secția obstetrică. Dacă rezultatul este pozitiv, proba de sânge se evaluează ca reactivă la anticorpi anti-HIV. Acest rezultat se aduce la cunoștința șefului secției obstetrice pentru luarea deciziei privind administrarea curei profilactice de ARV conform cerințelor în vigoare. La gravida respectivă se prelevă din venă a doua mostră

Figura nr. 3. Algoritmul testării gravidelor la markeri serologici ai HIV cu utilizarea testului rapid



de sânge, serul fiind expeditat în laboratorul teritorial de diagnosticare a SIDA, e de dorit, împreună cu prima mostră de sânge, pentru definitivarea statusului HIV. În laboratorul de diagnostic investigația la markeri serologici ai HIV se efectuează în conformitate cu algoritmul aprobat (testare de triere și confirmare).

- Evaluarea rezultatului testării se efectuează de către medic de laborator împreună cu laborantul care a realizat testarea, concluzia finală se efectuează de către medicul și se semnează de șef de laborator. Toate rezultatele testărilor rapide se comunică șefului secției obstetrice, rezultatele pozitive - în mod de urgență.

4.2.5.3. Cerințele la utilizarea testelor rapide în activități de supraveghere epidemiologică de sentinelă a infecției HIV. După cele sus menționate, în stadiul doi al infecției HIV - de epidemie concentrată - supravegherea epidemiologică se concentrează asupra particularităților comportamentale în grupele de populație cu risc sporit (UDI, lucrători de sex comercial, bărbați ce practică relații sexuale cu bărbați etc.). Pentru realizarea diferitor obiective ale supravegherii epidemiologice de sentinelă a infecției HIV, se utilizează metode ELISA și testări rapide.

După cum a fost menționat, investigațiile rapide la infecția HIV realizate în scop de supraveghere epidemiologică de sentinelă se organizează în conformitate cu ordinul (dispoziția) MS și un program aprobat.

1) Substraturi biologice testate. Testările rapide pot fi realizate pe diferite substraturi biologice: sângele integrat, serul, plasma, sputa și urina. Alegerea substratului biologic pentru testare depinde de obiectivele studiului epidemiologic, strategiile de testare alese, dotare cu test-sisteme diagnostice, prezența în apropiere a unui laborator diagnostic, posibilitate de a antrena în lucru personal medical sau fără studii medicale etc. Luând în considerație titrul mai înalt al anticorpilor în sânge față de alte substraturi biologice, precum și existența și accesibilitatea test-sistemelor comerciale performante, la alegerea tacticii de testare mostrele de sânge sunt mai preferabile.

2) Organizarea testării neasociate la anticorpi anti-HIV a rămășițelor de sânge din seringile colectate în grupe de UDI. Participanții din grupul UDI se informează privind faptul și motivul colectării seringilor utilizate. Seringile care urmează să fie reîntoarse se eliberează participantului în ajunul zilei de colectare a seringilor împreună cu fișa completată cu denumirea organizației și șampilată. Colectarea seringilor utilizate se efectuează concomitent cu eliberarea seringilor noi. La schimbarea seringilor fișa se completează cu datele privind localitatea, numărul grupei de sentinelă, sexul participantului și stagiul consumării drogurilor, data. Fiecare seringă se cifrează cu codul special, care conține codurile respective privind grupul de sentinelă (a, b, c ...), grupul de vîrstă după prima cifră (de

exemplu, grupul de 10-15 ani se codează „10”), stagiul consumării drogurilor (1 an, 2, 3...). Așa dar, marcarea seringii va fi, de exemplu: a,M,20,3 sau b,F,25,7.

Acele seringilor necesită să fie strâns acoperite cu tichii. Seringile se împachetează în sacoșe de polietilenă, pe urmă în cutii (containere) din material etanș. Cutiile se depun în container frigorifer și se expediază în laboratorul în care vor fi testate.

3) Cerințele la organizarea și realizarea testării salivei la anticorpi anti-HIV 1/2.

- Testarea rapidă a salivei poate fi efectuată în cabinete de consiliere și testare voluntară, în activități de supraveghere epidemiologică de sentinelă.
- Investigațiile la anticorpii anti-HIV 1/2 se efectuează la un loc de lucru amenajat cu o masă specială pentru realizarea testului, suprafața căreia se prelucrează cu soluție de dezinfectare după fiecare pacient. Salonul se dotează cu o masă și un scaun pentru operator, un scaun pentru pacient, o tumbă cu sertare sau un dulap pentru păstrarea testelor și consumabilelor, Pe o tumbă de asemenea cu suprafață acoperită cu material prelucrabil cu soluție de dezinfectare se instalează un vas cu soluție de dezinfectare pentru dezinfectarea materialelor utilizate.
- Locul de lucru al operatorului se dotează cu instrucțiune originală a producătorului la testul utilizat tradusă în limba de stat. În conformitate cu cerințele Manualului calității al instituției se elaborează Procedura Operațională Standard (POS) pentru lucru cu testul utilizat. Un compartiment al acestui document include traducerea în limba de stat a instrucțiunii la test al producătorului. La necesitate, POS include o anexă cu descrierea scurtă, schematică, a etapelor de realizare a testului.
- Investigația se efectuează de specialist cu studii medicale superioare sau medii pregătit în problemă. Acest specialist se pregătește la locul de lucru într-o instituție medicală republicană sau trece instructaj nemijlocit la locul de lucru unde vor fi realizate aceste testări de către un specialist pregătit în problemă. Instruirea se documentează conform modului stabilit, sub semnătura celui care a realizat instructajul și celui care a fost instruit.
- La efectuarea testării operatorul se conduce de POS sau de schema scurtă depusă într-o sacoșă transparentă din polietilenă (fail), care se prelucrează cu soluție de dezinfectare la terminarea lucrului.
- Prelevarea mostrelor de salivă se efectuează în conformitate cu cerințele instrucțiunii la test, utilizând accesoriul special din trusă. Înainte de a scoate acest accesoriu din trusă, operatorul îmbracă mănuși de gumă (cauciuc), se spală pe mâini cu săpun sub apă

curgătoare, prelucrează mâinile cu un tampon înmuiat cu alcool etilic de 70 °, după ce prelevă proba. Prelevarea probei cu accesoriul respectiv poate fi realizată nemijlocit de către pacientul, după instruirea detaliată efectuată de operator, dacă acest lucru permite de instrucțiunea la testul utilizat.

- Testarea mostrelor de salivă la anticorpi anti-HIV 1/2 se efectuează în conformitate strictă cu POS elaborată în baza cerințelor Manualului calității și instrucțiunii producătorului la testul utilizat.
- La terminarea timpului de expozitie se efectuează citirea rezultatului testului, care include două etape:

I etapă: validarea testului, care se efectuează conform cerințelor instrucțiunii. De obicei, dispozitivul testului conține zona de control și zona de test. Dacă în zona de control este prezentă o bandă (sau linie, pată, punct), înseamnă că testul a fost realizat corect și testul se evaluează ca valid. Dacă în zona de control aceasta linie lipsește, înseamnă, că controlul nu a trecut, reacția se evaluează ca invalidă și necesită să fie repetată. Fiecare caz de test invalid necesită să fie studiat pentru definitivarea cauzei invalidității. Dintre aceste cauze pot fi numite:

- expirarea termenului de păstrare a truselor;
- temperatura joasă sau înaltă în salonul de lucru, care nu corespunde condițiilor cerute de producător;
- careva neconformități comise la prelevarea mostrei, la realizarea testului, abateri de la cerințele instrucțiunii.

A II etapă: evaluarea rezultatului testării mostrei de salivă investigată. În cazul când testul realizat a fost evaluat ca valid, se efectuează evaluarea rezultatului testării mostrei de salivă respective conform cerințelor POS-ului. De obicei, pot fi obținute cel puțin două variante:

- **rezultat negativ:** pe dispozitiv vedem doar o bandă (punct) în zona controlului și nu este nici o bandă (linie, punct) în zona testului. Persoanei i se eliberează rezultatul: anticorpi anti-HIV 1/2 în mostră de salivă nu au fost depistați.
- **rezultat pozitiv**, când, în afară de bandă (linie, punct) în zona controlului apare o bandă (linie, punct) în zona testului. În așa caz investigația se repetă cu un dispozitiv nou. Dacă rezultatul testării repetate e pozitiv, se face concluzia privind rezultat preliminar pozitiv la testare rapidă a salivei la anticorpi anti-HIV. În acest caz persoanei respective i se comunică, că pentru definitivarea rezultatului testării la anticorpi anti-HIV testarea la infecția HIV necesită să fie efectuată pe proba de sînge și, cu consimțămîntul persoanei, i se dă îndreptare la salonul de proceduri pentru prelevarea mostrei de sînge. În cazul, când la testarea repetată a fost obținut

rezultat negativ, se face a treia testare cu un dispozitiv nou. Dacă la a treia testare a fost obținut rezultat negativ, se face concluzia privind rezultat negativ la anti-HIV 1/2. Persoanei i se eliberează rezultatul: anticorpi anti-HIV 1/2 în mostră de salivă nu au fost depistați. Dacă la a treia testare a fost obținut rezultat pozitiv, procedînd așa cum a fost menționat anterior.

- Unele test-sisteme pot prezenta și **rezultat suspect**, cînd nu poate fi efectuată concluzia definitivă privind rezultat negativ sau pozitiv. În așa cazuri se recomandă evaluarea testului de doi specialiști și dacă rezultatul testului se evaluează ca suspect, investigația se repetă cu un dispozitiv nou. Dacă rezultatul testării repetate e negativ, persoanei i se dă răspuns, că în mostră de salivă anticorpi anti-HIV 1/2 nu au fost depistați. Dacă rezultatul testării repetate se evaluează că suspect sau pozitiv, se face concluzia privind rezultat preliminar pozitiv sau, respectiv, suspect la testare rapidă a salivei la anticorpi anti-HIV. În acest caz persoanei respective se comunică, că testarea la infecția HIV necesită să fie efectuată pe proba de sînge și, cu consimțămîntul persoanei, i se dă îndreptare la salonul de proceduri pentru prelevarea mostrei de sînge.

4) **Calitatea testării mostrelor de salivă la anticorpi anti-HIV** se asigură prin respectarea următoarelor cerințe: testarea se efectuează în condiții care pot asigura cerințele procesului tehnologic și securității biologice; investigațiile se efectuează de personal (medical sau nemedical) pregătit în problemă, inclusiv în realizarea practică a testului; utilizarea test-sistemelor aprobate și înregistrate în țară; asigurarea cerințelor producătorului la transportarea și stocarea preparatelor; respectarea strictă a cerințelor producătorului la realizarea, validarea testului și evaluarea rezultatului testării.

Capitolul 5

SELECȚIA ȘI EVALUAREA TEHNOLOGIILOR DE TESTARE HIV FOLOSITE ÎN SUPRAVEGHEREA EPIDEMIOLOGICĂ A INFECȚIEI HIV

5.1. Recomandările UNAIDS și OMS privind Selecția și evaluarea tehnologiilor de Testare HIV folosite în supravegherea HIV

- Factorii de selecție:
 - Recomandările UNAIDS/OMS cu privire la selectarea ELIA sau testelor rapide
 - Raportul anual al UNAIDS/OMS privind caracteristicile operaționale ale testelor disponibile pentru domeniul de laborator
 - Caracteristicile operaționale ale testelor în țară
 - Condițiile în țară
- Evaluarea testelor selectate în țară
 - Evaluarea testelor în laboratorul național de referință, laboratorul regional și alegerea celor mai performante și convenabile.

Multe țări folosesc o varietate de diferite tehnologii de testare HIV și algoritme de testare. De exemplu, laboratorul național de referință poate utiliza pentru screening un test rapid și un ELISA pentru confirmare, în timp când laboratorul regional poate folosi alte teste rapide decât laboratorul național atât pentru screening cât și pentru confirmare. Din cauza acestor diferențe, este importantă coordonarea și documentarea la nivel național de supraveghere a tuturor tehnologiilor de testare și algoritmilor de testare, care sunt utilizate în țară. În plus, în scopul de a asigura date fiabile și comparabile de supraveghere într-o perioadă mai mare de timp, numărul de tehnologii de testare care sunt folosite într-o țară ar trebui să fie reduse la minimum.

Recomandare. Este important pentru coordonatorul de supraveghere pentru a documenta toate tehnologiile de testare și algoritmii de testare, care sunt utilizate în țară.

5.1.1. Cum se selectează testele

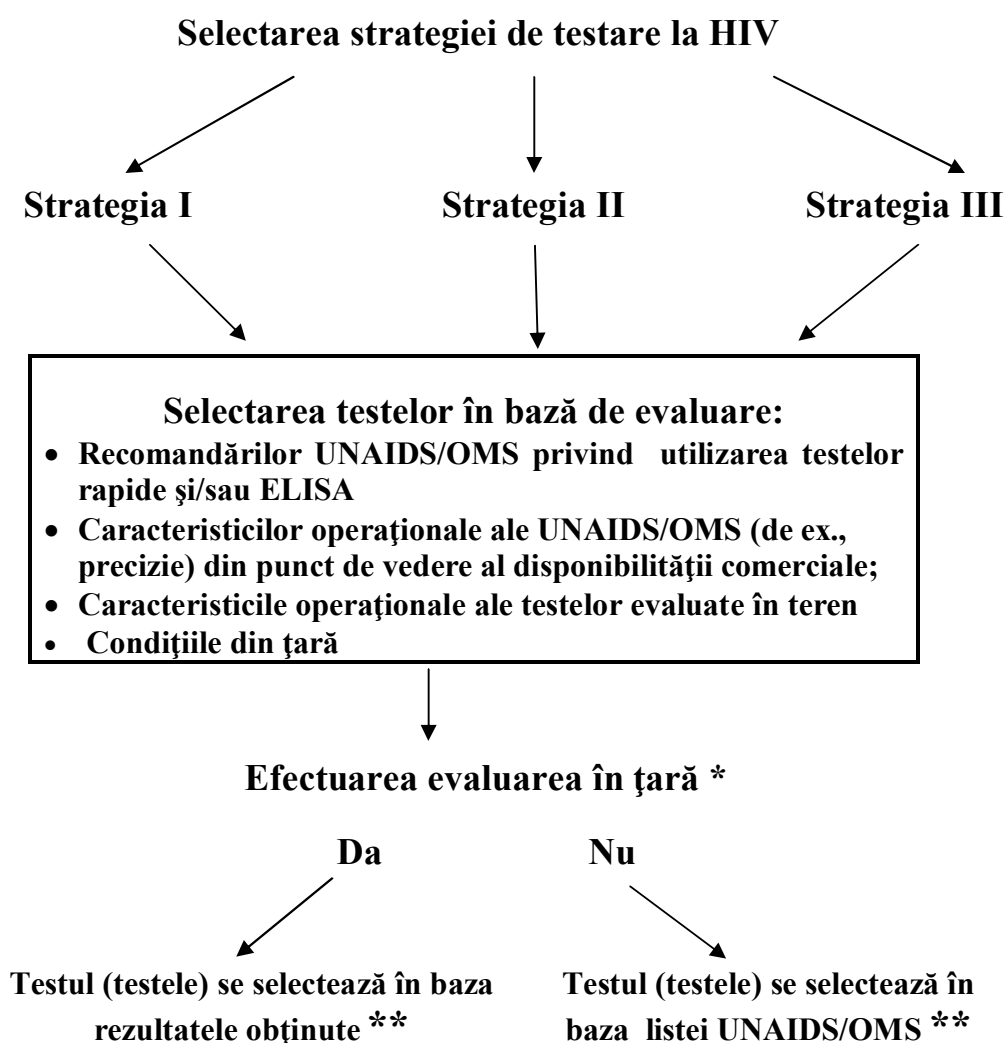
Selectarea tehnologiei adecvate de testare HIV pentru a fi utilizate în țările în curs de dezvoltare poate fi o problemă, deoarece poate să nu fie un grup consultativ tehnic la nivel național care ar putea să analizeze și să evalueze testele disponibile HIV. Prin urmare, decizia privind selectarea testului (testelor) poate fi adesea luată de către o agenție de donator bazată pe cost sau ca urmare a influenței unui producător.

