

# Kontrola kvalitete pripravaka trombocita dobivenih aferezom nakon postupka inaktivacije patogena

---

Maričić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:233887>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Maja Maričić**

**KONTROLA KVALITETE  
PRIPRAVAKA TROMBOCITA  
DOBIVENIH AFEREZOM NAKON  
POSTUPKA INAKTIVACIJE  
PATOGENA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Maja Maričić**

**KONTROLA KVALITETE  
PRIPRAVAKA TROMBOCITA  
DOBIVENIH AFEREZOM NAKON  
POSTUPKA INAKTIVACIJE  
PATOGENA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Marina Ferenac Kiš, mag. mol. biol.

Rad ima 25 listova, 5 tablica i 6 slika.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Marini Ferenac Kiš, mag. mol. biol. na nesebičnoj pomoći, potpori i suradnji tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, dečku i prijateljima na podršci i strpljenju tijekom cijelog studiranja.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Važnost transfuzijske medicine i liječenja.....	1
1.1.2. Dobrovoljno davalništvo .....	1
1.1.3. Sigurnost transfuzijskog liječenja .....	2
1.2. Krvni pripravci.....	3
1.2.1. Vrste krvnih pripravaka.....	3
1.2.2. Preparati trombocita .....	4
1.3. Osiguranje kvalitete krvnih pripravaka.....	5
1.3.1. Testiranje na krvlju prenosive bolesti .....	5
1.3.2. Kontrola kvalitete krvnih pripravaka .....	6
1.4. Inaktivacija patogena .....	7
2. CILJEVI.....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	9
3.1. Materijali.....	9
3.2. Metode .....	9
3.2.1. Postupak inaktivacije patogena na uređaju Intercept, Cerus.....	9
3.3. Statističke metode .....	10
4. REZULTATI.....	11
5. RASPRAVA .....	17
6. ZAKLJUČCI.....	20
7. SAŽETAK .....	21
8. SUMMARY .....	22
9. LITERATURA .....	23
10. ŽIVOTOPIS.....	25

## POPIS KRATICA

**Anti-HCV** – protutijelo na virus hepatitisa C

**DDK** - dobrovoljni davatelj krvi

**EDTA** – etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. ethylenediaminetetraacetic acid)

**HBsAg** – marker zaraze virusom hepatitisa B

**HBV** – hepatitis B virus

**HCV** – hepatitis C virus

**HIV** – virus humane imunodeficijencije (prema engl. human immunodeficiency virus)

**WNV** – virus zapadnog Nila (prema engl. West Nile Virus)

**NAT** – testiranje nukleinskih kiselina (prema engl. nucleic acid test)

## 1. UVOD

### 1.1. Važnost transfuzijske medicine i liječenja

Transfuzijska medicina važno je područje medicine koje se bavi proizvodnjom pripravaka iz ljudske krvi dobrovoljnih davatelja, dijagnostikom hemostatskih poremećaja, dijagnostikom markera krvlju prenosivih bolesti te liječenjem bolesnika pripravcima proizvedenim od ljudske krvi (1). Obuhvaća čitav niz aktivnosti kao što su: osiguranje dovoljnih zaliha učinkovitih, kvalitetnih i neškodljivih krvnih pripravaka, dobra laboratorijska praksa, sustav kontrole kvalitete, klinička transfuzijska praksa zasnovana na dokazima (2). Transfuzijsko liječenje pripravcima od ljudske krvi ovisi o broju i kvaliteti krvnih pripravaka. Ljudsko podrijetlo, ograničene zalihe, opasnost od infekcije transfuzijskim liječenjem i visoki troškovi proizvodnje krvnih pripravaka razlog su tome što su lijekovi proizvedeni od krvi pravo nacionalno bogatstvo. Transfuzijom se liječe većinom životno ugroženi pacijenti te se zbog toga posebnu pozornost treba obratiti na kvalitetu i sigurnost krvnih pripravaka. Kvaliteta i sigurnost transfuzijskog liječenja u velikoj mjeri ovise o organizaciji nacionalne transfuzijske službe (3).

#### 1.1.2. Dobrovoljno davalatstvo

Transfuzijska medicina zauzima posebno mjesto u području medicinskih znanosti u koju je uključena i skrb društvene zajednice. Darivanje krvi predstavlja vezu između zdrave populacije i bolesnika. Promidžba i okupljanje dobrovoljnih darivatelja socijalni je program i dobar pokazatelj interakcije društva i samog pojedinca. Postupak odabira davatelja obuhvaća čitav niz djelovanja kao što su prijedonacijsko informiranje, prikupljanje određenih podataka upitnicima i razgovorom, liječnički pregled za procjenu općeg zdravstvenog stanja. Savjesna je obveza svakog davatelja darovati krv koja je prihvatljiva za transfuziju i ne zatajivati ili skrivati informacije koje su liječniku važne u procjeni rizika (4). U Republici Hrvatskoj provodi se samo dobrovoljno davalatstvo koje se temelji na principima solidarnosti, humanosti, nesebičnosti i plemenitosti jer se utvrdilo da krv plaćenih davatelja ima 6 do 10 puta veći rizik od prijenosa zaraznih bolesti nego krv dobrovoljnih davatelja (5). Neovisno o razlozima darivanja, potreba za krvlju uvijek je prisutna i svaki dobrovoljni davatelj ima veliku ulogu u pridonosenju spašavanju ljudskih života. Krv može darovati svaka punoljetna osoba dobrog



općeg zdravstvenog stanja koja zadovoljava određene kriterije (starost između 18 i 65 godina, tjelesna težina iznad 55 kg proporcionalna visini, tjelesna temperatura do 37 °C, normalan tlak, puls te razina hemoglobina). Sam postupak uzimanja krvi traje otprilike 8 do 12 minuta, a prikuplja se 450 do 500 ml krvi u sterilne plastične vrećice. Uzorkovanje krvi provodi se u prostorijama koje zadovoljavaju kriterije sustava kvalitete (6).

### 1.1.3. Sigurnost transfuzijskog liječenja

Danas termini rizik i sigurnost zauzimaju vodeće mjesto u području transfuzijske medicine. Kao posljedica boljeg probira davatelja, uvođenje visoko osjetljivih i specifičnih testova u otkrivanju markera krvlju prenosivih bolesti, automatizacije i robotike u proizvodnji, razvoja dobre prakse (kliničke i laboratorijske) te osiguranje sustava kvalitete, krv je danas sigurnija nego ikad prije. Velika intelektualna, financijska i tehnološka sredstva uložena su u poboljšanje čistoće i sigurnosti krvnih pripravaka, a sav trud potaknut je zabrinutošću oko raznih infekcija koje se mogu prenijeti transfuzijom. Bez obzira na sav mogući napredak apsolutna sigurnost u transfuzijskom liječenju ne postoji i uz nju je vezan čitav niz rizika koji su posljedica samih bioloških obilježja krvi, tehnoloških ograničenja, ljudskih pogrešaka, pogrešaka u radu uređaja i sl. (5,7). Proizvodnja i čuvanje također utječu na sigurnost transfuzijskog liječenja, a gotovo nikad nije moguće iskontrolirati stabilnost, djelotvornost, količinu aktivne supstance, sterilnost i neškodljivost svake doze krvi. Dodatnu sigurnost omogućava veće zalaganje educiranog kadra koji je u ranijim vremenima radio vrlo široki raspon poslova, a sada je specifično usmjeren na kliničku transfuzijsku praksu (aktivno sudjelovanje u kliničkim konzultacijama, prijetransfuzijsko ispitivanje, poremećaji koagulacije, nadzor nad transfuzijskim liječenjem itd.) (2). Sigurnost transfuzijskog liječenja ovisi o svim postupcima koji se provode od uzimanja krvi darivatelja pa sve do transfuzije bolesniku. Ti postupci trebaju osigurati liječenje bolesnika sukladno postojećim medicinskim i znanstvenim standardima i znanju. Sigurnost ne ovisi samo o krvnim pripravcima već i o raznim drugim parametrima kao što su: organizacija i rad transfuzijske službe, rad pojedinaca te upravljanje sustavom kvalitete (3).

