

Obilježja pripravaka trombocita dobivenih trombaferozom i podvrgnutih metodi inaktivacije patogena amotosalenom

Meštrović, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:763475>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Lucija Meštrović

**OBILJEŽJA PRIPRAVAKA
TROMBOCITA DOBIVENIH
TROMBAFEREZOM I PODVRGNUTIH
METODI INAKTIVACIJE PATOGENA
AMOTOSALENOM**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Lucija Meštrović

**OBILJEŽJA PRIPRAVAKA
TROMBOCITA DOBIVENIH
TROMBAFEREZOM I PODVRGNUTIH
METODI INAKTIVACIJE PATOGENA
AMOTOSALENOM**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu u KBC-u Osijek.

Mentor rada: prof. prim. dr. sc. Marina Samardžija, dr. med., specijalist transfuzijske medicine

Rad ima 23 lista, 7 tablica i 1 sliku.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. <i>Dobrovoljni davatelji krvi</i> | 1 |
| 1.2. <i>Krvni pripravci</i> | 1 |
| 1.3. <i>Sigurnost transfuzijskog liječenja</i> | 2 |
| 1.4. <i>Posttransfuzijske reakcije</i> | 2 |
| 1.5. <i>Prijenos zaraznih bolesti transfuzijom krvi</i> | 4 |
| 1.6. <i>Prijetranfuzijsko testiranje doza krvi</i> | 5 |
| 1.7. <i>NAT testiranje</i> | 6 |
| 1.8. <i>Trombafereza</i> | 7 |
| 1.9. <i>Inaktivacija patogena</i> | 7 |
| 2. CILJEVI | 8 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 9 |
| 3.1. <i>Ustroj studije</i> | 9 |
| 3.2. <i>Materijali</i> | 9 |
| 3.3. <i>Metode</i> | 9 |
| 3.3.1. <i>Proizvodnja pripravaka trombocita postupkom trombafereze</i> | 9 |
| 3.3.2. <i>Postupak inaktivacije patogena na uređaju Intercept (Cerus)</i> | 9 |
| 3.4. <i>Statističke metode</i> | 10 |
| 4. REZULTATI | 11 |
| 5. RASPRAVA | 14 |
| 6. ZAKLJUČCI | 18 |
| 7. SAŽETAK | 19 |
| 8. SUMMARY | 20 |
| 9. LITERATURA | 21 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 23 |

POPIS KRATICA U TEKSTU

DDK - dobrovoljni davatelj krvi

CMV – citomegalovirus

AHTR – akutna hemolitička transfuzijska reakcija

TRALI – akutna plućna insuficijencija

TA – GVDH – transfuzijom uzrokovana reakcija presatka protiv primatelja

PTP – poslijetransfuzijska purpura

HIV – virus humane imunodeficijencije

NAT – tehnike umnažanja nukleinskih kiselina

WP – razdoblje prozora

RNK – ribonukleinska kiselina

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

HCV – hepatitis C virus

HBV – hepatitis B virus

HBsAg – biljeg zaraze virusom hepatitisa B

Anti – HCV – protutijelo na virus hepatitisa C

HIV Ag/At – biljeg zaraze virusom HIV-a

Anti – TP – antitijelo na *Treponemu pallidum*

UVA – ultraljubičasto zračenje

KZTM – Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

SARS – teški akutni respiratorni sindrom

MERS – bliskoistočni respiratorni sindrom

1. UVOD

1.1. Dobrovoljni davatelji krvi

Dobrovoljni davatelj krvi (DDK) može biti svaka zdrava osoba koja ispunjava određene zahtjevnosti (18 - 65 godina, tjelesna težina iznad 55 kg, tjelesna temperatura do 37 °C i drugi). Sam postupak traje 8 - 12 minuta i prikuplja se 450 ml krvi (1). Krv se uzorkuje u plastične vrećice s antikoagulantnom otopinom te se provjerava integritet vrećice, boja i volumen antikoagulantne otopine. Vrećice za krv s prijedonacijskim uzorkovanjem koriste se za smanjenje rizika bakterijske kontaminacije. Prvih 35 mL krvi iz te vrećice koristi se za laboratorijska ispitivanja, a preostali dio sakuplja se u veću vrećicu i koristi se u proizvodnji krvnih pripravaka. Za miješanje krvi s antikoagulantnom otopinom na raspolaganju su automatske vage miješalice, a doze se mogu miješati i ručno svakih 30 – 45 sekundi. Miješanje osigurava kvalitetu krvnih pripravaka, sprječavanje nastanka ugrušaka i izjednačavanje razlika u temperaturi i pH dviju tekućina. Druga mogućnost je uzimanje krvi pomoću staničnog separatora. U tom slučaju uzima se jedan određeni ili više krvnih sastojaka. U Hrvatskoj u prosjeku 38 na 1000 ljudi daruje krv. Načela dobrovoljnog davanja krvi su dobrovoljnost, besplatnost, anonimnost i solidarnost. Darivanje krvi se ne plaća, da bi se osiguralo iskreno darivanje, a ne darivanje potaknuto novčanom naknadom. U slučajevima plaćanja veća je i vjerojatnost zatajivanja važnih detalja (zarazne bolesti) koji bi mogli utjecati na zdravlje primatelja (2).