În schimb, în cazul în care infrastructura de laborator la nivel național

este suficientă, țările ar trebui să evalueze performanța de tehnologii de testare HIV în serviciul de laborator al lor. Cu toate acestea, evaluarea tehnologiilor de testare într-o țară poate fi limitată de costurile ridicate ale echipamentelor, lipsa experților tehnici, precum și în legătură cu capacitățile insuficiente pentru a procesa diferite specii de teste și apoi a le transporta în laborator de nivel național.

Dacă nu este posibil a realiza o evaluare în țară, o țară ar trebui să revizuiască factorii de selecție de mai jos și apoi să selecteze fie un test (e) din lista UNAIDS/OMS de teste HIV disponibile în prezent sau a selecta un test în baza evaluărilor, de preferință în regiune, de către o altă sursă independentă, necomercială (Fig. 4).

Figura 4. Strategiile de testare UNAID și OMS



* Determinarea sensibilității și specificității testelor HIV selectate în condițiile de clinică și de laborator.

** Selectați cel mai bun test (e) pentru Strategii II și III, în ordinea de teste.

Recomandare. Înainte de a selecta teste pentru utilizare, în țară ar trebui să fie efectuată evaluarea exactității testelor și caracteristicilor operaționale în acea țară sau, în cazul în care acest lucru nu este posibil, selectarea testelor se efectuează în baza evaluării efectuate de către o sursă independentă, necomercială.

Factorii de selectare. Prima decizie privind alegerea tehnologiilor de testare HIV, care ar trebui să fie luată, este decizia privind formatul de testare care va fi utilizat (ELISA, test rapid sau o combinație a celor două). Apoi, trebuie examinate caracteristicile operaționale ale tehnologiilor de testare în ceea ce privește condițiile în țară: infrastructura de laborator, disponibilitatea personalului calificat de laborator, precum și existența sistemului de asigurare a măsurilor de control al calității.

- **Recomandările UNAIDS/OMS privind selectarea testelor ELISA sau a testelor rapide.** UNAIDS și OMS recomandă teste rapide, în loc de teste ELISA, în zone îndepărtate geografic, zone în care lipsește sau infrastructura de laborator nu este bine dezvoltată și în instituțiile medicale unde se efectuează mai puțin de 100 de teste pe zi. În aceste situații, testele rapide sunt preferate, deoarece acestea se realizează repede și ușor și majoritatea au un termen de valabilitate mai mare decât reactivi pentru ELISA. Testele rapide sunt ideale pentru utilizarea la nivel local din cauza simplității lor și costeficienței relativ mică (în special cheltuielile pentru echipamente și întreținerea echipamentului). UNAIDS și OMS recomandă ELISA pentru zonele cu infrastructura de laborator bine dezvoltată, asigurate cu personal calificat, pentru instituții în care se efectuează 100 sau mai multe teste pe zi, fiind că testele ELISA sunt foarte eficiente pentru testare în serie și ușor de implementat în laboratoare la nivel național sau regional [18].
- **Raportul anual UNAIDS/OMS privind caracteristicile operaționale ale testelor HIV disponibile în comerț.** UNAIDS și OMS publică un raport anual privind caracteristicile operaționale ale testelor disponibile în comerț HIV, care include evaluări privind sensibilitatea și specificitatea ale testelor, ușurința de performanță, adecvare pentru utilizare în laboratoare mici și cost [17]. Copii ale acestui raport pot fi obținute prin contactarea UNAIDS sau de OMS la unaids@unaids.org sau publicatii@who.int. Un test foarte performant se recomandă atunci când cota rezultatelor fals negative și fals pozitive este redusă.
- **Caracteristicile operaționale ale testelor în teren.** Este important de a lua în considerare caracteristicile testelor selectate în țară în care acestea vor fi utilizate. Caracteristicile importante includ ușurința de realizare, cost per test, cerințele de depozitare, termenul de

valabilitate a produsului, echipamentul necesar și întreținerea lui, calificativul personalului, disponibilitatea regulată de teste de la producători [23].

- **Condițiile în țară.** Condițiile în țară care vor influența selectarea testelor include numărul de teste efectuate de zi cu zi, experiența și competența personalului, costurile de teste, infrastructura de laborator, existența unui laborator de referință, de control al calității și a măsurilor de asigurare a calității în laborator, condițiile de depozitare (refrigeratoare controlate), logistica de laborator (de ex., disponibilitatea materialelor, sursa de energie electrică permanentă).

5.1.2. Evaluarea testelor în țară

La selectarea tehnologiilor de testare HIV, testele ar trebui să fie evaluate în țară: 1) să fie determinată sensibilitatea și specificitatea testelor disponibile în comerț și 2) validarea performanțelor testelor la utilizarea diferitor algoritme de testare, bazate pe rezultatele sensibilității și specificității testelor evaluate [24]. Pentru evaluare în țară poate fi utilizată o abordare în trei etape (tab. 6). Prima etapă se desfășoară în laboratorul național de referință pentru a determina sensibilitatea și specificitatea noului test (e) în condiții ideale de laborator. În etapele II și III, speciimenele sunt colectate în perspectivă. În etapa a doua, speciimenele sunt colectate la unele clinici regionale și evaluate în laboratoarele regionale. În a treia etapă, exemplarele sunt colectate și evaluate în condiții de câmp în care acestea vor fi utilizate.

Acest tip de evaluare în trei etape a fost realizat în Honduras și în Uganda [25, 26]. În Honduras, șapte teste rapide au fost evaluate în etapa I, prin testarea a 600 exemplare stocate în laboratorul național de referință. Pe baza sensibilității și specificității, ușurinței de realizare au fost selectate cinci teste, care urmează să fie evaluate în perspectivă, în etapa a II (n = 900). Trei dintre cele cinci teste au fost ulterior evaluate în perspectivă, în etapa a III la spitalele și clinicele rurale. Valorile predictive pozitive și negative au fost calculate pentru diferite algoritme de testare, folosind trei teste pentru a determina, care algoritm de testare va fi cel mai adecvat. O prezentare generală în trei etape pentru o evaluare în țară este prezentată în tabelul 6, cu toate acestea, conturul ar trebui să fie adaptat și extins în dependență de particularitățile statale.

Tabelul 6. Prezentare generală pentru evaluare în țară a tehnologiilor de testarea HIV

Etapa I: Evaluarea retrospectivă a sensibilității și specificității testelor selectate în	• Selectați aproximativ 500 mostre de ser sau plasmă (aproximativ 250 pozitive la anticorpi anti-HIV și 250 negative la anti-HIV) de la exemplare deja colectate și stocate prin congelate (de ex., mostre colectate pe parcurs de activități de supraveghere) sau mostre de
--	--

laboratorul național de referință	sânge stocate la bănci de sânge. • Înainte de evaluare a testelor, a crea un panel de referință incluzând aproximativ 25 mostre pozitive la anti-HIV și 25 negative la anti-HIV, evaluarea competenței tehnicienilor care vor efectua testarea. Tehnicienii efectuează testarea specimenelor selectate de referință, folosind algoritmul actual de testare și testele selectate *. Algoritmul actual de testare ar trebui să fie considerat ca „standard de aur” pentru testele selectate pentru evaluare. Determinați sensibilitatea și specificitatea testelor selectate.
Etapa II: evaluarea de perspectivă a testelor selectate în laboratoarele regionale	• Presupunând performanță adecvată (de ex., sensibilitatea, specificitatea, ușurința de realizare), din testele selectate în etapa I, se efectuează evaluarea de perspectivă a testelor selectate în câteva laboratoare regionale și spitale din țară. Pentru panelul de evaluare ar trebui să fie colectate aproximativ 100 de specimene pozitive la anti-HIV și 200 de specimene negative la anti-HIV (în total 600 - 900 de specimene). • Fiecare specimen ar trebui să fie codificat cu un cod unic, astfel încât ulterior ar putea fi identificat după informații demografice corespunzătoare și specificul site-ului. O metodă posibilă de selecție poate fi următorul model. Aceste specimene confirmate ca pozitive la anti-HIV prin practici curente se supun testării cu testele selectate. Mostrele de sânge ar trebui să fie testate folosind testele selectate, conform instrucțiunilor producătorului și, de asemenea, testate folosind algoritmul de testare. Numai rezultate testării obținute conform algoritmului existent în țară pot fi elaborate persoanei; rezultatele testelor în curs de evaluare nu se eliberează persoanei. • Rezultatele testării HIV obținute prin algoritmul actual de testare ar trebui să fie considerate „standard de aur” pentru testele selectate și algoritmul de testare selectat (e) și ar trebui să fie evaluat pentru a determina sensibilitatea și specificitatea testelor selectate. În bază indicilor de sensibilitate și specificitate a testelor selectate în această etapă, selectați două-trei teste destinate evaluării în etapa III.
Etapa III: evaluarea de perspectivă a testelor selectate în teritorii în cazul în care cel mai probabil acestea vor fi utilizate	• speciemenle de sânge colectate prospectiv în total de la 500-900 de persoane în patru - șase teritorii în care aceste teste vor fi probabil utilizate se supun testării cu testele selectate. Scopul este de a avea cel puțin 50 de probe HIV-pozitive pentru fiecare teritoriu. Acest lucru este cel mai bine de a efectua în zonele cu prevalență sporită a infecției HIV. • Urmări aceleași proceduri de selecție în teritoriile, după cum este descris în Etapa II. • Determinați specificitatea și sensibilitatea testelor selectate și algoritme selectate de testare și să le

	compare cu cele obținute folosind algoritmul actual de testare existent în țară. În baza rezultatelor de evaluare a fiecărui test selectat și algoritmilor de testare selectate, se face recomandarea tehnologiei și algoritmului de testare HIV pentru țară.
--	---

* Tehnologiile de testare care utilizează numai sânge integral sau lichid oral pot fi evaluate numai în etapele II și III [25].

5.2. Selectarea și evaluarea tehnologiilor de testare HIV folosite în supravegherea HIV în Republica Moldova

5.2.1. Selectarea tehnologiilor de testare HIV pentru utilizarea în supravegherea epidemiologică în Republica Moldova se efectuează în baza:

- Recomandărilor UNAIDS/OMS cu privire la selectarea ELISA sau testelor rapide
- Raporturilor anuale ale UNAIDS/OMS privind caracteristicile operaționale ale testelor disponibile pentru domeniul de laborator
- Caracteristicilor operaționale ale testelor în țară
- Disponibilității surselor financiare
- Evaluării testelor selectate

Există un sistem de coordonare și documentare la nivel național a tehnologiilor de testare și algoritmilor de testare, care sunt utilizate în țară. Pentru realizarea acestor activități sunt abilitate:

- Centrul Național de Sănătate Publică, Centrul SIDA, laboratorul de diagnosticare a HIV/SIDA;
- Centrul Național de Sănătate Publică, laboratorul de referință în microbiologie;
- Centrul Național de Transfuzie a Sîngelui.

5.2.2. Principiile de selectare a testelor

În Republica Moldova selectarea testelor pentru utilizare în activități de supraveghere epidemiologică se iau în considerație următorii factori:

- Infrastructura de laborator bine dezvoltată;
- Disponibilitatea personalului calificat de laborator cu studii superioare și medii;
- Dotarea laboratoarelor diagnostice cu echipamente, accesorii, consumabile necesare, surse permanente de energie electrică,
- Asigurarea condițiilor de păstrare a testelor la temperaturi cerute de producătorii.
- Existența sistemului de asigurare a controllui calității.

Se utilizează teste evaluate la nivel național [27] și achiziționate în mod centralizat în conformitate cu legea în vigoare [28].

Luând în considerație cele expuse, selectarea testelor se efectuează reieșind din obiectivele investigațiilor la infecția HIV.

Teste ELISA se utilizează în activități de asigurare a securității hemotransfuzionale, supraveghere epidemiologică și diagnosticul individual al infecției HIV/SIDA.

În activități de supraveghere epidemiologică se utilizează teste ELISA, rapide pe sânge și pe salivă. Teste rapide pe sânge se utilizează în activitățile de profilaxie la transmiterea materno-fetală a infecției HIV. Sunt implementate teste rapide pe salivă în activități de consiliere și testare voluntară.

Capitolul 6

ASIGURAREA CALITĂȚII TESTĂRIILOR DE LABORATOR

6.1. Recomandările UNAIDS/OMS privitoare la asigurarea calității testărilor de laborator și securității biologice

- Asigurarea calității la nivel național
Competența testării
- Asigurarea calității de laborator
Stadiul preanalitic
Stadiul analitic
Stadiul postanalitic
- Securitatea

Repetabilitatea și reproductibilitatea durabilă a testarilor la HIV este o componentă importantă de supraveghere serologică a infecției HIV. Utilizarea testelor foarte performante la HIV încă nu garantează neapărat rezultate veridice de laborator. În perioada de la recepționarea mostrelor până la eliberarea rezultatelor se realizează mai multe procese de lucru în care pot apărea erori [29]. Prin urmare, este importantă monitorizarea permanentă a sistemului de laborator, atât pe plan intern al calității cât și cel extern. Asigurarea calității este un proces dinamic și permanent a unui sistem de monitorizare a veridicității și reproductibilității rezultatelor, care permite a efectua măsuri corective atunci când criteriile stabilite nu sunt îndeplinite.

6.1.1. Asigurarea calității la nivel național

Țările ar trebui să prevadă că laboratoarele de la toate nivelele să participe la un control extern al calității. Laboratorul național de referință, în conformitate cu programul național SIDA, ar trebui să monitorizeze eficiența rețelei de laboratoare participante în controlul extern al calității pentru a identifica orice laborator care ar putea necesita instruire suplimentare sau alte activități de îmbunătățire a sistemului de management.

Cea mai larg utilizată metodă de control extern al calității a unui laborator este încercarea de competență [29]. Laboratorul național de referință ar trebui să trimită la toate laboratoarele care participă în studii un panel de control al calității incluzând aproximativ șase probe pentru a identifica specițiile HIV pozitive și HIV negative. Acest panel trebuie să conțină specițiile HIV-negative și HIV-pozitive (de la extincții mici până la înalte), reprezentând tulpini de HIV care circulă în țară, prelevate în diferite stadii de infecție HIV. Controlul calității se efectuează o dată sau de

două ori pe an. Laboratoarelor din zonele geografice cu infrastructura de laborator limitată, pot fi expediate specimene de picătură de sânge uscată pe hârtie absorbantă, prealabil testat în laboratorul național de referință. Controlul extern al calității în laboratorul național de referință poate fi furnizat de către un laborator independent (de ex., din cadrul unei universități), sau de un program de asigurare a calității al OMS regional.

Un sistem de asigurare a controlului calității poate ajuta la crearea practicilor naționale corecte de laborator cu utilizarea procedurii standard, care va permite, de asemenea, schimbul de informații între laboratoare [29]. De asemenea, este important de a oferi feedback pentru laboratoarele participante în ceea ce privește evaluările lor. Elementele ale sistemului de asigurare a calității ar trebui să fie incluse în procedurile utilizate de către tehnicieni de laborator și alt personal de laborator. Conformitatea cu astfel de programe va spori veridicitatea și acuratețea rezultatelor obținute.

Tările ar trebui să solicite ca toate laboratoarele la toate nivelurile (de ex., laboratorul național de referință, laboratoarele de HIV în spitale, serviciile de transfuzie de sânge și laboratoare private HIV) să participe la un control extern al calității.