## 1.2. Krvni pripravci

Krvni pripravci predstavljaju lijekove dobivene iz ljudske krvi ili plazme. Priređuju se fizikalnim postupcima iz krvi jednog davatelja ili najviše 12 pripravaka svježe smrznute plazme za proizvodnju krioprecipitata. Svi krvni pripravci imaju točno propisan način skladištenja i čuvanja te određeni rok valjanosti. U proizvodnji prolaze različite postupke modifikacije osnovnog krvnog pripravka. Ovisno o potrebama bolesnika mogu biti filtrirani, oprani ili ozračeni. Filtracijom se davateljeve krvi smanjuje broj leukocita u krvnom pripravku koji mogu ometati transfuzijsko liječenje i uzrokovati pojavu određenih nuspojava. Malom broju bolesnika potrebni su u liječenju oprani eritrocitni ili trombocitni krvni pripravci i to su većinom bolesnici koji su prilikom transfuzijskog liječenja imali određene alergijske ili anafilaktičke reakcije (3).

### 1.2.1. Vrste krvnih pripravaka

U vrste krvnih pripravaka ubrajaju se:

1. Koncentrat eritrocita (KE)
2. Svježe smrznuta plazma (SSP)
3. Koncentrat trombocita (KT)
4. Koncentrat granulocita
5. Modificirani krvni pripravci
6. Krioprecipitat (5)

Koncentrat eritrocita pripravak je koji se dobiva centrifugiranjem i odvajanjem većeg dijela plazme iz pune krvi ili postupkom eritroafereze. Volumen pripravka ovisi o volumenu davateljeve doze krvi i o načinu proizvodnje. O davateljevu hematokritu ovisi također hematokrit i količina hemoglobina u pripravku (koja mora biti veća od 40 grama po dozi prema smjernicama EDQM). Rok uporabe ovisi o primijenjenoj antikoagulantnoj otopini.

Svježe smrznuta plazma lijek je proizveden iz ljudske krvi, priprema se odvajanjem plazme iz doze pune krvi ili metodom plazmafereze. Kako ne bi došlo do propadanja faktora zgrušavanja koji su vrlo važan sastojak plazme potrebno ju je brzo smrznuti na temperaturu ispod  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  unutar 4 sata. Kvaliteta i karakteristike proizvoda plazme ovise o više čimbenika kao što su: osobine davatelja, način uzimanja krvi, antikoagulantna otopina, laboratorijsko testiranje, proizvodni postupak, filtracija, duljina i temperatura skladištenja, inaktivacija virusa te način

otapanja. Osnovni kriteriji koje SSP mora zadovoljiti su volumen (200 – 300 ml) i FVIII > 0,7 i.j.

Krioprecipitat priprema se laganim otapanjem SSP na 4 °C , sterilnim odvajanjem plazme – supernatanta i zamrzavanjem netopivog taloga.

Granulociti se pripremaju postupkom leukaferenze i preporučuje se primijeniti ih odmah nakon pripreme, ne kasnije od 24 h (3,5).

### 1.2.2. Pripravci trombocita

Trombociti su krvne komponente potrebne za održavanje integriteta krvne žile i uspostavljanje primarne hemostaze. Njihovo djelovanje ovisi o brojnosti u krvi i samoj funkcionalnosti strukture. Trombocitne transfuzije danas su osnova u sprječavanju i liječenju krvarenja kod pacijenata sa smanjenim brojem ili narušenom funkcijom trombocita. Trombocitni pripravci zauzimaju posebno mjesto među pripravcima zbog ljudskog podrijetla, načina proizvodnje zbog kojeg se ne može uvijek postići optimalna učinkovitost i spriječiti nuspojave te su vrlo kratkog roka trajanja. Proizvedeni su izdvajanjem i koncentriranjem trombocita iz krvi DDK te istovremenim smanjivanjem broja ostalih krvnih stanica. U pripravku, osim trombocita, nalaze se još i plazma, mali broj eritrocita, leukociti, citokini i ostali metaboliti, antikoagulirajuće tvari te u nekima još i hranjiva otopina za pohranu trombocita (PAS III, Plasmalyte A, Composol).

U primarne trombocitne pripravke ubrajaju se:

1. Plazma bogata trombocitima
2. Trombocitni pripravak proizveden od 450 ml krvi DDK
3. Trombocitni pripravak dobiven izdvajanjem trombocita iz trombocitno-leukocitnog sloja
4. Trombocitni pripravak dobiven trombocitaferozom

Proizvodnja trombocitnih pripravaka mora započeti unutar 6 sati od uzimanja krvi dobrovoljnog darivatelja. Tri su načina na koji se mogu proizvoditi pripravci, a to su: proizvodnja dvostrukim centrifugiranjem od 450 ml krvi, proizvodnja iz trombocitno-leukocitnog sloja (iz jednog ili više pomiješanih trombocitno-leukocitnih slojeva) te postupkom trombocitaferenze gdje se iz krvi davatelja odmah odvajaju trombociti. Tijekom uzimanja krvi i skladištenja trombocitnog pripravka nastaju određene promjene koje smanjuju hemostatsko djelovanje trombocita i skraćuju njihov životni vijek nakon transfuzije. Trombocitne pripravke potrebno je skladištiti u posebnim uvjetima: plastičnoj vrećici koja je propusna za kisik i

ugljikov dioksid, temperatura treba biti između 20 i 24 °C, pripravak je potrebno stalno lagano miješati kako bi se ubrzala izmjena plinova što se postiže u posebnim inkubatorima tzv. agitatorima. Rok pohrane je 3 – 7 dana (ovisno o vrsti vrećice) (3,8).