1.2. Krvni pripravci

Krvni pripravci se dobivaju iz ljudske krvi ili plazme, a to su koncentracije eritrocita, trombocita, granulocita, krioprecipitati i svježe smrznuta plazma. Derivati plazme su lijekovi koji se proizvode po farmaceutskim pravilima iz velikih količina plazme: albumini, globulini, faktori zgrušavanja i drugi. Važno je razlikovati krvne pripravke od derivata plazme jer je kod krvnih pripravaka svaki krvni pripravak jedna serija, a kod derivata plazme je točno definirana količina aktivnog sastojka u svakoj seriji. Krvni sastojci su plazma i krvne stanice koje se uzimaju klasičnim postupkom ili aferezom i miješaju s antikoagulantnom otopinom. Krvni pripravci su lijekovi dobiveni iz krvi ili plazme koji se dalje koriste pri liječenju. Svi krvni pripravci čuvaju se u točno određenim uvjetima i s određenim rokom valjanosti (3). Krvni pripravci u proizvodnji prolaze različite postupke modifikacije osnovnog krvnog pripravka. Ovisno o potrebi bolesnika mogu biti sa smanjenim brojem leukocita (filtrirani), oprani ili

ozračeni. Krvni pripravci sa smanjenim brojem leukocita primjenjuju se kod bolesnika u kojih je predviđena dugotrajna transfuzija. Na taj način se sprječava ili odgađa imunizacija na leukocitne antigene. Primjenjuju se i kod bolesnika koji su imali dvije uzastopne febrilne nehemolitične reakcije na transfuziju eritrocita ili trombocita te bolesnika negativnih na *citomegalovirus* (CMV). Oprani krvni pripravci primjenjuju se kod bolesnika s teškim alergijskim reakcijama na transfuziju krvi, a ozračeni kod primjerice imunokompromitiranih bolesnika, bolesnika liječenih transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (eritrociti) ili tkiva i organa (trombociti), intramaternične transfuzije, transfuzije eritrocita ili trombocita od srodnika, bolesnika sa sindromom teške kombinirane imunodeficijencije i drugih (4).

1.3. Sigurnost transfuzijskog liječenja

Transfuzijsko liječenje je složen proces u kojem ne sudjeluju samo pacijent i liječnik. U ovom slučaju postoji i treća osoba, davatelj krvi. Zato treba pridati posebnu pozornost samoj sigurnosti, kako za liječnika i pacijenta, tako i za davatelja krvi. Najveću pozornost treba obratiti na prijenos zaraznih bolesti. Mjere za sprječavanje prijenosa zaraznih bolesti u Hrvatskoj su dobrovoljno besplatno davalaštvo, edukacija stanovništva, dobra prerađivačka i laboratorijska praksa, dobra klinička transfuzijska praksa, provođenje laboratorijskog testiranja i pismeni pristanak bolesnika. Pojavljuju se i novi virusi koji mogu biti preneseni, a njihovo otkrivanje i proizvodnja testova za dokazivanje je dugotrajan proces. Iz tog razloga provodi se inaktivacija svih uzročnika krvlju prenosivih bolesti. Postupak inaktivacije patogena ne može u potpunosti spriječiti rizik prijenosa uzročnika zaraznih bolesti, stoga se selekcija davatelja te serološka i molekularna testiranja krvi davatelja i dalje provode (5). Važno je pridržavanje postupaka koji su opisani u standardnom operativnom protokolu (SOP). SOP opisuje postupke uzimanja krvi, laboratorijskog testiranja, pripravljanja krvnih pripravaka, osiguranja kvalitete i transfuzijskog liječenja. Nužno je obrazovanje, iskustvo, detaljno upoznavanje s radnim procesom i mogućim nezgodama (6).

1.4. Posttransfuzijske reakcije

Svaka doza krvi podvrgnuta je imunoematološkim, serološkim i molekularnim ispitivanjima u svrhu održavanja kvalitete krvnih pripravaka i sigurnosti transfuzijskog liječenja.

U 3 do 5 % slučajeva opažaju se posttransfuzijske reakcije unatoč svim poduzetim mjerama sigurnosti. Posttransfuzijske reakcije dijele se prema uzroku (imunološke i neimunološke) i vremenu nastanka (rane i kasne). Imunološke su posredovane reakcijom antigena i antitijela za

razliku od neimunoloških u koje pripadaju brojne druge reakcije. Rane su one koje se dogode unutar 24 sata od transfuzije, a kasne nakon 24 sata. Uzroci reakcija su brojni i neki od njih navedeni su u tablici 1. (6).

Tablica 1. Uzroci posttransfuzijskih reakcija prema mjestu nastanka pogreške

| Uzrok | | Učestalost % |
|---|---|---------------------|
| Pogreške izvan transfuzijskog odjela | Identifikacija bolesnika | 43 % |
| | Uzimanje uzorka | 11 % |
| | Pogrješno ime, nije provedena identifikacija prije transfuzije | 3 % |
| | Namjerna transfuzija u hitnim stanjima | 1 % |
| Ukupno | | 58 % |
| Pogreške u transfuzijskoj ustanovi i izvan nje | Krv izdana za pogrešnog bolesnika i pogreška nije primijećena prije transfuzije | 15 % |
| | Neodgovarajuća zahtjevnica, pogreška nije primijećena u transfuzijskoj ustanovi | 2 % |
| Ukupno | | 17 % |
| Pogreške u transfuzijskoj ustanovi | Testiran pogrešan uzorak | 1 % |
| | Izdana je krv pogrešne krvne grupe | 11 % |
| | Pogreške u testiranju | 7 % |
| | Pogreške u prepisivanju | 6 % |
| Ukupno | | 25 % |

Posttransfuzijske reakcije mogu biti različite kliničke značajnosti, ali većina njih nije opasna po život bolesnika. Posttransfuzijske reakcije su akutna hemolitička transfuzijska reakcija (AHTR), febrilna reakcija, alergijske reakcije, akutna plućna insuficijencija (TRALI), transfuzijom uzrokovana reakcija presatka protiv primatelja (TA-GVDH), transfuzijom

uzrokovana refrakternost na transfuzije trombocita, poslijetransfuzijska purpura (PTP), pirogena reakcija, zračna embolija, intoksikacija citratom, transfuzijom uzrokovana hipotermija i transfuzijom uzrokovana hemosideroza. Neki od simptoma su žutica, hemoliza, poremećaj hemostaze, povišenje temperature i drugi (6).