6.1.2. Asigurarea controlului calității

Laboratoarele de toate nivelele (național, regional, local) trebuie să aibă programe funcționale de asigurare internă a calității. Fiecare laborator care efectuează testarea la HIV ar trebui permanent să monitorizeze și să evalueze programe de asigurare a calității la etapele preanalitică, analitică și postanalitică a procesului de testare.

6.1.2.1. Stadiul preanalitic. Stadiul preanalitic cuprinde următoarele componente:

- Training
- Securitate de laborator
- Numărul de instruiți ale personalului disponibil și capabil să execute testarea HIV
- Condițiile de colectare, etichetare și expediere a specimenelor
- Pregătirea specimenelor către testare
- Surse și tipuri de probe testate
- Număr de probele testate
- Selectarea truselor de testare
- Datele de expirare a truselor de testare. Kiturile trebuie să fie utilizate înainte de data de expirare, care sunt, de obicei indicate pe partea laterală a ambalajului trusei de testare. Rotația permanentă a truselor în stoc (trusele cu termeni de expirare mai mici se utilizează înainte de termeni de expirare a lor și înainte de truse cu termeni de expirare mai lungi) va duce la o utilizare mai eficientă a truselor livrate.

- Reactivii din trusele de testare la HIV. Reactivii trebuie să fie depozitați la temperatura corespunzătoare specificată în instrucțiunea la test furnizată de către producător. Anumiți reactivi (de ex., conjugatele pentru ELISA) necesită condiții de păstrare cu congelare; alte componente ale trusei de testare pot fi depozitate la temperatura camerei.

6.1.2.2. Stadiul analitic cuprinde însuși procesul de testare. Unele dintre componentele care urmează să fie revizuite de către programul de asigurare a calității include:

- Prelucrarea și depozitarea specimenelor
- Descrierea procedurii operaționale
- Prepararea reactivilor
- Testarea performantă
- Performanța și întreținerea echipamentului (de ex., spectrofotometre, spălătoare pentru plăci)
- Utilizarea corectă a reactivilor
- Includerea mostrelor de control intern de calitate în loturile de testare
- Proceduri de monitorizare a controlului calității

6.1.2.3. Stadiul postanalitic cuprinde toate procedurile realizate după procedura de testare, inclusiv:

- Interpretarea rezultatelor
- Transcrierea rezultatelor, de ex., înregistrarea corectă a rezultatelor în corespundere cu codurile de identificare a mostrelor
- Introducerea datelor în sistemul informațional și de monitorizare (calculator sau pe suport de hârtie)
- Controlul înregistrărilor
- Evaluarea datelor de control al calității.

6.1.3. Proceduri de securitate

Măsurile de siguranță sunt esențiale și ar trebui să fie respectate la toate etapele procesului de testare, de la recepționarea probelor pentru testare și depozitare până la eliminarea deșeurilor cu pericol biologic în așa fel încât să reducă la minimum riscul de infectare la locul de muncă. Măsurile de precauție pentru prevenirea transmiterii HIV și a altor agenți patogeni prezenți în sânge sunt bine definite [30, 31]. Toate deșeurile contaminate în clinicele și în laboratoarele ar trebui să fie decontaminate înainte de eliminare, incluzând speciemenle fluidelor din organism, sticlărie strică, containere cu ace contaminate [32]. Metodele de decontaminare a tuturor deșeurilor contaminate (de ex., autoclavare, dezinfecție chimică, incinerare), ar trebui să fie organizate la locul de lucru. Materialele care sunt decontaminate sau eliminate în afara laboratorului ar trebui să fie

plasate într-un container, care exclude scurgeri, înainte de a le transporta în exteriorul laboratorului.

6.2. Cerințele la asigurarea calității testărilor de laborator la infecția HIV/SIDA în Republica Moldova

Repetabilitatea și reproductibilitatea la HIV este o componentă a calității testării de laborator în cadrul supravegherii serologice a infecției HIV.

În republică este organizată și permanent monitorizată calitatea testărilor de laborator și securității biologice, care permite a efectua măsuri corective în cazurile necesare.

Măsurile de asigurare a controlului intern și extern al calității au fost elaborate în conformitate cu cerințele UNAIDS/OMS.

6.2.1. Asigurarea controlului intern al calității.

Asigurarea controlului intern al calității în fiecare laborator diagnostic se organizează în conformitate cu cerințele Manualului Calității al instituției în cadrul căreia ele funcționează. Fiecare laborator permanent monitorizează și evaluează activități de asigurare a calității la etapele preanalitică, analitică și postanalitică a procesului de testare.

6.2.1.1. Stadiul preanalitic

1) Personal. La stadiul preanalitic se asigură următoarele cerințe la pregătirea personalului laboratoarelor diagnostice:

- Trainingul personalului. În laboratoare activează specialiști cu studii superioare (medici de laborator, medici bacteriologi) și medii (laboranți, felceri laboranți pregătiți la cicluri de specializare și reciclare la cicluri de perfecționare organizate la bazele instituțiilor și facultăților respective din țară și internaționale. Pregătirea la locul de lucru a specialiștilor încadrați în câmpul muncii în laboratoarele noi deschise, noi angajați la lucru, la implementarea noilor metode de testare se organizează la baza laboratorului CNSP, Centrului SIDA.
- Pentru fiecare metodă de testare se elaborează Procedura Operațională Standard (POS).
- Personalul trece instruire privind fiecare POS înainte de implementare a testului. Instruirea se efectuează de către șeful laboratorului.
- Șeful laboratorului efectuează evaluarea însușirii fiecărui instructaj și, la necesitate, când specialistul nu a însușit materialul instruirii, instructajul se repetă pînă la însușirea amplă a materialului.

2) Cerințele la organizarea procedurilor de colectare a mostrelor de sînge pentru testare la HIV.

- Prelevarea mostrelor de sînge venos pentru testare la marcheri

serologici ai infecției HIV (anticorpii anti-HIV ½, antigene virale) se efectuează în sălile de proceduri plasate în cadrul instituțiilor medico-sanitare, departamentale sau private acreditate în modul stabilit.

- Procedura de venepuncție se efectuează de asistenta medicală instruită. Persoanele consiliate pre-test în cabinetul de consiliere și testare voluntară (CCTV) sunt îndreptate în sala de proceduri cu „Îndreptarea pentru investigația sîngelui la HIV/SIDA (individuală)” (f. SIDA Nr. 2/e aprobată prin ordinul MS RM nr. 139 din 28.05.02), eliberată de către consilierul CCTV. Îndreptarea individuală completată se semnează de consilier și se aplică ștampila.
- În cazurile excepționale, cînd nu există accesibilitate la CCTV (spitale, clinici) și persoana nu poate fi consiliată în CCTV se va direcționa la sala de proceduri cu îndreptarea individuală completată de medicul care a inițiat testarea la marcherii HIV și a efectuat consilierea pre-test.
- Prelevarea probei de sînge de la persoana examinată confidențial se efectuează în baza îndreptării la prezentarea buletinului de identitate (pașaportului), de la persoana examinată anonim - în baza îndreptării în care este indicat cifra individual (conform registrului).
- Nu se va preleva proba de sînge de la persoanele care preventiv au consumat grăsimi sau băuturi alcoolice. Se recomandă de a lua micul dejun.
- În sala de proceduri, datele despre persoanele deservite se înscriu în formularul SIDA Nr. 1/e „Îndreptarea probelor de sînge la investigația la anticorpi HIV/SIDA” aprobat prin ordinul MS RM nr. 139 din 28.05.02, în care se indică numărul eprubetei, numele, prenumele, sexul, anul nașterii (pentru copiii de pînă la 3 ani – și data nașterii), adresa la domiciliu, cifra de examinare conform „Regulilor de examinare și supraveghere medicală pentru depistarea contaminării cu virusul imunodeficienței umane (maladia SIDA)” aprobate prin ordinul MS RM nr. 314 din 31.07.2007, și data prelevării sîngelui. Pentru persoanele consiliate și testate anonim se indică cifra, genul și anul nașterii (pentru copiii de pînă la 3 ani – și data nașterii). Formularul se completează în două exemplare, indicînd denumirea instituției, numele, funcția și semnătura persoanei responsabile pentru prelevarea mostrei, se solicită și numărul de telefon).
- Formularul f. SIDA Nr 2/e „Îndreptare pentru investigația sîngelui la HIV/SIDA (individuală)” completată în CCTV se va anexa la formularul SIDA Nr. 1/e „Îndreptarea probelor de sînge la investigația la anticorpi HIV/” și se va expedia în laboratorul diagnostic.
- Mostra de sînge se prelevă din venă cubitală în volum de 5 ml (în

cazuri excepționale – prelevarea mostrelor de la copii, la persoanele cu vinele nepronunțate acest volum poate să fie mai mic), respectând cerințele antiseptice. Prelevarea se efectuează cu seringă sau vacutainer steril (sistem pe prelevare a sîngelui, incluzînd tub sub vacuum, ac și holder) de o singură folosință și se toarnă în eprubeta respectivă, verificînd corectitudinea numărului indicat pe eprubetă celui scris în îndreptare.

- Seringile cu acele utilizate se scufundă în recipiente cu soluții dezinfectante cu proprietate de activitate virulicidă, marcate „Pentru colectarea seringilor utilizate”, aspirînd prin ac în seringă soluția respectivă. În scop de excludere a expunerii accidentale nu se admite de a scoate acele de pe seringi.

3) Pregătirea mostrelor sanguine pentru a fi expediate în laboratorul de diagnosticare SIDA

- Pregătirea mostrelor sanguine pentru a fi expediate în laboratorul de diagnosticare SIDA se efectuează, de obicei, în laboratorul de diagnostic clinic al instituției medico-sanitare de specialistul responsabil numit prin ordin sau dispoziție, de conducătorul instituției.
- Pentru formarea cheagului și separarea serului, eprubetele cu mostrele de sînge se păstrează la temperatura camerei timp de două ore. Pentru separarea cheagului de la peretele eprubetei și formarea cît mai rapidă a cheagului, se admite de a scutura ușor eprubeta cu sînge, respectînd măsurile de precauție sau de a dezlipi cheagul de pe pereții eprubetei cu ajutorul unui con din masă plastică sau cu o pipetă (bețișor) din sticlă de o singură folosință prelucrate conform cerințelor de dezinfectare, spălare, uscare și sterilizare, care nu conține rămășiți de preparate de dezinfectare, detergenți, urme de sînge. Pentru obținerea cantității maxime a serului eprubetele cu sînge, închise cu dopuri curate, se centrifughează la 1000 rotații/min. timp de 5 minute. Serul obținut se toarnă în eprubetele pregătite din timp indicînd pe fiecare din ele numărul respectiv al eprubetei inițiale, care conținea sîngele integral.
- Se utilizează dozatoare automate cu conuri de o singură utilizare pentru fiecare mostră de sînge sau pipete din sticlă prelucrate și sterilizate, de asemenea se utilizează pipetă individuală pentru fiecare mostră de sînge. Se interzice utilizarea repetată a conurilor și pipetelor din masă plastică, pipetelor din sticlă pentru mai multe mostre de sînge. La efectuarea investigațiilor serologice, recipientele din masă plastică (conurile, pipetele, etc.) nu se supun spălării și utilizării repetate.
- Serurile de sînge pot fi păstrate la +2 - +8 °C timp de 3 zile. Reieșind din aceasta cerință, programul de lucru al sălii de proceduri și

graficul de transportare a probelor de sînge în laboratorul diagnostic se elaborează în mod respectiv. În unele cazuri excepționale, serul de sînge poate să fie congelat la -20°C , coordonînd cu laboratorul în care va fi efectuată testarea și indicînd în îndreptare data de congelare. Serurile congelate nu se supun decongelării înainte de transportare în laborator și nu se congelează repetat.

- În cazurile excepționale poate fi permisă expedierea în laborator a mostrelor de sînge integral prelevate în aceeași zi.
- În afară de ser de sînge testarea la markeri serologici ai HIV poate să fie realizată pe plasmă sanguină.
- Mostrele de sînge diluate, inactivate prin încălzire, cu hemoliză pronunțată, contaminare bacteriană, hiperlipemice, congelate-decongelate de două ori și mai mult, cu volum mic de probă, aduse în eprubete stricate se rebutează.
- Pentru expedierea mostrelor de sînge supuse testării la markeri serologici ai virusului HIV se utilizează termo-containere speciale care pot fi dezinfectate cu soluții respective, marcate „Mostre de sînge pentru testare la SIDA”.
- Toate substanțele infecțioase, inclusiv mostrele de sînge, se transportă, fiind ambalate conform sistemului de bază al ambalajului triplu care constă din trei straturi, după cum urmează [21]:
 - Recipient primar. Un recipient impermeabil, ermetic și etichetat care conține proba. Recipientul este ambalat cu material absorbant suficient pentru a absorbi toate lichidele în caz de spargere.
 - Ambalaj secundar. Un ambalaj secundar durabil, impermeabil și ermetic pentru a închide și proteja recipientul (ții) primar (i). Recipienți primari amortizați individual pot fi puși într-un ambalaj secundar, însă este necesar de folosit suficient material absorbant adițional capabil a absorbi toate lichidele în caz de spargere.
 - Ambalajul exterior. Ambalajele secundare sunt plasate în ambalajul exterior protejate cu material absorbant adecvat. Ambalajele exterioare protejează conținutul lor de influențele externe, cum ar fi leziunile fizice în tranzit.
- Fiecare ambalaj completat în mod normal se cere să fie marcat, etichetat corect și însoțit de documente corespunzătoare (adekvate).
- Toate mostrele de sînge se închid cu dopuri și se instalează în suporturi. Suporturile se instalează în container. La fundul containerului, între pereții containerului și suporturile cu eprubete necesită să fie plasat material absorbant în cantitate suficientă pentru a absorbi conținutul eprubetelor, astfel ca, în timpul transportării, orice scurgere a sîngelui nu va atinge pereții

containerului.

- În sezonul cald al anului mostrele de sânge se transportă în containere cu gheață sau elemente de răcire, fiind plasate într-un material prelucrabil cu soluții de dezinfectare.
- Ambele exemplare de îndreptare f. SIDA Nr. 1/e „Îndreptarea probelor de sânge la investigația la anticorpi HIV/SIDA” și îndreptările individuale f. SIDA Nr. 2/e „Îndreptarea pentru investigația sîngelui la HIV/SIDA (individuală)” se plasează într-o mapă din plastic rezistentă la prelucrare cu soluții de dezinfectare. Mapa se plasează în container împreună cu mostrele de sânge. Containerul se închide și se sigilează, aplicînd ștampila specială pentru acest lucru a laboratorului responsabil pentru expedierea probelor de sânge.
- În transport containerul închis se instalează într-un loc fixat.
- În cazul cînd în instituția medicală lipsește CCTV (spitale, clinici) și mostrele de sânge se prelevă în mai multe secții, containerul se expediază în secția (de obicei laboratorul de diagnostic clinic) responsabilă pentru colectarea mostrelor de sânge din toate secțiile și pregătirea lor pentru transportare, abilitată prin ordinul conducătorului instituției. Aici are loc înregistrarea, centrifugarea, numerotarea continuă a eprubetelor etc. Se ține cont, ca numerele de ordin ale persoanelor și eprubetelor expediate din diferite secții să nu se repete. Toate mostrele se instalează într-un container comun, care se închide și se sigilează, aplicînd ștampila respectivă și se instalează în transport.