### 1.3. Osiguranje kvalitete krvnih pripravaka

Kvaliteta pripravaka krvi važna je za sigurnost i djelotvornost transfuzijskog liječenja te ovisi o brojnim čimbenicima. Osiguranje kvalitete i njezino upravljanje trebalo bi biti integrirano u sve procese od početnog uzimanja krvi dobrovoljnog davatelja pa sve do transfuzije krvi bolesnicima. Svaki dio lanca cijelog procesa mora zadovoljavati određene zahtjeve kako bi se kvaliteta podigla na najvišu moguću razinu. Čimbenici koji djeluju na proces proizvodnje, kvalitetu krvnih pripravaka te rezultate laboratorijskog testiranja puno su više poznati od onih koji utječu na kvalitetu transfuzijskog liječenja. No, koliko god transfuzijska djelatnost napredovala, nulti rizik u transfuzijskom liječenju nije moguće postići zbog biološkog podrijetla krvnih pripravaka. Kontrola kvalitete, osiguranje kvalitete, sustavi kvalitete i upravljanje kvalitetom uvedeni su u područje transfuzijske medicine s ciljem smanjivanja opasnosti od nuspojava liječenja krvnim pripravcima. Transfuzijska ustanova mora uspostaviti i održavati sustav kvalitete, a ključni parametri za njezino postizanje su: rad sukladan specifičnim zakonskim, medicinskim, znanstvenim i stručnim zahtjevima, uveden sustav i upravljanje kvalitetom, stručno osoblje, radni uvjeti sukladni zakonima i sl. (3).

#### 1.3.1. Testiranje na krvlju prenosive bolesti

Krv je unikatno i nenadomjestivo tkivo za koje ne postoji zamjena u transfuzijskom liječenju, a putem krvi moguć je prijenos različitih virusnih, bakterijskih i gljivičnih bolesti. Laboratorijska ispitivanja krvnih pripravaka pridonose, utvrđuju, potvrđuju, modificiraju ili odbacuju početnu radnu dijagnozu i nezaobilazan su dio cijelog procesa. Najvažniji čimbenici dobre laboratorijske prakse su pravilno uzorkovanje, uredno vođenje dokumenata i ispravno tumačenje dobivenih rezultata različitih testova (5). Infekcije uzročnicima krvlju prenosivih bolesti najteže su nuspojave transfuzijskog liječenja, a opasnost od zaraze smanjuje se selekcijom davatelja, laboratorijskim testiranjem te postupkom inaktivacije patogena u krvnim pripravcima. Krv svakog dobrovoljnog darivatelja testira se na nekoliko markera ili uzročnika krvlju prenosivih bolesti koje su relativno česte, imaju vrlo teške posljedice ili imaju smrtnan ishod. Krv nije moguće testirati na sve patogene uzročnike, a svako laboratorijsko ispitivanje

započinje najprije testovima pretraživanja (engl. screening) koji moraju imati visoku zadovoljavajuću osjetljivost te se zatim testovima potvrde koji imaju visoku specifičnost potvrđuje valjanost rezultata testiranja. Pretraživanje prisutnosti virusnih markera najčešće se provodi enzimsko-imunološkim testovima. Obavezna serološka testiranja krvi davatelja u Republici Hrvatskoj obuhvaćaju testiranje na hepatitis B antigen (HBsAg), antigene i protutijela virusa hepatitisa C (anti-HCV), HIV protutijela i antigene te dokaz specifičnih protutijela na *Treponemu pallidum* koja je uzročnik sifilisa, a što se tiče molekularnih metoda u uporabi je NAT testiranje koje provodi Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu u kojem se obavlja NAT probir pojedinačnih doza krvi DDK na prisutnost virusa HBV, HCV, HIV te u sezoni komaraca (ljetno doba) na prisutnost virusa Zapadnog Nila (WNV). U nastojanju da se poveća sigurnost transfuzijskog liječenja teži se stalnom poboljšanju i usavršavanju postojećih testova (povećava se njihova osjetljivost i specifičnost). Kako bi se dodatno povećala zaštita od transfuzijski uzrokovane zaraze provodi se inaktivacija patogena u određenim pripravcima.

### 1.3.2. Kontrola kvalitete krvnih pripravaka

Kvaliteta u transfuzijskoj medicini određena je dostatnim brojem neškodljivih i učinkovitih krvnih pripravaka za klinički opravdano transfuzijsko liječenje. Sam pojam kvalitete može se definirati kao nekakav stupanj u kojem skup određenih karakteristika ispunjava različite zahtjeve i standarde. Osiguranje kvalitete krvnih pripravaka regulirano je Zakonom o krvi i krvnim pripravcima, Pravilnikom o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama, Pravilnikom o posebnim tehničkim zahtjevima za krv i krvne pripravke te Smjernicama Europske uprave za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb Vijeća Europe (EDQM). Kontrola kvalitete obuhvaća sve aktivnosti i mjerenja potrebna za ocjenjivanje zadovoljava li neki proizvod ili usluga potrebne uvjete. Osiguranje kvalitete podrazumijeva planiranje aktivnosti koje su potrebne kako bi se postigao kvalitetan krajnji proizvod. Cijeli sustav koji se bavi kvalitetom integriran je i djeluje na svaki dio procesa koji može biti kritičan za kvalitetu (5). Sustav kvalitete mora osigurati da su svi kritični procesi navedeni u odgovarajućim uputama i da se provode u skladu sa standardima i specifikacijama. Ovakva strategija zahtijeva razvoj jasnih politika, ciljeva i odgovornosti. Jedan od najvažnijih dijelova cijelog sustava kvalitete je dobra laboratorijska praksa koja osigurava kontroliranu proizvodnju krvnih pripravaka u skladu s postavljenim standardima. Sva oprema koja se koristi mora biti kvalificirana, kalibrirana i redovito održavana kako bi zadovoljila zahtjeve kvalitete (9). U skladu sa standardima kvalitete i specifikacijama krvnih pripravaka na oko 1 % svih

proizvedenih krvnih pripravaka provodi se kontrola kvalitete i utvrđuju se kritični parametri i njihove granice i obrađuju uz pomoć statističkih metoda. U statističkoj kontroli kvalitete većinu parametara i zahtjeve određene standardima mora zadovoljiti minimalno 75 % kontroliranih pripravaka. Kada rezultati odstupaju od propisanog potrebno je ustanoviti razloge zbog koji je došlo do odudaranja te provesti potrebne korektivne mjere.

Kontrola kvalitete trombocita uključuje procese uzorkovanja, kontrolu volumena, određivanje hematoloških vrijednosti, broja ostatnih leukocita, sterilnosti i pH. Određivanje broja trombocita i leukocita izvodi se na automatskim brojačima. Za uzorkovanje trombocitnih pripravaka koji se podvrgavaju kontroli koristi se EDTA epruveta i stavlja u automatski hematološki brojač koji određuje broj trombocita u pripravku. Ostalni leukociti određuju se na principu fluorescentnog bojenja na uređaju Adam rWBC Cell Counting System. Krajnji rezultati unose se u informatički program koji izračunava konačan broj ostatnih leukocita u pripravku. pH vrijednost mjeri se u koncentratima trombocita dan nakon što je prošao rok uporabe. Rezultat se očitava na uređaju za utvrđivanje acidobaznog statusa. Sterilnost se provjerava uzimanjem uzorka u bočicu za aerobnu i anaerobnu kultivaciju i odnosi se u mikrobiološki laboratorij na analizu (10).

