НАРЕДБА № 44 ОТ 26 АВГУСТ 2010 Г. ЗА УТВЪРЖДАВАНЕ НА МЕДИЦИНСКИ СТАНДАРТ "КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ"

Издадена от министъра на здравеопазването

Обн. ДВ. бр.68 от 31 август 2010г., изм. ДВ. бр.92 от 23 ноември 2010г., изм. и доп. ДВ. бр.32 от 8 април 2014г., ***изм. ДВ. бр.63 от 30 юли 2021г.***

Чл. 1. (1) С тази наредба се утвърждава медицинският стандарт "Клинична имунология" съгласно приложението.

(2) С медицинския стандарт се определят:

1. основните характеристики на специалността "Клинична имунология";

2. нивата на компетентност на лабораториите и на другите структури, които осъществяват дейност по специалността "Клинична имунология" в лечебните заведения за болнична и за извънболнична помощ;

3. основните изисквания към лабораторията по клинична имунология (персонал, устройство, дейност, контрол, документиране, задължителен и оптимален обем лабораторни показатели, апаратура, аналитични принципи);

4. основните изисквания към кабинетите, отделенията и клиниките по клинична имунология в лечебните заведения (устройство, задължителни дейности, персонал).

Чл. 2. Вътрешните актове на органите на управление на лечебното заведение и договорите за оказана медицинска помощ, сключвани от лечебните заведения, не могат да съдържат разпоредби, които определят по-ниско качество на осъществяваната дейност по клинична имунология от установеното с изискванията на тази наредба.

Преходни и Заключителни разпоредби

§ 1. Указания по прилагането на тази наредба се дават от министъра на здравеопазването.

§ 2. (Изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Контролът по изпълнение на наредбата се осъществява от Изпълнителна агенция "Медицински надзор", регионалните здравни инспекции и органите на управление на лечебните заведения.

§ 3. За нарушение или неизпълнение на задълженията по тази наредба виновните лица се наказват по реда на Закона за лечебните заведения и Закона за здравето.

§ 4. Наредбата се издава на основание чл. 6, ал. 1 от Закона за лечебните заведения и чл. 80 от Закона за здравето и отменя Наредба № 7 от 12 април 2006 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Клинична и лабораторна имунология" (ДВ, бр. 39 от 2006 г.).

§ 5. (Нов - ДВ, бр. 92 от 2010 г., отм. - ДВ, бр. 32 от 2014 г., в сила от 01.01.2014 г.)

§ 6. (Нов - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) (1) (Изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) В случаите, когато лечебното заведение за болнична помощ не разполага със собствена клинична лаборатория, то следва да осигури осъществяването на необходимите за дейността по клинична имунология изследвания, по договор със самостоятелна медико-диагностична лаборатория или с клинична лаборатория - структура на друго лечебно заведение. В тези случаи лабораторията, с която е сключен договорът, следва да бъде разположена на адреса, на който се осъществява дейността по клинична имунология. С договора задължително се обезпечава 24-часово осъществяване на дейностите по клинична лаборатория за нуждите на структурата по клинична имунология.

(2) (Отм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.)

Преходни и Заключителни разпоредби
КЪМ НАРЕДБА ЗА ИЗМЕНЕНИЕ НА НАРЕДБА № 2 ОТ 2010 Г. ЗА УТВЪРЖДАВАНЕ НА МЕДИЦИНСКИ СТАНДАРТ "КАРДИОЛОГИЯ"

(ОБН. - ДВ, БР. 32 ОТ 2014 Г., В СИЛА ОТ 01.01.2014 Г.)

§ 25. Наредбата влиза в сила от 1 януари 2014 г.

Приложение към чл. 1, ал. 1

(Изм. и доп. - ДВ, бр. 92 от 2010 г., изм. и доп. - ДВ, бр. 32 от 2014 г., в сила от 01.01.2014 г., изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.)

МЕДИЦИНСКИ СТАНДАРТ "КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ"

Раздел I

Основни характеристики на специалността "Клинична имунология"

1. (изм. - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) Клиничната имунология е медицинска специалност и научна дисциплина, която включва:

1.1. Изследване на имунната система на човека в норма и патология - специфичен диагностичен процес, основан на данните от анамнезата, сегашното състояние и приложеното до момента лечение, извършвани от лекар със специалност клинична имунология с цел определяне на предполагаемата диагноза и назначаване на необходимите изследвания.

1.2. Изследване на имунната система на човека при норма и патология чрез прилагането на специфични имунологични методи и тяхната интерпретация.

1.3. Определяне на индикациите за имуномодулираща терапия, лекарствено мониториране, мониториране на активността на болестния процес, засягащ имунната система.

1.4. Определяне на прогнозата на болестта. Диспансеризация и продължително наблюдение.

2. Основна цел на тази специалност е осигуряването на съвременна, надеждна информация за ранна диагноза на нарушенията, свързани с имунната система, проследяване на ефекта от приложеното лечение, контрол на динамиката на болестния процес, ефективна профилактика, оценка на степента на възстановяване на здравето и трудоспособността.

3. Клиничната имунология е специалност с интердисциплинарен характер, взаимодействащ с всички останали медицински специалности. В същото време специфичността на

методите на имунологията (обект на лабораторната имунология) и на широкия контингент от болни определят някои специфични изисквания към дейността:

3.1. обща валидност на задължителните норми на специалността независимо от вида на лечебното заведение;

3.2. участие на лекар със специалност клинична имунология на всички етапи от изследването на пациента - назначаване и провеждане на изследването, поставяне на диагнозата, избор на лечение, проследяване на ефекта на терапията;

3.3. провеждането и интерпретацията на имунологичните изследвания трябва да се извършва под контрола на лекар със специалност клинична имунология, независимо от вида на лечебното заведение;

3.4. задължителен (минимален) обем показатели и апаратура за имунологичните лаборатории и клиники (отделения), осъществяващи специализирана извънболнична и болнична помощ в България;

3.5. препоръчваните методологични и аналитични принципи за осъществяване на дейността за постигане на максимално високо качество на изследване, възпроизводимост на резултатите и унифициране на интерпретацията им.

Раздел II

Нива на компетентност

1. Лаборатория по клинична имунология - самостоятелно лечебно заведение или част от структурата на лечебно заведение за извънболнична помощ.

1.1. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Обезпеченост с персонал - персоналът (лекар/и и професионалисти по здравни грижи) се определя в зависимост от обхвата и обема на осъществяваните изследвания.

1.2. Необходима квалификация - съгласно раздел III, т. А "Персонал"

1.3. Компетентност и обем дейност:

- вид показатели - съгласно раздел III, т. Д.1. "Задължителен (минимален) обем показатели за лаборатория по клинична имунология":

- обхват изследвания - минимум 1000 годишно.

1.4. Необходима апаратура - съгласно раздел III, т. Д.2 "Задължителна (минимална) лабораторна апаратура"

2. Кабинет по клинична имунология - част от структурата на лечебно заведение за извънболнична помощ.

2.1. Необходим брой кадри - съгласно раздел IV, т. 1.4 "Персонал"

2.2. Необходима квалификация - вж. т. раздел III.А "Персонал"

2.3. Дейност - съгласно раздел IV, т. 1.3 "Задължителни дейности"

2.4. Необходимо оборудване - съгласно раздел IV, т. 1.2 "Оборудване"

3. Изисквания към лаборатория по клинична имунология от второ ниво на компетентност в лечебни заведения за болнична помощ.

3.1. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Обезпеченост с персонал - в лаборатория по клинична имунология от второ ниво на компетентност работят лекар/и, специалист/и с висше немедицинско образование от професионални направления "Биологически науки" и/или "Химически науки" и професионалисти по здравни грижи, като броят им е в зависимост от обхвата и обема на осъществяваните изследвания.

3.2.Необходима квалификация - съгласно т. III.А "Персонал"

3.3. Компетентност и обем дейност:

- вид показатели: съгласно раздел III, т. Д.1 "Задължителен (минимален) обем за лабораторни показатели за лаборатория по клинична имунология" и минимум 50 % от раздел III, т.

Е.1. "Допълнителен (оптимален) обем за лабораторни показатели за лаборатория по клинична имунология"

- обхват изследвания - минимум 3000 годишно

3.4. Необходима апаратура - съгласно раздел III, т. Д.2 "Задължителна (минимална) лабораторна апаратура" и раздел III, т. Е.2 "Допълнителен (оптимален) обем лабораторна апаратура (в зависимост от профила на лабораторията)", покриващ вида показатели.

4. Изисквания към лаборатория по клинична имунология от трето ниво на компетентност в лечебни заведения за болнична помощ.

4.1. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Обезпеченост с персонал - в лаборатория по клинична имунология от трето ниво на компетентност работят лекар/и, специалист/и с висше немедицинско образование и специалност "Лабораторна имунология", специалист/и с висше немедицинско образование от професионални направления "Биологически науки" и/или "Химически науки" и професионалисти по здравни грижи, като броят им е в зависимост от обхвата и обема на осъществяваните изследвания.

4.2.Необходима квалификация - съгласно раздел III, т. А "Персонал"

4.3. Компетентност и обем дейност:

- вид показатели: съгласно раздел III, т. Д.1. "Задължителен (минимален) обем показатели и минимум 75 % от раздел III, т. Е.1. "Допълнителен (оптимален) обем показатели за лаборатория по клинична имунология"

- обхват изследвания -минимум 5000 годишно

4.4. Необходима апаратура - съгласно раздел III, т. Д.2 "Задължителна (минимална) лабораторна апаратура" и раздел III, т. Е.2 "Допълнителен (оптимален) обем лабораторна апаратура в зависимост от профила на лабораторията, покриващ вида показатели

5. Изисквания към клиника/отделение по клинична имунология от трето ниво на компетентност в лечебни заведения за болнична помощ.

Лечебната дейност по имунология в лечебни заведения за болнична помощ се осъществява от клиники/отделения по клинична имунология от III ниво, които отговорят на следните изисквания:

5.1. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Обезпеченост с персонал - персоналът (лекар/и и професионалисти по здравни грижи) осигурява оказване на пълноценни грижи за изпълнявания обем и сложност на дейността.

5.2. Необходима квалификация - съгласно раздел III, т. А "Персонал" и раздел IV, т. 2.4 "Персонал"

5.3. Компетентност: имунодиагностика; имунни дефицити; автоимунитет; алергия; туморна имунология; имунотерапия. В отделение/клиника по клинична имунология на III ниво се осъществява лечение на всички остри, обострени и хронични имунологични заболявания, с комплицирано протичане и при които се предполагат интензивни диагностични и терапевтични процедури.

5.4. Дейност: съгласно раздел IV, т. 2.3. "Основни дейности". Минимален обем дейност - 350 преминали пациенти годишно.

5.5. Необходимо оборудване/апаратура в отделението/клиниката - съгласно раздел IV, т. 2.1 "Устройство" и раздел IV, т. 2.2 "Оборудване"

5.6. (изм. - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) Болницата, в която е разположена клиника/отделение по клинична имунология от III ниво, следва да разполага на територията си със:

5.6.1. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) клинична лаборатория за осъществяване на необходимите за дейността изследвания;

5.6.2. ((*), зал. - ДВ, бр. 32 от 2014 г., в сила от 01.01.2014 г.)

5.6.3. рентгенов апарат за скопия и графия;

5.6.4. (изм. - ДВ, бр. 64 от 2021 г.) лаборатория по клинична имунология за осъществяване на необходимите за дейността изследвания.

5.7. (изм. - ДВ, бр. 92 от 2010 г.) Структурата следва да разполага с възможност за 24-часов достъп, включително в условия на спешност, до КАТ или МРТ на територията на населеното място.

5.8. (нова - ДВ, бр. 32 от 2014 г., в сила от 01.01.2014 г.) Структурата следва да разполага с достъп до микробиологична лаборатория - в структурата на болницата или по договор.