1.5. Prijenos zaraznih bolesti transfuzijom krvi

Unatoč svim ispitivanjima u laboratoriju i postupcima koji se obavljaju prije same transfuzije, nezgode i štetni događaji uvijek su mogući i događaju se. Osim posttransfuzijskih reakcija, veliku opasnost predstavlja prijenos zaraznih bolesti. Neke od zaraznih bolesti koje predstavljaju problem su virusi hepatitisa A, B, C, D, E, HIV, EBV, CMV, bakterije *Yersinia spp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Clostridium sp.*, paraziti, gljivice i prioni. (tablica 2.). Opasnosti u transfuzijskom liječenju su, u odnosu na druge medicinske postupke, vrlo male.

Rizik smrti od posljedica transfuzijskog liječenja je u rasponu 1 : 100 000 do 1 : 1 000 000. Možemo zaključiti da je transfuzijsko liječenje relativno sigurno (5).

Tablica 2. Krvlju prenosivi uzročnici bolesti s pretpostavljenim rizikom prijenosa putem transfuzija krvi

| Zaraza uzročnicima krvlju prenosivih bolesti | Pretpostavljeni rizik poslije transfuzije 1 doze krvi |
|--|---|
| Bakterijska infekcija nakon <ul style="list-style-type: none"> • Transfuzije eritrocita • Transfuzije trombocita (klinički simptomi) | < 1 : 1 000 000 1 : 5000 – 1 : 10 000 |
| Endotoksični šok | Vrlo rijetka |
| Malarija (SAD) | 1 : 4 000 000 |
| Ostale parazitne bolesti (Babesia) | < 1 : 1 000 000 |
| Hepatitis A | 1 : 1 000 000 |
| Hepatitis B (Hrvatska - Njemačka) | 1 : 60 000 – 1 : 500 000 |
| Hepatitis C (Hrvatska - Njemačka) | 1 : 230 000 – 1 : 13 000 000 |
| Zaraza CMV-om <ul style="list-style-type: none"> • Pripravicima bez leukocita | 5 : 100 – 7 : 100 Vrlo rijetka |
| Parvovirusima B19 | < 1 : 1 000 000 |
| Zaraza EBV-om | 0,5 : 100 |
| Zaraza HIV-om (Hrvatska - Njemačka) | 1 : 2 000 000 – 1 : 11 000 000 |
| Zaraza HTLV-1/2 (SAD) | < 1 : 2 993 000 |
| Zaraza prionima – vCJB | ? |

1.6. Prijetransfuzijsko testiranje doza krvi

Svako transfuzijsko liječenje zahtjeva laboratorijske postupke testiranja prije same transfuzije krvi u svrhu sigurnog i učinkovitog liječenja. Prijetransfuzijsko testiranje obuhvaća:

1. određivanje AB0/RhD krvnih grupa
2. test pretraživanja na neočekivana protutijela
3. test podudarnosti krvne grupe primatelja i davatelja (križna proba)
4. testiranja na uzročnike zarazne bolesti koja uključuju HIV 1 i HIV 2, hepatitis B i C te sifilis

5. molekularno testiranje za detekciju nukleinskih kiselina hepatitisa B, C i HIV-a (engl. *Nucleic Acid amplification Technique, NAT*) (7).

1.7. NAT testiranje

NAT testiranje relativno je novija molekularna tehnika za dokazivanje HIV-a te hepatitisa B i C. Temelji se na dokazivanju virusnih RNA i DNA u krvi (plazmi), a može se raditi kao pojedinačni test ili u *poolu*. Visoko je osjetljiva i specifična metoda. NAT testiranjem postiže se smanjenje razdoblja prozora (engl. *window period, WP*), a to je vrijeme potrebno da osoba zaražena primjerice HIV-om počne proizvoditi protutijela na sam virus (Tablica 3.). Općenito to je vrijeme od same infekcije do mogućnosti dokazivanja iste.

Tablica 3. Razdoblje prozora za molekularne i serološke testove

| | Test | Prosjek perioda prozora u danima | Osjetljivost IU/mL |
|---|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Triplex ID-NAT Grifols (molekularni test) | HIV-1 RNK HCV-RNK HBV-DNK | 5 – 6 | 18,2 – 25,7 |
| | | 3 – 4 | 4,5 – 6,7 |
| | | 15 | 3,0 – 4,1 |
| | | | |
| Serološki test | HBsAg | 38 | < 0,13 |
| | Anti-HCV | 60 | |
| | HIV Ag/At | 16 | |
| | Anti-TP | 21 | |

Izvor: Internet stranica Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (<http://www.hztn.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-prema-rezultatima-nat-i-seroloskih-testova-u-transfuzijskoj-djelatnosti-rh.pdf>)

Pojedinačno molekularno testiranje na prisutnost nukleinskih kiselina (Multiplex ID NAT test) istovremeno dokazuje HIV1 - RNK, HCV - RNK, HBV - DNK i genome drugih virusa ovisno o proizvođaču i potrebama. Diskriminacijski test (dNAT) je NAT test kojim se uz pomoć

specifičnih klica (eng. *primera*) dokazuje koji je od virusnih genoma bio uzrok reaktivnosti u ID - NAT testiranju. U Hrvatskoj obvezno testiranje obuhvaća ID - NAT (HIV, HBV, HCV) i serološke testove za HBsAg, anti - HCV, HIV Ag/At i antitijela sifilisa, *Treponema pallidum* (7).

1.8. Trombafereza

Pojam afereza odnosi se na uzimanje jednog krvnog sastojka, a trombafereza na uzimanje trombocita iz krvi. Postupak se radi pomoću staničnog separatora. U slučaju plazmafereze izdvaja se plazma, a stanični elementi se vraćaju u cirkulaciju. U slučaju citaferenze uzimaju se krvne stanice, u slučaju trombafereze trombociti, a krvna plazma se vraća. Princip rada je uzimanje krvi koja se centrifugira (razdvaja) i željeni dio se odvoji, a ostatak vraća u cirkulaciju. Trombaferezom dobije se koncentrat koji je jednak 6 - 8 doza u *poolu* trombocita iz doze pune krvi (3).