#### 1.4. Inaktivacija patogena

Inaktivacija patogena laboratorijski je proces kojim se uklanjaju ili inaktiviraju bakterije, gljivice ili virusi koji se mogu naći u krvnim pripravcima. Metode koje se koriste prilikom ovog postupka moraju reducirati patogene na najmanju moguću razinu bez narušavanja ili oštećivanja funkcije ili dugovječnosti krvnog pripravka, a reagensi koji se koriste moraju biti sigurni za pacijente što znači da ne smiju biti toksični ili imati imunogeni učinak. Svi rizici inaktiviranih pripravaka moraju biti manji od rizika dobivanja određenih bolesti iz pripravaka koji nisu podvrgnuti inaktivaciji. Inaktivacija patogena u pripravcima trombocita povećava sigurnost cjelokupnog liječenja jer se puno više patogena može pronaći kod asimptomatskih DDK nego se danas testira. Proces inaktivacije mora imati visoku razinu učinkovitosti na patogene uz očuvanje strukture, kvalitete i funkcije trombocita. Unatoč tome što inaktivacija patogena pridonosi sigurnosti u liječenju, sam postupak može utjecati na kvalitetu krvnog pripravka i vrlo je važno provesti kontrolu kako bi utvrdili da je takav pripravak i dalje prikladan i siguran za pacijenta te da i dalje zadovoljava određene kriterije kvalitete (11).

## 2. CILJEVI

Ciljevi istraživanja:

1. Ispitati utjecaj postupka inaktivacije patogena amotosalenom na kvalitetu pripravaka trombocita dobivenih postupkom afereze.
2. Usporediti kvalitetu pripravka trombocita prije i nakon postupka inaktivacije patogena.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Istraživanje obuhvaća laboratorijske rezultate kontrole kvalitete 200 pripravaka trombocita prije i nakon inaktivacije kroz 2021. godinu dobivenih u KBC-u Osijek u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu.

Koncentrat trombocita, afereza, sa smanjenim brojem leukocita u PAS otopini mora zadovoljiti slijedeće vrijednosti obilježja kontrole kvalitete:

- volumen više od 40 ml /  $60 \times 10^9$  trombocita
- sadržaj trombocita najmanje  $2 \times 10^{11}$  po dozi
- sadržaj leukocita manje od  $1 \times 10^6$  po dozi
- pH više od 6,4

#### 3.2. Metode

U ovom istraživanju statistički će se usporediti rezultati kontrole kvalitete prije i nakon postupka inaktivacije patogena u pripravcima trombocita dobivenih aferezom. Pripravcima su određivane hematološke vrijednosti na automatskom hematološkom analizatoru Mindray BC-3600, a ostatni leukociti na automatskom uređaju Adam rWBC. Inaktivacija patogena odrađena je na uređaju Intercept, Cerus metodom s amotosalenom.

##### 3.2.1. Postupak inaktivacije patogena na uređaju Intercept, Cerus

Intercept PRT sustav za inaktivaciju patogena u trombocitima sadrži integrirani sustav vrećica koje u sebi imaju sterilnu nepirogenu tekućinu. Trombociti su suspendirani u 35 % plazme i 65 % PAS (Intersol) i prolazili su kroz spremnik s amotosalenom u iluminacijsku vrećicu. U Intercept iluminatoru odvijao se postupak fotoaktivacije. Procesor uređaja šalje UVA zračenje jačine od  $3 \text{ J/cm}^2$ . Ostatni amotosalen reducirao se na minimalnu razinu inkubacijom u



Compound Adsorption Device-u (CAD) prije prebacivanja tretiranog pripravka trombocita u vrećicu za pohranu i distribuciju.

#### 3.3. Statističke metode

Statistička obrada odrađena je u programu RStudio (inačica 4.2.1. RStudio). Rezultati analize prikazani su tabelarno i grafički. Za provjeru distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilk test (testiranje normalnosti uzoraka), a za usporedbu numeričkih podataka korišteni su t-test za ponavljana mjerenja kod normalno distribuiranih podataka i Wilcoxonov test kod podataka koji ne slijede normalnu distribuciju. Svi testovi odrađeni su na razini značajnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4. REZULTATI

U ovom radu obrađeni su podaci kontrole kvalitete za 200 pripravaka trombocita iz 2021. godine prije postupka inaktivacije i nakon odrađenog postupka inaktivacije patogena u pripravcima.

Kontrola kvalitete trombocita dobivenih aferezom podrazumijeva određivanje težine i volumena pripravka, broja trombocita u uzorku, broja ekvivalentnih doza te broja ostalih leukocita po dozi kao i sterilnost i pH.

Sterilnost i pH određivani su sukladno važećim zakonima i propisima za 15% pripravaka. Svih 30 kontroliranih pripravaka, na isteku roka uporabe, bili su sterilni te su zadovoljili kriterije za pH vrijednost.

Praćene su promjene u vrijednostima obilježja kontrole kvalitete prije i nakon postupka inaktivacije za: težinu (g), trombocite  $\times 10^9/L$ , volumen (ml), ml na  $60 \times 10^9$  trombocita, broj ekvivalentnih doza, broj trombocita  $\times 10^{11}$  / pripravku, broj leukocita / dozi  $\times 10^6$ , sterilnost i pH.

Rezultati kontrole kvalitete prikazani su aritmetičkom sredinom te pripadajućim standardnim devijacijama za pripravke koji nisu prošli postupak inaktivacije patogena kod obilježja koja slijede normalnu distribuciju podataka, a medijanom i interkvartilnim rasponom kod obilježja koja ne slijede normalnu distribuciju podataka. Prikazane su i pripadajuće p vrijednosti. Sva obilježja zadovoljavaju propisane zahtjeve kontrole kvalitete (Tablice 1 i 2).

**Tablica 1.** Vrijednosti obilježja kontrole kvalitete u pripravcima trombocita koji nisu podvrgnuti inaktivaciji patogena

	težina (g)	volumen (ml)	ml na $60 \times 10^9$ trombocita	broj leukocita/ dozi $\times 10^6$
Medijan	358	318,23	49,02	0,109
Interkvartilni raspon	9	8,87	6,78	0,114
p-vrijednost*	< 0,001	< 0,001	0,012	< 0,001

\*Shapiro-Wilk test

**Tablica 2.** Vrijednosti obilježja kontrole kvalitete u pripravcima trombocita koji nisu podvrgnuti inaktivaciji patogena

	trombociti x 10 <sup>9</sup> /L	broj ekvivalentnih doza	broj trombocita x 10 <sup>11</sup> / pripravku
Aritmetička sredina	1227,228	6,489	3,893
Standardna devijacija	108,101	0,603	0,362
p-vrijednost*	0,146	0,174	0,174

\*Shapiro-Wilk test

Rezultati pripravaka koji su prošli postupak inaktivacije prikazani su također srednjim vrijednostima i pripadajućim standardnim devijacijama kod obilježja koja slijede normalnu distribuciju podataka, a medijanom i interkvartilnim rasponom kod obilježja koja ne slijede normalnu distribuciju. Prikazane su pripadajuće p vrijednosti. Sva obilježja zadovoljavaju propisane zahtjeve kontrole kvalitete (Tablice 3 i 4).