Раздел III

Основни изисквания към лабораторията по клинична имунология (персонал, устройство, дейност, контрол, документиране, задължителен и оптимален обем лабораторни показатели, апаратура, аналитични принципи)

А. Персонал

1. Началникът на лаборатория по клинична имунология отговаря на изискванията на Закона за лечебните заведения (ЗЛЗ) и притежава поне 4-годишен опит в областта на имунологията.

2. Старши лаборантът (старшата медицинска сестра) отговаря на изискванията на ЗЛЗ и поне 3 години стаж в областта на имунологията под ръководството на началник-лаборатория.

3. Лекарят и/или биологът, отговарящи по отделните направления в работата на лабораторията, трябва да притежават специалност "Клинична имунология" или "Лабораторна имунология" и поне 3 години стаж в областта на имунологията под ръководството на началник-лаборатория.

4. Лаборантът, медицинската сестра и специалист с немедицинско образование може да извършва самостоятелна дейност след една година опит в областта на имунологията независимо от образователно-квалификационната степен или други специализации, като дотогава работят под ръководството на специалист по клинична или лабораторна имунология.

5. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Персоналът се определя в зависимост от обема и обхвата на осъществяваната дейност.

Б. Общи изисквания

1. Пространството на лабораторията е достатъчно голямо, за да могат да се извършват всички процедури. Необходимо е подходящо осветление и вентилация.

2. Лабораторията отговаря на всички нормативни изисквания, свързани с осигуряване на безопасни и здравословни условия на труд, противопожарна охрана, складиране на химични, биологични и радиоактивни материали.

3. Хладилниците и фризерите поддържат оптимална температура за съхраняване на всеки тип проба или реагент. Те се следят ежедневно. Записващите термометри са препоръчителни за механичните фризери и хладилници. Препоръчва се те да бъдат свързани с алармена система, инсталирана на място, където може да се чува 24 часа в денонощието. В лабораториите, използващи течен азот за съхранение на замразени клетки, нивото на течния азот се следи на интервали с цел осигуряване на адекватното му подаване през цялото време. Температурата на околната среда и/или температурата в инкубаторите, в които се извършват тест процедурите, се следят ежедневно и съответстват на температурните интервали, посочени в работните инструкции.

4. Лабораториите, извършващи смесени лимфоцитни култури или други клетъчни тестове, притежават ламинарни боксове или други подходящи асептични работни условия.

5. Лабораторията спазва, проследява и документира параметрите (например концентрация на CO_2, влажност, лазерна мощност и др.) на оборудването съобразно изискванията за съответната апаратура/инструментариум и инструкциите на производителя.

6. Лабораторията въвежда процедури за поддържане на оборудването си, инструментите и тест системите чрез: а) определяне на програма за профилактика на апаратурата и

инструментариума; б) извършване и документиране на сервизните профилактични прегледи на оборудването толкова често, колкото е определил производителят; в) протоколи за коригиращи действия и ясни инструкции кога е необходим сервизен ремонт.

7. Използваните автоматични системи и компютърни програми се тестуват рутинно за точност и възпроизводимост на изследванията.

8. В лабораторията има утвърдени правила, отнасящи се до вземането на кръв.

9. Лабораторията извършва тестове само при искане по писмен или електронен път от лечебно заведение или пациент. Искането включва: а) името на пациента или друг начин на идентификация; б) името и адреса на изискващия изследването; в) вид на изследването; г) датата и час на вземане на пробата; д) източник на пробата (напр. периферна кръв, костен мозък, далачни клетки).

10. Кръвните проби се означават с име или друг специфичен идентификационен маркер на пациента и дата на вземане. Когато се вземат повече от една епруветка, всяка епруветка се надписва индивидуално.

11. Лабораторията поддържа система за идентификация на пробите и документира всяка стъпка при тестуването на пробите на пациентите с цел да се осигурят точни резултати.

12. Лабораторията има критерии за отхвърляне на пробите и механизъм, който да потвърди, че пробата не е тестувана, защото не отговаря на критериите на лабораторията за приемливост.

13. Кръвните проби се вземат в помещения, различни от тези, в които се провеждат асептичните процедури. Кожата на донора се подготвя така, че да се сведе до минимум рискът от инфекция на донора или замърсяване на пробата.

14. Транспортирането и работата с кръвните проби се извършват внимателно, за да се избегне опасността от пренасяне на инфекции.

15. Пробите за изследване се вземат и транспортират съгласно валидирани процедури за всеки метод.

16. Подходящи антикоагулант/консервираща среда се използват за запазване виталността на клетките, антигените и разпределението на маркерите за максимално най-дългото време, като при установяване на този интервал лабораторията взема в съображение протокола за изработване на пробата, препоръките на производителя на реагенти и използваната апаратура.

17. Всички реагенти подходящо се обозначават и съхраняват съобразно производствените инструкции. Всеки серум, моноклонално антитяло, панел за типизиране и ДНК реагенти (олигинуклеотиди, ензими и др.) се съхраняват при условия, подходящи за поддържане на тяхната стабилност и специфичност, която се потвърждава чрез публикувани данни и/или документация на производителя и/или документирано локално тестуване.

18. Реагентите, разтворите, средите, контролите, калибраторите и други материали се надписват за означаване на: а) името и когато е необходимо, титъра, силата и концентрацията; б) изискванията за съхранение; в) датата на приготвяне, срок на годност и всякаква друга уместна информация.

19. Всички процедури, използвани в лабораторията, детайлно се описват в наръчник, достъпен при провеждането на процедурите. Наръчникът се проверява най-малко поне веднъж годишно от началника на лабораторията и се съхраняват писмените данни от тези проверки. Всички промени в процедурите се подписват от началника на лабораторията, като се означава и датата на промяната.

20. Лабораторията се осигурява с документирани критерии за изработване на референтните стойности на изследваните показатели, които се осъвременяват периодично.

21. Компютърните анализи и резултати се преглеждат, проверяват и подписват от началника на лабораторията, преди да бъдат предавани.

В. Качествен контрол

1. Лабораторията има разработени правила за осигуряване на качеството.

2. Лабораторията участва най-малко в една програма за външна оценка на качеството (ВОК).

3. Пробите за ВОК се тестуват по същия начин, както и пробите на пациенти.

4. Лабораторията извършва вътрелабораторен качествен контрол (ВЛКК) и контрол на реагенти, проби за изследване, извършваните в лабораторията тестове, използваната апаратура и др.

5. Всеки член на персонала най-малко 4 пъти годишно участва в тестуването на проба с неизвестна специфичност с оглед оценка на способността му да дава възпроизводими резултати. Тези резултати се документират.

6. Лабораторията трябва да има установени процедури, които прилага, както и документира взетите мерки, когато: а) тест системите не отговарят на установените критерии на лабораторията, включително резултати от ВОК, които са извън допустимите граници, и когато; б) са открити грешки в резултати на пациенти. Впоследствие лабораторията е длъжна бързо: а) да уведоми този, който е поръчал изследването или вече използва грешните резултати; б) да изпрати нови - коригирани резултати; и в) да съхранява копие от оригиналния резултат и коригирания резултат най-малко две години.

7. Началникът на лабораторията и другите медицински и немедицински специалисти участват в програми за обучение в съответните категории медицински и лабораторни дейности.

8. Лабораторията по клинична имунология може да осигурява част от дейността по клинична имунология по договор с друга лаборатория, която да извършва вместо нея дадени тестове. В този случай втората лаборатория трябва също да покрива медицинските стандарти за отделните тестове.

Г. Документиране

1. Лабораторията пази документация с данни на тестуваните лица за две или повече години в съответствие с действащата нормативна уредба.

2. Работните протоколи трябва ясно да показват идентичността на лицето, чийто материал се тестува, използваните реагенти, датата на изследване и лицето, извършило анализа, препоръчително е да съдържат и кратко описание на използвания материал в пробата (кръв, лимфен възел, слезка, костен мозък и др.).

3. Фишът с готовия резултат съдържа:

а) името на изследваното лице и идентификационния номер;

б) датата на вземане на пробата;

в) вида на пробата;

г) използвания метод;

д) заключение, дата и подпис на началника на лабораторията или заместника му.

Фишът може да съдържа и:

а) дата на изработване на пробата;

б) съответните контролни стойности (референтни граници), в случай че е целесъобразно.

4. Лабораторията посочва информация относно състоянието на пробите, които не отговарят на приетите критерии.

5. Лабораторията съхранява записите с резултати от ВЛКК и ВОК.

Д. Задължителен (минимален) обем показатели и задължителна апаратура за лаборатория по клинична имунология - самостоятелно лечебно заведение или част от структурата на лечебно заведение за болнична или за извънболнична помощ.

1. Задължителен (минимален) обем за лабораторни показатели:

1.1. определяне на общи имуноглобулини ИгГ, ИгМ, ИгА;

1.2. определяне на С3 и С4 компоненти на комплемента;

1.3. определяне на ревматоиден фактор (РФ);

1.4. определяне на антистрептолизинов титър (АСТ);

1.5. определяне на криоглобулини;

1.6. определяне на антинуклеарни антитела (АНА).

2. Задължителна (минимална) лабораторна апаратура:

2.1. затворена система за вземане на кръв;

2.2. центрофуга;

2.3. термостат;

2.4. хладилник (4 - 8 °C);

2.5. хладилна камера (- 20 °C);

2.6. светлинен и/или флуоресцентен микроскоп;

2.7. спектрофотометър (ELISA спектрофотометър) или автоматизирана система за имуноблот

Е. Допълнителен (оптимален) обем показатели и апаратура за лаборатория по клинична имунология самостоятелно лечебно заведение или част от структурата на лечебно заведение за болнична или за извънболнична помощ.

1. Допълнителен (оптимален) обем за лабораторни показатели (в зависимост от характера на дейността и по преценка на ръководството на лечебното заведение)

1.1. Определяне на антинуклеарни антитела срещу различни нуклеарни антигени: dsDNA, Sm,RNP, SS-A(Ro), SS-B(La), Scl 70, Jo-1, центромери, хистони и др.

1.2. Определяне на антимитохондриални антитела (АМА)

1.3. Определяне на антигладкомускулни антитела (АГМА)

1.4. Определяне на антифосфолипидни антитела (АФА)

1.5. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (АНЦА)

1.6. Определяне на антитела към щитовидна жлеза (анти-тиреоглобулинови /ТАТ/, анти-микрозомални/МАТ/, срещу тиреоидна пероксидаза /ТПО/, срещу рецептор за тирео-стимулиращ хормон и др.)

1.7. Определяне на С реактивен протеин (СРП)

1.8. Определяне на единична HLA специфичност (HLA-B5, -B27, DRB1*04 и др.);

1.9. Определяне на туморни маркери - CA 19-9, CEA, CA 15-3, PSA, AFP, bHCG и др.

1.10. Определяне на хормони: тироидни, надбъбречни, хипофизни, полови и др.

1.11. Определяне на антитела и антигени от вируси, бактерии (вкл. хламидии и микоплазми), паразити

1.12. Определяне на моноклонални протеини: ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, капа и ламбда свободни леки вериги в серум с имунофиксационна електрофореза

1.13. Определяне на общи и специфични имуноглобулин Е

1.14. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити

1.15. Определяне на HLA системата

1.16. Определяне на тъканната съвместимост чрез кросмач реакция

1.17. Определяне на циркулиращи алоантитела

1.18. Определяне на други органспецифични и органнеспецифични антитела

1.19. Определяне на спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцитите - in vitro test

1.20. Определяне на ин витро алерген специфична активация/дегранулация на базофилни гранулоцити чрез флоуцитометрия

1.21. Митоген- и антиген-индуцирана бластна трансформация

1.22. Имунохистохимични изследвания

1.23. Определяне на цитокини

1.24. Определяне на антиген-специфични Т лимфоцити

1.25. Определяне на фагоцитоза и оксидативен взрив на неутрофили и моноцити.