1.9. Inaktivacija patogena

Problem dokazivanja patogena u uzorcima krvi nastaje zbog stvaranja novih patogena čije otkrivanje i proizvodnja samog testa traje određeno vrijeme. Postoji i opasnost da je osoba inficirana, ali je zbog perioda prozora infekciju nemoguće dokazati. Isto tako, putovanja u određene zemlje su svojevrsan rizik. Inaktivacija patogena uklanja navedene poteškoće i povećava sigurnost cjelokupnog procesa. Proces inaktivacije mora imati visoku razinu učinka na patogene uz čuvanje strukture, funkcije i kvalitete krvnih stanica. Proces ne smije imati toksičan, imunogeničan i mutagen učinak te je poželjno lako i jednostavno korištenje (8). Danas se za inaktivaciju patogena koriste sustavi Intercept, Cerus (psoralen, amotosalen) i Mirasol, Terumo (riboflavin) uz djelovanje UV svjetlosti. Intercept metoda uključuje upotrebu psoralena. To su aktivni sastojci izolirani iz biljaka. U psoralene pripada i amotosalen hidroklorna kiselina (S – 59). Aktivira se utjecajem ultraljubičastog svjetla (UVA). Hemoglobin apsorbira UVA svjetlo te se metoda ne koristi za pripreme eritrocita. Vežanjem za DNA ili RNA, točnije kovalentnom vezom za pirimidinske baze, S – 59 blokira replikaciju nukleinske kiseline. Veže se i za lipide i proteine. Posljednji korak je uklanjanje ostatka S – 59 nakon čega određeni dio ostaje vezan za plazmu i trombocite (~ 15 %). Metoda inaktivacije patogena djeluje na širok spektar bakterija, virusa, parazita i ostalih leukocita donora (9, 10, 11).

2. CILJEVI

1. Ispitati koliko je pripravaka trombocita zadovoljilo kriterije za podvrgavanje postupku inaktivacije patogena (volumen, koncentracija trombocita, omjer plazme i hranjive otopine te kontaminacija eritrocitima) te postoji li razlika s obzirom na spol DDK-a.
2. Ispitati koje su indikacije za primjenu pripravaka trombocita dobivenih trombaferezom sa smanjenim brojem leukocita u hranjivoj otopini podvrgnutih inaktivaciji patogena amotosalenom.
3. Ispitati nuspojave transfuzijskog liječenja ovim krvnim pripravkom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je presječnog tipa s povijesnim podacima (12).

3.2. Materijali

Materijali koji se koriste su podatci Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Osijek, u razdoblju od 1. 11. 2019. do 15. 3. 2020. godine.

3.3. Metode

Za potrebe istraživanja koriste se podatci o broju trombafereza, količini pripravaka trombocita koji su podvrgnuti postupku inaktivacije patogena amotosalenom, indikacijama za primjenu te nuspojavama transfuzijskog liječenja.

3.3.1. *Proizvodnja pripravaka trombocita postupkom trombafereze*

Trombafereza je postupak kojim se iz uzorka krvi jednog davatelja dobije gotovi pripravak trombocita na automatiziranom aparatu za odvajanje stanica Amicus. Davatelj je spojen ekstrakorporalnom cirkulacijom s centrifugom gdje se odvajaju trombociti. Pripravak trombocita dobiven trombaferezom ekvivalentan je šest do osam pripravaka proizvedenih od 450 ml krvi. Pripravak trombocita odlaže se u agitator na temperaturu od $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na pet dana od postupka trombafereze (13).

3.3.2. *Postupak inaktivacije patogena na uređaju Intercept (Cerus)*

Trombocitni set za iluminaciju sadrži amotosalen (S – 59) otopinu, iluminacijsku vrećicu, Compound Adsorption Device (CAD) za uklanjanje ostatnog amotosalena i vrećicu za pohranu inaktiviranih trombocita. Pripravci za inaktivaciju moraju biti donirani prethodnog dana, pohranjeni u aditivnoj otopini (PAS III), volumena 255 – 325 ml, koncentracije trombocita $2,5 - 7,0 \times 10^{11}/\text{L}$ uz omjer plazme i PAS otopine 32 – 47 %. Količina amotosalena iznosi 15 ml, doza UVA zračenja $3\text{ J}/\text{cm}^2$, a CAD tretman inkubacije je u trajanju od 4 do 16 sati. Pripravak vizualno mora biti bez sadržaja eritrocita. Potrebno je izmjeriti težinu pripravka koja mora biti 289 – 360 g. Prvi korak inaktivacije patogena je suspendiranje trombocita u 35 % plazme i 65 % PAS otopine. Koncentrat trombocita sterilno se spoji s vrećicom amotosalena te trombociti

prolaze iz vrećice s amotosalenom u iluminacijsku vrećicu. Sadržaj vrećice se promiješa i istisne suvišak zraka. Sistem se zavari maksimalno 4 cm od vrećice s trombocitima. Pripravci se zatim stavljaju u iluminator. Iluminator ozrači svaki pripravak UVA zračenjem tri do četiri minute. Pripravke je potrebno izvaditi iz iluminatora unutar maksimalno 15 minuta od zvučnog signala. Posljednji korak je puštanje sadržaja vrećice u CAD vrećicu te uklanjanje zraka. Liniju na iluminacijskoj vrećici treba zavariti neposredno do CAD vrećice. CAD vrećica stavlja se u agitator minimalno 4, a maksimalno 16 sati. Sve postupke treba pravilno obilježiti. Po završetku inkubacije, koncentrat trombocita premješta se u finalnu vrećicu, uzimaju se uzorci za kontrolu kvalitete i pripravak se pohrani do korištenja (13).