**Tablica 3.** Vrijednosti obilježja kontrole kvalitete u istim pripravcima trombocita koji su podvrgnuti inaktivaciji patogena

	težina (g)	volumen (mL)	mL na 60x10 <sup>9</sup> trombocita	broj leukocita/ dozi *10 <sup>6</sup>
Medijan	340	289,66	49,16	0,046
Interkvartilni raspon	12	11,82	6,56	0,127
p-vrijednost*	0,003	0,003	0,001	< 0,001

\*Shapiro-Wilk test

**Tablica 4.** Vrijednosti obilježja kontrole kvalitete u istim pripravcima trombocita koji su podvrgnuti inaktivaciji patogena

	trombociti x 10 <sup>9</sup> /L	broj ekvivalent-nih doza	broj trombocita x 10 <sup>11</sup> / pripravku
Aritmetička sredina	1216,310	5,856	3,514
Standardna devijacija	109,131	0,571	0,343
p-vrijednost*	0,294	0,514	0,514

\*Shapiro-Wilk test

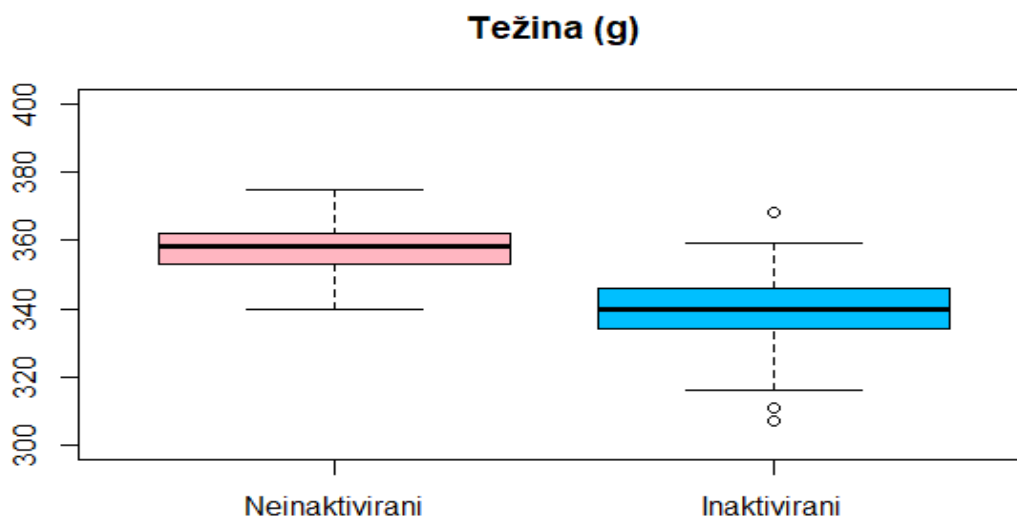
Vrijednosti parametara kontrole kvalitete pripravaka prije i nakon inaktivacije uspoređivani su t-testom za ponavljana mjerenja kod podataka s normalnom distribucijom (trombociti x 10<sup>9</sup>/L, broj ekvivalentnih doza i broj trombocita po pripravku), a kod obilježja koja ne slijede normalnu distribuciju (težina, volumen, ml na 60 x 10<sup>9</sup> trombocita i broj leukocita po dozi) korišten je Wilcoxonov test. Statistički značajnu razliku možemo vidjeti kod težine pripravaka, volumena, broju ekvivalentnih doza, broju trombocita po pripravku te broju ostalih leukocita po dozi. Došlo je do smanjenja u težini, volumenu, broju ekvivalent doza, broju trombocita i broju leukocita po dozi što je rezultat samog postupka inaktivacije tijekom kojeg se određeni dio volumena izgubi i samim time dolazi do smanjenja ostalih parametara (Tablica 5).

**Tablica 5.** Usporedba rezultata kontrole kvalitete kod pripravaka trombocita prije i nakon inaktivacije

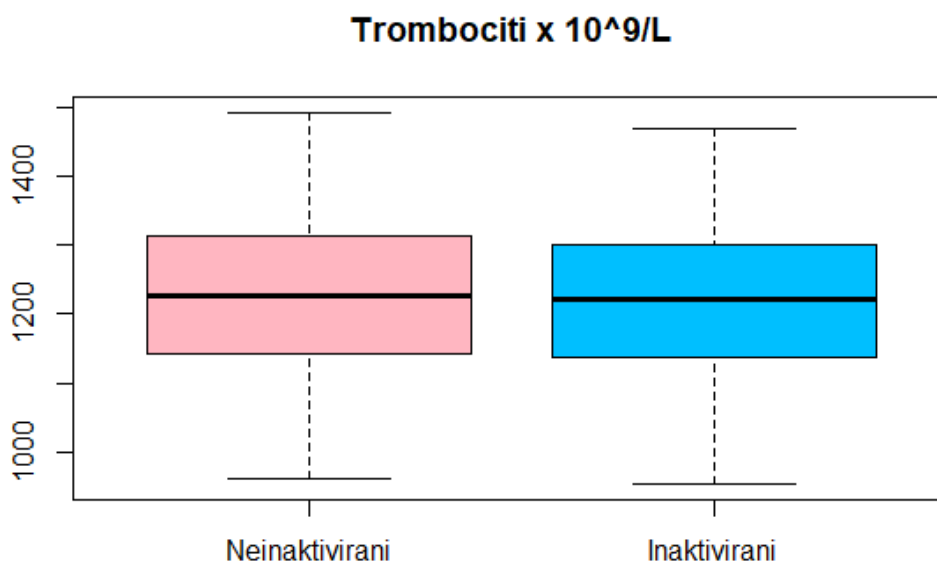
	težina (g)*	trombociti x 10 <sup>9</sup> /L†	Volumen (ml)*	ml na 60 x 10 <sup>9</sup> trombocita *	broj ekvivalent nih doza†	broj trombocit a x 10 <sup>11</sup> / pripravku †	broj leukocita/ dozi x 10 <sup>6</sup> *
p	< 0,001	0,307	< 0,001	0,376	< 0,001	< 0,001	< 0,001