4) Transportarea mostrelor de sânge în laboratoarele de diagnosticare a SIDA, hepatitelor și altor infecții virale

- Mostrele de sânge prelevate în instituțiile medico-sanitare, inclusiv în cele dislocate în teritoriile rurale, se transportă fiind însoțite de un lucrător medical sau o altă persoană (curier) instruită privind cerințele la transportare și responsabilitatea pentru containerul cu mostrele transportate.
- În transport containerul se instalează într-un loc bine fixat, mai răcoros, fiind fixat în așa fel, ca să fie exclusă deteriorarea lui în timpul transportării.
- În perioada transportării se interzice accesul la mostrele sanguine, formularele de însoțire a mostrelor, rezultatele testărilor precedente.
- Curierul care a expediat probele în laborator recepționează din laborator containerul închis, sigilat și ștampilat și îl duce în laboratorul (secția) de unde au fost expediate mostrele de sânge.

6.2.1.2. Stadiul analitic cuprinde procesul de testare. Programul de asigurare a calității în acest stadiu include următoarele:

- 1) Prelucrarea și depozitarea specimenelor se efectuează în salonul de recepție. Registratorul (laborant, felcer laborant) controlează calitatea mostrelor de sânge expediate, documentelor de însoțire și le înregistrează conform modului prezentat anterior (compartimentul 4.2.2). Păstrarea mostrelor înainte de testare se efectuează în conformitate cu cerințele instrucțiunii la testul care va fi utilizat pentru investigație.
- 2) Procedura Operațională Standard se elaborează pentru fiecare metodă și procedură de lucru în conformitate cu cerințele Manualului Calității al instituției. În POS-urile referitoare la metodele de lucru (cu test-sisteme diagnostice, alte investigații) se introduce un compartiment special care prezintă traducerea metodei (instrucțiunii producătorului testului utilizat) în limba de stat. POS-urile se aprobă în mod stabilit descris în Manualul Calității al instituției.
- 3) Se respectă cerințele la testarea mostrelor de sânge și controlul calității lotului de lucru expuse în compartimentul 4.2.2.
- 4) Toate echipamentele laboratorului se întrețin în conformitate cu cerințele instrucțiunilor producătorului. În baza instrucțiunii producătorului se elaborează instrucțiuni de utilizare și menținere a aparatelor. Mijloacele de măsurare se supun verificării metrologice în conformitate cu cerințele în vigoare.

6.2.1.3. Stadiul postanalitic cuprinde toate procedurile realizate după procedura de testare, inclusiv:

- 1) Interpretarea corectă a rezultatelor testării efectuate cu teste ELISA, imunoblot, rapide.
 - 2) Introducerea datelor testării în registrele și formularele de evidență;
 - 3) Eliberarea rezultatelor testării:
- Rezultatele investigației se eliberează, utilizând exemplarul doi al formularului SIDA Nr. 1/e „Îndreptarea probelor de sânge la investigația la anticorpi HIV/SIDA” și/sau f. SIDA Nr 2/e „Îndreptare pentru investigația sîngelui la HIV/SIDA (individuală) sau f. SIDA Nr 26/e „Rezultatul investigației sîngelui la HIV/SIDA”, conținînd numărul și data înregistrării mostrelor în laborator, rezultatele testării, data eliberării rezultatului, ștampilate și semnate de șeful de laborator.
 - Rezultatele testării pentru mostrele de sânge în care nu au fost depistați markeri serologici HIV (negative) se eliberează în timp de 24 de ore de la momentul recepționării și înregistrării (cu excepția zilelor de odihnă).
 - Rezultatele testării mostrelor de sânge se plasează în plic lipit pe care se indică destinatorul și marcat „confidențial” și se expediază instituției medico-sanitare care a expediat mostrele pentru testare.

6.2.1.4. Managementul informației de laborator. Introducerea datelor în sistemul de monitorizare (calculator sau pe suport de hîrtie). Registrele și formularele privind investigațiile de laborator se păstrează pe suport de hîrtie. Formularele f. SIDA Nr 1/e, 2/e, 3/e, 4/e, 10/e, 11/e, 17/e, 20/e și 22/e se păstrează 10 ani de zile, cele cu Nr 7/e, 8/e, 9/e, 21/e, 13-1/e, 13-2/e, 14-1/e, 14-2/e - permanent. Toate registrele și formularele ce conțin date nominale se păstrează în locuri neaccesibile, în dulapuri, safeuri, sub cheie, pentru personalul laboratorului care nu lucrează cu aceste documente. Nimicirea documentelor cu termen de păstrare expirat se efectuează în conformitate cu permisul Arhivei Naționale a Republicii Moldova și actului comisiei de nimicire a documentelor.

Laboratorul Centrului SIDA, CNSP creează și menține baza de date privind persoanele infectate cu HIV pe suport electronic, utilizînd un computer a parte, neconectat la Internet, care se conectează prin cod pe care îl cunoaște doar șeful și medicii de laborator. Acești specialiști poartă responsabilitatea pentru confidențialitatea datelor și păstrarea tainei medicale, conform fișelor de post aprobate în mod stabilit.

6.2.2. Asigurarea controlului extern al calității.

Controlul extern al calității testărilor la infecția HIV/SIDA (depistarea anticorpilor, acizilor nucleici) se efectuează de către laboratorul de referință în microbiologie din cadrul CNSP conform prevederilor ordinului Ministerului Sănătății în vigoare după următorul algoritm:

- 1) Laboratoarele care efectuează investigații ELISA expediază în laboratorul de referință în microbiologie probe de sînge selectate: a cîte un ser de sînge testat cu rezultat negativ din godeul „6-D” (sau din godeul „D” din stripul din mijloc, dacă s-a lucrat pe stripuri, dar nu pe placă întregă):
 - Din fiecare al zecelea lot de lucru (reacție) cu numărul 10, 20, 30, 40 și așa mai departe pentru laboratoarele din cadrul CNSP, Centrului SIDA, CSP mun. Chișinău, CNTS, CRTS Bălți, Centrul SIDA din or. Tiraspol și CTS or. Tiraspol;
 - Din fiecare al cincilea lot de lucru cu numărul 5, 10, 15, 20 și așa mai departe pentru toate celelalte laboratoare;
 - În cazurile, cînd pentru serul testat în acest godeu a fost obținut rezultat pozitiv sau suspect, se alege un alt ser cu rezultat negativ din godeul „7-D” sau „8-D” și așa mai departe.
- 2) Laboratoarele care efectuează investigații de depistare a ARN/ADN viral:
 - Trimestrial - prima probă testată cu rezultat ADN/ARN HIV negativ;
 - Lunar - prima probă testată cu rezultat ADN/ARN HIV pozitiv;
- 3) Serurile testate în ELISA destinate retestării în cadrul controlului

calității se păstrează la minus 20 °C și se expediază în laboratorul de referință în microbiologie însoțite cu formular de îndreptare cu indicarea numărului și datei de înregistrare a mostrelor, trusei utilizate pentru testare (denumire, lot, termen de expirare), indicilor de densitate optică, cut-off-ului, raportului DO ser/cut-off.

- 4) Probele testate în PCR destinate testării în cadrul controlului calității se păstrează la minus 70 °C și se expediază în laboratorul de referință, însoțite de trimiterea pentru confirmarea cu indicarea numărului și datei de înregistrare a mostrelor, trusei utilizate pentru testare (denumire, lot, termen de expirare), Ct-ului, numărului de copii/ml sau UI/ml.
- 5) Laboratorul de referință în microbiologie efectuează testarea probelor expediate, utilizând aceleași test-sisteme care au fost utilizate în laboratoarele respective, în baza rezultatelor obținute decide veridicitatea rezultatului investigației și comunică acestor laboratoare concluzie privind veridicitatea rezultatelor testării efectuate în laborator.
- 6) Laboratorul de referință anual remite laboratoarelor care efectuează diagnosticul de laborator al infecției HIV/SIDA panouri standarde de control pentru testarea la markeri ai infecției HIV (antigeni, anticorpi, acizi nucleici), însoțite de un formular de expediere cu indicarea termenilor de testare.
- 7) Rezultatele testării obținute în aceste laboratoare la testarea panourilor standarde de control se remit în laboratorul de referință, indicând trusa utilizată pentru testare (denumirea, lotul, termenul de valabilitate), indicii de densitate optică, cut-off, raportul DO ser/cut-off, Ct-ului, numărului de copii/ml sau UI/ml, precum și concluziile privind rezultatele obținute, conform formularului aprobat în modul stabilit.
- 8) Laboratorul de referință analizează rezultatele obținute și remite în laboratorul respectiv concluziile privind veridicitatea rezultatelor testării fiecărei mostre de material biologic și corectitudinea concluziilor.

Capitolul 7

DIAGNOSTICUL INFECȚIEI HIV/SIDA CU UTILIZAREA TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

7.1. Structura si replicarea HIV

Genomul HIV este format din două lanțuri de ARN cu aproximativ 9200 de nucleotide. El este conținut într-un miez central proteic (o proteină cu masa moleculară de 24 kilodaltoni - p24), de formă alungită, alături de enzimele virale. Acesta este înconjurat de o nucleocapsidă proteică (p17), la rândul ei înconjurată de o anvelopă lipidică. Aceasta din urmă conține proteine provenite din membrana celulei gazdă, precum și două glicoproteine: gp 41 (glicoproteina trans-membranară) și gp 120 (glicoproteina de anvelopă) derivate dintr-un precursor comun, gp160. Gp41 și gp120 sunt legate în așa fel încât gp120 protruzează la suprafața anvelopei (72 molecule pe suprafața unui virus). Replicarea virală este similară cu cea a tuturor retrovirusurilor. Ea implică câteva etape cheie: virusul este adsorbit pe membranele celulelor care poartă receptori pentru glicoproteinele de pe suprafața sa. Cel mai cunoscut receptor este celula CD4 care interacționează cu gp120. Virusul infectează în primul rând celulele care prezintă acest marker: limfocite TCD4+ (cele mai importante), monocite, macrofage, celule gliale din creier, celule cromafine din intestinul subțire, celule Langerhans din piele. De asemenea, mai infectează și celule care nu exprimă CD4 (fibroblaști, limfocite B, celule NK, celule hematopoietice, celule endoteliale) sugerând că și alți receptori pot fi implicați (de exemplu, receptori pentru Fc al Ig sau pentru complement).

- Odată pătruns în celulă, virusul își pierde anvelopa lipidică, iar nucleul său este eliberat în citoplasmă;
- ARN-ul viral este transcris în ADN (monocatenar, apoi dublucatenar), folosind nucleotide din celula gazdă într-un proces catalizat de revers transcriptază virală (p51);
- ADN-ul viral dublucatenar este integrat în ADN-ul celulei gazdă, procesul fiind catalizat de către integrază virală (p32). Această formă a ADN-ului viral integrat în ADN-ul celular se numește „provirus”. Provirusul viral folosește mecanismele de transcripție ale celulei gazdă. Din acest moment virusul nu mai poate fi distrus decât distrugând celula însuși.
- Odată cu transcripția ADN celular are loc și transcripția provirusului, rezultând ARN-ul viral care codifică proteinele virale;
- Aceste proteine sunt asamblate în noi particule virale (virioni), fenomen dependent de o altă proteină virală – proteaza (p11).

Virionii părăsesc celula gazdă prin înmugurire și infectează alte celule.

7.2. Diagnostic de laborator PCR

Metoda de polimerizare în lanț (PCR) - metodă directă de detectare, bazată pe amplificarea fragmentelor specifice acizilor nucleici HIV in vitro.

7.2.1. Descrierea testelor.

Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction, reacția de polimerizare în lanț) permite sinteza *in vitro* a unei secvențe specifice ADN-ului, folosind două fragmente scurte de ADN (oligonucleotide, primeri), care aderă la cele două catene complementare ale moleculei de ADN sintetizate, în poziții care flanchează regiunea de interes (țintă). Metoda este intens folosită în cele mai diverse aplicații din biologie și medicină.

Chimia din spatele metodei depinde de complementaritatea bazelor azotate din helixul dublu de ADN. Dacă o moleculă de ADN este încălzită suficient, legăturile de hidrogen ce țin unite cele 2 lanțuri se rup. Lăsate să se răcească cele 2 catene rezultate pot reforma helixul dublu inițial. Pentru ca metoda să funcționeze, este nevoie de minim o jumătate de helix de ADN, și apoi cu ajutorul unor primeri se va forma jumătatea complementară.

Reacția de polimerizare în lanț constă în amplificarea selectivă a unei secvențe de ADN printr-o succesiune de cicluri de amplificare, fiecare ciclu având la rândul său trei etape. Principiul poate fi împărțit în 3 pași:

- 1) **Denaturarea ADN-ului:** încălzirea la 95°C separă ADN-ul țintă în cele 2 catene;
- 2) **Hibridizarea primerilor:** prin răcire la aproximativ de 55°C primerii se vor lega la catenele complementare;
- 3) **Elongația:** Soluția se încălzește la 72 °C și în prezența polimerazei ADN termostabilă, ionilor de Mn^{2+} și a deoxinucleotidtrifosfaților se începe procesul de replicare.

Cu fiecare repetare a ciclului cantitatea de copii de ADN sintetizate se dublează, după aproximativ 30 de cicluri se obțin peste 1 milion de copii ale fragmentului inițial.

7.2.2. Obiectivele metodei

- 1) Diagnosticul infecției HIV la copiii, inclusiv născuți din mame HIV infectate;
- 2) Testarea încărcăturii virale (ÎV) pentru:
 - determinarea gradului de replicare virală.
 - Monitorizarea tratamentului cu preparate ARV;

3) Determinarea rezistenței HIV către preparatele ARV.

7.2.3. Metode de diagnostic al infecției HIV. Depistarea ARN/ADN viral se efectuează prin metode calitative și cantitative.

Metoda calitativă este bazată pe amplificarea fragmentelor specifice acizilor nucleici HIV in vitro și se utilizează în următoarele activități:

- Controlul sîngelui donat;
- Diagnosticul infecției HIV la copiii de vîrstă de pînă la 18 luni, inclusiv la nou născuții din mame infectate conform algoritmului aprobat [22];
- Utilizarea în cadrul investigațiilor de triere și diferențiere la persoanele cu rezultate discordante la testare la anticorpi anti-HIV, nedeterminate în western blot;

Metoda cantitativă (evaluarea încărcăturii virale) este bazată pe amplificarea unei singure secvențe prin intermediul unei reacții de revers-transcripție urmată de amplificarea in lanț (RT-PCR) și cuantificarea copiilor amplificate ale fragmentului de ADN viral în cursul reacției PCR cu ajutorul unei sonde marcate cu o substanță fluorescentă (PCR „Real-time”). Metoda cantitativă se utilizează pentru:

- Determinarea cantității copiilor ARN-ului viral în plasmă sanguină în scop de evaluare a încărcăturii virale în cadrul diagnosticului clinic al infecției HIV;
- Luarea deciziei privind administrarea terapiei ARV;
- Monitorizarea eficienței schemelor utilizate de ARV;

7.2.4. Determinarea rezistenței la preparate antiretrovirale (ARV)

Adeseori HIV suferă schimbări și mutații în organismul gazdă. Uneori aceste schimbări fac virusul rezistent la anumite preparate farmaceutice ARV. Aceasta înseamnă că medicamentul respectiv nu mai poate încetini sau preveni multiplicarea virusului sau nu mai poate proteja sistemul imun. Pentru a determina rezistența virusului la medicamente, sunt disponibile două teste sanguine:

- Testul de genotipare (determinarea genotipului): care detectează mutațiile din genomul viral;
- Testul de fenotipare (determinarea fenotipului): care măsoară capacitatea virusului de a se dezvolta în celulele tratate cu preparate ARV.

Rezistența virusului la medicamente apare atunci cînd:

- Se produce o modificare în felul în care organismul absoarbe medicamentul;

- Sunt interacțiuni medicamentoase cu alte medicamente ce se administrează concomitent;
- Se produc modificări în structura virusului și acesta nu mai răspunde la medicamentul administrat;
- Tulpina virală este rezistentă la medicament;
- Nu se respecta modul de administrare prescris de medic.
- Există medicamente care sunt capabile să trateze infecția cu anumite tulpini HIV rezistente la terapia medicamentoasă obișnuită.