2. Допълнителен (оптимален) обем лабораторна апаратура

2.1. Специализирани центрофуги (напр. микроцентрофуга, цитоцентрофуга, високооборотна и др.)

2.2. Фризер (-70 °C)

2.3. Флоуцитометър

2.4. Ламинарен бокс

2.5. CO_2 инкубатор

2.6. Стереомикроскоп

2.7. PCR апарат

2.8. Набор за електрофореза

2.9. Трансилюминатор

2.10. Други.

Ж. Аналитични принципи за извършване на имунологичните изследвания

Медицинският стандарт "Клинична имунология" препоръчва да се използват аналитични принципи за извършване на имунологичните изследвания, основани на принципите, възприети от Европейската федерация на имунологичните дружества (EFIS), Европейската федерация по имуногенетика (EFI), Американското дружество по тъканна съвместимост (ASHI), Международния комитет по стандартизация в хематологията (ICSH), Лабораторен стандарт на Нюйоркския институт на здравето (NYSDH) и други.

1. Определяне на протеини в серум и други биологични течности: общи имуноглобулини ИгМ, ИгГ и ИгА; С3 и С4 компоненти на комплемента.

1.1. Имунологичните лаборатории трябва да са в състояние да определят количеството на общите серумни имуноглобулини от класовете ИгМ, ИгГ и ИгА; С3 и С4 компонентите на комплемента.

1.2. Използват се утвърдени техники за оптималното определяне на неспецифични серумни имуноглобулини от класовете ИгМ, ИгГ и ИгА; С3 и С4 компоненти на комплемента, като радиална имунодифузия, нефелометрия и др.

1.3. Определяне на общи серумни имуноглобулини от класовете ИгМ, ИгГ и ИгА; С3 и С4 компоненти на комплемента чрез радиална имунодифузия по Манчини.

1.3.1. Използва се стандартизиран, търговски разпространяван контролен (референтен) серум с известна концентрация на имуноглобулините, С3 и С4, който се тестира при всяко извършване на теста.

1.3.2. Използват се търговски разпространявани стандарти с различни (най-малко 3) известни концентрации на изследваните серумни протеини, когато е необходимо построяване на стандартна крива.

1.3.3. При започване на работа с нова партида плаки всички стандарти и контролен серум се тестират на новата партида плаки.

1.3.4. Текущ качествен контрол на имуноплаките се провежда на всеки 6 - 8 седмици с всички стандарти и контролни серуми.

1.3.5. При всяко следващо изследване със същата партида плаки качествен контрол се извършва само с контролния серум, като се следи неговите стойности да попаднат в доверителния интервал. Ако те не са в този интервал, изследването се повтаря, като заедно с контролния серум се тестират поне 3 стандарта и се изработва стандартна крива.

1.4. Определяне на общи серумни имуноглобулини от класовете ИгМ, ИгГ и ИгА; С3 и С4 компоненти на комплемента чрез нефелометрия.

1.4.1. При нефелометричното определяне на имуноглобулини, С3 и С4 компоненти на

комплемента се използват високо и ниско положителни серуми, предлагани заедно с търговските набори. Техните очаквани стойности са указани от производителя.

1.4.2. Резултатите от изследваните серумни проби се приемат за валидни само ако ниско и високо контролните серуми имат стойности, попадащи в указания интервал.

2. Определяне на моноклонални протеини: ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, капа и ламбда свободни леки вериги в серум.

2.1. Имунологичните лаборатории трябва да са в състояние да определят наличието на моноклонални протеини: ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, капа и ламбда свободни леки вериги в серум.

2.2. Използват се утвърдени техники за качественото доказване на моноклоналните протеини, като имуноелектрофореза и имунофиксационна електрофореза.

2.3. Новите набори от реагенти се тестуват и сравняват с познат набор, даващи приемливи резултати, или с проби с позната реактивност.

2.4. Използва се търговски разпространяван или приготвен в лабораторията серумен пул, съдържащ моноклонални протеини от всички изотипове за периодичен контрол на реактивността на антисерумите.

3. Определяне на общи имуноглобулини Е (ИгЕ).

3.1. Лабораторията трябва да е в състояние да изследва общите ИгЕ. Използват се утвърдените за това методи: имуноензимни, радиоимунологични, флуориметрични, хемилуминесцентни и други.

3.2. Всяко изследване включва контролни серуми с различна концентрация на ИгЕ, вкл. серум с липса на ИгЕ. По получените стойности от изследването на тези серуми се построява кривата за отчитане на резултатите.

3.3. При всяко изследване се използва и един и същи серум с известна концентрация на ИгЕ, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

4. Определяне на специфични имуноглобулини (ИгЕ).

4.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определя специфичните ИгЕ. Използва се един от утвърдените методи: имуноензимен, радиоимунологичен, флуориметричен, хемилуминесцентни.

4.2. Поради бързата промяна на нивата на циркулиращите специфични ИгЕ към инсекти и лекарства се препоръчва кръвта да се взема не по-рано от 2 - 3 седмици и не по-късно от 6 месеца след ужилването или приемането на медикамента.

4.3. Всяко изследване включва контролни серуми с различна концентрация на специфичните ИгЕ, вкл. серум с липса на ИгЕ. По получените стойности от изследването на тези серуми се построява кривата за отчитане на резултатите.

4.4. При всяко изследване се използва един и същи серум с известна концентрация на Иг Е, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

5. Определяне на ревматоиден фактор (РФ).

5.1. Лабораторията трябва да е в състояние да изследва ревматоиден фактор (РФ). Използва се една от утвърдените техники: хемаглутинация (Rose-Waaler реакция), латекс-аглутинация, имунотурбидиметрия и нефелометрия. В случаите на отрицателен резултат по тези методи се препоръчва използването на имуноензимен метод. В този случай се определя и изотипът на РФ.

5.2. Всяко изследване включва контролни серуми: с висока концентрация на РФ (положителна контрола) и серум, в който предварително не е установен РФ (отрицателна контрола). Резултатите от изследването са невалидни, ако тези серуми не покажат очаквания резултат.

6. Определяне на антистрептолизинов титър (АСТ).

6.1. Лабораторията определя АСТ по един от утвърдените аглутинационни, неутрализационни, имуноензимни, имунотурбодиметрични или нефелометрични методи.

6.2. Всяко изследване включва контролни серуми с различна концентрация на АСТ, вкл. положителна и отрицателна контрола.

6.3. Всяко изследване включва контролен серум с известна концентрация на АСТ, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

7. Определяне на С реактивния протеин (СРП).

7.1. Лабораторията трябва да може да определя СРП в серума. Използва се един от утвърдените методи: аглутинационен, имуноензимен, турбидиметричен, хемилуминесцентен или нефелометричен.

7.2. Всяко изследване включва контролни серуми с различна концентрация на СРП.

7.3. По получените стойности от изследването на тези серуми се построява кривата за отчитане на резултатите.

7.4. При всяко изследване се използва и един и същи серум с известна концентрация на С РП, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

8. Определяне на антинуклеарни антитела (АНА) в серум.

8.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определя наличие и титър или количество на АНА в серум.

8.2. Използват се утвърдени техники за оптималното определяне на АНА, като индиректна имунофлуоресценция върху препарати от клетъчна линия (НЕр2, НЕр2000 или други стандартизирани такива) или тъканни животински срези (бъбрек от мишка или комбинация от черен дроб, стомах и бъбрек от плъх), както и имуноензимен тест за скрининг на АНА, според стандартните работни процедури, възприети в лабораторията.

8.3. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

8.4. Лабораторията е в състояние да оценява вида на флуоресценцията съгласно общоприетите стандартни типове.

8.5. Използва се положителен за АНА контролен серум, търговски или приготвен в лабораторията от пациенти със системно автоимунно заболяване, с предварително доказана характеристика и титър.

8.6. Използва се отрицателен за АНА серум, търговски или приготвен в лабораторията от здрав донор, с предварително доказана липса на АНА.

9. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (АНЦА).

9.1. Лабораторията може да определя наличие, специфичност и титър/количество на АНЦА според официално приетата номенклатура.

9.2. Използват се утвърдени техники за оптимално определяне на АНЦА.

9.3. Като субстрат за ИИФ може да се използва намазка или цитоцентрофужен препарат от нормални донорни левкоцити, фиксирани с етанол, приготвени по стандартизиран метод и/или търговски препарати.

9.4. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

9.5. Стандартната индиректна имунофлуоресцентна техника трябва да се използва като скриниращ тест.

9.6. Лабораторията е в състояние да оценява вида на флуоресценцията, като използва международно приетата номенклатура за имунофлуоресцентните стандартни типове на АНЦА:

ц-АНЦА - цитоплазмени АНЦА

п-АНЦА - перинуклеарни АНЦА

х-АНЦА - (атипични) АНЦА.

9.7. За определяне специфичността и титъра/количеството на АНЦА се прилагат твърдофазови имуноензимни техники с пречистени антигени.

9.8. Използва се международно приетата номенклатура за имуноензимни типове АНЦА:

Протеиназа 3-АНЦА - автоантитела срещу протеиназа 3.

Миелопероксидаза-АНЦА - автоантитела срещу миелопероксидаза.

9.9. Отрицателният контролен серум е търговски серум или от здрави индивиди (може и пул от няколко донора), доказан с имуноензимни техники, че е негативен срещу специфични неутрофило-цитоплазмени антигени (протеиназа 3 и миелопероксидаза).

9.10. Положителният контролен серум е търговски серум или от пациенти с хистологично доказан системен некротизиращ васкулит, съдържащи антитела с верифицирана чрез ИЕМ специфичност (протеиназа 3 и миелопероксидаза).

9.11. Всички серумни проби с п-АНЦА или атипични АНЦА, съдържащи едновременно интерфериращи АНА (с хомогенна или периферна нуклеарна флуоресценция), задължително се изследват с ИЕМ за наличие на протеиназа 3-АНЦА и миелопероксидаза-АНЦА.

9.12. При използване на пречистени в лабораторията антигени се предпочита метод, причиняващ възможно най-малката им денатурация. Желателно е чистотата на пречистения антиген да бъде верифицирана с имуноензимен тест с антисеруми срещу потенциално контаминиращи други АНЦА-антигени.

9.13. Всяка нова партида антиген (търговски или пречистен в лабораторията) се тестува и сравнява със "стара" партида.

9.14. Препоръчва се всички серумни проби, положителни за АНЦА от ИИФ-скрининга, да бъдат изследвани за наличие на протеиназа 3-АНЦА и миелопероксидаза-АНЦА.

10. Определяне на антитела срещу различни нуклеарни антигени: dsDNA, Sm, RNP, ss-A(Ro), ss-B (La), Scl-70, centromere, хистони и др. в серума.

10.1. Лабораторията може да определя наличието на антитела срещу различни нуклеарни антигени според общоприетата номенклатура.

10.2. Използват се утвърдени техники, като: ИЕМ, имунофлуоресценция, флоуцитометрия и други стандартизирани методи.

10.3. При използване на търговски препарати се препоръчва сравнението между всеки две последователни серии.

10.4. При разработен в лабораторията метод се препоръчва стриктен контрол на изолираните антигени, използваните плаки за ИЕМ, сравнени с търговски препарати.

10.5. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

10.6. Всяко изследване съдържа положителна и отрицателна контрола и серуми с позната концентрация на антителата, по която се построява стандартна крива.

11. Определяне на антимитохондриални антитела (АМА) в серум.

11.1. Лабораторията е в състояние да определя наличие, специфичност и титър на АМА в серум според официално приетата номенклатура.

11.2. Използват се утвърдени техники за оптимално определяне на АМА.

11.3. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

11.4. Индиректната имунофлуоресценция върху тъканни животински срези от бъбрек на плъх или мишка или препарати от клетъчна линия HEp 2 се използва като скрининг тест.