3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\text{Alphan} = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 19.1.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

4. REZULTATI

Prvi korak u proizvodnji koncentrata trombocita dobivenih trombaferezom sa smanjenim brojem leukocita u hranjivoj otopini podvrgnutih inaktivaciji patogena amotosalenom je trombafereza. Donaciji je pristupilo 436 dobrovoljnih davatelja od kojih je 413 (94,7 %) bilo muškaraca, a 23 (5,3 %) su bile žene. Neostvarenih venepunkcija nije bilo. Nakon liječničkog pregleda koji se provodi prije darivanja krvi, odbijeno je ukupno 8 osoba. U tablici 4. prikazani su razlozi odbijanja dobrovoljnih davatelja. Nema značajnih razlika u razlogu odbijanja u odnosu na spol (Tablica 4).

Tablica 4. Razlozi odbijanja potencijalnih dobrovoljnih davatelja krvi

| RAZLOG | MUŠKARCI | ŽENE | UKUPNO | P* |
|-------------------------------|----------|------|--------|------|
| Bolesti probavnog sustava | 1/7 | 0 | 1/8 | 0,89 |
| Bolesti respiratornog sustava | 1/7 | 0 | 1/8 | |
| Krvni tlak | 1/7 | 0 | 1/8 | |
| Ostalo | 3/7 | 1/1 | 4/8 | |
| Povrede i trovanja | 1/7 | 0 | 1/8 | |
| Ukupno | 7/7 | 1/1 | 8/8 | |

Darivanju krvi (trombaferezi) pristupilo je 428 osoba. Od 428 donacija koje su napravljene, 404 su bile sukladne za podvrgavanje postupku inaktivacije (92,7 %). Svaki od koncentrata trombocita mora zadovoljiti određene kriterije koji su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Zahtjevi za koncentrate trombocita prije inaktivacije patogena amotosalenom

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Volumen | 255 – 325 ml |
| Koncentracija trombocita | $2,5 - 7,0 \times 10^{11}$ |
| Omjer plazme i PAS otopine | 32 – 47 % |
| Kontaminacija eritrocitima | vizualno bez sadržaja eritrocita |

Od 24 koncentrata trombocita koji ne zadovoljavaju kriterije za podvrgavanje metodi inaktivacije patogena 12 ih ne zadovoljava ukupan volumen, 4 volumen plazme te 8 koncentrata nema zadovoljavajuću koncentraciju trombocita. Broj donacija po mjesecima u

razdoblju od 1. 11. 2019. do 15. 3. 2020. godine je bez značajne razlike u broju onih koji su pristupili, koji su prihvaćeni ili sukladni u odnosu na promatrana razdoblja (Tablica 6).

Tablica 6. Broj prihvaćenih i donacija sukladnih za inaktivaciju po mjesecima

| | 1. 11. – 30. 11. | 1. 12. – 31. 12. | 1. 1. – 31. 1. | 1. 2. – 29. 2. | 1. 3. – 15. 3. | P* |
|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Pristupilo | 106 | 93 | 100 | 102 | 35 | 0,83 |
| Prihvaćeno (%) | 105 (99,1) | 91 (97,8) | 99 (99) | 98 (96,1) | 35 (100) | 0,80 |
| Sukladno (%) | 95 (89,6) | 88 (94,6) | 95 (95) | 92 (90,2) | 34 (97,1) | 0,95 |

* χ^2 test (bez razdoblja od 1.3. do 15.3.)

U navedenom razdoblju, nakon postupka inaktivacije patogena amotosalenom, 71 pripravak trombocita isporučen je pacijentima na odjel (slika 1.). Zabilježena su i 4 slučaja posttransfuzijskih reakcija. U dva slučaja radi se o alergijskim reakcijama, a u preostala dva o febrilnoj nehemolitičkoj transfuzijskoj reakciji.



Slika 1. Prikaz isporučenih pripravaka trombocita po odjelima

Najviše isporučenih pripravaka trombocita isporučeno je u razdoblju od 1. 11. do 30. 11. 2019. godine, ukupno 22 (31 %) svih pripravaka, bez značajne razlike prema spolu u odnosu na razdoblja isporuke (Tablica 7).

Tablica 7. Isporučeni pripravci trombocita u razdoblju od 1. 11. 2019. do 15. 3. 2020.

| | MUŠKARCI | ŽENE | Ukupno | P* |
|------------------|----------|----------|----------|------|
| 1. 11. – 30. 11. | 14 | 8 | 22 | 0,14 |
| Udio (%) | 35 | 26 | 31 | |
| 1. 12. – 31. 12. | 8 | 8 | 16 | |
| Udio (%) | 20 | 26 | 23 | |
| 1. 1. – 31. 1. | 13 | 5 | 18 | |
| Udio (%) | 32 | 16 | 25 | |
| 1. 2. – 29. 2. | 5 | 8 | 13 | |
| Udio (%) | 13 | 26 | 18 | |
| 1. 3. – 15. 3. | 0 | 2 | 2 | |
| Udio (%) | 0 | 6 | 3 | |
| Ukupno | 40 (100) | 31 (100) | 71 (100) | |