Determinarea rezistenței HIV către preparatele ARV. Pentru determinarea rezistenței HIV la medicamente o răspândire largă au obținut testele moleculare bazate pe secvențierea ADN. Secvențierea ADN-ului poate furniza informații cu privire la toate înlocuirile de nucleotide în segmentul selectat a genomului HIV, inclusiv mutații care determină rezistența la ARV. Deoarece preparatele de bază în tratamentul antiretroviral pentru infecția cu HIV sunt inhibitori de reverstranscriptază și protează, apariția de mutații anume în aceste gene duc la dezvoltarea rezistenței la preparate ARV.

Indicațiile de utilizare cuprind următoarele grupe persoanele infectate cu HIV în lipsa eficienței terapiei ARV, dacă nu există nici un alt motiv evident de eșec terapeutic (încălcarea de administrare a preparatelor ARV, sindrom de malabsorbție de droguri).

Criterii virusologice de eșec terapeutic sunt [22]:

- Eșecul de a diminua încărcătura virală sub 400 copii/ml către săptămâna 24 a tratamentului, sau sub 50 copii/ml către săptămâna 48;
- Atunci când încărcătura virală a scăzut deja până la niveluri nedetectabile, dar două măsurări indică >400-1.000 copii/ml peste 4 – 8 săptămâni;
- “Salturile” - majorări ușoare a valorilor încărcăturii virale, de la pragul de testare până la 50-200 copii/ml. Acestea pot avea loc fără dezvoltarea tulpinilor de virus rezistente (erori de laborator), dar trebuie să constituie motivul unor discuții în materie de aderență. În această situație, ar putea fi de asemenea utilă monitorizarea terapeutică a medicației (MTM). Orice salt trebuie să fie controlată timp de patru săptămâni.

Contraindicații la utilizarea metodei:

- Valoarea încărcăturii virale este mai mică decât sensibilitatea testului utilizat pentru a determina rezistența.
- După întreruperea tratamentului.

7.2.5. Cerințele de organizare a laboratorului PCR

1) Laboratorul, în conformitate cu etapele de analiză ar trebui să includă următorul set de zone consecutive independente de lucru (camere) sau zone de lucru selectate separat în componența altor încăperi, al căror număr este stabilit în funcție de metodele de amplificare a acizilor nucleici utilizate:

- primirea, înregistrarea, analiza și prelucrarea materialului. Această zonă de lucru poate fi comună în laboratoarele, unde se folosesc alte metode de diagnosticare (microbiologică, ELISA, alte) – Zona 1;
- extragerea acizilor nucleici – Zona 2;
- pregătirea mixului pentru reacția de amplificare, reacției de amplificare și evaluarea rezultatelor prin metoda de detectare fluorescentă – Zona 3;
- evaluarea rezultatelor reacției de amplificare a acizilor nucleici prin metoda de electroforeză și (sau) hibridizare - metoda de enzimă de detectare – Zona 4;

2) În laborator pot fi incluse încăperi auxiliare (camera personalului, biroul șefului de laborator, vestiare pentru personal, cameră de relaxare și de luat masa pentru personal, viceu, spațiu de depozitare), care trebuie amplasate în afara zonei de lucru.

3) Este necesar să fie prevăzută cameră de autoclavare pentru decontaminarea materialului cercetat, care poate fi partajată cu alte compartimente în condiția respectării cerințelor de siguranță biologică.

4) În Zona 1 de lucru se va efectua primirea materialului, etichetarea acestuia, înregistrarea în registre speciale, pregătirea primară (concentrarea materialului prin centrifugare, filtrare, imunosorbție, suspendarea, trecerea materialului uscat și dens în faza lichidă, etc.), fuziunea sau divizarea probelor în aliquote, dezinfectarea și depozitarea probelor, decontaminarea reziduurilor de material.

5) În Zona de lucru 1 se permite recepția, păstrarea, înregistrarea, prelucrarea și manipularea materialului cercetat prin alte metode de diagnostic (bacteriologice, virusologice, imunologice etc.).

6) În Zona 2 de lucru se efectuează extragerea și purificare acizilor nucleici a microorganismelor din probele pregătite în Zona 1 de lucru

7) În zona 3 de lucru se efectuează pregătirea amestecurilor de reacție, efectuarea de revers transcriere, de amplificare a acizilor nucleici și înregistrarea rezultatelor amplificare prin hibridizare - metoda fluorescența de detectare.

8) Prepararea amestecurilor de reacție pentru revers transcriere și de amplificare a acizilor nucleici este efectuată înainte de a aduce în zona 3 de lucru probele pregătite în zona de lucru 2.

9) Se recomandă de a diviza zona de lucru 3 în două subzone (3a și 3b) și dislocate în camere separate. În subzona 3a se va pregăti amestecul de reacție și se va desfășura revers transcrierea. În subzona 3b - reacția de

amplificare a acizilor nucleici și înregistrarea rezultatelor de amplificare cu utilizarea metodei de hibridizare cu detectare fluorescent.

10) Zona 4 de lucru este izolată de zona 3 de lucru pentru a preveni contaminarea produselor amplificate prin fluxul de aer.

11) În condițiile climatului cald în camerele zonelor de lucru a laboratorului se permite instalarea ventilației cu aer condiționat, cu condiția ca acestea sunt deconectate pe durata lucrărilor, cu prelucrarea ulterioare a locului de muncă.

12) Fiecare zonă individuală de lucru trebuie să fie echipată cu un set minim de echipament de laborator adecvat, în funcție de scopul funcțional și a riscului de contaminare, un set necesar de mobilier, plastic și sticlă, consumabile, îmbrăcăminte de protecție și echipamentul de curățare vor fi utilizate numai în această zonă.

13) Mobilă de laborator, echipamentul și accesoriile fiecărei zone de lucru trebuie marcate corespunzător, utilizarea lor în alte zone de lucru (interior) sau pentru alte tipuri de cercetare nu sunt permise.

14) Mobilierul de laborator, suprafețele echipamentului folosit trebuie să fie rezistente la detergenți și dezinfectanți, radiații ultraviolete, suprafața meselor trebuie să fie liberă de fisuri.

15) Echipamente și instrumente de măsurare utilizate în laborator trebuie să fie înregistrate în modul prevăzut și în stare bună, să dispună de pasaport și instrucțiune de lucru pentru utilizare, să corespundă regulilor de siguranță și compatibilitate electromagnetică, să fie supuse controlului metrologic în conformitate cu cerințele în vigoare.

16) În laborator ar trebui să fie prevăzut o trusă medicală pentru prim ajutor în caz de accidente, în conformitate cu normele sanitare în vigoare care reglementează siguranța de lucru cu microorganisme din grupurile I-IV de patogenitate.

17) Personalul care lucrează în laborator de diagnostic PCR trebuie să fie instruit corespunzător.

18) Lucru în laborator, ar trebui să fie organizat într-o singură direcție: de la zonele de lucru pre-PCR spre post-PCR. Transferul probelor din o zonă de lucru în alta, precum și depozitarea lor în zonele de date se efectuează în containere/suporturi din plastic sau metalice bine închise cu prelucrarea lor ulterioară cu soluții dezinfectante reglementate, după fiecare utilizare.

19) În zonele pre-PCR și post-PCR a laboratorului ar trebui să lucreze personal diferit.

20) Prelucrarea hainelor de lucru din zonele de pre- si post-PCR ar trebui să fie efectuată separat.

21) Trebuie să fie tuburi de unică folosință și vîrfuri pentru pipete automate. Vîrfurile sunt schimbate de fiecare dată cînd se trece de la o probă la alta pentru a preveni contaminarea încrucișată în timpul extracției ADN sau pipetării amestecului de reacție.

22) Pentru pipete automate se vor utiliza vîrfuri cu barieră aerosolică, la

prelucrarea probelor clinice, precum și la introducerea ADN/ARN-ului extras în tubul de reacție.

23) Probele clinice se vor depozita separat de reactivi.

24) La finalizarea lucrului, toate obiectele contaminate sau potențial contaminate se vor depozita în condiții de refrigerare pe perioada studiului. Locul de muncă și suprafețele de lucru a echipamentelor sunt supuse dezinfecției. Vîrfurile utilizate pentru pipete, tuburile și alte materiale contaminate cu ADN, trebuie să fie prelucrate cu reactivi cu activitate de degradare a ADN-ului (1 N HCl, hipoclorit de sodiu 10% sau 10% clor).

25) Condițiile de depozitare a kiturilor de reactiv (seturi de reactivi), mostre de probe ar trebui să respecte instrucțiunile de utilizare. Probele de probe care conțin acizi nucleici și (sau) ampliconi sunt depozitate separat de reactivi în frigider de diferite. Nu se permite folosirea kiturilor necertificate, reactivilor care au expirat, stocate în condiții de încălzire a regimului de temperatură. Frigiderele ar trebui să fie prevăzute cu mijloace de control manual sau automat al temperaturii cu înregistrări care vor dovedi regimul real de stocare a kiturilor și probelor studiate.

7.2.6. Prelevarea probelor

Un rol extrem de important în performanța diagnosticului etiologic îl are nu numai precizia și acuratețea de efectuare a procedurii analitice, dar și calitatea pregătirii probelor clinice la etapa preanalitică, înțelegînd prin aceasta: starea pacientului, tipul probelor, momentul recoltării, modul de recoltare, materialul folosit, modul de stocare, modul și materialele folosite la transport.

Recoltarea eficientă, transportul în laborator cît mai rapid posibil și stocarea probelor în condițiile stabilite sunt cele mai importante în standardizarea investigațiilor de laborator. La transportare se i-a în considerație necesitatea de a menține stabilitatea probelor pentru cercetări în funcție de timp, temperatură și acțiunea directă a luminii.

1) Cerințe generale

- Pentru prelevarea bioprobelor se utilizează doar instrumente de unică folosință și recipient de unică folosință din plastic.
- După prelevarea probelor eprubetele se închid etanș, se marchează și se transportă la laborator prin curier cu fișa de însoțire, aprobată în modul stabilit. Numerele de identificare de pe eprubete trebuie să corespundă numerelor de pe îndreptare.
 - acest număr de identificare ar trebui utilizat în toate documentele referitoare la probele provenind de la aceeași sursă;
 - pe fiecare recipient cu probe trebuie de asemenea înscrise informațiile despre tipul de produs din tub și data prelevării;
- Perioada de transport și stocare a materialului poate varia în funcție de tipul materialului de investigat și regimul de transport.
- Perioada de păstrare a probelor, propuse în recomandările prezente,

sunt considerate ca orientative și pot varia în funcție de trusele utilizate. Indicațiile instrucțiunilor la truse în această situație sunt prerogative.

- Deoarece se permite doar un singur proces de congelare/decongelare a materialului, a asigura stocarea lui corectă și livrarea în intervalul de timp admisibil în formă dezghețată.

2) Sânge (plasmă, ser)

- Precauțiile standard trebuie urmate întotdeauna când se prelevează și se manipulează probele de sânge
- Folosiți EPP – cel puțin mănuși (plus scut facial, mască și halat dacă se anticipează posibilitatea stropirii).
- Scoateți și îndepărtați EPP imediat după realizarea operațiunii.
- Spălați-vă pe mâini de fiecare dată după ce scoateți mănușile.

Prelevarea probelor

Pentru obținerea plasmei recoltarea sîngelui din venă se efectuează pe nemîncate sau 3 ore după masă. Sângele se recoltează în tuburi sterile cu EDTA sau cu citrat de sodiu (a introduce volumul de sânge indicat pe eprubetă. Aceasta este important pentru respectarea raportului dintre sânge și coagulant, ceea ce este necesar pentru obținerea plasmei). Eprubetele cu heparină pentru recoltarea sîngelui nu se utilizează deoarece heparina poate inhiba reacțiile PCR. După recoltarea sîngelui acesta trebuie amestecat cu atenție cu anticoagulantul aflat în eprubetă (în caz contrar sângele se va coagula și detectarea ADN/ARN-ului va fi imposibilă). Plasma recoltată pe anticoagulant (EDTA) este de asemenea valoroasă pentru detecția ARN viral în sânge, deoarece EDTA inactivează RNA-zele prezente în probă.

La testarea sîngelui integral proba se colectează în cantitate de 2 ml în tuburi sterile cu 0,2 ml EDTA de 3%. După recoltare tubul se închide cu capac.

7.2.7. Preprocesarea probelor

Prelevarea probelor ar trebui făcută doar la nivele de siguranță corespunzătoare ale laboratorului (de preferință în cabinete de biosiguranță de clasa a II-a, certificate) cu utilizarea consumabilelor de unică folosință pentru fiecare probă. Se acordă atenție deosebită pentru a nu contamina sau a nu contamina încrucișat probele, deoarece procedurile PCR sunt vulnerabile la contaminarea încrucișată după amplificare și la desfacerea tubului.

Plasma se obține prin centrifugarea tuburilor cu sânge integral la 800 - 1600g (RCF) timp de 20 de min la temperatura camerei pentru a compacta fracția celulară. În caz când la centrifugile utilizate lipsește opțiunea „g” (RCF), atunci RCF se va transfera în rpm după formula următoare:

$$S \text{ (rpm)} = \sqrt{(1.118 \times 10^5 \times g) / r},$$

Unde: r – radiusul rotorului în cm,
sqrt – rădăcina pătrată.

Apoi se prelevă plasmă, avînd grijă să nu se extragă celule sanguine în același timp, în volum de 1 ml cu un vîrf cu filtru steril separat (sau pipetă Pasteur sterilă) în tuburi sterile tip Eppendorf cu volumul de 1,5 sau 2,0 ml. Este mai bine să fie prelevate mai multe porțiuni (aliquots) dintr-o probă, decît să fie subdivizate probele mai tîrziu, cel mai mic volum de probă stocabil este de 0,5 ml (astfel plasma/serul în volum de 3 ml poate fi divizată în șase sub-probe separate). Prelevarea de sub-probe ar trebui să se facă înainte de congelarea probei deoarece congelarea/decongelarea repetată a probelor poate reduce conținutul viral și de aceea ar trebui evitată.

Sîngele integral după recoltare se agită minuțios, întorcînd eprubeta cu susul în jos de 3-4 ori.

7.2.8. Transportarea probelor de sînge

Transportarea probelor de sînge trebuie să se realizeze în mod obligatoriu în containere de transport adecvate, marcate cu pictograma "Risc biologic".

Transportul materialului și probelor preprocesate se efectuează în termocontainere speciale cu elemente de răcire sau în termos cu gheață. Flacoanele și tuburile cu probe de sînge trebuie transportate în poziție verticală și securizate într-un container care se închide etanș sau într-un stativ pus într-o cutie specială de transport. De asemenea este necesar să aibă suficientă hîrtie absorbantă în jurul lor încît să absoarbă întreaga cantitate de lichid în caz de scurgere.

7.2.9. Păstrarea probelor

Mostrele de sînge integral: la temperatura de la 2°C pînă la 8 °C – timp de 12 ore de la recoltarea materialului;

Mostrele de plasmă:

- la temperatura de la 2°C pînă la 8°C – timp de 3 zile;
- în stare congelată la minus 70°C – timp îndelungat.

Se permite doar un singur proces de congelare/decongelare a materialului.

7.2.10. Înregistrarea probelor

La primirea probelor în laborator se verifică:

- Concordanța dintre marcajul tubului, flaconului, containerului și

- datele din formularul de solicitare;
- Acceptarea duratei dintre recoltarea și primirea probei în laborator;
- Dacă proba a fost răcită sau au fost adăugați conservanți în cazul în care transportul a fost întârziat;
- Înregistrarea tuburilor, containerelor și condiția în care se află;
- Volumul materialului suficient pentru testările solicitate;
- Probele primare se verifică dacă nu sunt hemolizate, lipemice, etc.