11.5. За диференциране на вариантните типове АМА (М1 - М9) се използва имуноензимен метод с дефиниран митохондриален антиген.

11.6. Използва се положителен за АМА контролен серум - търговски или приготвен в лабораторията от пациенти с доказана диагноза първична билиарна цироза, с предварително определен титър.

11.7. Използва се отрицателен за АМА серум - търговски или приготвен в лабораторията

от здрав донор.

12. Определяне на антигладкомускулни антитела (АГМА) в серум.

12.1. Лабораторията е в състояние да определя наличие и титър на АГМА в серум.

12.2. Използват се утвърдени техники за определяне на АГМА, като индиректна имунофлуоресценция върху тъканни животински срези от стомах на плъх, мишка или маймуна, или имуноензимен метод според стандартните работни процедури, възприети в лабораторията.

12.3. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

12.4. Използват се положителен за АГМА контролен серум с предварително определен титър и отрицателен за АГМА серум.

13. Определяне на антифосфолипидни антитела (АФА).

13.1. Лабораторията е в състояние да определя антифосфолипидните антитела според общоприетата номенклатура - антикардиолипинови, анти b2 гликопротеин I, анти-етаноламин, анти-лизолецитин, анти-сфингомиелин и др.

13.2. Използват се утвърдени имуноензимни техники за определяне наличието, количеството и изотипа (ИгГ и ИгМ) на АФА.

13.3. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

13.4. Всяко изследване включва контролни серуми с различна концентрация на АФА, вкл. серум с липса на антитела. По получените стойности от изследването на тези серуми се построява кривата за отчитане на резултатите.

13.5. При всяко изследване се използва и един и същи серум с известна концентрация на АФА, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

14. Определяне на антигломерулобазално мембранни (АГБМ) антитела.

14.1. Лабораторията трябва да може да определя наличие, специфичност и титър на АГБМ антитела.

14.2. Използват се утвърдени техники за определяне на АГБМ антитела, като индиректната имунофлуоресцентна техника върху криостатни срези на човешки или за предпочитане маймунски бъбрек, от кръвна група 0 или имуноензимен метод, според стандартните работни процедури, възприети в лабораторията.

14.3. Лабораторията има изработени критерии за разграничаване на положителни и отрицателни проби.

15. Определяне на антитела към щитовидна жлеза - анти-тиреоглобулинови антитела (ТАТ), анти-микрозомални антитела (МАТ) и антитела срещу тиреоидна пероксидаза (ТПО).

15.1. Лабораторията е в състояние да определя наличие, концентрация или титър на ТАТ, МАТ или ТПО антитела в серум.

15.2. При използване на търговски набори или антигени производителят предоставя информация за специфичността и чувствителността на тестовете, съответно за чистотата и характеристиката на антигена. Всяка нова партида се сравнява с предишната.

15.3. Лабораторията следва да извършва количествено определяне на ТАТ и МАТ чрез стандартна крива от стандарти с определена концентрация или полуколичествено определяне, чрез титруване или определяне индекс на позитивност. Използват се положителен и отрицателен контролни серуми при всяко изследване.

15.4. При смяна на реагентите или диагностичния търговски кит те трябва да се сравнят с познат набор или контролни серуми с позната концентрация на антителата. Получените резултати трябва да бъдат в границите на допустимата вариация.

16. Определяне на антитела спрямо бета-клетката на панкреаса.

16.1. Лабораторията е в състояние да определя наличие, концентрация или титър на

антитела спрямо декарбоксилазата на глутаминовата киселина, 65 Кд изоформа (GAD 65) и втория антиген на бета-клетката (IA-2) в серум.

16.2. Използват се утвърдени чувствителни техники за специфично определяне на GAD65 и IA-2 антитела - имуноензимен или радиоимунологичен.

16.3. За целите на бета-клетъчния автоимунитет се използва като антиген 65 изоформата на декарбоксилазата на глутаминовата киселина. Антигенни препарати, включващи и 67 изоформата, са с ниска чувствителност и специфичност. При използване на търговски препарати производителят предоставя информация за специфичността и чистотата на антигена. Всяка нова партида се сравнява с предишната.

16.4. Препоръчва се количествено определяне на антителата чрез стандартна крива от стандарти с определена концентрация. Използват се положителен и отрицателен контролни серуми при всяко изследване.

16.5. При смяна на реагентите или диагностичния търговски кит те се сравняват с познат набор или контролни серуми с позната концентрация на антителата. Получените резултати трябва да бъдат в границите на допустимата вариация.

17. Определяне на инсулинови автоантитела (ИАА) и инсулинови антитела (ИА).

17.1. Лабораторията е в състояние да определя наличие, концентрация или титър на ИАА и ИА в серум.

17.2. Използват се утвърдени чувствителни техники за специфично определяне на ИАА и ИА - имуноензимен, радиоимунологичен и др.

17.3. Като антиген се използва човешки рекомбинантен инсулин. Производителят предоставя информация за специфичността и чистотата на антигена. Всяка нова партида се сравнява с предишната.

17.4. Използват се положителен и отрицателен контролни серуми при всяко изследване.

17.5. При смяна на реагентите или диагностичния търговски кит те се сравняват с познат набор или контролни серуми с позната концентрация на антителата. Получените резултати трябва да бъдат в границите на допустимата вариация.

18. Определяне на автоантитела към мозъчни и неврални антигени в серум и ликвор.

18.1. Лабораторията е в състояние да изследва антитела от ИгГ и ИгМ изотипове към антигени от централна и периферна нервна система - миелин, миелин базичен протеин (МБП), протеолипиден протеин (ПЛП), миелин олигодендроцитен гликопротеин (МОГ), миелин асоцииран гликопротеин (МАГ), ганглиозиди GM1, GD1b, S100 протеин, ацетилхолинови рецептори, калциеви канали, церебеларни клетки, цитоплазмения антиген Yo, антинуклеарните Hu, Ri, невrофиламенти, синаптозоми, глутаматергични рецептори, глутамат декарбоксилаза (ГАД), b-интерферон и др.

18.2. Използват се утвърдените за това методи: имуноензимни, радиоимунологични, дот-блот техники индиректна имунофлуоресценция.

18.3. Стандартната ИИФ техника се препоръчва като скриниращ тест (миелин, церебеларни клетки).

18.4. ИЕМ и дот-блот техники се препоръчват за типизиране на специфичността на автоантителата срещу антигени на централната и периферната нервна система (МБП, ПЛП, МОГ, МАГ, GM1, GD1b, Yo, Hu, Ri и т.н.).

18.5. Всеки тест съдържа отрицателна и положителна контрола.

18.6. Всички серумни и ликворни проби, положителни на ИИФ скрининга, се изследват за наличие на специфични антитела с ИЕМ.

19. Определяне на глиадинови и тъканни трансглутаминозни антитела(АТГА).

19.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определя глиадинови и трансглутаминозни антитела според общоприетата номенклатура.

19.2. Трябва да се използват утвърдени имуноензимни техники за определяне наличието,

количеството и класа.

19.3. Определят се ИгГ и ИгА .

19.4. Лабораторията трябва да извърши количествено определяне на АГлА и АТГА срещу стандартна крива от стандарти с определена концентрация, определени от производителя.

19.5. Всяко изследване трябва да включва положителна и отрицателна контрола, дефинирана от производителя.

19.6. Трябва да се използват търговски набори с предоставена информация за специфичността и чувствителността на тестовете.

19.7. Задължително трябва да се определя и серумното ниво на ИгА.

20. Определяне на антитела срещу тъканна трансглутаминаза (AtTg).

20.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определя антитела срещу тъканна трансглутаминаза според общоприетата номенклатура.

20.2. Трябва да се използват утвърдени имуноензимни техники за определяне наличието, количеството и класа.

20.3. Определят се ИгГ и ИгА изотипове на антитрансглутаминазни антитела.

20.4. Лабораторията трябва да извършва количествено определяне на антитрансглутаминазни антитела срещу стандартна крива от калибратори с определена концентарция, предоставени от производителя.

20.5. Всяко изследване трябва да включва положителна и отрицателна контрола, дефинирана от производителя.

20.6. Задължително трябва да се определя и серумното ниво на ИгА.

21. Определяне на спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцити.

21.1. Лабораторията може да определя спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцитите in vitro, като се използват утвърдени методики, като изотопна, флоуцитометрична.

21.2. Вариантът на метода (с изолирани лимфоцити или с цяла кръв) се подбира според целите на изследването.

21.3. Всички процедури по изолирането и култивирането на клетките се извършват в стерилна непирогенна, полистиренова посуда за еднократна употреба.

21.4. Лимфоцитната стимулирана активация се изследва с поликлонални митогени, специфични антигени и ко-стимулиращи фактори.

21.5. Лабораторията трябва да установи според метода подходящи концентрации на активатора, като: минимална (прагова), средна (50 % активация) и максимална (плато на активацията), при които се активират достатъчен процент от лимфоцитите.

21.6. Заедно с кръвта на изследваните пациенти като контрола се изследва кръв от здрав донор.

21.7. Всяко определяне включва негативна контрола (нестимулирана проба) за спонтанна активация и пролиферация на лимфоцити.

21.8. При флоуцитометричния метод всяко определяне на активацията на лимфоцити включва изотипна контрола на активирана и неактивирана кръв.

21.9. Когато се работи с изолирани клетки, концентрацията им трябва да бъде еднаква, а когато се работи с цяла кръв, обемът на материала е еднакъв във всяка ямка (епруветка).

21.10. Строго се съблюдава качеството на използваната хранителна среда и допълващите я ингредиенти. По възможност се работи с продуктите на един установен производител.

21.11. При използването на изотопен метод:

21.11.1. да се работи с една и съща минимална активност на изотопа;

21.11.2. внасянето на изотопа и прекъсването на култивирането се извършва винаги в точно определен час от общото време за култивиране;

21.11.3. използваните филтри за утаяване на клетките са с една и съща големина на порите.

21.12. За определяне на степента на активация чрез флоуцитометрия:

21.12.1. се използва експресията на повърхностни активационни маркери (като CD69, HLA-DR и др.); препоръчва се моноклоналните антитела за активационните маркери да бъдат конюгирани с флуорохрома фикоеритрин и да се използват в комбинация с поне едно антитяло, определящо вида на лимфоцитната субпопулация (напр. CD3, CD4, CD8, CD56 и др.);

21.12.2. анализът е за най-малко 2500 клетки в аналитичния прозорец на изследваната субпопулация.

21.13. Лабораторията има разработени критерии за определяне степента на активация и пролиферация.

22. Количествено определяне на цитокини в супернатанти от стимулирани in vitro мононуклеарни клетки.

22.1. Лабораторията може да определя количеството на цитокини в супернатанти от стимулирани in vitro мононуклеарни клетки.

22.2. Прилагат се утвърдени методики за стимулиране синтеза на цитокини in vitro.

22.3. За стимулатори на мононуклеарни клетки се използват митогени или специфични антигени.

22.4. Вариантът на метода (с изолирани лимфоцити или с цяла кръв) се подбира според целите на изследването.

22.5. Всички процедури по изолирането и култивирането на клетките, както и по обработването на цялата кръв, се извършват в стерилна непирогенна полистиренова посуда.

22.6. Когато се работи с изолирани клетки, концентрацията им във всички ямки трябва да бъде еднаква, а когато се работи с цяла кръв, обемът на материала е еднакъв във всяка ямка.

22.7. Лабораторията определя времето за култивиране на клетките според характеристиката на търсения цитокин.

22.8. Лабораторията използва утвърдени методи, като имуноензимен метод, за определяне количеството на съответния цитокин в супернатаната.

23. Количествено определяне на антиген-специфични CD4 и CD8 Т лимфоцити.