*Fisherov egzaktni test

5. RASPRAVA

U našem istraživanju prikazali smo proizvodnju i primjenu novog krvnog pripravka u transfuzijskom liječenju u Republici Hrvatskoj. KZTM je jedina ovlaštena ustanova u prikupljanju i proizvodnji krvnih pripravaka koja proizvodi ovaj krvni pripravak u našoj zemlji. U KZTM-u metoda inaktivacije patogena provodi se od 2019. godine. U Švicarskoj je 2009. godine odobrena, a 2011. godine preporučena implementacija Intercept sustava za inaktivaciju patogena (13). Metodu inaktivacije patogena implementirale su i druge europske zemlje poput Njemačke, Norveške i Austrije (8). Ono što razlikuje krvne pripravke od većine drugih lijekova (krv je lijek) je proizvodnja koja je ograničena brojem davatelja te način proizvodnje. Postoje velike zahtjevnosti u postizanju učinkovitosti krvnog pripravka i sprječavanju posttransfuzijskih reakcija. Razlika je i u tome što su trombocitni pripravci ljudskog podrijetla te kratkog roka uporabe (14). Uvođenje metode inaktivacije patogena dodatan je korak za poboljšanje sigurnosti krvnih pripravaka. Iako prenošenje bolesti krvnim pripravcima ne predstavlja velik rizik zbog već uvedenih postupaka u proizvodnji krvnih pripravaka, metoda inaktivacije patogena koristi se kako zbog već poznatih patogena tako i zbog onih nepoznatih ili manje poznatih. Upravo sada svjedočimo pojavi novog soja koronavirusa (SARS – CoV – 2) koji uzrokuje bolest Covid – 19. Koronavirusi uzrokuju bolesti sa simptomima od prehlade do upale pluća, a do sada ih poznajemo sedam. U skupinu koronavirusa pripadaju SARS koronavirus i MERS koronavirus koji uzrokuju teški akutni respiratorni sindrom (SARS) te bliskoistočni respiratorni sindrom (MERS). Simptomi Covid – 19 bolesti su povišena temperatura, suhi kašalj, glavobolja, kratak dah, osjećaj umora, bol u mišićima i ostalo. Velik broj oboljelih nema simptome što predstavlja problem u detekciji i zaustavljanju širenja virusa, a povećava rizik od prijenosa uzročnika transfuzijom krvi. Do danas nema prijavljenih slučajeva prijenosa SARS – CoV – 2 virusa transfuzijom krvi, ali kako imamo saznanja o asimptomatskim bolesnicima (pripravci krvi se ne testiraju na koronavirus u rutinskoj praksi) potencijalni rizik postoji. Metoda inaktivacije patogena ključna je upravo u takvim slučajevima kada u krvi mogu biti prisutni virusi i ostali patogeni koji se mogu prenijeti na primatelja krvi i potencijalno dovesti do pojave bolesti. Za liječenje oboljelih od Covid – 19 bolesti potencijalni lijek je plazma bolesnika koji su preboljeli Covid – 19 (rekonvalescentna plazma). Osim za liječenje, može se koristiti i kao profilaksa za rizične skupine (zdravstvene radnike, staračke domove, skloništa za beskućnike i ostalo). Metoda inaktivacije patogena u tim procesima je dodatni korak koji pridonosi sigurnosti liječenja i profilakse (15).

U ovom istraživanju prikazani su koraci u proizvodnji pripravaka od samog darivanja krvi do isporuke gotovog pripravka pacijentu. Od 436 dobrovoljnih darivatelja, 404 uzorka bila su podvrgnuta metodi inaktivacije patogena, a 71 pripravak isporučen je na odjele Kliničkog bolničkog centra Osijek. Dobrovoljni davatelji krvi moraju biti zdrave osobe te se njihovi uzorci krvi moraju provjeriti određenim testovima prije samog doniranja. One osobe koje ne zadovoljavaju sve kriterije ne mogu pristupiti darivanju krvi. U navedenom razdoblju, od 436 osoba odbijeno je 8 osoba zbog bolesti probavnog i respiratornog sustava, poremećenog krvnog tlaka i ostalih nepravilnosti. Nema značajne statističke razlike s obzirom na spol DDK-a. Svi koraci prije transfuzije krvi pridonose sigurnosti pacijenta i samog davatelja krvi te se obvezno moraju provoditi. Novih davatelja krvi nema jer se postupku trombafereze podvrgavaju samo oni koji su već ranije pristupili darivanju krvi. Zahtjeve u proizvodnji nisu zadovoljila 24 krvna pripravka za metodu inaktivacije patogena amotosalenom. Odgovarajući ukupni volumen nema 12 pripravaka, 4 pripravka volumen plazme, a 8 nema odgovarajuću koncentraciju trombocita. Pripravci trombocita sa smanjenim brojem leukocita koji su podvrgnuti metodi inaktivacije patogena najčešće se primjenjuju u liječenju krvarenja, kardiokirurških bolesnika, hematoloških bolesti te pri gastrointestinalnim krvarenjima što je dokazano i ovim istraživanjem (14). U našem istraživanju najveći broj krvnih pripravaka isporučen je hematološkim bolesnicima te kardiovaskularnim, onkološkim, bolesnicima na intenzivnoj njezi te na odjele abdominalne kirurgije i gastroenterologije. Najviše u razdoblju od 1. 11. do 30. 11. 2019. godine bez značajne razlike s obzirom na spol. Isto je dokazano i u prospektivnoj kohortnoj studiji o sigurnosti trombocitnih pripravaka podvrgnutih metodi inaktivacije patogena amotosalenom u kojoj je sudjelovao 561 bolesnik. Transfuzije krvi većinom su primali hematološki i onkološki bolesnici (58,1 %) i bolesnici koji su bili na kardiokirurškim operacijama (26,9 %) (16). Svaka transfuzija krvi nosi određeni rizik od posttransfuzijskih reakcija (6). U našem istraživanju potvrđene su 4 posttransfuzijske reakcije. U dva slučaja radilo se o alergijskoj reakciji koja može biti uzrokovana antigenima ili protutijelima u pripravku krvi, transfuzijskom ili infuzijskom priboru te drugim faktorima koji nisu povezani s transfuzijom krvi. U preostala dva slučaja došlo je do posttransfuzijske nehemolitičke reakcije. One su posljedica reakcije između trombocita, leukocita ili proteina i protutijela u serumu davatelja ili bolesnika, reakcije uzrokovane antitrombocitnim protutijelima ili reakcije transplantata protiv stanica primatelja transfuzije (GVHD - *graft versus host disease*) (6). Retrospektivnom analizom u Francuskoj dokazan je manji broj posttransfuzijskih reakcija korištenjem PAS otopine, ali i veći broj slučajeva kod trombocitnih pripravaka dobivenih aferezom za razliku od pripravaka dobivenih iz trombocitno – leukocitnog međusloja.