\*Wilcoxonov test , † t-test za ponavljana mjerenja

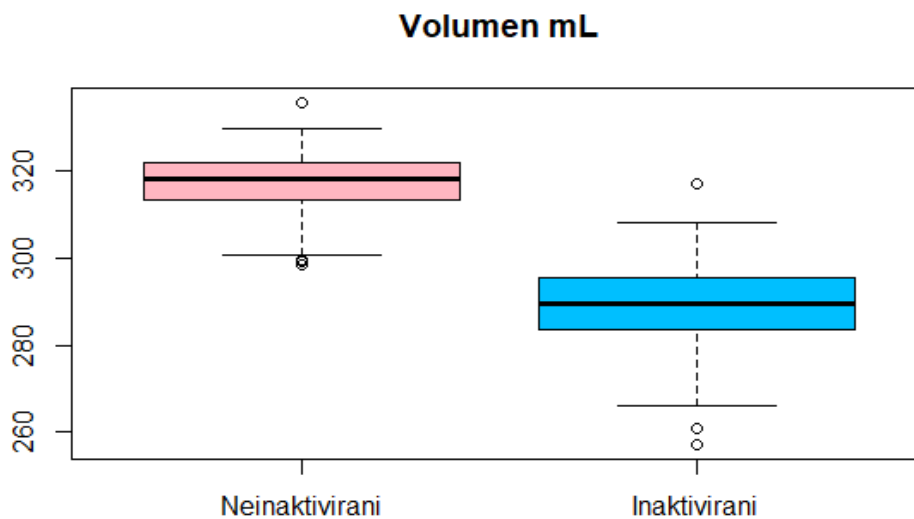
U ovom istraživanju primijećen je pad u vrijednostima parametara kontrole kvalitete pripravaka trombocita nakon inaktivacije. Pad od 10 % vidi se u težini (Slika 1), 0,88 % u broju trombocita po litri (Slika 2), 8,93 % u volumenu pripravka (Slika 3), 9,75 % u broju ekvivalentnih doza (Slika 4), 9,75 % u broju trombocita po pripravku (Slika 5) te 44,9 % u broju ostalih leukocita po dozi (Slika 6). Na svakom grafičkom prikazu središnja crta označava medijan, kutija interkvartilni raspon, a brkovi označavaju minimalne i maksimalne vrijednosti.



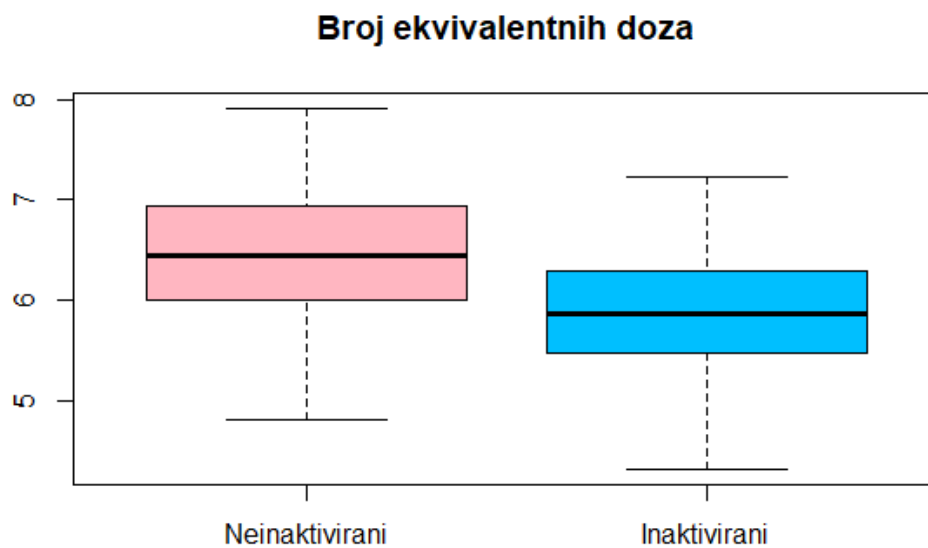
**Slika 1.** Razdioba u težini pripravaka trombocita prije i nakon postupka inaktivacije



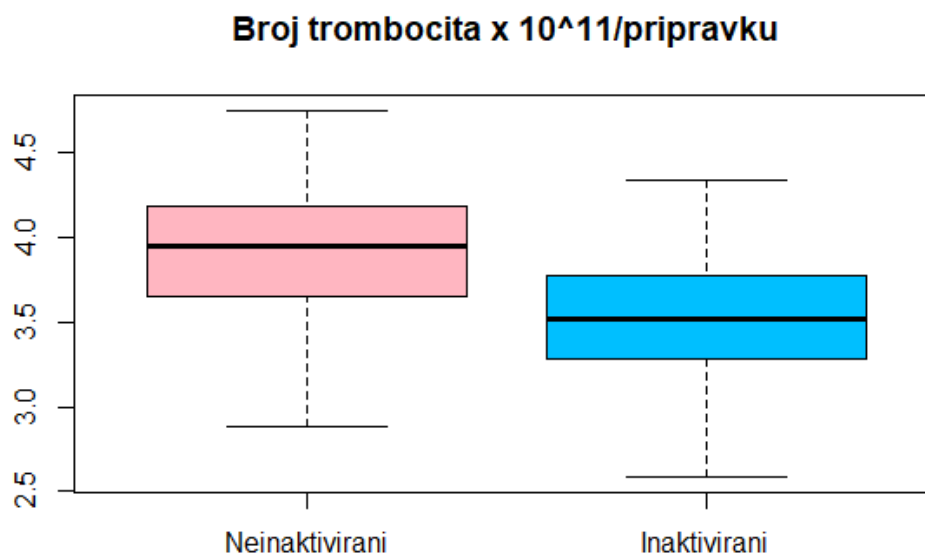
**Slika 2.** Razdioba u broju trombocita po litri u pripravku trombocita prije i nakon postupka inaktivacije



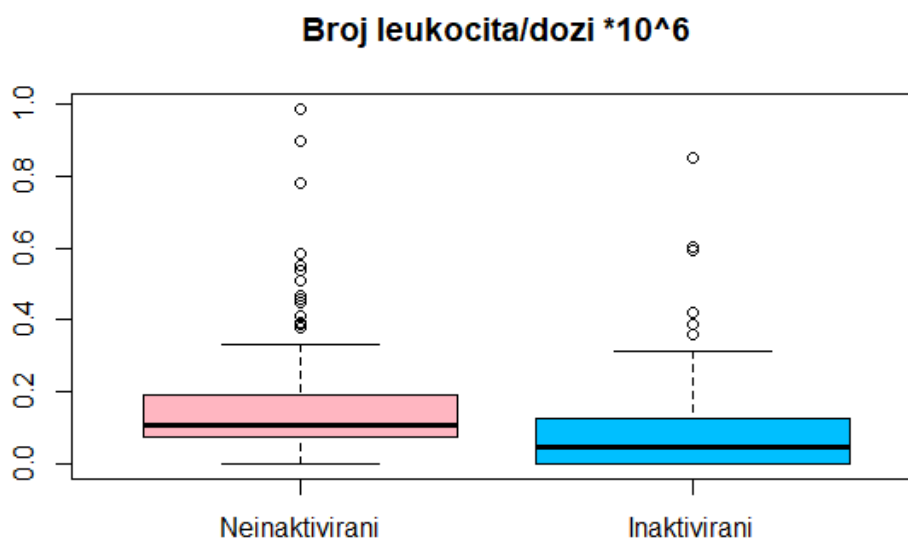
**Slika 3.** Razdioba u volumenu kod pripravaka trombocita prije i nakon postupka inaktivacije