23.1. Лабораторията е в състояние да определя количествено антиген специфичните CD4+ и CD8+ Т клетки чрез флоуцитометрия и ИЕМ на ниво единична клетка.

23.2. За неспецифичен активатор се използва най-често митоген в предварително определена работна концентрация.

23.3. За специфичен активатор се използват съответни пептидни антигени в предварително определена работна концентрация.

23.4. Всяко определяне на активацията на лимфоцити включва:

23.4.1. негативна контрола (нестимулирана проба);

23.4.2. положителна контрола - кръв, стимулирана с подходящ неспецифичен активатор-митоген.

23.5. При определяне на антиген-специфични Т лимфоцити на ниво единична клетка:

23.5.1. натоварването на плаките със съответните специфични моноклонални антитела, посяването и култивирането на клетъчния материал се извършват при спазване на общоприетите изисквания за стерилност;

23.5.2. лабораторията определя броя на антиген-специфичните клетки по продукцията на цитокина IFN-g на ниво единична клетка;

23.5.3. работи се винаги с една и съща концентрация на клетките във всички ямки;

23.5.4. плаката се отчита изключително прецизно, като се изброява всеки отделен спот (петната), представляващ единичната цитокин-продуцираща антиген-специфична клетка;

23.5.5. броят на антиген-специфичните клетки се отчита с помощта на стереомикроскоп или апарат за отчитане на спотовете (ELISpot Reader);

23.5.6. след отчитането плаките се съхраняват на тъмно и сухо място поне за една година.

23.6. При флоуцитометричния метод:

23.6.1. всяко определяне на активацията на лимфоцитите включва изотипна контрола на активирана (със специфичен антиген) и неактивирана кръв;

23.6.2. за определяне на антиген специфичните клетки се използват моноклонални антитела, конюгирани с флуорохром, чрез които се установява коекспресията на повърхностни активационни маркери (като CD69) и вътреклетъчни цитокини (интерферон-g, TNF-a и др.);

23.6.3. антителата срещу активационните маркери и интрацелуларните цитокини се използват в комбинация с поне едно антитяло, определящо вида на лимфоцитната субпопулация (напр. CD3, CD4, CD8, CD56 и др.);

23.6.4. изброяването обхваща най-малко 20 000 лимфоцити в аналитичния прозорец (CD4 или CD8 Т лимфоцити).

24. Определяне на фагоцитоза и оксидативен взрив.

24.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определи фагоцитоза и оксидативен взрив по един от следните утвърдени методи: микроскопски, спектрофотометрично или флоуцитометрично.

24.2. Нитроблутетразолов тест (НБТ):

24.2.1. Лабораторията е в състояние да определи микроскопски процент на неутрофилни гранулоцити от периферна кръв, които са погълнали багрилото нитроблутетразол и са го редуцирали в цитоплазмата до тъмносини формазанови кристали.

24.2.2. Работи се с унифицирана методика за оцветяване на периферни гранулоцити с НБТ.

24.2.3. За всеки пациент се изготвят по две контролни натривки от инкубирана с буфер вместо с пирогенал клетъчна суспензия.

24.2.4. Лабораторията е в състояние да определи с помощта на спектрофотометър количеството на екстрахирания формазан, който е погълнат по време на фагоцитозата.

24.2.5. Всяко определяне на оксидативен взрив на периферни неутрофили и моноцити на пациенти включва проба на клинично здрав донор с нормални стойности на оксидативен взрив.

24.3. Флоуцитометричен тест:

24.3.1. Лабораторията е в състояние да определи процент фагоцитирали и оксидативно активни гранулоцити и моноцити и тяхната фагоцитарна и ензимна активност за единична клетка.

24.3.2. Използват се утвърдените флоуцитометрични техники за оптимално определяне на фагоцитоза и окислителен взрив на периферни неутрофили и моноцити.

24.3.3. Препоръчва се използването на стандартизирани обекти за фагоцитоза - E. coli, Staph. aureus, флуоресцентни микрочастици.

24.3.4. При оксидативния взрив се препоръчва използването и на слаб стимулатор като хемотактичния пептид fMLP.

24.3.5. Всяко определяне на фагоцитоза и окисидативен взрив на периферни неутрофили и моноцити на пациенти включва негативна контрола на проба на пациента на 0 °C.

25. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на лимфоцити.

25.1. Лабораторията е в състояние да извършва имунофенотипизиране на лимфоцити в кръв и други биологични течности чрез флоуцитометрия.

25.2. Имунофенотипизиране с флоуцитометрия се провежда със съответно валидирана многоцветна имунофлуоресценция.

25.3. Имунофенотипизирането на лимфоцити чрез флоуцитометрия включва съпоставима изотипна контрола.

25.4. Всяко двуцветно имунофенотипизиране на лимфоцити в кръв чрез флоуцитометрия за количествени цели включва CD45 и CD14 антитела.

25.5. За количествено определяне на лимфоцитни популации чрез двуцветна имунофлуоресценция се използва следният стандартен набор:

CD3+ Т лимфоцити

CD3+CD4+ Т лимфоцити

CD3+CD8+ Т лимфоцити

CD19+ В лимфоцити

CD3-CD16+ плюс CD56+ NK клетки

(CD3-CD16+ или CD3-CD56+ типизиране е приемливо за определяне на NK клетки)

25.6. За проследяване броя на CD4+Т лимфоцити чрез флоуцитометрия панелът включва определяне най-малко на следните лимфоцитни субпопулации:

CD3+ Т лимфоцити

CD3+CD4+ Т лимфоцити

CD3+CD8+ Т лимфоцити

25.7. За многоцветен анализ се използва CD45/SSC прозорец на лимфоцитите, базиран на силно светеща CD45+ популация с нисък SSC.

25.8. За многоцветен набор за маркиране изотипна контрола се използва за проби с трудно разграничими положителни от отрицателни популации.

25.9. За количествено определяне на дадена субпопулация чрез флоуцитометрия трицветният анализ следва да използва набор за маркиране, включващ:

CD3/CD4/CD45

CD3/CD8/CD45

CD3/CD19/CD45

CD3/CD16+56/CD45.

25.10. За количествено определяне на дадена субпопулация чрез флоуцитометрия четирицветният анализ следва да използва набор за маркиране, включващ:

CD3/CD4/CD8/CD45

CD3/CD56 ± CD16/CD19/CD45.

25.11. За три- или четирицветните набори се включват минимум две епруветки със същия маркер (напр. CD3 в епруветките с CD3/CD4/CD45 и CD3/CD8/CD45).

25.12. Всяка лаборатория може да използва допълнителни комбинации от моноклонални антитела за изследване на други маркери (клетъчни субпопулации) за нуждите на дианостично-лечебния процес.

25.13. Анализът обхваща най-малко 2000 лимфоцита в прозореца.

25.14. Лимфоцитната чистота в прозореца се определя за всички проби.

25.15. Лимфоцитният добив (процента на лимфоцитите, включени в аналитичния прозорец) се определя за всяка проба.

25.16. За двуцветен анализ всички стойности на лимфоцитите се коригират за лимфоцитна чистота.

25.17. Стойностите на CD3 се проследяват в лимфоцитния имунофенотипизиращ панел на пациента.

25.18. Сборът на лимфоцитите се проследява, когато всички лимфоцитни популации са включени в панела за лимфоцитен анализ.

25.19. Сумата на Т клетките (CD3+CD4+ плюс CD3+/CD8+) се проследява в рамките на лимфоцитния имунофенотипизиращ панел на пациента.

25.20. Лабораторията има възможности за определяне на бели клетки и ДКК, необходими за изчисление на абсолютния брой на лимфоцитни/левкоцитни субпопулации. Абсолютният брой на

субпопулациите може да се определя и чрез индиректен метод с частици.

26. Флоуцитометрично имунофенотипизиране за левкемия/лимфом.

26.1. Лабораторията е в състояние да идентифицира и характеризира имунофенотипно чрез флоуцитометрия патологично разраснали хемопоетични клетки от различни линии на диференциация.

26.2. Пробите за изследване могат да бъдат получени от периферна кръв, костен мозък, ликвор, малигнени изливи, лимфни възли или туморни формации след изготвяне на клетъчна суспензия.

26.3. Лабораторията трябва да има възможности за морфологично и цитохимично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал.

26.4. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.

26.5. Препоръчва се при невъзможност за анализиране на пробата веднага след получаването й морфологичното изследване да се извърши два пъти - веднъж след получаване на пробата и втори път - непосредствено преди маркирането й.

26.6. Имунофенотипизирането на левкемии и лимфоми с флоуцитометрия се провежда минимум с валидирана двуцветна имунофлуоресценция (4-параметърна флоуцитометрия). С използването на 5- или 6-параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба.

26.7. Резултатите при повтарящото се антитяло (антитела) в рамките на тест панела на пациента са устойчиви (в границите на 5 %), освен ако рутинно не се получава по-голяма разлика поради използването на различни флуоресцентни маркери или антитела, разпознаващи различни антигенни епитопи.

26.8. Тест панелът се подбира така, че да включва поне един антиген с ярка експресия върху повечето клетки в пробата, какъвто е CD45.

26.9. Резултатите се представят като процент положително маркирани клетки в електронния прозорец на предполагаемите неопластични клетки и включват коментар за линейната принадлежност и степен на съзряване.

26.10. При получаване на абнормална реактивност (по-висок или по-нисък интензитет на светене от наблюдавания върху нормални клетки, аберантно съчетаване на линейно-асоциирани антигени и др.) резултатът трябва да включва и описание (слабо или с нисък интензитет и/или ярко или с висок интензитет, линейно-кръстосана или асинхронна експресия и т.н.).

27. Флоуцитометрично определяне на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки.

27.1. Лабораторията е в състояние да извършва определяне на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки в периферна кръв, костен мозък или кръв от пъпна връв чрез флоуцитометрия.

27.2. Определянето на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки с флоуцитометрия се провежда със съответно валидирана дву- или трицветна имунофлуоресценция.

27.3. Определянето на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия не изисква включване на изотипна контрола.

27.4. Всяко двуцветно определяне на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия включва CD45 и CD34 антитела.

27.5. За определяне на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия се използват CD34 антитела само от клас II, конюгирани с фикоеритрин, или клас III независимо от вида на конюгата.

27.6. За определяне на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия

се използват CD45 антитела, които установяват не само всички изоформи, но и всички гликоформи на CD45 антигена.

27.7. Анализът включва минимум 100 CD34(+)-положителни събития или не по-малко от 75 000 CD45(+)-положителни събития във всяка епруветка.

27.8. Анализът се осъществява в две успоредно маркирани проби от един и същ клиничен материал и броят CD34(+) хемопоетични стволови клетки се определя като средна стойност от двата резултата.

27.9. Определянето на броя CD34(+) хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия изисква стратегия на последователно определяне на електронни прозорци за анализ:

27.9.1. за анализ се използва CD45/SSC прозорец, базиран на слабо светеща CD45(+) популация с нисък SSC;

27.9.2. използва се CD34/SSC прозорец, базиран на силно светеща CD34(+) популация с нисък SSC;

27.9.3. използва се FSC/SSC прозорец, базиран на популация с нисък SSC и нисък, но не по-нисък от този на лимфоцитите FSC;

27.9.4. определя се популация хемопоетични клетки със следните характеристики: нисък SSC и нисък FSC, но не по-нисък от този на лимфоцитите, силно светеща CD34(+) и слабо светеща CD45(+).

27.10. Резултатът се представя като процент CD34(+) хемопоетични стволови клетки, определен на базата на броя CD34(+) събития, отговарящи на критериите в 27.9.4, и броя CD45(+) събития (и в двата случая представени като средни стойности от анализа на две успоредно маркирани проби).

27.11. Абсолютният брой на CD34(+) хемопоетични стволови клетки може да се определя и чрез индиректен метод с частици.

28. Флоуцитометрично определяне на ин витро алерген специфична активация/дегранулация на базофили.