Najmanja pojavnost dokazana je kod pripravaka trombocita tretiranih amotosalenom. Osim smanjenja rizika od posttransfuzijskih reakcija, postupkom inaktivacije patogena amotosalenom smanjuje se i rizik od infekcije krvnog pripravka (17). U istraživanju provedenom 2018. godine Candotti D i sur. dokazali su 9 slučajeva prijenosa hepatitisa B transfuzijom krvi. Radi se o 3 davatelja čiji su krvni pripravci podvrgnuti testiranju na površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) te NAT testiranju, a rezultat je bio negativan. Autori zaključuju da je potrebna revizija minimalne infektivne doze hepatitisa B te osjetljivosti NAT testiranja kao i uvođenje metode inaktivacije patogena u rutinu. Nitko od 6 primatelja transfuzije krvi čiji su pripravci bili podvrgnuti metodi inaktivacije patogena amotosalenom (Intercept) nije bio zaražen hepatitisom B (18). Postoje indikacije da metoda inaktivacije patogena amotosalenom može produljiti rok uporabe trombocitnih pripravaka sa 5 na 7 dana. Potrebno je dodatno istražiti sigurnost i učinkovitost takvih pripravaka. Produljenje roka uporabe trombocitnih pripravaka može doprinijeti značajnom smanjenju gubitaka pripravaka kojima je istekao rok i smanjenju troškova (19). To je i potvrđeno velikim kohortnim istraživanjem u Švicarskoj. Produljenje roka uporabe pripravaka trombocita sa 5 na 7 dana dovelo je do smanjenja troškova, a nije uzrokovalo povećanje broja neželjenih reakcija niti povećanu uporabu trombocitnih pripravaka (13). Pripravci trombocita imaju veći rizik od bakterijske kontaminacije pa i prijenosa na primatelja transfuzije krvi zbog skladištenja na temperaturi od 22 do 24 °C koja je pogodna za razvoj bakterija. Dokazana je veća učinkovitost metode inaktivacije patogena od samog dokazivanja bakterija osobito u slučaju male količine bakterija. Tada je bakterije teže dokazati i imamo lažno negativne rezultate (20).

Sigurnost transfuzijskog liječenja na visokoj je razini zahvaljujući velikom broju zahtjevnosti koje davatelj mora zadovoljiti te prijetransfuzijskom testiranju. Uvođenjem metode inaktivacije patogena doseže se najviša razina sigurnosti što i jest cilj u svakom medicinskom postupanju. Metoda inaktivacije patogena ima važnu ulogu u slučajevima lažno negativnih rezultata, kada dođe do pojave novih virusa, bakterija i drugih patogena o kojima nemamo saznanja ili ih imamo, ali su oskudni, nedovoljni ili nepotpuni. Kada se definira pojava novih patogena potrebno je dulje vrijeme da se naprave testovi sa zadovoljavajućom osjetljivošću i specifičnošću te da se takvi testovi uvrste u rutinska testiranja pripravaka krvi prije transfuzijskog liječenja. U takvim slučajevima metoda inaktivacije patogena može predstavljati „prvu liniju obrane“ od nepoznatih patogena. Primjeri takvih patogena osim SARS – CoV – 2 virusa su i virus Zapadnog Nila, Chikungunya virus i Zika virus. Nakon uvođenja NAT

testiranja 2013. godine, KZTM u Osijeku 2019. godine uvodi i metodu inaktivacije patogena i time osigurava sigurno i učinkovito liječenje svakom pacijentu.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- KZTM u Osijeku je prvi u Republici Hrvatskoj proizveo pripravak trombocita dobiven trombaferozom sa smanjenim brojem leukocita u hranjivoj otopini i podvrgnut metodi inaktivacije patogena amotosalenom.
- Od svih donacija koje su napravljene u razdoblju od 1. 11. 2019. do 15. 3. 2020. godine, 92,7 % pripravaka trombocita zadovoljava kriterije za podvrgavanje metodi inaktivacije patogena amotosalenom.
- Ne postoji statistički značajna razlika s obzirom na spol DDK-a.
- Najveći broj pripravaka trombocita isporučen je na hematološke, kardiovaskularne, onkološke odjele i na odjele intenzivne njege.
- Isporučen je 71 krvni pripravak na odjel, a zabilježene su 4 posttransfuzijske reakcije.
- Uvođenjem ovog krvnog pripravka podignuta je kvaliteta i sigurnost transfuzijskog liječenja na najvišu razinu.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog rada je ispitati obilježja pripravaka trombocita dobivenih trombaferozom sa smanjenim brojem leukocita u hranjivoj otopini i podvrgnutih metodi inaktivacije patogena.

Nacrt studije: Istraživanje je presječnog tipa s povijesnim podacima.

Materijali i metode: Za potrebe istraživanja koriste se podatci KZTM-a Osijek u razdoblju od 1. 11. 2019. do 15. 3. 2020. godine. Podatci se odnose na broj trombaferaza, količinu pripravaka trombocita koji su podvrgnuti postupku inaktivacije patogena amotosalenom, indikacije za primjenu te nuspojave transfuzijskog liječenja.

Rezultati: Među 436 DDK-a, 8 je odbijenih jer ne ispunjavaju sve zahtjevnosti. Od napravljenih 428 donacija, 404 su sukladne (92,7 %). Zahtjevnosti koje moraju ispuniti krvni pripravci prije podvrgavanja metodi inaktivacije amotosalenom ne ispunjavaju 24 krvna pripravka. Sveukupno je 71 krvni pripravak trombocita sa smanjenim brojem leukocita dobiven trombaferozom i podvrgnut metodi inaktivacije patogena isporučen na bolničke odjele. Najviše krvnih pripravaka isporučeno je na hematološke, kardiovaskularne, onkološke i odjele intenzivne njege.