Personalul laboratorului la recepționarea probelor:

- le atribuie un număr de identificare în laborator;
- transferă identificarea și testele solicitate în registrele de lucru a probelor și sau în listele de lucru;
- documentează registrele, listele de lucru (îregistrează data și ora primirii probei și identitatea persoanei care a primit proba);

Probele primare sunt identificate prin intermediul trimiterilor. Probele primare cărora le lipsește identificarea nu sunt accesate sau procesate în cadrul laboratorului. Probele aflate în așteptare pentru testare sau pentru analize ulterioare de asemenea se identifică.

Înregistrarea se efectuează în formă scrisă în registru de înregistrare sau protocolul (raportul) de lucru.

7.2.11. Rebutarea probelor

Dacă proba primară nu satisface condițiile necesare, personalul responsabil, comunică unității corespunzătoare, notează incidentul în registrul de rebutare (formular Nr. 394/e) și returnează proba primară sau o elimină din laborator prin metoda stabilită.

Criteriile de rebutare:

- identificarea incorectă a pacientului;
- identificarea incorectă a probei;
- date eronate în formularele de însoțire;
- hemoliză, lipemie, contaminarea probei;
- devierea activității specifice a componentului cauzată de nerespectarea condițiilor de recoltare, transportare și păstrare.

În cazuri excepționale (bolnav în stare grea, puncție venoasă dificilă sau imposibilă, decesul bolnavului etc.) proba se lucrează, dar în rezultat se indică neconformitatea depistată, care mai mult sau mai puțin ar putea influența rezultatul.

Proba rebutată nu se aruncă înainte de a consulta personalul clinic sau pacientul și a stabili o decizie de comun acord.

7.2.12. Realizarea investigației PCR

1) Condițiile de efectuare a reacției:

- Toate manipulările cu reactivi și probe se efectuează în HSB
- Temperatura aerului 20 ± 5 °C;
- Veselă de unică folosință din plastic (eprubetele, conurile) va fi răsturnate în containerele speciale cu dezinfectant.
- Suprafețele mesei, cum și încăperile, în care se efectuează reacția PCR, înainte și după lucru trebuie să fie iradiate cu lumină ultravioletă timp de 30 de min.
- Nu se utilizează reactivi expirați.
- Nu se utilizează reactivi din diferite loturi în cursul unei serii de lucru.
- Reactivii concentrați se diluează cu grijă pentru a evita orice contaminare.

1) Investigarea propriu-zisă

În cursul analizei se utilizează numai consumabile din plastic de unică folosință sterile, de calitate recunoscută, marcate „RNase-free, DNase-free”. Tot utilajul de laborator, inclusiv dozatoarele, suporturile, vesela de laborator, cum și soluțiile de lucru trebuie să fi strict staționare. Este interzisă deplasarea lor dintr-o încăpăre în altă. A lucra numai în mănuși de unică folosință, fără talc sau amidon, a folosi și a schimba la fiecare etapa conuri de unică folosință pentru dozatoarele automate cu barieră de aerosol.

Metoda de diagnostic se selectează în funcție de scopul investigației și se efectuează în strictă corespundere cu instrucțiunile de utilizare la kit.

7.2.13. Asigurarea controlului de calitate

În scopul raportării rezultatelor valide la fiecare reacție PCR atât la etapa de extragere cât și cea de amplificare se utilizează controalele din componența kitului pentru asigurarea calității investigațiilor. De asemenea în baza programului de audit intern se efectuează controlul intern al calității cu o periodicitate stabilită în funcție de volumul investigațiilor efectuate dar nu mai rar de o dată în trimestru.

Controlul extern al calității se efectuează prin examinarea panelurilor standarde certificate de control care conțin mostre "pozitive" și "negative", precum și prin participarea laboratorului la diferite programe de comparări inter-laboratoare.

7.2.14. Furnizarea rezultatelor

Laboratorul este responsabil de formatul raportului (forma de evidență medicală) și asigură ca rapoartele să fie primite de persoanele corespunzătoare în intervalul de timp stabilit.

Rezultatele sunt raportate în formulare de evidență medicală elaborate și aprobate în funcție de metoda de investigare și includ toate informațiile cerute de clienți și necesare pentru interpretarea rezultatelor, precum și toate informațiile solicitate de metoda utilizată.

Rezultatele trebuie să fie lizibile, fără greșeli de transcriere și se raportează persoanelor autorizate să primească și să folosească informații medicale. Raportul include:

- Identificarea clară lipsită de ambiguitate a analizei,
- Datele de identificare a laboratorului, care a emis raportul;
- Identificarea unică a pacientului precum și adresa sa;
- Numele sau alt mod de identificare unică (denumirea instituției) a solicitantului;
- Data eliberării rezultatului;
- Originea și tipul probei de analizat;
- Rezultatele analizei cu indicarea unităților de măsură (UI, copii/ml sau alte unități), când este cazul intervalele biologice de referință și interpretarea rezultatelor;
- Datele de identificare și semnătura persoanei care a autorizat emiterea raportului de examinare;

În laborator există un mecanism, care asigură manipularea și transmiterea rapoartelor în mod confidențial. La descrierea analizelor efectuate și a rezultatelor obținute se respectă vocabularul și nomenclatura recomandărilor naționale și ale OMS. În raport se includ date privind calitatea sau acceptabilitatea probei primare, care ar putea compromite rezultatul.

Laboratorul păstrează copii ale rezultatelor raportate în formă scrisă (protocol) și format electronic, informație necesită să fie găsită rapid. Rezultatele raportate se păstrează atîta timp cît sunt importante din punct de vedere medical conform specificărilor ordinului nr.139 al MS al RM.

La obținerea rezultatelor fals pozitive sau fals negative laboratorul repetă examinarea probei sau solicită o nouă probă a aceluiași pacient.

Laboratorul notifică imediat medicul sau alt specialist responsabil de îngrijirea pacientului, atunci când rezultatele analizei sunt situate în intervalele de alertă sau critice prin intermediul telefonului sau unui raport preliminar. Pentru rezultatele transmise preventiv, raportul final se transmite de către persoana responsabilă din laborator întotdeauna celui care a făcut cererea.

În laborator este stabilită perioada de obținere a rezultatelor pentru fiecare tip de analiză, care reflectă nevoile clinice și pacientul sau persoana care a îndreptat proba este înștiințată despre acest fapt la primirea probelor. În cazul întârzierilor efectuării analizelor solicitantul este notificat de medicul care efectuează investigația cu înștiințarea șefului de laborator.

Capitolul 8

PROCEDURILE DE SECURITATE

Diferite substraturi biologice, mai ales sângele și componentele lui, fiind mediul de habitat și de reproducere a agenților etiologici ai unui șir larg de maladii infecțioase, prezintă risc esențial de infectare a personalului medical, pacienților deserviți în procesul efectuării procedurilor parenterale, precum și poluării biologice a mediului ambiant.

8.1. Recomandările UNAIDS și OMS privind măsurile de siguranță

Măsurile de siguranță sunt esențiale și ar trebui să fie urmate la toate etapele de testare: recoltarea probelor pentru testare, depozitarea, eliminarea deșeurilor cu pericol biologic, în așa fel încât să reducă la minimum riscul de locul de muncă.

În conformitate cu clasificare OMS, laboratoarele se clasifică în următoarele nivele din punct de vedere al biosiguranței [20]:

- de bază – nivel de biosiguranță 1
- de bază – nivel de biosiguranță 2
- securizat – nivel de biosiguranță 3
- înalt securizat - – nivel de biosiguranță 4.

După OMS, microorganisme infectioase se clasifică pe următoarele grupe de risc:

Grup de risc 1 – risc infecțios individual sau comunitar scăzut sau absent. Microorganisme cu probabilitate minimă de a provoca îmbolnăvire la om sau animal;

Grup de risc 2 – risc individual moderat, risc comunitar scăzut. Agenți patogeni care pot provoca îmbolnăvire la om sau animal, dar este puțin probabil să reprezinte un pericol sever pentru personalul de laborator, comunitate, faună sau mediu. Expunerile în laborator pot cauza infecții severe, dar pentru care există tratament eficient și măsuri profilactice, iar riscul de răspândire al infecției este limitat.

Grup de risc 3 – risc individual moderat, risc comunitar scăzut. Agenți patogeni care în mod obișnuit provoacă îmbolnăvire severă la om sau animal, dar, de regulă, nu se răspândesc de la un individ la altul. Există tratament eficient și măsuri profilactice.

Grup de risc 4 – risc individual și comunitar ridicat. Agenți patogeni care provoacă, de regulă, îmbolnăvire severă la om sau animal și care se pot transmite spontan de la un individ la altul, direct sau indirect. Nu există, în general, tratament eficient și măsuri profilactice.

Directiva 2000/54/CE a Parlamentului European și Consiliului din data de 18 septembrie 2000, referitoare la protecția lucrătorilor împotriva riscurilor presupuse de expunerea la agenți biologici la locul de muncă, prezintă lista de clasificare a agenților infecțioși pentru ființe umane [33 sau anexa 6 din [20]. Conform acestei clasificării, mostrele biologice infectate și potențial infectate cu anumiți agenți biologici clasificați în grupul 3 (HIV, virusii hepatitelor virale, HTLV 1 și 2, unele Micobacterii și alte microorganisme), prezintă un risc limitat de infectare pentru lucrători, întrucât în mod obișnuit nu sunt infecțioși pe calea aerului. Din această considerație măsurile antiepidemice în lucrul cu aceste materiale biologice se organizează în conformitate cu cerințele pentru nivelul 2 de biosiguranță.

Este necesar de a asigura subdiviziunile în care se lucrează cu materialele biologice cu echipamente (autoclave, incinerare) sau preparate de dezinfectare chimică pentru decontaminare a tuturor deșeurilor contaminate sau potențial contaminate. Materiale care sunt decontaminate sau eliminate în afara laboratorului ar trebui să fie plasat într-un container puternic, excluzând scurgeri de materiale lichide înainte de a le transporta în afara laboratorului.

8.2. Cerințele la organizarea regimului antiepidemic în laboratoarele de diagnosticare a SIDA în Republica Moldova

8.2.1. Cerințele generale

8.2.1.1. Testarea mostrelor de sânge se efectuează de către laboratoarele acreditate, în care sunt asigurate condiții pentru respectarea regimului antiepidemic și tehnicii securității în lucrul cu agenți biopatogeni la nivelul 2 de biosiguranță.

8.2.1.2. Responsabilitatea pentru organizarea și realizarea complexului măsurilor antiepidemice și de dezinfectare se asumă conducătorului instituției și șefului laboratorului.

8.2.1.3. Lucrul cu materialele biologice se efectuează de specialiștii cu studii medicale superioare și medii cu pregătire specială post-diplomică și la locul de lucru. Lor li se permite a lucra de sine stătător la însușirea completă a cerințelor biosiguranței și deprinderilor practice.

8.2.1.4. Personalul laboratorului trece instruire privind regimul antiepidemic și tehnica securității inițială - la încadrarea în câmpul lucrului și periodic - de 2 ori pe an.

8.2.1.5. Întrarea persoanelor străine în laborator este interzisă. Întrarea personalului tehnic se permite de șeful laboratorului, se efectuează după terminarea lucrului și măsurilor de dezinfectare în prezența specialistului laboratorului.

8.2.1.6. Toți colaboratorii laboratorului se află la evidența medicală și sunt supuși testării la AgHBs, anti-HCV și infecția HIV/SIDA de 2 ori pe an.

8.2.1.7. Toate măsurile de dezinfectare se efectuează în conformitate cu cerințele documentelor normativ-tehnice în vigoare. Regimurile de dezinfectare a diferitor obiecte contaminate cu microorganisme patogene se elaborează luând în considerație remedii de dezinfectare disponibile. Toate măsurile de dezinfectare se efectuează în conformitate strictă cu cerințele expuse în instrucțiunile la remediile aplicate.

8.2.2. Organizarea și amenajarea încăperilor laboratorului.

8.2.2.1. Laboratorul se organizează în cadrul centrelor de sănătate publică și centrelor de hemotransfuzie, respectând cerințele expuse în Ghidul Național de biosiguranță pentru laboratoare [20]. Reieșind din capacitatea de producere, el poate fi organizat ca o subdiviziune aparte sau în cadrul laboratorului bacteriologic (la volumul investigațiilor mai mic de 25 mii analize pe an). Laboratorul se amplasează într-o clădire aparte sau într-un bloc izolat al clădirii cu intrare aparte. La intrarea în laborator se afișează denumirea laboratorului și semnul de securitate biologică. Ușile trebuie să fie închise bine, cu semnalizare automată, fereștrici - cu plasă contra insectelor. Teritoriul și încăperile instituției se supun pazei permanente. La plasarea laboratorului la primul etaj ferestrele se asigură cu gratii.

Laboratorul trebuie să fie asigurat în mod centralizat sau autonom cu apeduct și canalizare, energie electrică, încălzire.

8.2.2.2. Toate încăperile laboratorului trebuie să fie luminoase, asigurate cu iluminare artificială, în conformitate cu cerințele sanitare și normativele de construcție.

8.2.2.3. Numărul și amenajarea încăperilor trebuie să corespundă cerințelor la organizarea complexului măsurilor care asigură separarea fluxurilor «curate» și «contaminate», organizarea condițiilor pentru efectuarea investigațiilor de laborator, dezinfectarea materialelor biopatogene, securitatea personalului.

8.2.2.4. Încăperile laboratorului sunt divizate în două zone: «curată» și «contaminată». În zona «curată» se plasează vestiarul, salonul pentru personal, saloane pentru lucrul administrativ, depozit, salonul pentru distilare;

8.2.2.5. Încăperile destinate lucrului cu materiale biologice infectate și potențial infectate sunt plasate în consecutivitate conform fluxului materialelor biologice în procesul tehnologic și sunt următoarele:

- Salon de primire și înregistrare a materialului biologic;
- Salon de pregătire a mostrelor pentru testare;
- Salon de centrifugare;
- Salon ELISA;
- Salon WESTERN-BLOT și alte cercetări de confirmare (pentru laboratorul de referință);
- Salon pentru medici;

- Salon de autoclavare (sau de dezinfectarea materialului biologic);
- Spălătoria este ultimul salon în lanțul încăperilor de producție; în care se transferă materialele biologice și vesela de laborator dezinfectate;
- Depozit pentru păstrarea test-sistemelor.

8.2.2.6. În laboratoarele cu volumul mic de investigații unele etape de lucru pot fi comasate într-un salon de lucru, respectând trecerea torentului «curat» și celui «contaminat» (de exemplu, recepționarea și pregătirea eșantioanelor pentru testare, etc.).

8.2.2.7. Saloanele laboratorului.

- Salonul de recepție și înregistrare a materialului biologic se amenajează cu fereastră pentru primirea mostrelor. Salon se dotează cu o masă pentru lucrul cu materialele biopatogene, o masă pentru lucru cu documente, masă sau stelaj pentru rezultatele cercetărilor efectuate, stelaje sau dulape pentru păstrarea eprubetelor, suporturilor etc. Suprafața de 14-20 m².
- Expedierea materialului biologic în laborator se efectuează folosind containere, bixe sau containere frigorifice.
- Salonul de pregătire a mostrelor pentru testare și salonul de centrifugare, de obicei, se amenajează într-un bloc. În aceste saloane eșantioanele sanguine se pregătesc pentru testarea de screening: serul sanguin se separă de cheag, eprubetele cu ser sanguin se instalează în suporturi cu 96 cuiburi. Salonul se amenajează cu mese pentru lucru cu materialul biologic, documente, dulape, frigidere, centrifugi. Suprafața salonului - 17-20 m².
- Salonul ELISA (unul sau mai multe în dependență de volumul de investigații) se amenajează cu mese de lucru pentru efectuarea investigațiilor imunoenzimatic (individuale pentru fiecare specialist care efectuează reacția), mese pentru instalarea spectrofotometrelor, spălătoarelor pentru plăci, vaselor cu soluții de dezinfectare, frigidere, congelatoare (-20°C), termostate, dulapuri medicale, veselă de laborator de măsurare, vas cu capac pentru apă distilată, etc. Suprafața 20-40 m².
- Salonul western-blot se amenajează cu mese pentru efectuarea reacției imunoblot, lucrul cu documente, instalarea agitatorului și spălătorului, cu frigider, dulap medical, etc. Suprafața 15-20 m².
- Salonul pentru medici se amenajează cu mese de lucru, dulapuri închise cu cheie pentru păstrarea documentelor, computer. Suprafața 15-20 m².
- În salonul pentru autoclavare se instalează autoclav vertical sau orizontal și mese de lucru. Suprafața trebuie să corespundă cerințelor la montarea autoclavului de marca anumită.
- Salonul distilare se amenajează cu distilatoare, vase pentru

colectarea apei distilate.