28.1. Лабораторията е в състояние да определя ин витро алерген специфична активация/дегранулация на базофилни гранулоцити чрез флоуцитометрия.

28.2. Пациентите, тестирани ин витро, не трябва да са приемали най-малко до 48 часа преди вземането на кръвната проба антиалергични лекарствени средства, като антихистамини, или да са преустановили преди два месеца приема на кортикостероиди.

28.3. На етапа стимулация на базофилите е недопустимо замърсяване на кръвните проби с въздушни алергени. Ин витро активацията се извършва в чисти помещения и закрити боксове.

28.4. Лабораторията установява подходящите концентрации за всеки нов алерген или за всяка нова партида алергени.

28.5. Всяко определяне на активация/дегранулация на базофили включва отрицателна и положителна контрола. Като положителна контрола се използва неспецифичен активатор (например хемотаксичен пептид fMLP).

28.6. Данните се събират през аналитичен прозорец за базофилната популация, експресираща високи нива на ИгЕ.

28.7. Изброяват се най-малко 1000 базофила за проба или 50 000 до 100 000 левкоцита при анализ на клетките според параметъра големина (FSC).

28.8. Определя се процентът на дегранулираните базофилни гранулоцити според експресията на активационния антиген gp 53 (CD63) след анализ на съответните контроли за всеки отделен пациент - отрицателна и положителна.

29. Определяне на HLA системата.

29.1. Терминологията на HLA антигените трябва да съответства на последния доклад на комитета по номенклатура към Световната здравна организация (СЗО).

29.2. Фенотипите и генотипите се означават съобразно препоръките на СЗО, напр.:

29.2.1. Единични алели: HLA-B*07. Единични антигени: HLA-B7 или само B7 в случай, че HLA се подразбира от контекста.

29.2.2. HLA тип. Серологично записване: HLA-A2, 30; B7, 44; Cw5. ДНК записване: HLA-A*02,*30; B*07,*44; C*05,*16; DRB1*01,*04; DQB1*05,*03:01.

29.2.3. Генотип. Серологично записване : HLA-A2, B44, Cw5 / A30, B7, Cw-, . ДНК записване: HLA-A*02, B*44, C*05, DRB1*01, DQB1*05 / A*30, B*07, C*16, DRB1*04, DQB1*03:01.

29.3. Ако е открит само един антиген или алел за даден локус чрез серологично или ДНК типизиране, той може да бъде записан два пъти във фенотипа само в случай, че хомозиготността е потвърдена чрез изследване на фамилии или типизирането недвусмислено показва носителство на 2 различни алела от една и съща специфичност (напр. DRB1*13:01/59, DRB1*13:03/33, специфичността се записва два пъти DRB1*13,*13).

29.3.1. Типизиране с висока разграничителна способност се дефинира като: а) определяне на HLA алелите с ниво на разграничаване, съответстващо на първото и второто поле (напр. DRB1*13:01) съгласно номенклатурата на СЗО и разграничаване на всички неразграничими комбинации, определени от полиморфизми в екзони 2 и 3 на HLA клас I локусите и екзон II на HLA клас II локусите, и б) разграничаване на всички нераразграничими комбинации, включващи нулев алел, независимо от това, къде е локализиран полиморфизмът, освен когато е доказано, че антигенът е експресиран върху клетъчната повърхност.

29.4. Определяне на хаплотипите.

29.4.1. Определянето на хаплотипите и генотипите се извършва чрез изследване на фамилията, включващо родители, сиблинги и/или деца на пациента.

29.4.2. Генотипна идентичност се доказва само при изследване и на двамата родители или когато сегрегацията на 4-те хаплотипа е ясно определена.

29.4.3. Наразграничими комбинации в хаплотипното разпределение се разграничават чрез типизиране по HLA-C и/или DQ и/или DP. Необходимо е типизиране с висока разграничителна способност за разрешаване на тези комбинации.

29.4.4. При установяване на рекомбинации те се посочват в резултата, включващ хаплотипното разпределение.

29.5. Неродствени индивиди. Определянето на най-вероятните хаплотипи, направено въз основа на популационни честоти, трябва да бъде ясно посочено.

29.6. Серологично HLA клас I типизиране:

29.6.1. Лабораторията трябва да е в състояние да определи HLA-A, B специфичностите, официално признати от СЗО.

29.6.2. Използват се утвърдените техники за оптималното определяне на HLA специфичностите.

29.6.3. Всяко типизиране включва поне по една положителна контрола - позитивен контролен серум, за който предварително е показано, че реагира с всички клетки. В случай че позитивната контрола не реагира както се очаква, резултатите от типизирането са невалидни.

29.6.4. Всяко типизиране включва поне един негативен контролен серум, за който предварително трябва да е показано, че не съдържа антитела.

29.6.5. Минималното количество живи клетки и реактивността на контролните серуми, изискващи се за валидност на серологичното типизиране, трябва да бъдат описани в лабораторния наръчник.

29.6.6. Всеки HLA-A, B, антиген се дефинира поне от два серума, ако и двата са функционално моноспецифични. При мултиспецифични серуми поне 3 частично неприпокриващи се серума се използват за определяне на всеки HLA-A, B антиген.

29.6.7. Неразграничими комбинации при серологичното типизиране се разграничават чрез

ДНК метод.

29.6.8. Всяка нова партида типизиращи панели се тестува на поне 5 различни вида клетки с познати фенотипи, представящи основни специфичности или паралелно с вече тестувани панели. Всяка нова пратка от предварително тестувана партида типизиращи панели се верифицира с 1 вид клетки с познат фенотип.

29.6.9. Серологично определяне на единичен антиген (напр. HLA-B27) чрез лимфоцитотоксичен тест и флоуцитометрично.

29.6.9.1. Всяка партида моноклонални антитела или типизиращи плаки се тестува с контролните клетки:

• контролите включват поне три вида клетки, експресиращи специфичния антиген;

• контролите включват поне два вида клетки, експресиращи кръстосано реагиращ антиген;

• контролите включват поне два вида клетки, които не експресират специфичния и кръстосано реагиращия антиген.

29.6.9.2. При лимфоцитотоксичния тест:

• позитивната и негативната серумна контрола се тестуват по време на типизирането;

• серумните контроли включват и два серума за всеки антиген, реагиращ кръстосано със специфичния;

• серумите за дефиниране на всеки антиген съответстват на изискванията за серологично HLA типизиране.

29.6.9.3. При флоуцитометричния тест:

• във всеки тест се използва негативна контрола, включваща моноклонално антитяло/антитела от същия вид и субклас, като моноклоналите, използвани за фенотипизиране;

• при индиректно маркиране негативните контролни реагенти включват несъответстващо първо антитяло и съответното второ антитяло, белязано със същия флуорохром, използван в теста;

• при директно маркиране негативните контролни реагенти включват несъответстващо антитяло, белязано с използвания в теста флуорохром;

• всяка серия от тестове включва позитивна серумна контрола, за която е доказано, че реагира с всички HLA клас I антигени;

• лабораторията трябва да има критерии за разграничаване на позитивните реакции;

• в случай че се установи взаимодействие на моноклоналните антитела с антигени, различни от специфичните, трябва да съществува писмен протокол за начина на разграничаване на специфичен от неспецифичен антиген.

29.7. ДНК анализ:

29.7.1. Всички преамплификационни процедури се извършват само на определени за целта работни места. Препоръчителни са пространствено разделяне и ограничен поток на трафика.

29.7.2. В преамплификационната зона се използват само определени за целта оборудване, консумативи и лабораторно облекло.

29.7.3. Всички дейности, произтичащи от и включващи амплификация в PCR апаратите, се извършват в постамплификационната зона.

29.7.4. Методи, които използват двустъпална амплификация, предразполагат към грешки, свързани с PCR контаминация. Прибавянето на матрицата за втората амплификация е разделено физически от преамплификационното и постамплификационното работно място. Изисква се да се използват определени оборудване и консумативи.

29.7.5. Контрол за замърсяване ("wipe-test").

29.7.5.1. Замърсяване се проследява при всички амплификационни процедури.

29.7.5.2. Рутинен wipe-test на преамплификационната зона и оборудване се извършва най-малко 1 път на всеки 2 месеца. Тестуване на другите зони е препоръчително.

29.7.5.3. Мониторирането на замърсяване се извършва по методи с чувствителност, съответстваща на рутинно използваните методи.

29.7.6. Оборудване и реактиви

29.7.6.1. Точността на PCR апаратите се верифицира чрез: поддръжка съобразно препоръките на производителя; проверка на функционирането на всеки апарат на 6-месечни интервали.

29.7.6.2. Инкубаторите и водните бани се контролират при всеки анализ.

29.7.6.3. Преди използване в рутинната работа всяка нова партида от реактивите и търговските китове се тестува.

29.7.6.4. За търговските китове се документират производител, партиден номер, срок на годност и условия на съхранение.

29.7.7. Праймери и сонди

29.7.7.1. Специфичностите на праймерите и сондите, позициите на праймерите и таргетните секвенции на сондите се документират.

29.7.7.2. Всеки партиден номер трябва да бъде тестуван върху поне една ДНК проба с известна специфичност. Интензитетът на сигнала трябва да бъде дефиниран, мониториран и да съответства на приемливото ниво.

29.7.7.3. Праймерите и сондите се използват при емпирично определени условия, осигуряващи специфичност в рутинното тестуване.

29.7.8. Изолиране на ДНК, електрофореза и анализ

29.7.8.1. Изолиране на ДНК

29.7.8.1.1. ДНК се изолира и пречиства по стандартен метод, който е документиран и валидиран в лабораторията.

29.7.8.1.2. Ако ДНК не се използва веднага след пречистване, лабораторията трябва да разполага с метод за съхранение, който запазва материала от деградиране.

29.7.8.1.3. ДНК трябва да бъде с достатъчна чистота и концентрация за осигуряване на надеждни резултати.

29.7.8.2. Електрофореза

29.7.8.2.1. Трябва да бъдат определени и документирани оптимални електрофоретични условия и приемливи граници.

29.7.8.2.2. Лабораторията установява критерии за приемане на всеки старт или капилярна гелна миграция.

29.7.8.2.3. Когато размерът на ампликона е критичен фактор при анализа, във всеки гел се включва маркер с размер на фрагментите, съответстващ на всички очаквани фрагменти.

29.7.8.3. Анализ

29.7.8.3.1. Приемливи граници на силата на сигнала се дефинират за определяне на позитивен и негативен резултат.

29.7.8.3.2. При мануално отчитане на позитивни/ негативни реакции и определяне на алелите при SSP и SSOP методите се извършват 2 независими интерпретации на първичните данни. При спешни ситуации е допустима 1 интерпретация.

29.7.8.3.3. Методът за определяне на алелите и алелната база данни се документират.

29.7.8.3.4. При неразграничим резултат всички възможни алелни комбинации се посочват в резултата.

29.8. Методи за типизиране

29.8.1. PCR-SSP

29.8.1.1. Всяка ампификационна реакция включва контрола за детекция на технически проблеми - вътрешна контрола (допълнителни праймери или матрица, които дават продукт, разграничим от специфичния амплификат).

29.8.1.2. При липса на специфичен амплификат и вътрешна контрола за дадена праймерна смес лабораторията трябва да има политика за приемане или отхвърляне на резултатите от типизирането.

29.8.1.3. Неспецифична или слаба амплификация и тенденция към образуване на праймерни димери трябва да бъдат документирани.

29.8.2. Секвениране

29.8.2.1.Матрицата за нуклеотидно секвениране се характеризира с достатъчна чистота, специфичност, количество и качество.

29.8.2.2. Пречистване на матрицата след амплификация се извършва за отстраняване на dNTP, Taq плимераза и амплификационни праймери.