**Slika 4.** Razdioba u broju ekvivalentnih doza pripravaka trombocita prije i nakon postupka inaktivacije



**Slika 5.** Razdioba u broju trombocita po pripravku trombocita prije i nakon postupka inaktivacije



**Slika 6.** Razdioba u broju leukocita po dozi kod pripravka trombocita prije i nakon postupka inaktivacije

## 5. RASPRAVA

Kontrola kvalitete pripravaka trombocita od izuzetne je važnosti za djelotvornost i sigurnost transfuzijskog liječenja, ali opasnost od prijenosa raznih krvlju prenosivih bolesti zasjenjuje njegove terapijske prednosti. Novonastali patogeni ili mutacije koji se trenutnom laboratorijskom praksom ne mogu otkriti mogli bi ugroziti kvalitetno transfuzijsko liječenje. Inaktivacija patogena u pripravcima trombocita predstavlja potencijalno rješenje za te probleme (12). U našem istraživanju pratilo se zadovoljavaju li pripravci trombocita koji su podvrgnuti inaktivaciji i dalje kriterije kontrole kvalitete i jesu li i dalje sigurni za primjenu u transfuzijskom liječenju. Nakon postupka inaktivacije patogena došlo je do smanjenja težine i volumena pripravaka što možemo objasniti samim postupkom inaktivacije. Naime, samim prolaskom pripravaka kroz spremnike sustava za inaktivaciju određeni dio volumena ostaje u prethodnim spremnicima. Unatoč tome, volumen pripravka i nakon inaktivacije zadovoljio je kriterije kontrole kvalitete. Slični rezultati pokazani su i u studiji iz 2021. godine koju su radili Escolar i sur. gdje je također došlo do smanjenja volumena pripravka.

Inaktivacija patogena doprinosi sigurnosti transfuzije trombocita. Rezultati ovog istraživanja pokazuju i pad u broju ostatnih leukocita kod pripravaka koji su prošli inaktivaciju, što su pokazali Fast i sur. u svom istraživanju gdje također dolazi do smanjenja broja leukocita prilikom inaktivacije (13). Smanjenje broja leukocita dodatno povećava sigurnost transfuzijskog liječenja zbog smanjene mogućnosti pojave imunoreakcija kod pacijenata. Svi pripravci trombocita testirani na sterilnost pokazuju 100 %-tno zadovoljenje ovog parametra. Jutzi i sur. izvijestili su da, od 2011. godine, kada je uveden postupak inaktivacije za testiranje svih trombocitnih pripravaka proizvedenih u Švicarskoj, nije prijavljen niti jedan slučaj bakterijske infekcije uzrokovane transfuzijom trombocita u usporedbi sa 16 slučajeva (uključujući 3 fatalna) u sedmogodišnjem razdoblju prije uvođenja inaktivacije (14). U istraživanju Kackera i sur. najveći učinak na smanjenje rizika bakterijske kontaminacije imao je upravo postupak inaktivacije patogena, ali ujedno i najveće troškove gledano iz perspektive bolničke transfuzijske službe što može predstavljati jednu negativnu stranu samog postupka inaktivacije (15). U našem istraživanju broj ekvivalentnih doza po pripravku se smanjio nakon postupka inaktivacije. Obzirom da se cijena trombocitnog pripravka određuje prema broju doza u pripravku ovakav pripravak se manje naplaćuje zbog smanjenog broja doza, a ujedno zbog dodatno korištenog seta za inaktivaciju u konačnici ima veću cijenu. Međutim, prema analizi McCullough i sur. troškovne implikacije povezane s implementacijom postupka inaktivacije



pokazale su da postoji zapravo potencijalno smanjenje troškova, osobito nakon produljenja roka trajanja trombocitnih pripravaka na 7 dana (16). Na smanjenje troškova postupka utječu također i izostanak bakterijske analize, niža stopa zastarjelosti uzoraka i niža stopa odbačenih uzoraka što znači veću učinkovitost i bolju kontrolu cjelokupnog procesa proizvodnje i testiranja (17).

Inaktivacija patogena u našem istraživanju rađena je na uređaju Intercept metodom s amotosalenom. Prije inaktivacije prosječna vrijednost broja trombocita iznosila je  $1227 \times 10^9$  /L, a nakon postupka inaktivacije  $1216 \times 10^9$ /L. Prisutno je minimalno smanjenje broja trombocita. Slične rezultate dobili su Escolar i sur. uspoređujući različite metode inaktivacije patogena. U svom radu su pokazali kako je prilikom inaktivacije patogena na Intercept uređaju došlo do smanjenja broja trombocita u pripravcima što je zapravo zanemarivo u usporedbi s drugim prednostima transfuzijskog liječenja inaktiviranim trombocitima (18). U istraživanju iz 2017. godine koje su proveli Magron i suradnici također je mjeren broj trombocita u pripravcima nakon inaktivacije patogena na Intercept uređaju i došlo je ponovno do smanjenja volumena pripravka i broja trombocita, a doza trombocita ostala je dovoljna za učinak u kvalitetnom transfuzijskom liječenju (19). Možemo vidjeti u navedenim istraživanjima da se kroz postupak inaktivacije izgubi određeni broj trombocita, ali je još uvijek unutar kriterija kontrole kvalitete da bi bio siguran i učinkovit za transfuzijsko liječenje. Inaktivirani pripravci daju dodatnu razinu sigurnosti koja nije osigurana probirom davatelja i testiranjem dobrovoljnih davatelja zakonom propisanim testovima za poznate patogene. Ove tehnologije povećavaju sigurnost pacijenata unatoč nekim strukturnim i funkcionalnim gubitcima u trombocitima koji su se pokazali u kliničkim istraživanjima. Sadašnji pristup probiru davatelja i testiranje na poznate krvlju prenosive uzročnike drastično je poboljšalo sigurnost transfundiranih krvnih pripravaka. S povećanjem globalizacije, raznih klimatskih promjena te nepredvidivosti novih vrsta patogena aktivna provedba postupaka inaktivacije patogena bit će vrijedna za sve uzročnike krvlju prenosivih zaraznih bolesti te svakako povećati sigurnost od budućih prijetnji koje bi se mogle prenijeti krvlju (Escolar i sur). Sigurnost transfuzijskog liječenja na visokom je nivou zbog zahtjevnih kriterija koje davatelj mora zadovoljiti prilikom prijetransfuzijskog testiranja. Implementacijom metode inaktivacije patogena doseže se najviša razina sigurnosti što i je zapravo cilj svake transfuzijske službe. Prilikom pojave novih vrsta patogena potrebno je određeno vrijeme kako bi se razvili testovi kojima se može utvrditi njihova prisutnost u krvi i upravo u takvim slučajevima metoda inaktivacije patogena može biti vrlo korisna kao prva linija obrane od nepoznatih patogena. Rezultati našeg istraživanja uvelike se podudaraju s

rezultatima drugih istraživača koji se s bavili problematikom i kontrolom kvalitete regularnih trombocitnih pripravaka te pripravaka koji su podvrgnuti metodi inaktivacije patogena.

## 6. ZAKLJUČCI

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

- postupkom inaktivacije patogena na uređaju Intercept dolazi do smanjenja broja trombocita, volumena i težine pripravaka, broja ekvivalentnih doza te broja ostatnih leukocita po dozi
- postupkom inaktivacije patogena pripravci trombocita zadovoljavaju propisane kriterije kontrole kvalitete te su zbog smanjenog broja patogena i broja leukocita po pripravku sigurniji za primjenu kod pacijenta od neinaktiviranih pripravaka

## 7. SAŽETAK

**Cilj:** Cilj ovog rada je ispitati utjecaj postupka inaktivacije patogena amotosalenom na kvalitetu pripravaka trombocita dobivenih aferezom i usporediti rezultate kontrole kvalitete prije i nakon postupka inaktivacije.