- În spălătorie se instalează 2-3 căzi pentru spălare și clătirea veselei de laborator, mese de lucru, aragaz sau reșou, dulapuri cu căldură uscată, stelaje pentru plasarea vaselor pentru dezinfectarea și spălarea veselei de laborator, hainelor de protecție, vaselor pentru dezinfectarea rămășițelor materialelor biologice. Se asigură condiții pentru păstrarea inventarului de dereticare. Suprafața 25-30 m².
- Depozit pentru păstrarea test-sistemelor diagnostice, altor materiale se amenajează cu frigidere, mese de lucru, stelaje.

8.2.2.8. Toate încăperile trebuie să fie asigurate cu apă curgătoare, încălzire și canalizare centrală, apa caldă, robinete pentru spălarea mâinilor, ștergătoare electrice (sau șervete diferite pentru mânuși și mâini), să fie iluminate bine. Încăperile în care se efectuează lucru cu materiale infectate se amenajează cu lămpi bactericide.

8.2.2.9. La ieșire din blocul «contaminat» se instalează un dulap sau cuier pentru hainele de protecție destinate lucrului în acest bloc al laboratorului. Ieșirea în aceste haine în partea «curată» a laboratorului este interzisă.

8.2.2.10. La organizarea laboratorului e necesar de a prevedea încăperi pentru păstrarea materialelor și utilajului de rezervă, reactivelor chimice.

8.2.2.11. La planificarea încăperilor laboratorului e necesar de a prevedea asigurarea fluxului «curat» și «contaminat», consecutivitatea deplasării materialului patogen, începând de la recepționare a materialului biologic și până la dezinfectarea lui, excluzând «încrucișarea» fluxului «curat» și «contaminat». Salonul de recepție și înregistrare a materialului biologic se recomandă a amplasa la intrare în laborator, alături de încăperea destinată pregătirii lor pentru cercetare. Salonul de autoclavare și spălătorie se amplasează alături.

8.2.2.12. În scopul asigurării condițiilor necesare la efectuarea cercetărilor serologice și obținerii rezultatelor conforme, temperatura aerului în încăperile de lucru trebuie să corespundă cerințelor instrucțiunii la testul aplicat, de obicei, în limită de 18-25 °C, fiind asigurată prin condiționarea aerului. În timpul lucrului cu materialul biopatogen condiționarul se deconectează. Este necesară instalarea în laborator a sistemului de ventilare flux-reflux.

8.2.2.13. Podelele în saloanele laboratorului trebuie să fie acoperite cu linoleum sau teracotă, pereții finisați cu teracotă sau vopsiți, ca și podurile, cu vopsea de ulei de culori deschise, să fie netede, lavabile, rezistente la umezeală și preparate de dezinfectare.

8.2.2.14. Mobila și utilajul de laborator trebuie să fie din materiale solide, fără margini ascuțite. Suprafețele de lucru ale meselor destinate pentru lucru cu materialele biopatogene să fie acoperite cu materiale nepenetrabile pentru apă și rezistente la preparate de dezinfectare. Toată

mobila să fie lavabilă.

8.2.2.15. Laboratorul se dotează cu dozatoare automate de volume necesare pentru măsurări. Turnarea serului sanguin și a reactivelor dintr-o eprubetă în altă, distribuirea lor în godeurile plăcii se efectuează cu dozatoare automate. Se interzice pipetare cu gură.

8.2.2.16. Lucrul cu dosare și materiale patogene în saloanele de lucru se efectuează pe mese diferite.

8.2.2.17. Trecerea materialelor biologice prin zona «curată» se efectuează folosind casonete (containere, bixe) destinate acestui lucru, fabricate din materiale rezistente la umezeală și dezinfectanți, cu capac bine închis.

8.2.3. Cerințele la organizarea regimului antiepidemic și măsurile de protecție personală în laboratoarele de diagnosticare a SIDA, hepatitelor și altor infecții virale

8.2.3.1. Măsurile generale de protecție

1) Fiecare loc de lucru trebuie să fie dotat cu instrucțiuni, în care sunt expuse cerințele de bază la organizarea lucrului, tehnica securității, regimul antiepidemic și protecția personală. Îndrumătoarele se elaborează de către șeful de laborator, luând în considerație cerințele la organizarea măsurilor de dezinfectare și condițiilor locale, de exemplu, dotarea cu preparate de dezinfectare etc. Instrucțiunea privind regimul de dezinfectare se elaborează, reieșind din dotarea laboratorului cu autoclav, asigurarea cu preparate de dezinfectare etc. Instrucțiunile se aprobă de către conducătorul instituției. Pentru fiecare unitate de aparataj instalat în laborator de asemenea se elaborează instrucțiunea privind exploatarea lui, aprobată de conducătorul instituției și prezentată la locul de muncă respectiv. Toate aparatele electrice trebuie să fie împământate, dotate cu covorașe dielectrice, dacă acest lucru este cerut de producătorul.

2) Toate încăperile laboratorului se mențin curate, zilnic, la terminarea lucrului, sunt dereticate cu dezinfectarea podelelor și altor suprafețe (uși, polițe, pervazuri, dulapuri, etc.), folosind soluție de cloramină sau clorura de var de 1% sau alt preparat de dezinfectare. Peste 2 ore sau a doua zi dimineața, înainte de începutul lucrului, încăperile prelucrate se aerisesc, podelele și alte suprafețe se spală cu apă curată. Pereții și podurile nu mai rar decât o dată pe lună să fie prelucrate cu soluție de dezinfectare, spălate cu apă caldă și săpun (detergent) și șterse cu cârpă curată. E strict interzis a aduce și a păstra în încăperile zonei «contaminate» orice obiecte și lucruri care nu sunt aplicate în procesele tehnologice.

3) Locurile de lucru trebuie să fie dotate cu trusă farmaceutică pentru acordarea primului ajutor medical, inclusiv în cazuri de avarii și accidente. Ea trebuie să fie completată cu soluție de 5% de iod, soluție de verde brilliant, o fiolă cu amoniac, alicote de 250 miligrame de permanganat de potasiu și 500 mililitri de apă distilată pentru pregătirea soluției de 0,05%,

pipetă oculară, materiale de pansament, leucoplast bactericid, degetare, garou hemostatic, validol, preparate antipiretice și analgetice.

4) Saloanele de lucru se dotează cu vase cu capace marcate pentru colectarea și dezinfectarea deșeurilor.

5) Laboratorul se dotează cu un volum de rezervă al remediilor de dezinfectare, peroxid de oxigen, alcool etilic, preparate de clor. Se achiziționează preparate înregistrate în țară în mod stabilit. Soluțiile de lucru ale preparatelor de dezinfectare se pregătesc conform cerințelor instrucțiunii producătorului.

6). Centrifugarea mostrelor sanguine se efectuează în salon special, folosind centrifuge verificate metrologic.

7) Toate deșeurile - rămășițele de sânge, ser, soluțiile de tampon, de spălare a plăcilor, condensatul frigiderelor, plăcile consumate, hîrtia adezivă, pungile, flacoanele cu rămășițele serurilor-martor pozitiv, altor reactive se supun dezinfectării în mod obligatoriu. Se interzice turnarea lichidelor nedezinfectate în rețea de canalizare și aruncarea la gunoi a oricăror materiale nedecontaminate.

8.2.3.2. Măsurile de securitate personală. Luînd în considerație căile de transmitere prin sânge a maladiilor infecțioase, lucrătorii medicali trebuie să evite contactul pielii și mucoaselor cu sângele și cu toate materialele biologice contaminate și potențial contaminate, ceea ce se asigură prin folosirea hainelor de protecție, efectuarea cu prudență a tuturor etapelor de lucru cu biomateriale, efectuarea la timp a dezinfecției curente, înlăturarea consecințelor situațiilor de avarie și respectarea măsurilor de protecție personală.

1) Toate activitățile de lucru de laborator se efectuează folosind haine de protecție: halat chirurgical îmbrăcat asupra pijamalei, bonetă, mască, mănuși de cauciuc. La pericolul stropirii, anume la manipulare a serurilor sanguine, se utilizează mijloace de protecție a cavității bucale, căilor respiratorii și ochilor: mască din tifon, ochelari sau ecrane speciale de protejare, care se supun dezinfectării. Pentru lucru cu biomateriale fiecare lucrător se dotează cu haine de protecție și încălțăminte individuale (halate chirurgicale - 2, halate medicale - 2, bonete sau casînci - 2, pijamale de vară și de iarnă - cîte 2 complete, ciupici, ecrane de protejare sau ochelari - 1, mănuși de cauciuc). Halatele se schimbă o dată în săptămîină, măștile - zilnic. Pentru ieșire în teritoriul instituției lucrătorii se dotează cu halate calde.

2) Înainte de a începe lucru, toate leziunile pielii la mîini se acoperă cu leucoplast sau se îmbracă degetar, după ce se îmbracă mănuși de cauciuc (latex).

3) Toate tipurile de lucru se efectuează cu prudență, excluzînd stropirea picăturilor de sânge, ser, reactivelor din test-sisteme. Flacoanele se deschid cu precauție, mai ales cele cu martorii pozitivi.

4) Toate speciile de lucru cu sânge - separarea serului de la cheag,

turnarea, distribuirea, etc. - se efectuează folosind dozatoare automate cu conuri de o singură folosință, cu acuratețe, excluzând stropirea și răsturnarea lor.

5) La terminarea lucrului personalul laboratorului este obligat să efectueze dezinfectarea mesei de lucru și mâinilor înainte și după dezbrăcarea mănușilor. Mâinile în mănușile se prelucreează cu alcool etilic de 70 °, expoziția 2 min., se spală cu săpun și apă curgătoare, după ce se șterg pînă la uscare. Analogic se spală mâinile și după dezbrăcarea mănușilor. Pentru ștergerea mâinilor cu mănuși și fără sunt prevăzute șervetele diferite.

6) La locurile de lucru se interzice categoric a mânca, a bea, a fuma, a folosi cosmetica.

8.2.3.3. Regimul antiepidemic la locul de lucru la recepționarea mostrelor sanguine și pregătirea lor pentru investigație serologică.

1) Dotarea locului de lucru:

- Vas cu tampoane umezite cu alcool etilic de 70 ° pentru prelucrarea mâinilor, mesei, containerilor, în care sunt expediate probele sanguine;
- Vas pentru colectarea materialului contagios prelucrat: eprubetele cu mostre rebutate, eprubetele stricate, tampoanele folosite, conurile pentru dozatoare automate, etc.;
- Vas cu soluție de dezinfectare (apă oxigenată de 6%) pentru colectarea dopurilor de cauciuc;
- Trusă farmaceutică cu materialele necesare pentru prelucrarea urgentă a pielii și mucoaselor în caz de accident;
- Cuve, suporturi, eprubete, alte obiecte pentru aranjarea probelor sanguine recepționate;
- Pensetă anatomică;
- Vas cu dezinfectant (apă oxigenată de 6%, alcool de 70 °) pentru dezinfecția mănușilor de cauciuc (latex) în cazul refolosirii lor;
- Două șervete marcate: «Pentru mănuși», «Pentru mâini».

2) Este interzisă primirea mostrelor sanguine expediate fără container, în genți, sacoșe de polietilenă.

3) Formularele de însoțire să fie puse într-o pungă de polietilenă. Se interzice recepționarea mostrelor cu formularele băgate înăuntru eprubetelor. Formularele contaminate cu sânge, ser se prelucreează cu fer de călcat bine încălzit.

4) A deschide cu acuratețe containerul, a se convinge, că toate eprubetele sunt întregi. Mostrele de sânge se expediază în eprubete din masă plastică de o singură folosință (tip eppendorf) bine închise sau din sticlă închise cu dopuri de cauciuc sau vată-tifon învelite cu polietilenă. Dezambalarea materialului expedit în laborator pentru testare se efectuează cu prudență, respectînd măsurile de precauție, folosind mănuși

de cauciuc (latex).

5) După primirea mostrelor, containerul se prelucrează cu soluție de dezinfectare. În cazul vărsării sîngelui sau la prezența urmelor vizibile de sînge pe container el se dezinfectează prin scufundarea în soluție de cloramină sau clorurii de var de 3%, expoziția 2 ore, după ce se clătește cu apă și se usucă. Curierului se întoarce containerul dezinfectat. Rezultatele investigațiilor efectuate anterior se eliberează, plasîndu-le într-o sacoșă de polietilenă.

6) După înregistrare și triere serurile se expediază în salonul de investigații serologice.

7) Toate mostrele sanguine primite se păstrează pînă la testare la +4 - +8°C.

8.2.3.4. Regimul antiepidemic și măsurile de securitate personală la locul de lucru la efectuarea investigației serologice. În saloanele de investigații serologice (ELISA, imunoblot, etc.) pentru dezinfectarea curentă se folosește alcool etilic de 70°, apă oxigenată de 6%, alte preparate de dezinfectare conform instrucțiunilor de utilizare. Se interzice a păstra și a utiliza în timpul lucrului ELISA preparate care elimină clor (alterează enzimele).

1) Saloanele de cercetări imunoenzimatică și imunoblot în conformitate cu cerințele de organizare a regimului antiepidemic se consideră similare boxei pentru lucru cu agenți biopatogeni din grupul 2. Pentru lucru în aceste saloane a prevedea haine de protecție aparte, care se păstrează în dulap (cuiet) instalat la intrare în salon. La ieșire din salon se dezbracă halatul, masca, boneta, mănușile.

2) Salonul se înzestrea cu:

- Echipament ELISA (western blot);
- Container sau bix pentru expedierea eșantioanelor pentru testare și scoaterea celor consumate (la trecerea prin încăperi «curate»);
- Un recipient cu capac pentru deșeuri contaminate;
- Două șervete marcate «Pentru mănuși» și «Pentru mîini»;
- Trusa farmaceutică (una pentru salon).

Amenajarea locului de lucru:

- Un vas cu tampoane cu alcool etilic de 70 °;
- Cuvă emailată (metalică);
- Un set de dozatoare automate pentru măsurarea volumelor necesare;
- Vas cu conuri curate pentru dozatoare automate;
- Veselă de laborator pentru pregătirea diferitor soluții și reactive de lucru;
- Un vas cu soluție de dezinfectare pentru colectarea materialelor biopatogene consumate, mostrelor sanguine rebutate, eprubetelor stricate etc.;

3) Toate procedurile în procesul realizării reacției - dizolvarea și distribuirea serurilor sanguine testate, martorilor, altor reactive - se efectuează numai pe cuvă emailată (metalică), cu acuratețe, evitând formarea aerosolilor și nimerirea picăturilor și stropilor de sânge pe masă, podea, mănuși, etc.