29.8.2.3. Трябва да бъдат установени критерии за приемане на първичните резултати (интензитет на пиковете, флуктуации на базовата линия, форма на пиковете, точно определяне на константните позиции).

29.8.2.4. Съотношението сигнал/шум трябва да бъде достатъчно за надеждно определяне на нуклеотидите.

29.8.2.5. Методът за определяне на алелите се документира

29.8.2.6. Трябва да се използват методи, които да не допускат позициите, включени в амплификационните праймери, да се анализират при определянето на алелите.

29.8.2.7. Лабораторията документира базата данни, използвана при интерпретацията на данните.

29.8.2.8. Ако определената секвенция е неразграничима, крайният резултат посочва всички възможни алелни комбинации.

29.8.3. PCR-SSOP

29.8.3.1.Амплификацията се мониторира чрез гел-електрофореза преди извършване на хибридизация.

29.8.3.2. Всеки анализ включва вътрешна сонда, специфична за консервативен регион на амплифицирания продукт.

29.8.3.3. Всеки анализ включва съответни контроли за валидиране на хибридизацията и детекцията.

29.8.3.4. Всяка амплификация и хибридизация включва негативна контрола (без ДНК).

29.8.3.5. Автоматичните системи за хибридизация се калибрират най-малко 1 път в годината.

29.8.3.6. При използване на скенери се извършва второ визуално отчитане за потвърждаване на данните.

29.8.3.7. При автоматизирано отчитане всички критични елементи, оказващи влияние върху функционирането на машината, трябва да бъдат мониторирани. Лабораторията документира функционалната проверка на апаратурата. Почистването и калибрирането на флоуцитометър подобните инструменти се извършва и документира преди използването им.

30. Определяне на циркулиращи алоантитела

30.1. Лабораторията има документирана политика за оценяване сенсибилизацията на всеки пациент от времето на първоначалното характеризиране.

30.2. Лабораторията има програма за регулярен скрининг на серуми от всеки пациент за антитела срещу HLA антигени съобразно изискванията за трансплантация на органи и медицински стандарт "Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки".

30.3. Лабораторията разполага с документация за потенциално сенсибилизиращи събития на всеки пациент. Серумите след всяко от тези събития се тестуват за антитела срещу HLA антигени и се съхраняват за бъдещ кросмач.

30.4. Определя се и се документира специфичността на HLA антигени, срещу които са

насочени откритите антитела. Необходимо е да бъдат разграничени антителата срещу HLA антигени от антитела с друга специфичност.

30.5. Използва се класическата комплемент-зависима лимфоцитотоксична техника и/или друга техника с чувствителност, еквивалентна или по-висока от тази на цитотоксичната.

30.6. За откриване на антитела срещу HLA клас II антигени се използва техника, която ги разграничава от антитела срещу HLA клас I антигени.

30.7. Панелът от HLA антигени включва достатъчен брой донори, за да се обхване най-голям брой антигенни специфичности и да се осигури съответствие на разпределението им в популацията. Броят на индивидите и на антигенните специфичности се документира.

30.8. Комплемент зависим лимфоцитотоксичен тест:

30.8.1. Във всяка плака се включва HLA специфична положителна контрола за активността на комплемента и отрицателна контрола за жизнеспособността на тестуваните клетки.

30.8.2. ИгГ и ИгМ положителни контроли се включват, ако серумите се изследват след третиране с дитиотреитол (ДТТ).

30.9. Микросферов тест:

30.9.1. Лабораторията има утвърдена процедура за контролиране на неспецифичното свързване на антитела към таргетните микросфери.

30.9.2. Всяко изследване задължително включва отрицателна контрола - серум от неалоимунизиран човешки донор(и).

30.9.3. Всяко изследване включва положителна контрола - серуми от алоимунизирани индивиди, за които е документирано, че реагират с HLA антигени. Антителата са от подходящия за изследването изотип.

30.9.4. Лабораторията трябва да има изработени критерии за разграничаване на позитивните от негативните реакции.

30.10. Имуноензимен тест.

30.10.1. Всяко изследване на алоантитела чрез ИЕМ включва отрицателна и положителна серумна контрола както при микросферовия анализ.

30.10.2. Контрола без HLA антиген се включва в тест-системата.

30.10.3. Лабораторията документира свой собствен праг на сигнификантни нива на антитялово свързване.

31. Определяне на тъканна съвместимост чрез кросмач реакция.

31.1. Кросмач реакцията се извършва проспективно.

31.2. Използват се техники с еквивалентна чувствителност на скриниращия алоантителата тест. Могат да бъдат използвани тестове с доказана повишена чувствителност в сравнение с основния микролимфоцитотоксичен тест, напр. удължена инкубация, усилване на реакцията с антиглобулин или флоуцитометрия.

31.3. Лабораторията може да определя Т- и В-клетъчен кросмач.

31.4. Лабораторията може да диференцира положителен кросмач, дължащ се на алоантитела, от този, дължащ се на автоантитела.

31.5. Серумите, взети на 14-ия ден след сенсибилизиращо събитие, се включват в кросмач реакцията преди трасплантация.

31.6. Лабораторията има утвърдена политика за подбор на положителни исторически серуми за тестуване в кросмач реакцията при сенсибилизирани реципиенти.

31.7. Лимфоцитотоксичен кросмач:

31.7.1. Във всяка плака се включва HLA специфична положителна контрола за активността на комплемента и отрицателна контрола за жизнеспособността на донорните лимфоцити.

31.7.2. ИгГ и ИгМ положителни контроли се включат, ако кросмачът се извършва след

третиране на серумите на пациентите с ДТТ.

31.8. Флоуцитометричен кросмач:

31.8.1. Препоръчва се многоцветна техника.

31.8.2. Свързването на човешкия имуноглобулин се установява чрез флуорохром-белязан F(ab')2 античовешки ИгГ.

31.8.3. Всяко изследване включва отрицателна и две положителни (силна и слаба) контроли.

31.8.4. Контролният нормален човешки серум е от неимунизирани, здрави индивиди и доказано флоуцитометрично негативен срещу човешки левкоцити.

31.8.5. Позитивната контрола включва човешки серуми, съдържащи антитела от определен изотип, специфични за HLA антигените или всякакви други алоантигени, които са от значение за кросмача. Позитивната контрола би трябвало да реагира с всички човешки лимфоцити.

31.8.6. Всяка лаборатория установява собствен праг за позитивен кросмач. Всяка значителна промяна в протокола или апарата изисква повторно характеризиране на позитивния праг.

32. Определяне на тумор-асоциирани антигени в серум.

32.1. Лабораторията е в състояние да изследва туморни маркери по един от утвърдените методи: РИА, ИЕМ, хемилуминесценция.

32.2. Изследването на туморни маркери за диагностично уточняване и контрол на лечението включва:

32.2.1. преди провеждане на терапия - изследване на най-подходящия маркер за вида и локализацията на тумора;

32.2.2. при отсъстващо или недостоверно повишаване стойностите на маркера може да се изследва маркер на втори избор;

32.2.3. повторно изследване на маркера се препоръчва не по-рано от 14 - 20 дни след терапевтичната интервенция;

32.2.4. в зависимост от промените в стойностите на туморния маркер в сравнение с предтерапевтичните и/или при промяна на терапевтичното поведение се изработва индивидуална схема за конкретния пациент за честотата на проследяване на маркера.

32.3. Всяко изследване включва контролни концентрации на дадения туморен маркер, вкл. серум с липса на маркера. По получените стойности от изследването на контролни концентрации се построява кривата за отчитане на резултатите.

32.4. При всяко изследване се използва един и същ серум с известна концентрация на маркера, като полученият резултат трябва да попада в указаните граници.

33. Определяне на хормони

33.1. Използва се международно приетата номенклатура на методите за анализ на хормони.

33.2. Полуколичествените методи (хроматографски принцип на тест ленти) се използват като диагностичен ориентир (скрининг тест). При получаване на резултати извън границите на нормата се използват количествени методи: радиоимунологичен анализ (РИА), имуно-радиометричен анализ (ИРМА), ензимно-имунен анализ (ЕИА), имуно-ензимен анализ (ИЕА), флуоро-имунен анализ (ФИА), имуно-флуорометричен анализ (ИФМА), луминесцентно-имунен анализ (ЛИА), имуно-луминесцентен анализ (ИЛМА).

33.3. Изборът на метод за анализ на хормони се съобразява с определени изисквания:

33.3.1. по отношение на чувствителност методите се нареждат по следния начин ЕИА = ИЕА < РИА < ИРМА = ИЛМА = ЛИА = ФИА = ИФМА;

33.3.2. за всеки вид хормон съобразно неговата структура, транспортни белтъци и пр. има оптимален вид анализ, който има предимства пред другите независимо от горепосочения ред.

33.4. Стриктно се спазват условията за вземане и съхранение на пробите при всеки

отделен хормон.

33.5. Лабораторията може да определя количествено и полуколичествено стероидни хормони (кортизол, 17-ОН прогестерон, дехидроепиандростерон-сулфат, алдостерон и техните метаболити в кръвен серум, плазма и урина) по една от утвърдените техники.

33.6. Лабораторията може да определя количествено, а където е необходимо - и полуколичествено, репродуктивни хормони - естрадиол, прогестерон, тестостерон и техни метаболити в кръвен серум, плазма и урина, по една от утвърдените техники.

33.7. Лабораторията може да определя количествено тиреоидни хормони (общ трийодтиронин и тироксин, свободен трийодтиронин и типоксин, трийодтиронин-обратен, тиреоглобулин) в кръвен серум или плазма по една от утвърдените техники.

33.8. Лабораторията може да определя хипофизни хормони (адренокортикотропен хормон, тиреоид-стимулиращ хормон, соматотропен хормон, пролактин, фоликулостимулиращ хормон, лутеинизиращ хормон) по една от утвърдените техники:

33.8.1. Полуколичествените методи на тест ленти могат да се използват за скринингови цели и първоначален диагностичен ориентир.

33.8.2. При отклонение на резултата от нормалните стойности лабораторията може да анализира пробата по един от количествените методи: ФИА, ИЛМА, ИРМА.

33.9. Лабораторията може да определя инсулин и С-пептид и е препоръчително определянето на глюкагон в серум или плазма по една от утвърдените техники (ЕИА, МЕИА, РИА, DELFIA) за количествено определяне. Полуколичествените методи на тест ленти не се препоръчват.

34. Имунохистохимично и имуноцитохимично изследване.

34.1. Лабораторията е в състояние да идентифицира и локализира антигени в тъканни срези и цитологични препарати чрез съответно имунохистохимично или имуноцитохимично маркиране с антитела, използвани като специфични реагенти в антиген-антитяло реакция и последваща визуализация посредством флуоресцентни бои или ензимни системи.

34.2. Всяко изследване включва положителна и отрицателна контрола.

34.3. Фоновото маркиране се намалява максимално чрез специфично блокиране на ендогенните субстрати в зависимост от използваната визуализираща система.

34.4. Като отрицателна контрола на неспецифичното свързване на антителата се използват контролни изотипни антитела, специфични спрямо антигени, които не се срещат и не могат да бъдат индуцирани в тъкани на бозайници.

34.5. Като отрицателни контроли на имунохистохимичното или имуноцитохимичното изследване с цел оценка на наличието на ендогенен субстрат на визуализиращата система в изследваните тъкани или клетки успоредно се инкубират препарати от изследвания материал, при които е пропуснато първичното антитяло.

34.6. Като положителна контрола се използват тъкани или клетки, за които е известно, че са положителни за тествания антиген. При изследване на левкоцитни антигени хемопоетичната тъкан предоставя вътрешни положителни контроли за използваните антилевкоцитни антитела.

34.7. Лабораторията има възможности за морфологично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал.

34.8. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.

34.9. Резултатите съдържат информация за вида на положително и отрицателно оцветените клетки и структури, описание на типа на оцветяването (дифузно, фокално, цитоплазмено, ядрено, мембранно), а при необходимост и коментар на контролите и използваните антитела.

Раздел IV

Основни изисквания към структурите по клинична имунология в лечебните заведения за болнична и извънболнична медицинска помощ (устройство, задължителни дейности, персонал)

1. Кабинет по клинична имунология в амбулатория за специализирана извънболнична медицинска помощ

1.1. Устройство

Кабинетът по клинична имунология е най-малката структура, която може да бъде самостоятелно звено или част от структурата на лечебно заведение за специализирана извънболнична помощ. Състои се от кабинет и манипулационна.

Кабинетът се използва за преглед на пациента - снемане на анамнеза, физикален статус и попълване на медицинските документи.

Манипулационната служи за извършване на специфични диагностични дейности - кожно-алергични проби, кожни проби за забавен тип свръхчувствителност, за провеждане на кардиопулмонална ресусцитация при необходимост. Манипулационната може да се обособи като функционална част от кабинета или при необходимост да се помещава в отделна стая.

1.2. Оборудване

Кабинет: лекарско бюро, стол, шкаф за документи, медицинска кушетка, мивка с течаща топла и студена вода, телефон, компютър и принтер, медицински документи: амбулаторен журнал, рецепти, бланки за назначаване на лабораторни и рентгенови изследвания.

Манипулационна: хладилник за съхранение на реактивите за кожно-алергичните проби и пробите за забавен тип свръхчувствителност, масичка за извършване на кожните проби, стол за извършващия пробите, стол за пациента, спешен шкаф с медикаменти, кислородна бутилка, амбу, есмарх, ластични бинтове, масичка за поставяне на спринцовки с алергени, шкаф, мивка с течаща топла и студена вода, медицинска кушетка.

1.3. Задължителни дейности

1.3.1. Прегледи:

- първичен преглед с описание на анамнеза и статус и изработване на индивидуална диагностично-лечебна схема;

- първичен преглед в домашна обстановка;

- вторичен преглед и оценка на нов медицински проблем;

- вторичен преглед в домашна обстановка;

- консултация с друг специалист в амбулаторни условия;

- експертиза на временна неработоспособност.

1.3.2. Общомедицински дейности:

- инжекции;

- парентерални инфузии;

- кардио-пулмонална ресусцитация (по витални индикации).

1.3.3. Специфични дейности:

- назначаване и интерпретиране на лабораторни и специализирани имунологични изследвания;

- назначаване, започване и контролиране на специфична имунотерапия, неизискваща стационарни условия.

1.4. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Персонал:

- лекарят с призната специалност по клинична имунология носи пълна отговорност за пациента от момента на първия преглед, като контролира провеждането на изследванията, поставя диагнозата, изготвя лечението и следи ефекта му чрез контролни прегледи до момента, в който пациентът бъде предаден на общопрактикуващия лекар (ОПЛ), постъпи в болница или при промяна на местожителството;

- медицинска сестра в кабинет по имунология се назначава по преценка на лекаря

имунолог при достатъчна натовареност; медицинската сестра работи под контрола на лекаря имунолог и извършва следните дейности: извършва кожните проби, попълва документацията, регулира потока от пациенти и следи за консумативите (памук, спирт, спринцовки и игли и т.н.);

- санитар - назначава се по преценка на лекаря.

2. Клиника (отделение) по клинична имунология към лечебно заведение за болнична помощ

2.1. Устройство

Клиниката или отделението включва:

- болнични стаи - с мивка, кислородна инсталация на всяко легло, естествено осветление, общо и локално изкуствено осветление, 1 - 3 легла в стая с тристранен достъп, нощно шкафче за всяко легло;

- приемен кабинет с манипулационна за консултации и приемане на лежащо болни;

- регистратура;

- лекарски кабинети;

- кабинет за началника на клиниката (отделението);

- кабинет на дежурния лекар с легло, бюро, телефон и мивка;

- манипулационна за стационара с работни плотове, шкафове, централен спешен шкаф и хладилник;

- сестринска стая, която се използва и за стая на дежурната сестра;

- склад;

- санитарен възел.

2.2. Оборудване

- кислородна инсталация, електроинсталация;

- общо луминесцентно осветление със 150 Вт източници и индивидуално (за легло) нелуминесцентно осветление - 60 - 75 вата;

- апарат за ЕКГ;

- дефибрилатор;

- АМБУ;

- носилка;

- седяща инвалидна количка;

- персонални компютри, свързани в мрежа;

- хладилници - минимум по един в манипулационните.

2.3. Основни дейности

- лечебно-диагностична дейност в оптимален размер, съобразен с актуалните световни достижения в областта на имунологията;

- учебно-преподавателска дейност на студенти и стажант-лекари и обучение на специализиращи лекари, докторанти и медицински сестри в рамките на следдипломно обучение (СДО);

- научноизследователска работа в областта на нови диагностични и терапевтични методи и на предстоящи за регистриране медикаменти от фаза II, III и IV.

2.4. (изм. - ДВ, бр. 63 от 2021 г.) Персоналът (лекар/ите, медицинската/ите сестри и санитар/и) се определя в зависимост от броя на леглата, потока на амбулаторните пациенти, обучаването на студенти и специализанти и научноизследователската дейност.

2.4.1. Лекарят имунолог в клиниката (отделението) по клинична имунология извършва следните дейности:

- снемане на анамнеза според изискванията и правилата на специалността;

- клиничен преглед - снемане на физикален статус по системи, назначаване на необходимите лабораторни, специфични имунологични, функционални и инструментални

изследвания;

- интерпретира резултатите от назначените изследвания;

- назначава необходимите консултации със съответни специалисти;

- назначава съответни лечебни процедури под ръководството на съответния ръководител (началник-отделение и началник-клиника);

- ежедневно минава на визитация с медицинската сестра и дава ясни назначения за поведението, изследванията и лечението на болните;

- контролира изпълнението на назначенията от медицинската сестра и друг помощен персонал;

- подготвя и докладва болните за визитация на началника на клиниката.

Лекуващият лекар носи цялата отговорност за пациента от приемането до момента на изписването му. В деня на изписването му дава епикриза.

Лекуващият лекар е длъжен да информира пациента или неговите близки за неговото състояние, за характера на заболяването му, за предстоящите изследвания и методи на лечение (вид медикаменти, клинична ефективност и безопасност на прилаганите медикаменти).

В отделението/клиниката по клинична имунология лекарите без призната специалност по клинична имунология работят под ръководството на лекар имунолог.

В отделението/клиниката могат да работят и лекари без призната специалност по клинична имунология в хода на тяхното обучение (специализиция) по съответната програма за следдипломно обучение. Това се извършва под ръководството и отговорността на ръководителя на клиниката с помощта на лекар имунолог от отделението.

Клиничните имунолози, работещи в отделенията, могат да извършват научно-приложна дейност - научна разработка на теми, клинични проучвания и изследване на нови медикаменти в различна фаза на проучването им.

2.4.2. Медицинската сестра в отделенията има следните функции и задължения:

- приема новоприетите болни, извършва санитарната им обработка и ги подпомага в настаняването в болнична стая;

- запознава болните с правилника за вътрешния ред и подпомага адаптацията им в болничната среда;

- поддържа постоянен контакт с болните и проявява внимание към нуждите им;

- следи за спазване на правилника за вътрешния ред и дневен режим; следи за добрия ред в стационара по време на свиждане;

- организира, ръководи и контролира работата на санитаря;

- отговаря за реда и чистотата в болничните стаи;

- подготвя болните и болничните стаи за визитация и участва в нея с лекуващия лекар;

- организира и осигурява болничните грижи за тежко болни на легло;

- при екзитус организира процедурите по своевременно изнасяне на трупа; описва и съхранява ценностите на починалия и ги предава на старшата медицинска сестра или близките на болния по установения ред;

- изпълнява всички назначения и инструкции на лекуващия лекар, касаещи болните, като своевременно го информира за извършеното и евентуални затруднения;

- подпомага лекуващия лекар при провеждане на изследванията и повикване на консултанти;

- измерва температура, пулс, артериално налягане (АН), дишане, диуреза;

- прави подкожни, мускулни и венозни инжекции и вливания;

- прави подготовка за определяне на кръвни групи, изписва кръв и биологични продукти, подготвя всичко необходимо за кръвопреливане, което се извършва от лекар;

- взема материали от болния за бактериологично и вирусологично изследване;

- изписва, получава, разпределя, раздава и заприходява предписаните лекарства;

- следи за изправността на подаващата кислород система, следи за наличието на кислород;

- подготвя болните за различни изследвания и ги придружава до съответното звено;

- прави очистителни клизми по назначение, поставя грейки, лед, компреси, влажни обтривания, масажи срещу декубитус, редовен тоалет и обслужване на тежко болни;

- поддържа хигиена на работното място;

- техническо участие в научната дейност;

- споделя своите знания и опит със специализиращи колеги;

- води съответната документация за медицински сестри (рапортна книга, тетрадка за визитации, тетрадка за назначения, табели за изписани лекарства и санитарни материали);

- поръчва, разпределя и раздава храната на болните според назначените диети;

- следи за опазване на болничното имущество;

- изпълнява работния график (редовен работен ден, следобедни или нощни дежурства), съставен от старшата медицинска сестра и одобрен от началника на отделението;

- в края на работния ден предава работното си място с рапорт на следващата смяна, а тежко болните - до леглото на болния;

- задължена е да пази медицинска тайна и не разгласява лични конфиденциални данни за болния, като съблюдава човешките му права;

- за изпълнение на задълженията си носи отговорност пред старшата медицинска сестра и висшия медицински персонал.

3. Право на пациентите за достоверна и поверителна информация от имунологичните изследвания за собственото им здраве

За да се защитят правата на пациентите, изследвани и консултирани в имунологична лаборатория:

• персоналът на лабораторията носи отговорност не само за достоверността на резултатите от изследванията, но и гарантира персонална тайна за цялата информация, получена от изследванията; ако данните от изследванията се нанасят в компютър, те трябва да са защитени с код, който е известен само на персонала на лабораторията;

• резултатът се предава лично на заявителя на изследването или оторизирано от него лице при запазване конфиденциалност на информацията; резултати от изследването не се дават по телефон.

4. Право на работещите в имунологична лаборатория за мотивиран отказ от извършване на изследвания

Имунологичната лаборатория има право да откаже да извърши изследвания при:

• неправилни индикации за изследване;

• негоден за изследване материал: неправилно взет и/или неправилно транспортиран;

• липса на данни за изследвания материал или непосредствени клинични данни за пациента.

5. Взаимовръзка на специалността "Клинична имунология" с останалите клинични дисциплини

При посочените клинични състояния е задължително/препоръчително да се поиска консултация с лекар имунолог за назначаване на необходимите имунологични изследвания и тяхното интерпретиране с оглед поставяне (уточняване) на диагноза, мониториране активността на болестния процес, засягащ имунната система, определяне индикациите за имуномодулираща терапия и мониторирането й.

Клинични състояния	Консултация с лекар със специалност клинична имунология	
	задължителна	препоръчителна
1	2	3
Първични имунодефицити	x	
Вторични имунодефицити (СПИН и др.)	x	
Алергични болести	x	
Ревматични болести	x	
Ендокринни болести		x
Хематологични болести		x
Сърдечни и съдови болести		x
Болести на храносмилателната система		x
Болести на пикочо-половата система		x
Кожни болести		x
Нервни болести		x
Очни болести		x
Болести на дихателната система		x
Репродуктивни нарушения	x	
Онкологични заболявания		x
Остри и хронични инфекции и паразитози		x
Хирургични възпалителни заболявания		x
Масивни и многократни	x	

кръвопреливания при хирургични заболявания	
Трансплантация на кожа, солид-ни органи, костен мозък и хемопоетични стволови клетки	x
Автоимунни и други имуно-медиирани състояния	x