**Materijali i metode:** Rad obuhvaća laboratorijske rezultate kontrole kvalitete neinaktiviranih i inaktiviranih pripravaka trombocita kroz cijelu 2021. godinu dobivenih u KBC-u Osijek. Rezultati su statistički uspoređeni prije i nakon metode inaktivacije. Hematološke vrijednosti kontrole kvalitete određene su na automatskom hematološkom analizatoru Mindray BC-3600, a broj ostalih leukocita na automatskom uređaju Adam rWBC. Inaktivacija patogena odrađena je na uređaju Intercept, Cerus metodom fotoaktivacije amotosalenom. Rezultati analize prikazani su grafički i tabelarno, s prikazom srednjih vrijednosti za svaki parametar kontrole kvalitete. Za usporedbu numeričkih podataka korišteni su t-test za ponavljana mjerenja i Wilcoxonov test. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ , a analiza je odrađena u programu RStudio (inačica 4.2.1. RStudio).

**Rezultati:** Iz dobivenih rezultata vidimo statistički značajnu razliku u obilježjima: težina i volumen pripravka, broju trombocita, broju ekvivalentnih doza te broju ostalih leukocita po dozi. Zbog samog postupka inaktivacije došlo je do smanjenja volumena pripravka i posljedično do smanjenja u broju trombocita što nam je bilo najvažnije obilježje kontrole kvalitete.

**Zaključak:** U radu je zaključeno da postupkom inaktivacije patogena na uređaju Intercept dolazi do smanjenja broja trombocita, težine i volumena pripravaka, broja ekvivalentnih doza te broja ostalih leukocita zbog samog procesa inaktivacije, ali trombocitni pripravci koji su podvrgnuti inaktivaciji i dalje zadovoljavaju propisane kriterije kontrole kvalitete i sigurni su za primjenu u transfuzijskom liječenju.

**Ključne riječi:** pripravak trombocita, inaktivacija patogena, kontrola kvalitete

## 8. SUMMARY

**Title:** Quality control of platelet concentrates collected by apheresis and subjected to the pathogen inactivation method

**Objective:** The aim of this study is to assay the pathogen inactivation process with amotosalen on the quality of platelet concentrates obtained by apheresis and compare quality control results before and after the inactivation process.

**Materials and methods:** The study includes laboratory quality control results of non-inactivated and inactivated platelet concentrates throughout the year 2021. obtained at KBC Osijek. The results were statistically compared before and after the inactivation method. Hematological quality control values were determined on a Mindray BC-3600 automatic analyzer, and the number of remaining leukocytes was determined on the Adam rWBC automatic device. Pathogen inactivation method was performed on the Intercept, Cerus device using the photoactivation method with amotosalen. The results of the analysis are shown graphically and table-like, showing the mean values for each quality control parameter. To compare numerical data, t-test for repeated measures and Wilcoxon's test were used. The level of statistical significance was set at  $\alpha=0.05$ , and the analysis was performed in the statistical tool RStudio (Inca 4.2.1. RStudio).

**Results:** From the obtained results, a statistically significant difference was found for weight and volume of the concentrates, number of platelets, number of equivalent doses and number of remaining leukocytes per dose. Due to the inactivation process, there was a decrease in the volume of the concentrates and consequently a decrease in the number of platelets, which was the most important quality control parameter for this study.

**Conclusion:** The study concluded that the process of pathogen inactivation on the Intercept device leads to a reduction in the number of platelets, the weight and volume of concentrates, the number of equivalent doses and the number of remaining leukocytes due to the inactivation process, but platelet concentrates that are subjected to inactivation process still meet the prescribed quality control criteria and are safe for use in transfusion treatment.

**Key words:** platelet concentrate, pathogen inactivation, quality control

## 9. LITERATURA

1. Benazić S, Slivar A. Transfuziologija. Glasnik pulske bolnice. 2007; 4:111-115.
2. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti. Zavod za biomedicinske znanosti u Rijeci. Značaj transfuzijske medicine u kliničkoj praksi. Dostupno na adresi: [https://www.info.hazu.hr/upload/File/aba/14.-znanstvena-tribina\\_HAZU\\_Rijeka.pdf](https://www.info.hazu.hr/upload/File/aba/14.-znanstvena-tribina_HAZU_Rijeka.pdf). Datum pristupa: 12.7.2022.
3. Grgičević D i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
4. "Simpozij 1 – Dobrovoljno davalaštvo i uzimanje krvi." Liječnički vjesnik. 2021;143(2):15-91.
5. Balen S. Osnove transfuzijske medicine. 2. izd. Osijek: Medicinski fakultet; 2014.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Dostupno na adresi: [https://hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/06/DAROVANJE\\_KRVI\\_clanak.pdf](https://hzjz.hr/wp-content/uploads/2014/06/DAROVANJE_KRVI_clanak.pdf). Datum pristupa: 9.6.2022.
7. Dzik WH. Emily Cooley Lecture 2002: transfusion safety in the hospital. Transfusion. 2003;43(9):1190-9.
8. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol. 2009;27(3):158-67.
9. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 19.izd. Strasbourg: European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion, Council of Europe; 2017.
10. Vuk T i suradnici. Upravljanje kvalitetom u transfuzijskoj medicini. Zagreb: Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu; 2002.
11. Pelletier JP, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42.
12. Gathof BS, Tauszig ME, Picker SM. Pathogen inactivation/reduction of platelet concentrates: turning theory into practice. ISBT Sci Ser. 2010;5:114-119.
13. Fast LD, DiLeone G, Marschner S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. Transfusion. 2011;51(7):1397-404.

14. 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.
15. Kacker S, Bloch M, Ness PM, Gehrie EA, Marshall CE, Lokhandwala PM i sur. Financial impact of alternative approaches to reduce bacterial contamination of platelet transfusions. *Transfusion*. 2019;59:1291–1299.
16. McCullough J, Goldfinger D, Gorlin J, Riley WJ, Sandhu H, Stowell C i sur. Cost implications of implementation of pathogen-inactivated platelets. *Transfusion*. 2015;55:2312–2320.
17. Roskopf K, Helmberg W, Schlenke P. Pathogen reduction of double-dose platelet concentrates from pools of eight buffy coats: Product quality, safety, and economic aspects. *Transfusion*. 2020;60(9): 2058 - 2066.
18. Escolar G, Diaz-Ricart M, McCullough J. Impact of different pathogen reduction technologies on the biochemistry, function, and clinical effectiveness of platelet concentrates: An updated view during a pandemic. *Transfusion*. 2022;62(1):227-246.
19. Magron A, Laugier J, Provost P, Boilard E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets*. 2018;29(1):2-8.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Maja Maričić

**Datum i mjesto rođenja:** 1.10.1998., Đakovo, Hrvatska

**Adresa stanovanja:** Biskupa Antuna Mandića 78, Đakovo

**E-mail:** maricicmaja921@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2005. – 2013. -osnovno obrazovanje

2013. – 2017. -gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo

2017. – 2020. -Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na medicinskom fakultetu Osijek