4) Flacoanele cu martori pozitivi, negativi, alte reactive și reactivi se deschid cu prudență, evitând lezarea pielii, vărsare și stropire a conținutului. Toate eprubetele, fiolele se instalează în suporturi speciale pentru evitarea vărsării. Dopurile și suprafețele flacoanelor la terminarea lucrului se prelucrează cu alcool etilic de 70 °, iar în cazul când nu vor fi întrebuințate, se aruncă, fiind deschise, într-un vas special cu capac destinat colectării deșeurilor.

5) Păstrarea serurilor sanguine (bancare) ale persoanelor infectate cu HIV, a tuturor mostrelor sanguine în procesul investigațiilor de triere și de confirmare se efectuează în eprubete de sticlă bine închise cu dopuri de gumă sau în eprubete eppendorf sau crioeprobete în congelator la temperatura -20 – -40 °C. Dezghețarea acestor seruri se efectuează cu permiterea medicului, respectând măsurile antiepidemice. La terminarea lucrului, suprafața eprubetei și dopului se prelucrează cu grijă cu alcool etilic de 70 °, după ce se instalează în suport în frigider.

8.2.3.5. Metodele de dezinfectare și prelucrare a veselei de laborator, hainelor de protecție, încăperilor de lucru în laboratoarele de diagnosticare a SIDA.

1) Toate materialele biologice, vesela de laborator, aparatajul și utilajul, suprafețele de lucru și ale saloanelor, hainele de protecție, inventarul folosit la dereticarea încăperilor se supun dezinfectării.

2) Dezinfectarea deșeurilor medicale se efectuează prin autoclavare de către specialist cu pregătire specială confirmată cu certificat. Materialele utilizate se colectează în vase speciale. În fiecare vas se pune fiolă cu unul din testele chimice cu temperatura de topire 132 °C pentru controlarea regimului funcționării autoclavului. Autoclavarea se supune controlului fizic (termometru) și biologic (cultura *Bacillus cereus* o dată în lună).

Vasul se închide bine cu capac, se leagă cu sfoară și se supune autoclavării la temperatura 132 °C la tensiunea abundentă 2,0 kg/cm² (0,20 MPa) timp de 60 min. La terminarea autoclavării laborantul controlează fiola cu testul chimic de control. Topirea testului chimic și colorarea lui confirmă atingerea temperaturii necesare. Numai după aceasta procedură vasul cu materiale poate fi trecut în salonul de spălare.

3) În lipsa autoclavului se permite dezinfectarea materialelor biopatogene prin metoda chimică. În acest caz dezinfectarea se realizează de un specialist cu studii medii - laborant, felcer-laborant. Spălarea veselei dezinfectate, dezinfectarea încăperilor de lucru și dereticarea lor, dezinfectarea și spălarea hainelor de protecție se efectuează de infirmieră.

4) Se utilizează preparate aprobate și înregistrate în țară cu proprietăți

bactericide, tuberculocide, virulicide și fungicide. Pregătirea soluțiilor de dezinfectare se efectuează conform cerințelor producătorului.

5) Materialele consumate în procesul ELISA și imunoblot, microplăcile cu tot conținutul se dezinfectează prin scufundarea în soluție de dezinfectare, expoziție de două ore (sau timpul indicat de producătorul produsului), după aceea se aruncă într-un loc special, excluzând accesul persoanelor străine.

6) La dezinfectarea chimică rămășițele de sânge se toarnă cu acuratețe din eprubetele într-un vas special marcat și se adaugă cloramină sau clorură de var în proporție 5:1 (sânge : preparat), se amestecă bine și se lasă pe un termen de 2 ore. Alte preparate de dezinfectare se utilizează conform indicației producătorului. Eprubetele de o singură utilizare (din masă plastică), fiole cu cheaguri de sânge, rămășiți de ser se scufundă într-o soluție de dezinfectare, respectând măsurile de precauție: eprubetele se iau cu pensă anatomică, o bransă fiind puțin introdusă în cavitatea eprubetei, eprubeta puțin se înclină și se scufundă până la umplerea cu soluție, evitând formarea bulelor de aer. După scufundarea tuturor eprubetelor pensa se dezinfectează.

7) Frigiderele, în care se păstrează mostrele sanguine, preparatele diagnostice, se întrețin curate, se dezgheață și se spală la formarea gheții, dar nu mai rar de o dată în două săptămâni. Condensatul se strânge într-un vas special, se dezinfectează prin adăugarea cloraminei sau clorurii de var până la concentrație de 3% (30 gr. la un litru), sau altui preparat de dezinfectare, după expoziție de două ore se varsă în rețeaua de canalizare. Suprafețele dinăuntru se prelucrează cu alcool de 70 ° sau se flambează, se spală și se usucă.

8) Termostatele se prelucrează cu alcool de 70 ° sau se flambează, se spală și se usucă. Aparatele ELISA se dezinfectează conform indicațiilor instrucțiunii producătorului.

8.2.4. Măsurile la accidente

În caz de accident lucrul se stopează. Despre fiecare caz de avarie imediat se înștiințează șeful laboratorului. Înlăturarea avariei se efectuează sub controlul medicului, la necesitate în acest lucru sunt implicați și alți colaboratori ai laboratorului.

1) La răsturnarea eșantioanelor sanguine în timpul transportării sau la locul de lucru, transportarea serului în eprubete stricate sau la stricarea lor în laborator a sorta cu atenție eprubetele cu sânge, separînd cu ajutorul pensei anatomice cele stricate de cele întregi, evitînd stropirea și nimerirea picăturilor dintr-o eprubetă în altă. La posibilitate, e de dorit a păstra rămășițele sîngelui din eprubetele stricate (numai în cazul, cînd poate fi exclusă contaminarea reciprocă a probelor) și a transfera conținutul în eprubete curate. Eprubetele contactate cu cele stricate se prelucrează de pe de afară cu alcool etilic de 70 ° sau cu apă oxigenată de 6%, după ce se instalează în suport. Eșantioanele suspecte la contaminarea cu sânge din eprubetele stricate se trec în rebut.

2) Containerul sau alt vas contaminat cu sânge se scufundă într-o soluție de.

3) La nimerirea materialului contaminat sau potențial contaminat pe halat,

îmbrăcăminte acest loc se prelucrează imediat cu soluție dezinfectantă, după ce se dezbracă mănușile, pe urmă - halatul, care se scufundă într-o soluție de dezinfectare sau se pune în cazoletă pentru autoclavare. Încălțăminte se prelucrează prin ștergerea dublă cu cârpă înmuiată în soluție dezinfectantă. Mîinile și pielea de pe alte suprafețe ale corpului care a contactat cu hainele contaminate se prelucrează cu alcool etilic de 70 °.

4) La nimerirea materialului contaminat pe față, locul respectiv se prelucrează cu alcool etilic de 70 °, pe urmă se spală bine cu săpun.

5) La nimerirea sau suspiciunea nimeririi materialului contaminat la tunica mucoasă: a gurii - a clăti gura și gîtul cu permanganat de potasiu de 0,05% sau alcool etilic de 70 °; ochii - cu soluție de 1% de acid boric sau cu cîteva picături de nitrat de argint de 1%, sau cu permanganat de potasiu de 0,05%, în nasul se picură permanganat de potasiu de 0,05%.

6) La lezarea pielii (tăietură, zgîrietură) a scurge intensiv din rana cîteva picături de sînge, pe urmă a prelucra rana și pielea împrejurul ei cu alcool etilic de 70 °, a spăla mîinile cu apă și săpun, după ce a prelucra rana cu soluție de iod de 5%, la necesitate a pansa rana. Dacă lucrul s-a efectuat în mănuși de cauciuc, acele măsuri se precedă cu prelucrarea mănușilor cu soluție de dezinfectare și dezbrăcarea lor. Pentru a continua lucrul se îmbracă degetar și mănuși de cauciuc (latex) noi. Persoana dată se ia la evidența medicală conform cerințelor instrucțiunii în vigoare [34].

7) La nimerirea materialului infectat pe podea, pereți, mobilă, utilaj etc. suprafața contaminată se prelucrează cu soluție de dezinfectare (apă oxigenată de 6%, cloramină sau clorură de var de 3%, alte preparate). La vărsarea unui volum mare de sînge, ser suprafața contaminată, împreună cu eprubetele stricate, se presoară cu cloramină sau clorură de var praf. După expoziție timp de 60 min. toate rămășițele se strîng într-un vas cu soluție de clorura de var sau cloramină de 3% și după expoziție de 2 ore se aruncă. Toată suprafața se șterge cu cârpă muiată cu soluție de dezinfectare, după ce se spală cu apă. Cîrpa folosită se scufundă în soluție de dezinfectare sau se pune în container pentru autoclavare ulterioară.

8) În caz de avarie la centrifugare (stricarea eprubetelor în procesul centrifugării), centrifuga se deconectează, se lasă închisă timp de 30 min. pentru depunerea aerosolului format. Aditivele și bucăți de sticlă stricate se transferă, cu ajutorul pensei, în soluție de dezinfectare, după ce părțile interioare și exterioare ale centrifugii se dezinfectează.

9) Toate avariile se înregistrează cu descrierea detaliată în registru pentru înregistrarea avariilor cu indicația datei și măsurilor luate.

10) După lichidarea avariei șeful laboratorului informează despre cele întîmplate conducătorul instituției și președintele comisiei de regim a instituției. Pentru fiecare caz de avarie se întocmește act cu datele depline a analizei cauzelor ei și evaluării măsurilor luate. Actul se semnează de conducătorul instituției, președintele comisiei de regim și șeful laboratorului.

8.2.5. Evidența medicală a personalului laboratoarelor diagnostice.

Colaboratorii laboratoarelor diagnostice HIV/SIDA se supun testării la anticorpii anti-HIV și AgHBs inițial, la angajarea la lucru, și ulterior de două ori pe an cu bancarea serurilor sanguine în laboratorul CNSP, Centrului SIDA. Probele de sânge se însoțesc cu formularul f. SIDA Nr 12/e „Îndreptare a probelor de sânge a lucrătorilor medicali, care asigură diagnosticarea, tratamentul, deservirea nemijlocită a infectaților și bolnavilor de HIV/SIDA pentru examinare și depozitare”.

În laboratorul Centrului SIDA eșantioanele sanguine se testează în ELISA la anticorpi anti-HIV și, la necesitate, - în testul imunoblot. Investigația la AgHBs se efectuează în instituția medico-sanitară la locul de domiciliu al lucrătorului. Rezultatele testărilor se prezintă în laboratorul Centrului SIDA.

În cazurile de expunere profesională în procesul de lucru cu materiale biologice infectate și potențial infectate se procedează conform cerințelor Instrucțiunii cu privire la măsurile de prevenire a infectării cu virusul imunodeficienței umane (HIV) în caz de expunere profesională accidentată a lucrătorilor medicali” [34] și Procedurii operaționale standard elaborate în baza acestei instrucțiuni.

Conducătorul instituției medicale și șeful laboratorului sunt responsabili pentru testarea la timp a colaboratorilor laboratoarelor diagnostice.

Referiri

1. Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance: Selection, Evaluation, and Implementation. UNAIDS. CDC, USAUD, WHO, 2001.
2. Guedelines for Assuring the Accuracy and Reliability of HIV Rapid Testing: Applyng a Quality System Approach. WHO/CDC, 2005.
3. A handbook for Improving HIV Testing and Counseling Cervices. WHO, 2010.
4. Standardului Moldovean SM SR EN ISO/CE 15189/2010 „Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență”.
5. Situația în infecția HIV/SIDA, perioada de referință 2010. Buletin informativ nr. 10a-7/212 din 14.03.2011.
6. UNAIDS/WHO. Guidelines for second generation HIV surveillance. Geneva: UNAIDS/WHO. WHO/CDS/CSR/EDC/2000.5. UNAIDS/00.03E. 2000.
7. Programul Național de prevenire și control al infecției HIV/SIDA și infecțiilor cu transmitere sexuală pentru anii 2011-2015. HG nr. 1143 din 16.12.2010.
8. Lege Nr. 10 din 03.02.2009 privind supravegherea de stat a sănătății publice (MO Nr. 67 art Nr: 183).
9. Lege cu privire la profilaxia infecției HIV/SIDA nr. 23-XV din 16.02.2007 (MO nr. 54-56/250 din 20.04.2007).
10. Protocolul Național în supraveghere epidemiologică de generația a II-a și manualul operațional în supraveghere epidemiologică a HIV/SIDA în Republica Moldova.
11. Legea privind donarea și transfuzia sanguină nr. 241-XVI din 20.11.2008.
12. Programul Național „Securitatea transfuzională și autoasigurarea țării cu preparate sanguine pentru anii 2007-2011” aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 637 din 07.06.2007.
13. Cu privire la aprobarea algoritmilor de testare a sîngelui donat. Ordinul MS nr. 220 din 02.04.2010.
14. Cu privire la Regulile de examinare și supraveghere medicală pentru depistarea contaminării cu virusul imunodeficienței umane (maladia SIDA). Ordin MS RM nr. 314 din 31.07.2007.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS] 1998.
16. Lennette E.H., Balows A., Hausler Jr Wj, Shadomy H.J. Manual af Clinical Microbiology, 1985.

17. UNAIDS/WHO. Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Report II. January 1999. UNAIDS/WHO.
18. UNAIDS/WHO. UNAIDS/WHO Recommendations. The importance of simple/rapid assays in HIV testing. Weekly Epidemiological Record. 1998; 73:321-28.
19. Respass RA, Rayfield MA, Dondero TJ. Laboratory testing and rapid HIV assays: applications for HIV surveillance in hard-to-reach populations. AIDS 2001; 15 (suppl 3):S49-S59.
20. Ghid Național de biosiguranță pentru laboratoare . Chișinău, 2011.
21. Ghid Național de reglementări pentru transportul substanțelor infecțioase. Chișinău, 2011).
22. Ghid național de tratament și îngrijiri în infecția HIV și SIDA. Ordin MS Nr. 523 din 24.12.2009).
23. UNAIDS. HIV Testing Methods: UNAIDS Technical Update (UNAIDS Best Practice Collection Technical Update). Geneva: UNAIDS, November 1997.
24. Branson B. Assessing diagnostic techniques marketed to less industrialized countries. Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care February 2000;56-8.
25. Stetler HC, Granade TC, Nunez CA, Meza R, Terrell S, Amador L, et al. Field evaluation of rapid HIV serologic tests for screening and confirming HIV-1 infection in Honduras. AIDS 1997;11:369-75.
26. Downing RG, Otten RA, Marum E, et al. Optimizing the delivery of HIV counseling and testing services. J. Acquir Immune Defic Syndr Hum. Retrovirol 1998; 18(4): 384-8.
27. Cu privire la autorizarea vaccinurilor, serurilor și preparatelor imunobiologice. Ordin MS nr. 179 din 14.03.2011.
28. Lege privind achizițiile publice Nr. 96 din 13.04.2007.
29. UNAIDS/WHO. Guidelines for organizing national external quality assurance schemes for HIV serological testing. UNAIDS/96.6 Geneva: UNAIDS/WHO; January 1996.
30. WHO. Biosafety guidelines for diagnostic and research laboratories working with HIV. Geneva: World Health Organization. 1991. WHO AIDS Series 9.
31. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other pathogens in health-care settings. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1988; 37(24): 377-88.

32. Richmond J and McKinney R, editors. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 3rd ed. Washington (DC):U.S. Government Printing Office; 1993.
33. Directive 2000/54/CE of The European Parliament and The Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
34. Instrucțiune cu privire la măsurile de prevenire a infectării cu virusul imunodeficienței umane (HIV) în caz de expunere profesională accidentată a lucrătorilor medicali. Hotărârea medicului șef sanitar de sta al Republicii Moldova Nr. 15 din 20.07.2006.
35. Instrucțiune de utilizare a testelor rapide în supravegherea epidemiologică a infecției HIV și testarea gravidelor. Ordin MS RM nr. 254 din 25.06.2007.