Zaključak: Transfuzijska medicina s već postojećim postupcima prije samog transfuzijskog liječenja dosegla je zavidnu razinu sigurnosti. Kako se neprestano suočavamo s novim izazovima, virusima, bakterijama i ostalim patogenima bilo je potrebno uvesti dodatni korak za prevenciju neželjenih nuspojava. KZTM Osijek prvi u RH proizvodi krvni pripravak trombocita dobivenih trombaferozom sa smanjenim brojem leukocita u hranjivoj otopini i podvrgnut metodi inaktivacije patogena i tako dosežu najvišu razinu sigurnosti transfuzijskog liječenja.

8. SUMMARY

Objectives: The aim of this paper was to test the characteristics of platelet concentrates produced by plateletpheresis with reduced number of white blood cells in additive solution and subjected to the pathogen inactivation method.

Study design: A cross-sectional study with historical data.

Materials and methods: Data of the Clinical Institute for Transfusion Medicine in Osijek in the period from 1 November 2019 to 15 March 2020. Data relate to the number of plateletpheresis, the amount of the platelet preparations subjected to the pathogen inactivation method with the use of amotosalen, indications for the application and side-effects of the transfusion therapy.

Results: Out of 436 voluntary blood donors, 8 of them were refused as they did not satisfy all requirements. Out of 428 donations made, 404 are compliant (92.7 %). The requests that need to be satisfied by blood preparations before being subjected to the inactivation method with the use of amotosalen were not satisfied by 24 blood preparations. An overall of 71 blood preparations of platelets with reduced number of white blood cells was produced by plateletpheresis and subjected to the pathogen inactivation method, supplied to hospital departments. Most blood preparations were supplied to haematology, cardiovascular and oncology departments, and intensive care units.

Conclusion: Transfusion medicine has already gained an enviable level of security with existing procedures before the transfusion therapy was introduced. As we are constantly facing new challenges, viruses, bacteria, and other pathogens, it was necessary to introduce an additional measure for the prevention of undesirable side-effects. The Clinical Institute for Transfusion Medicine in Osijek is the first one in the Republic of Croatia to produce a blood preparation of platelets produced by plateletpheresis with a reduced number of white blood cells in an additive solutions and subjected to the pathogen inactivation method, thus acquiring the highest level of security of transfusion therapy.

9. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu. Dostupno na adresi: <https://hztm.hr/hr/content/2/darivanje-krvi/14/o-darivanju/> Datum pristupa: 4. 11. 2019.
2. Strauss Patko M, Jukić I, i sur. Sigurni krvni pripravci. 1. izd. Zagreb: Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu; 2013.
3. Balen S. Osnove transfuzijske medicine. 1. izd. Osijek: Medicinski fakultet; 2010.
4. Skodlar J, Majerić – Kogler V, i sur. Klinička transfuzijska praksa, sustav kvalitete. 1. izd. Zagreb: Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske; 2002.
5. Samardžija M. Krvlju prenosive bolesti. 1. izd. Osijek: Medicinski fakultet; 2011.
6. Grgičević D. Transfuzijska medicina. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1995.
7. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. Guide to preparation, use and quality assurance of blood components. 19. izdanje. 2017.
8. Pelletier JPR, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. Best Practise & Research Clinical Haematology. 2006; 205 - 242.
9. Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. Transfusion and apheresis science 39. 2008; 75 - 82.
10. Seltsam A. Pathogen Inactivation of Cellular Blood Products – An Additional Safety Layer in Transfusion Medicine. Front. Med. 2017; 4: 219.
11. Jutzi M, Mansouri Taleghani B, Rueesch M, Amsler L, Buser A. Nationwide Implementation of Pathogen Inactivation for All Platelet Concentrates in Switzerland. Transfus Med Hemother. 2018; 45: 151 - 156.
12. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
13. Infanti L, Holbro A, Passweg J, Bolliger D, Tsakiris DA, Merki R, i sur. Clinical impact of amotosalen – ultraviolet A pathogen – inactivated platelets stored for up to 7 days. Transfusion. 2019; 9999: 1 - 12.
14. Grgičević D i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
15. Keil SD, Ragan I, Yonemura S, Hartson L, Dart NK, Bowen R. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in plasma and platelet products using a riboflavin and ultraviolet light – based photochemical treatment. Vox sanguinis. 2020.

16. Osselaer JC, Messe N, Hervig T, Bueno J, Castro E, Espinosa E, *i sur.* A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion.* 2008; 48: 1061 - 1071.
17. Mertes PM, Tacquard C, Andreu G, Kientz D, Gross S, Malard L, *i sur.* Hypersensitivity transfusion reactions to platelet concentrate: a retrospective analysis of the French hemovigilance network. *Transfusion.* 2019; 9999; 1 - 6.
18. Candotti D, Assennato SM, Laperche S, Allain JP, Levicnik – Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut* 2018; 0: 1 – 9.
19. Gorria C, Labata G, Lezaun M, Lopez FJ, Perez Aliaga AI, Perez Vaquero MA. Impact of implementing pathogen reduction technologies for platelets on reducing outdates. *Vox sanguinis.* 2019; 115 (2): 167 – 173.
20. Corash L. Bacterial contamination of platelet components: potential solutions to prevent transfusion – related sepsis. *Expert Rev. Hematol.* 2011; 4 (5): 505 – 525.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Lucija Meštrović

Datum i mjesto rođenja: 30. srpnja 1997., Split, RH

Adresa stanovanja: Ćirila i Metoda 22, Split

E – mail: lucijamestrovic4@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2003. – 2011. – osnovno obrazovanje

2011. – 2015. – Prva jezična gimnazija, Split

2015. – 2018. – Zdravstveno veleučilište Zagreb, preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2018. – 2020. – Medicinski fakultet Osijek, diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika