Usporedba nalaza kontrole kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih iz sloja leukocita i trombocita i postupkom trombafereze

Matenda, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:892196

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Josipa Matenda

USPOREDBA NALAZA KONTROLE KVALITETE KONCENTRATA TROMBOCITA PROIZVEDENIH IZ SLOJA LEUKOCITA I TROMBOCITA I POSTUPKOM TROMBAFEREZE

COMPARISON OF QUALITY CONTROL OF PLATELET CONCENTRATES PRODUCED BY BUFFY COAT AND PLATELETPHERESIS METHOD

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Dr.sc. Dejana Bogdanić

Split, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD……5

1.1. Trombociti……5

1.1.1. Stvaranje trombocita……5

1.1.2. Građa trombocita……6

1.1.3. Uloga trombocita……7

1.1.4. Bolesti trombocita……9

1.2.Transfuzija……10

1.2.1. Dobrovoljno darivanje krvi……11

1.2.1.1. Izdvajanje trombocita iz darovane „pune krvi“……12

1.2.1.2. Izdvajanje trombocita iz darovane krvi trombaferezom……14

1.2.2. Laboratorijsko testiranje uzorka krvi……14

1.2.3. Pohrana trombocita……14

1.2.4. Transfuzijsko liječenje……15

1.3. Kontrola kvalitete……17

1.3.1. Zahtjevi kvalitete……17

1.3.2. Nuspojave i vrste štetnih događaja……19

1.3.3. Sustav hemovigilancije……20

2. CILJ RADA……22

3. MATERIJALI I METODE……23

3.1. Kontrola kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih iz sloja leukocita i trombocita……23

3.2. Kontrola kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih trombaferezom…….....……26

3.3. Opis istraživanja i statistička obrada……...…..…28

4. REZULTATI……...…...29

5. RASPRAVA……...…….35

6. ZAKLJUČCI……...…...38

7. LITERATURA……...……39

8. SAŽETCI……..……..……..41

8.1. SUMMARY……...…….42

9. ŽIVOTOPIS…….....…..43

Prilozi slika i tablica……..44

POPIS KRATICA

IL – interleukin

GM-CSF – čimbenik stimulacije granulocitno makrofagnih kolonija *(engl. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)*

TPO – trombopoietin *(engl. Thrombopoietin)*

SCF – čimbenik stimulacije matičnih stanica *(engl. Steam Cell Factor)*

SDF-1 – čimbenik 1 stromalnih stanica *(engl. Stromal cell-Derived Factor-1)*

vWF – von Willebrandov čimbenik *(engl. von Wilebrand Factor)*

HPA – humani trombocitni antigeni *(engl. Human Platelet Antigen)*

HLA – humani leukocitni antigen *(engl. Human Leukocyte Antigen)*

DDK – dobrovoljni darivatelji krvi

PRP – plazma bogata trombocitima *(engl. Platelet Rich Plasma)*

BC – sloj leukocita i trombocita *(engl. Buffy Coat)*

DLP – dobra laboratorijska praksa *(engl. Good Laboratory Practice)*

TRALI – transfuzijom uzrokovana akutna upala pluća *(engl. Transfusion Related Acute Lung Injury)*

GVHD – reakcija transplantanta protiv primatelja *(engl. Graft Versus Host Disease)*

PTP – post-transfuzijska purpura *(engl. Post-Transfusion Purpura, PTP)*

OKOK – odsjek za osiguranje i kontrolu kvalitete

OKK – odsjek za kontrolu kvalitete

OPI – odjel za preradu i izdavanje krvi

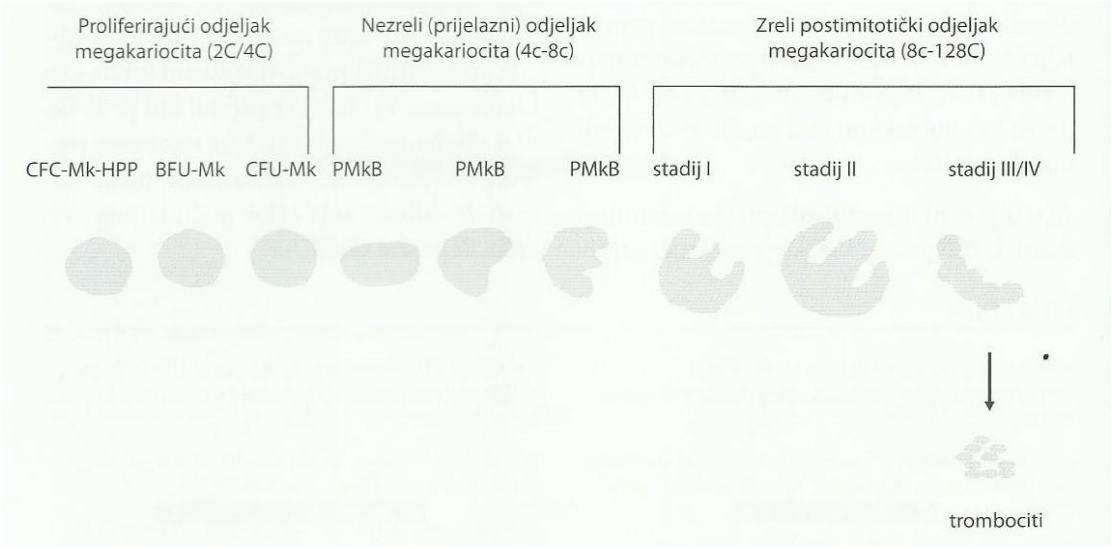
1. UVOD

1.1. Trombociti

Trombociti ili krvne pločice su stanice koje nastaju u koštanoj srži raspadanjem citoplazme zrelih megakariocita. Njihova diferencijacija i sazrijevanje naziva se megakariocitopoeza. Trombociti maju važnu ulogu u procesu zaustavljanja krvarenja iz oštećene stijenke krvne žile.

1.1.1. Stvaranje trombocita

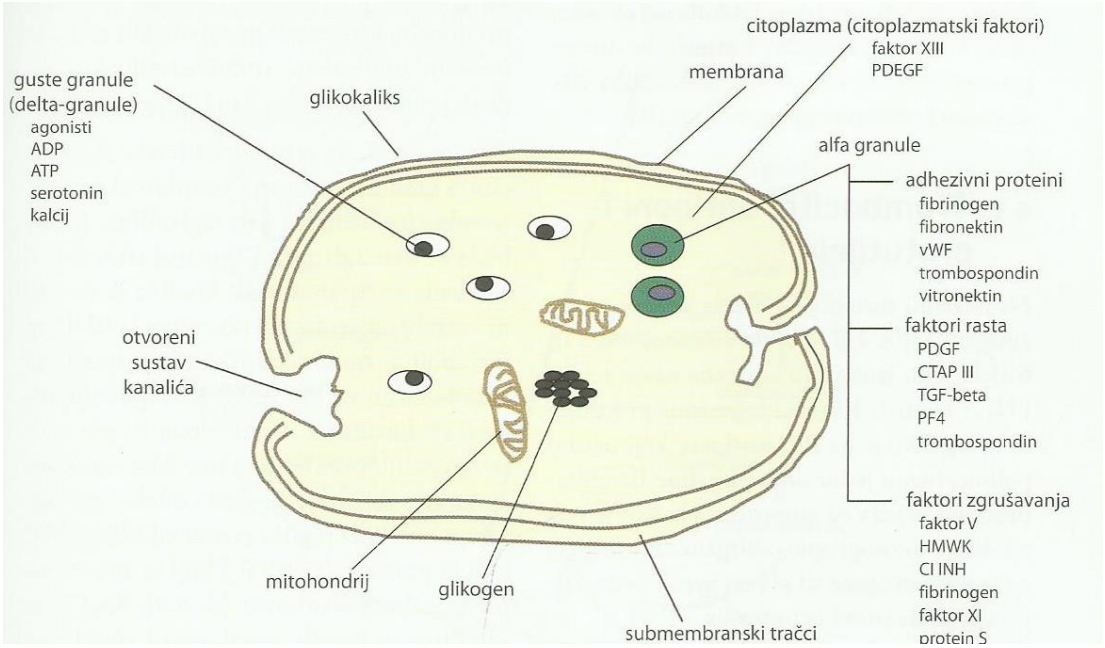
Megakariocitopoeza je proces stvaranja trombocita (slika 1.). Iz nezrelih hematopoetskih stanica nastaju zreli megakariociti čijim se fragmentiranjem citoplazme oslobađaju trombociti. Tako iz jednog zrelog megakariocita može nastati i do 3 000 trombocita. Veliku ulogu za rast i razvoj trombocita imaju proliferacijski faktori IL-3 i čimbenik stimulacije granulocitno makrofagnih kolonija *(engl. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF)* i drugi faktori koji pojačavaju učinak spomenutih faktora, a to su trombopoietin *(engl. Thrombopoietin, TPO),* čimbenik stimulacije matičnih stanica *(engl. Steam Cell Factor, SCF),* IL-1 i IL-1α. Od velikog značaja je TPO koji nastaje u koštanoj srži i slezeni, a najvećim dijelom u jetri i bubrezima. Nadalje, tu su geni NFE-2 i TUBB-1, odgovorni za stvaranje i određivanje diskoidnog oblika trombocita, te čimbenik 1 stromalnih stanica (*engl. Stromal cell-Derived Factor-1, SDF-1*) koji oslobađa trombocite iz megakariocita. Nakon otpuštanja iz koštane srži, trombociti odlaze u slezenu gdje ostaju 36 sati prije nego krenu u periferni krvotok. 2/3 ukupnog broja trombocita cirkulira u perifernom krvotoku dok ostatak ostaje u slezeni. Slezena osim pričuve trombocita služi i kao raspadno mjesto istih, zajedno sa jetrom i koštanom srži.



Slika 1. Prikaz stvaranja trombocita u tri faze (1)

1.1.2. Građa trombocita

U strukturi trombocita razlikujemo 4 cjeline: membranski sustav, perifernu i strukturalnu zonu i citoplazmatsku zonu s granulama i organelama. Trombociti u svojoj strukturi nemaju jezgru, endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat. Periferija trombocita je obavijena glikokaliksom koji sadrži faktore zgrušavanja, faktore fibrinolize, plazmatske proteine i komplement. Ispod glikokaliksa nalazi se membrana sastavljena od kombinacije lipida i proteina, a ispod te membrane smješteni su mikrotubuli i filamenti koji održavaju kostur trombocita (slika 2.). U samoj unutrašnjosti nalaze se dvije vrste granula: alfa granule, koje čine većinski dio i guste granule, koje sadrže medijatore važne za funkciju trombocita. Prisutni su i mitohondriji koji vrše metabolizam i aerobnu glikolizu, pa tako trombociti dobivaju energiju. Gusti tubularni sustav unutar trombocita mjesto je gdje nastaju prostaglandin i tromboksan A_2. Na površini trombocita nalaze se: specifični trombocitni antigeni *(engl. Human Platelet Antigen, HPA),* antigen tkivne snošljivosti *(engl. Human Leukocyte Antigen, HLA)* i antigeni sustava krvnih grupa (ABO antigeni).



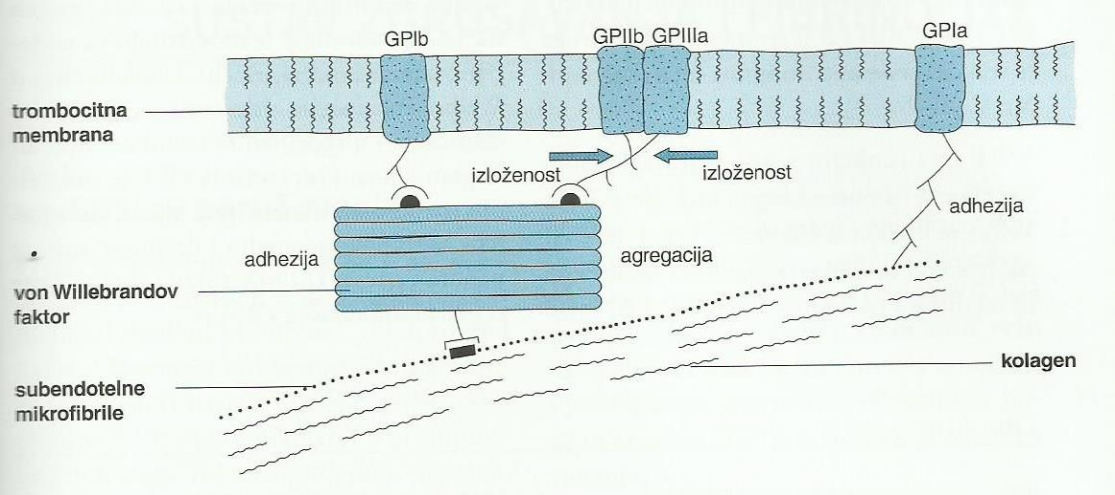
Slika 2. Prikaz građe trombocita (1)

1.1.3. Uloga trombocita

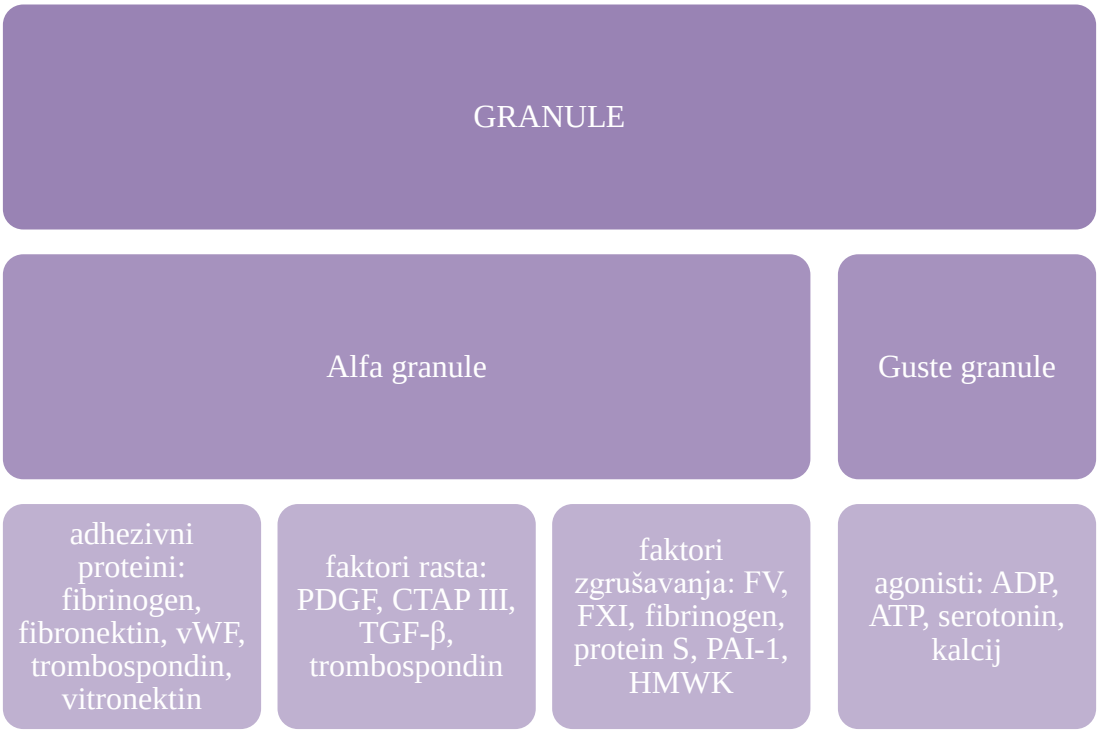
Glavna funkcija trombocita je vezana uz proces zaustavljanja krvi odnosno stvaranje primarnog hemostatskog čepa kod oštećene stijenke krvne žile (slika 3.) gdje trombociti imaju zadaću adhezije i agregacije.

Adhezija je vezanje trombocita za oštećenu krvnu žilu odnosno za bazalni endotel i kolagen kojeg sadrži. Vezanje se vrši pomoću von Wilebrandovog čimbenika (*engl. von Willebrand Factor, vWF*) i glikoproteina Ia. Tu dolazi do aktivacije trombocita – prelazak iz inaktivnog, diskoidnog oblika u aktivni oblik sa pseudopodijima kojima je povećana površina djelovanja.

Aktivacija uzrokuje promjenu površine trombocita sa posljedičnim razmještajem organela u citoplazmi, oslobađanje metabolita aktivnih tvari i sadržaja iz granula (slika 4.). Jedna od tvari koja se oslobađa je tromboksan A_2 koji potiče agregaciju (vezanje trombocita jedan za drugog) i snažan je vazokonstriktor.



Slika 3. Prikaz adhezije i agregacije trombocita

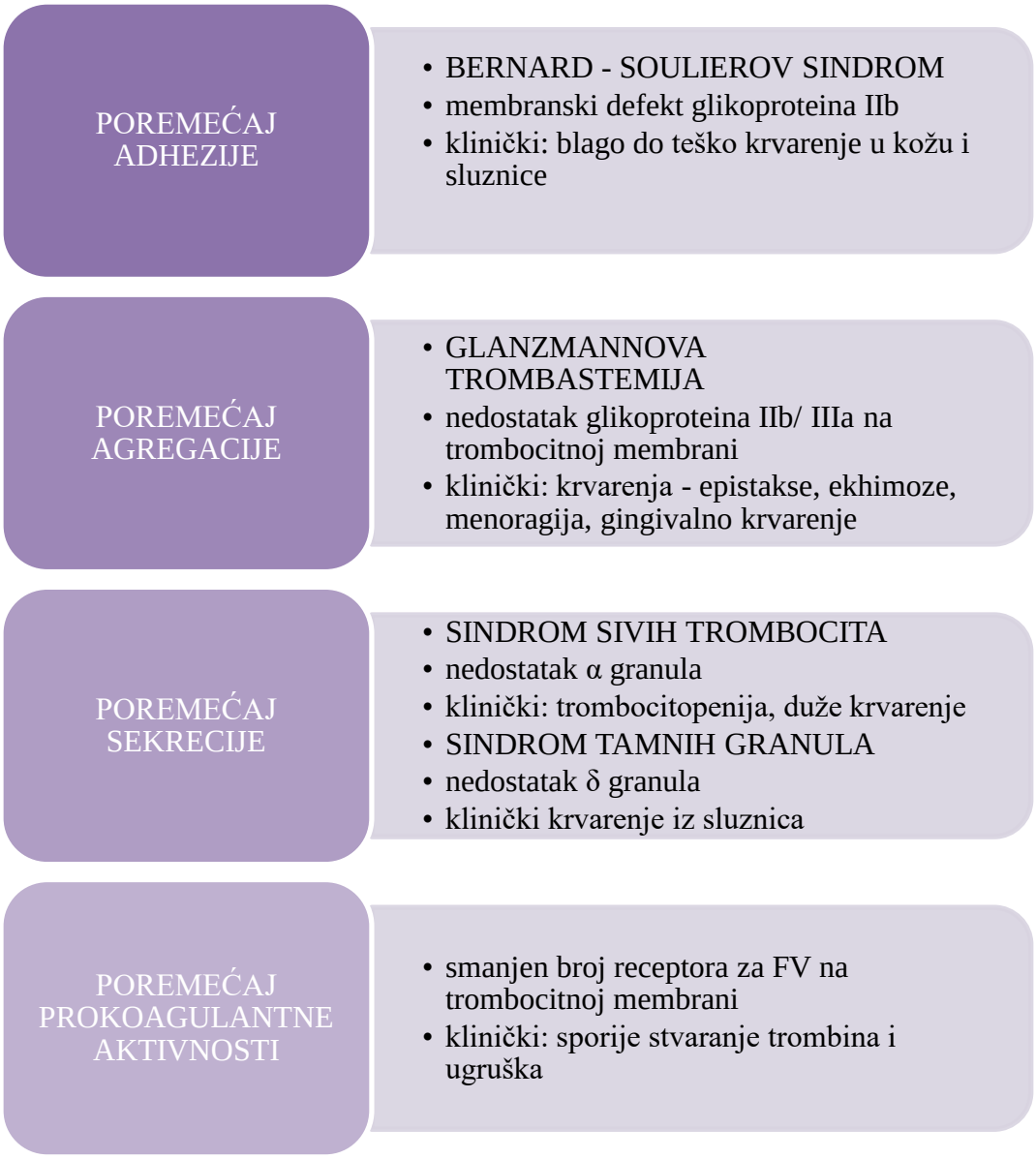


Slika 4. Prikaz sadržaja alfa granula i gustih granula

1.1.4. Bolesti trombocita

Referentni interval za broj trombocita u krvi odrasle osobe je 150 – 450 x10^9/L. Bolesti trombocita mogu biti posljedice kvantitativnih poremećaja odnosno trombocitopenija - smanjen broj trombocita i trombocitoza - povećan broj trombocita, ili posljedica kvalitativnog poremećaja - trombocitopatije.

a) Trombocitopenija je stanje smanjenog broja trombocita, praćena krvarenjima u kožu i sluznice, a po načinu nastanka može biti nasljedna i stečena. Posljedica je nedovoljnog stvaranja broja trombocita (npr. zračenjem, infiltracijom koštane srži tumorom), ubrzane razgradnje trombocita (npr. posttransfuzijska purpura) ili poremećaja raspodjele trombocita u cirkulaciji (npr. hipersplenizam, transfuzija stare krvi).
b) Trombocitoza je stanje povećanog broja trombocita i dijeli se na primarnu trombocitozu tj. trombocitemiju – klonalnu bolest pluripotentne matične stanice i sekundarnu trombocitozu - reaktivnu.
c) Trombocitopatije su kvalitativni poremećaji trombocita. Mogu biti nasljedne i stečene, iskazane su krvarenjima u kožu i sluznice. Nasljedne trombocitopatije se odnose na poremećaj funkcije trombocita (slika 5.), dok su stečene učestalije, vezane su uz autoimune bolesti i izazvane su lijekovima. Najčešći lijek koji izaziva stečeni poremećaj je aspirin i njegovi derivati. (1)



Slika 5. Prikaz poremećaja funkcije (adhezije, agregacije, sekrecije i prokoagulantne aktivnosti) trombocita sa pripadajućim bolestima

1.2. Transfuzija

Transfuzija krvi podrazumijeva unos krvi i krvnih pripravaka u krvotok primatelja dobivenih od strane dobrovoljnog darivatelja krvi (DDK). Lanac transfuzijske medicine čine DDK, pacijenti, liječničko osoblje i djelatnici Crvenog Križa. Cijeli je proces dobrovoljnog darivanja krvi baziran na načelima dobrovoljnosti, anonimnosti,

besplatnosti i solidarnosti. Svi imaju zajedničke interese, a to su: pronalazak darivatelja, zaštita darivatelja i primatelja i priprema kvalitetnih krvnih pripravaka.

Ljudska je krv neprocjenjiv lijek kojim se spašavaju ljudski životi i liječe brojne bolesti. Krvni pripravci imaju posebno mjesto među svim drugim lijekovima jer su ljudskog podrijetla. Broj DDK je ograničen, teško je kontrolirati količinu aktivnog sastojka i predvidjeti njegovu učinkovitost. Krv i krvni pripravci moraju biti dostupni svima tokom čitave godine, stoga se rade planovi i organiziranje akcija uzimanja krvi na tjednoj, mjesečnoj, tromjesečnoj i godišnjoj bazi. Dan DDK obilježava se 25. listopada svake godine, a tom prigodom dodjeljuju se priznanja Crvenog Križa za 50, 75 i 100 puta darovanu krv. (2)

1.2.1. Dobrovoljno darivanje krvi

„Darivanje se smatra dobrovoljnim i neplaćenim ako osoba daje krv, plazmu ili stanične sastojke po svojoj slobodnoj volji i za to ne primi nikakvu naknadu niti u novcu niti na bilo koji drugi način koji bi se mogao smatrati zamjena za novac, uključujući radno vrijeme osim vremena potrebnog za dolazak na mjesto uzimanja krvi i postupak uzimanja krvi. Manji darovi, osvježenje i naknada izravnih putnih troškova sukladni su s dobrovoljnim neplaćenim davanjem krvi“ (članak 2. Preporuka Vijeća Europe br. R (95) 14).

Svaki DDK koji odgovara općim pravilima (tablica 1.) mora zadovoljiti slijedeće: provjeru količine željeza u krvi, razgovor sa liječnikom i liječnički pregled. Provjera količine željeza se određuje brzinom spuštanja kapljice krvi u posudi sa bakrenim sulfatom poznate koncentracije. Razgovorom sa liječnikom se nastoje otkriti rizična ponašanja, putovanja u druge zemlje ili bilo što drugo, što nije po pravilima propisanim zakonom, a kod primatelja bi primanjem krvi te osobe izazvalo komplikacije. Liječnički pregled obuhvaća provjeru zdravstvenog stanja, mjerenje krvnog tlaka i rada srca. Nakon što DDK zadovolji sve što je navedeno, može započeti izdvajanje trombocita darivanjem krvi klasičnim putem iz „pune krvi“ ili postupkom trombafereze.

Tablica 1. Opća pravila za DDK

Dob	18-65 godina
Tjelesna težina	>55kg, proporcionalna sa visinom
Tjelesna temperatura	Do 37°C
Krvni tlak	Sistolički 100-180 mmHg Dijastolički 60-110 mmHg
Puls	50-100x/min
Hemoglobin	M 135 g/l Ž 125 g/l
Broj darivanja godišnje (puna krv)	M 4x godišnje, 3mj. razmaka Ž 3x godišnje, 4mj. razmaka
Broj darivanja godišnje (afereza)	M i Ž do 12x godišnje, 3 dana razmaka

Koncentrat trombocita se proizvodi kao koncentrat iz pune krvi od više DDK („pool“ trombociti) ili kao koncentrat trombafereze dobiven aparatom za odvajanje od jednog DDK. Važno je da DDK nisu uzimali antiagregacijsku terapiju i da se procesu proizvodnje pristupi odmah nakon donacije pune krvi.

1.2.1.1. Izdvajanje trombocita iz darovane „pune krvi“

Najčešći način darivanja krvi je jednom dozom „pune krvi“. Proces se odvija na način da krv sustavom cjevčica iz vene davatelja odlazi prvo u predonacijsku vrećicu iz koje se uzimaju uzorci za testiranje, a zatim u donacijsku vrećicu s antikoagulantnom otopinom volumena 450 ± 50 ml koja omogućuje rok trajanja do 35 dana. Takva vrećica

donirane krvi sadrži sve elemente krvi: eritrocite, leukocite, trombocite i krvnu plazmu. Krv se centrifugira da bi se razdvojila na svoje osnovne elemente. Cijeli postupak darivanja krvi traje 8-12 minuta, kraće od trombafereze. U Republici Hrvatskoj je postupak proizvodnje trombocita metodom iz plazme bogate trombocitima *(engl. Platelet Rich Plasma, PRP)* zamijenjen metodom iz sloja leukocita i trombocita *(engl. Buffy Coat, BC)*. BC metoda se primjenjuje u većem broju zemalja zapadne Europe.

Načini proizvodnje koncentrata trombocita darivanjem iz doze „pune krvi“ su:

1. Proizvodnja koncentrata trombocita iz PRP

- Potrebno je tijekom 6 sati od donacije izdvojiti PRP, a zatim ponovnim centrifugiranjem iz nje izdvojiti trombocite

2. Proizvodnja koncentrata trombocita iz BC

- 1. faza: odvajanje sloja leukocita i trombocita iz centrifugirane pune krvi
- 2. faza: miješanje 4 sloja leukocita i trombocita s jednom dozom plazme, centrifugiranje i izdvajanje supernatanta koncentrata trombocita

Dorađeni koncentrati trombocita:

1. Koncentrat opranih trombocita
    - Ostatak <0,5 g/dozi proteina, gubitak ≤ 20% trombocita
    - Rok valjanosti do 6 sati
    - Indikacije: alergijske reakcije nakon 2 ili više uzastopnih transfuzija, anti-A protutijelo
2. Ozračeni koncentrat trombocita – zračenje 25-50 Gy
    - Rok valjanosti do 6 sati
    - Indikacije: prije i nakon transplantacije matičnih stanica, Hodgkinova bolest, prijevremeno rođena djeca i novorođenčad, imunodeficijencija
3. Trombociti u smanjenom volumenu plazme
    - Centrifugiranje i uklanjanje plazme
    - Rok valjanosti do 6 sati

Ako usporedimo trombocitne pripravke dobivene metodom iz PRP i metodom iz BC možemo zaključiti da je gubitak eritrocita i plazme za kliničku primjenu različit kod ovih metoda. Kod PRP je veći gubitak količine plazme, ali je manji gubitak eritrocita i aktivacije trombocita. Također, veći je konačan broj trombocita u pripravku. Razlika je i

u dostupnosti pripravka. PRP trombociti su dostupni u istom danu od uzimanja krvi, a BC trombociti su dostupni nakon 24 sata od uzimanja krvi.

1.2.1.2. Izdvajanje trombocita iz darovane krvi trombaferezom

Afereza je postupak dobivanja jednog ili više krvnih sastojaka pomoću staničnog separatora. Tako se primjerice trombaferzom iz krvi DDK izdvajaju samo trombociti. Proces se odvija na način da se iz vene jedne ruke DDK sustavom cjevčica krv doprema u stanični separator, gdje se pomoću filtra odvajaju trombociti, a ostatak se opet sustavom cjevčica vraća u krvotok davatelja u venu iste ili suprotne ruke. Cijeli postupak traje manje od 90 minuta, DDK može darovati krv više puta godišnje i kombinirati darivanje krvi aferezom i klasičnim putem u razmaku od 3 tjedna. (3, 4)

1.2.2. Laboratorijsko testiranje uzorka krvi

Svaka donirana doza krvi mora proći laboratorijsko testiranje. Ono uključuje slijedeće:

- Imunohematološke pretrage: ABO sustav i Rh sustav, antieritrocitna protutijela
- Biljege krvlju prenosivih bolesti: testiranje na HIV, HBV, HCV, sifilis (4, 5)

1.2.3. Pohrana trombocita

Pripravci trombocita su posebno osjetljivi kada je riječ o pohrani. Vrećica za pohranu zahtjeva povećanu propusnost za kisik pa su te vrećice drukčijeg sastava od ostalih, a dodatno se pazi na prodiranje ljepila naljepnice unutar vrećice i rezidualnih toksičnih tvari nakon sterilizacije. Njihov metabolizam i vijabilnost ovise o kisiku, temperaturi i pH suspenzijske otopine. Kada broj trombocita prijeđe broj koji se može opskrbiti kiskom, poveća se potrošnja glukoze za 3 do 5 puta i posljedično se stvara mliječna kiselina, smanjuje se pH, smanjuje se količina ATP- a i vijabilnost trombocita. Stoga se oni pohranjuju na temperaturi od +20˚ do +24˚C u zatvorenom uređaju koji kontrolira temperaturu. Iznimno je važno da se trombociti čuvaju na navedenim temperaturama i da se nikad ne stavljaju u hladnjak jer niske temperature izazivaju ireverzibilnu agregaciju. Međutim treba imati na umu da upravo ovi uvjeti čuvanja pogoduju razvoju mikroorganizama. Agitatori su uređaji u kojima su skladišteni trombociti, oni protresaju vrećice te omogućuju izmjenu plinova kroz stjenku vrećice, izbjegavaju preklapanje

vrećica, rade na stalnoj temperaturi i sprječavaju pjenušanje. Uređaji imaju termografe i alarmne sustave te se redovito održavaju po uputi proizvođača. (6)

1.2.4. Transfuzijsko liječenje

Transfuzijsko liječenje u pacijenta podrazumijeva nadoknadu onog dijela krvi koji nedostaje. Ispravno je samo u stanjima kada se krvni dio ne može zamijeniti i nadoknaditi drugim načinima liječenja, a izostanak tog krvnog dijela u manjku rezultirao bi pogoršanjem stanja pacijenta ili čak smrću. U transfuzijskom liječenju se koriste ovi pripravci: Koncentrat eritrocita, koncentrat trombocita, svježe smrznuta plazma i krioprecipitat i derivati plazme dobiveni frakcioniranjem (FIX, FVIII, FVII, von Wilebrand-ov faktor, ptrotrombinski kompleks, imunoglobulini i albumin).

Transfuzijsko liječenje obuhvaća određivanje krvne grupe, prijetransfuzijsko ispitivanje, ispitivanje uzroka reakcije na transfuziju krvi. Prijetransfuzijsko ispitivanje je prva od stavki transfuzijskog liječenja. Cilj joj je izbjeći akutnu i odgođenu hemolitičku transfuzijsku reakciju koja je uzrokovana antieritrocitnim protutijelima. Češće se ta protutijela nalaze u primatelja nego u darivatelja. Stoga se rade provjere ABO i Rh sustava, ispitivanje klinički značajnih antieritrocitnih protutijela, križna proba za podudarnost bolesnikove plazme/seruma i darivateljevih eritrocita.

Prijetransfuzijsko ispitivanje pokazuje *in vitro* podudarnost, ne može spriječiti nastale nuspojave, prognozirati životni vijek transfundiranih pripravaka niti spriječiti krvlju prenosive bolesti ako su posljedica metabolita pripravaka ili administrativne pogreške.

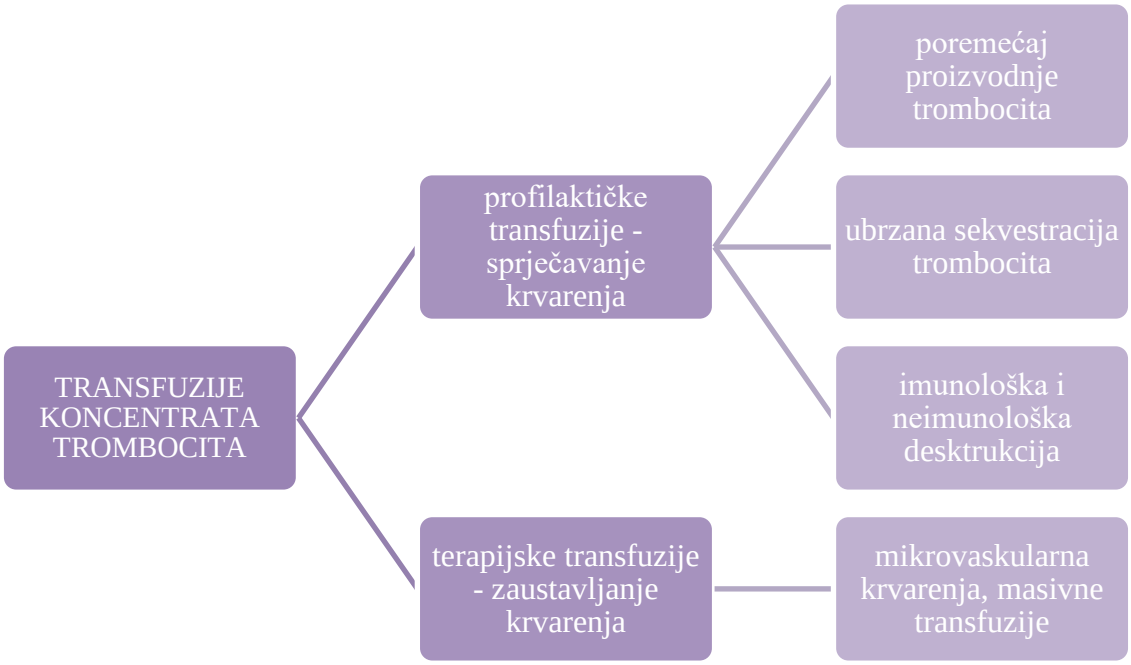
Indikacije za transfuziju trombocita u svrhu liječenja krvarenja su:

- Trombocitopenije i trombocitopatije neovisne o broju trombocita
- Sprječavanje krvarenja kod hematoloških pacijenata s trombocitopenijom <5-10 $x10^9$/L
- Manji kirurški zahvat, kad je broj trombocita <30 $x10^9$/L
- Kod operacije srca ili veći kirurški zahvat, kad je broj trombocita <50 $x10^9$/L
- Kirurški zahvat na oku ili središnjem živčanom sustavu, kad je broj trombocita <80 $x10^9$/L

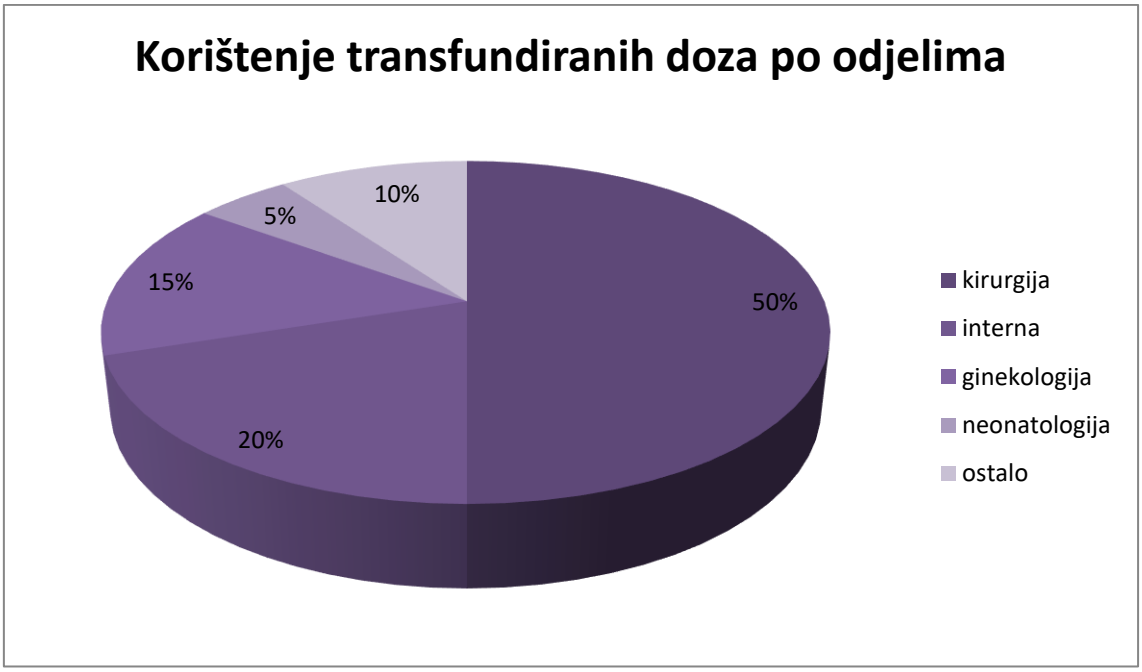
1 pripravak trombocita dobiven trombaferezom ili 1 pripravak dobiven BC metodom poveća broj trombocita kod odraslih osoba za 20-40 $x10^9$/L. Transfuzija trombocita se

može dati profilaktički i to neposredno prije ili tijekom kirurškog zahvata, kad ima najveću učinkovitost (slika 6.).

Transfuzijsko liječenje pacijenata samo onim krvnim dijelom koji je u manjku ima puno prednosti jer se bolesniku daje samo ono što mu nedostaje, ne prima nepotrebne krvne komponente, smanjuje se učestalost nuspojava i u konačnici od 1 doze krvi moguće je liječiti više pacijenata. Transfuzijsko liječenje pacijenata visi o puno čimbenika, a broj transfundiranih doza varira od odjela do odjela (slika 7.). (7, 8)



Slika 6. Prikaz liječenja koncentratima trombocita, u svrhu sprječavanja i zaustavljanja krvarenja



Slika 7. Grafički prikaz postotaka općeg korištenja transfuzijskih pripravaka po odjelima

1.3. Kontrola kvalitete

Upravljanje kvalitetom sustav je osiguranja kvalitete koji obuhvaća sve što može utjecati na kvalitetu krvnih pripravaka. To uključuje Dobru laboratorijsku praksu - DLP *(engl. Good Laboratory Practice, GLP),* kontrolu kvalitete i nadzore.

1.3.1. Zahtjevi kvalitete

Zahtjevi kvalitete obuhvaćaju:

a) Kontrolu kvalitete i provjeru stručnosti
b) Unutarnju i vanjsku kontrolu – unutarnjim i vanjskim kontrolama se nastoji osigurati kvaliteta svih načela DLP, kontrolu izvode odgovorne osobe
c) Osoblje i organizaciju – proizvodnja krvnih pripravaka odgovoran je posao i zahtjeva dovoljan broj educiranog osoblja. Svaki od osoblja obavlja zadatke temeljene na načelima DLP. Tako kliničko osoblje u transfuzijskoj djelatnosti čine: voditelj proizvodnje, voditelj osiguranja i specijalist transfuzijske medicine, a dužnosti i odgovornosti su definirane u opisu radnog mjesta. Osoblje

mora dobiti edukaciju i usavršavanja u okviru dodijeljene im dužnosti o čemu se vode evidencije i provjere po potrebi

d) Prostor, oprema i materijali – prostor treba biti opremljen za svrhu kojoj služi i imati odijeljene prostore za odabir davatelja, prikupljanje krvi, obradu krvi, čuvanje krvi, laboratorijske i pomoćne prostorije. Treba paziti na ograničene ulaze u određene prostorije npr. sobe za ozračivanje krvnih pripravaka, kantine i sobe za presvlačenje

   Oprema – oprema treba biti redovito servisirana i najmanje štetiti osoblju, pripravcima, davateljima i pacijentima

   Materijali – materijali moraju imati potvrdu o zadovoljavanju testova i odgovarati istim. Zajedno s opremom moraju biti sukladni, a sve nesuglasnosti zapisivati i obavijestiti proizvođača

e) Dokumentacija – pravilno vođena dokumentacija sprječava i smanjuje broj pogrešaka. Obuhvaća provjeru svih faza rada laboratorija (slika 8.)

f) Obrada krvi – nakon odabira davatelja i uzimanja krvi priprema se pripravak po jasnim i strogim pravilima. Kada je god moguće, priprema se izvodi u zatvorenim prostorijama kako bi se smanjila opasnost od zagađenja. Svi novi postupci i promjene vezani za proizvodnju moraju biti testirani prije i nakon uvođenja promjene. Svi uzorci i spremnici moraju biti pravilno označeni, čuvani i transportirani

g) Pritužbe i opoziv pripravaka – sve pritužbe potrebno je detaljno i pomno istražiti u što kraćem roku. Valja voditi računa o *„look-back“* i *„trace-back“* postupcima. Dokumentiraju se svi opozivi neispravnih krvnih pripravaka i onih za koje se sluti da su neispravni

h) Istraživanje pogrešaka i nuspojava – organizacije trebaju prikupljati takve podatke radi utvrđivanja problema u sustavu i poduzeti preventivne i korektivne mjere



Slika 8. Prikaz svih faza rada laboratorija

1.3.2. Nuspojave i vrste štetnih događaja

Nuspojava je šteta nastala korištenjem lijeka, liječenja ili medicinskom pogreškom. U transfuzijskoj medicini nuspojave ovise o krvnom pripravku, transfuzijskom liječenju i pacijentu. Liječenje nije uvijek uspješno i sukladno očekivanjima pa se mogu dogoditi pogreške. „*Near-miss*“ je događaj koji bi uzrokovao nuspojavu i štetu da se dogodio, ali je izbjegnut. Štetni događaj je događaj uzrokovan pogreškom ili liječenjem, a nije posljedica bolesti.

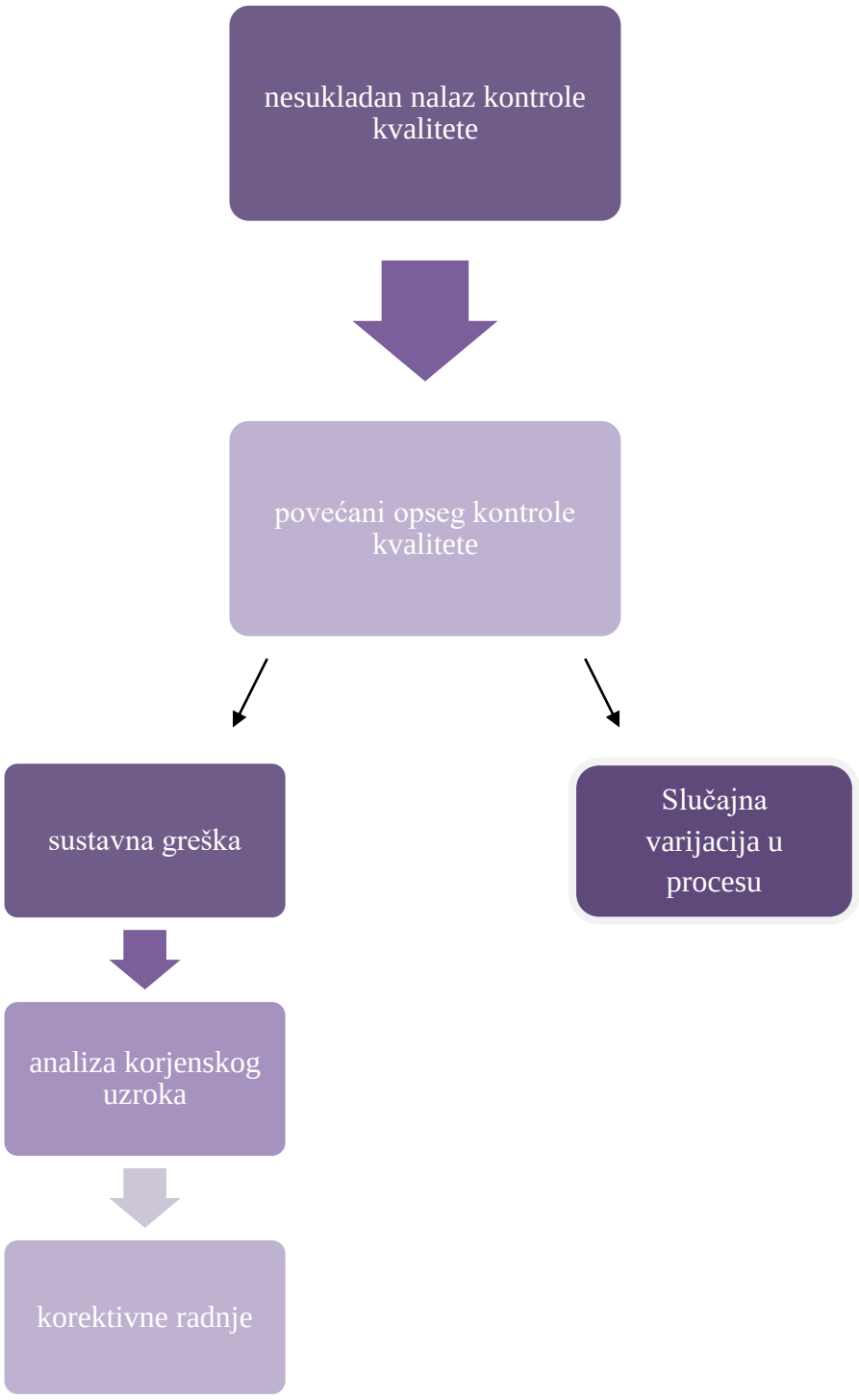
Vrste štetnih događaja:

- Neposredne štetne reakcije tijekom transfuzije (hemoliza, transfuzijom uzrokovana akutna upala pluća *(engl. Transfusion Related Acute Lung Injury, TRALI),* osip, reakcija transplantanta protiv primatelja *(engl. Graft Versus Host Disease, GVHD))*
- Odgođene štetne reakcije (post-transfuzijska purpura *(engl. Post-Transfusion Purpura, PTP),* hemoliza)
- Infekcije bakterijama, virusima i parazitima
- Aloimunizacija antigenima
- Transfuzija nepodobnog ili neodgovarajućeg krvnog pripravka (6)

1.3.3. Sustav hemovigilancije

U svrhu smanjenja posljedica i nuspojava uveden je sustavni nadzor nad transfuzijskim liječenjem – sustav hemovigilancije (*engl. Haemovigilance*). Hemovigilancija je skup postupaka koji kontinuirano prati ozbiljne štetne događaje i ozbiljne štetne reakcije kod davatelja i primatelja i biljege zaraznih bolesti kod davatelja. Zadaci hemovigilancije su preventiva, rane dojave upozorenja, a cilj sprječavanje novonastalih štetnih događaja i reakcija. Tim se postupcima nastoji povećati kvaliteta krvnih pripravaka, liječenja i sigurnost od nuspojava. Osnova hemovigilancije je ponavljanje planiranih postupaka (*engl. plan, do, check, act*) kojima se poboljšava kvaliteta.

U Republici Hrvatskoj postoji Registar transfuzijskih reakcija (RTR) koji je dio Hrvatskog nacionalnog sustava za nadzor transfuzijskog liječenja (slika 9.). Prijavljuju se nuspojave putem obrazaca, ali ne i pogreške, štetni događaji i „*near-miss"* događaji čija se težina ocjenjuje prema Preporukama Vijeća Europe. Radi prevencije, postavljanja dijagnoze i liječenja, potrebno je sakupljati i analizirati podatke o nuspojavama iz što većeg broja zemalja. Stoga su se zemlje članice EU udružile u zajedničku organizaciju *European Haemovigilance Network (EHN)* i zajedno rade na većoj sigurnosti transfuzijskog liječenja u cijeloj Europi. (9, 10)



Slika 9. Algoritam postupanja u slučaju nesukladnog nalaza kontrole kvalitete

2. CILJ RADA

Koncentrati trombocita u Zavodu za transfuzijsku medicinu – ZTM, KBC Split, proizvode se na dva načina; metodom iz sloja leukocita i trombocita i metodom trombafereze. Cilj ovog rada je prikaz i usporedba parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih na oba načina i utvrđivanje statistički značajne razlike u volumenu i broju trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita.

3. MATERIJALI I METODE

Kontrola kvalitete krvnih pripravaka je potrebna zbog biološke raznolikosti početnog materijala. Kvaliteta gotovog proizvoda ovisi o brojnim faktorima povezanim s uzimanjem, proizvodnjom i skladištenjem krvi i krvnih pripravaka. Svaka doza krvi je zasebna serija. Stabilnost, učinkovitost i količina aktivne tvari ne mogu biti ispitane u svakom krvnom pripravku. Stoga je potrebno statističko praćenje različitih parametara za procjenu ukupne kvalitete. Učestalost kontrole kvalitete je propisana mjesečnim planom kontrole svih krvnih pripravaka u RU-OKK-001, uobičajeno se testira 1% ukupne mjesečne proizvodnje. Statistička procjena kontrola je bazirana na matematičkim modelima. U transfuzijskim ustanovama koje imaju veliku proizvodnju i različite tehnologije proizvodnje, broj testiranih pripravaka mora biti veći od statističkog minimuma da bi se uočila moguća odstupanja.

3.1. Kontrola kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih iz sloja leukocita i trombocita

Koncentrat trombocita sa smanjenim brojem leukocita „pool“ više doza iz sloja leukocita i trombocita, krvni je pripravak dobiven spajanjem četiri različite doze sloja leukocita i trombocita (uz prethodno odvajanje nakon centrifugiranje) i jedne pripadajuće doze plazme istog ABO i Rh D sustava te leukofiltracijom „pool-a“.

Svi parametri (tablica 2.) moraju zadovoljiti 75% rezultata kontrole kvalitete, broj leukocita 90%, a sterilitet odnosno mikrobiološka čistoća 100%. Učinkovitost transfuzije trombocita ovisi o broju, funkciji i vijabilnosti trombocita.

Tablica 2. Parametri kontrole kvalitete, zahtjevi kvalitete i učestalost kontrole

Parametar	**Zahtjev kvalitete**	**Učestalost kontrole**
Volumen	>40 mL na svakih $6x10^{10}$ trombocita	1% mj. proizvodnje
Broj trombocita	>2 x 10^{11}/ dozi	1% mj. proizvodnje
Broj leukocita	<1,0 x 10^{6}/dozi	1% mj. proizvodnje
ph na isteku roka valjanosti	>6,4	1% mj. proizvodnje (min. 4 doze/mj)
Sterilitet	Sterilno	√*0,4 (min. 4 doze/mj.)

Volumen

Volumen plazme ili hranjive otopine u kojoj su trombociti suspendirani utječe na pH, metabolizam trombocita i produkciju laktata. Volumen mora biti veći od 40 ml/dozi, kako bi pH tijekom skladištenja ostao >6,4. Volumen određuje svakoj dozi koja se uzorkuje za hematološka mjerenja. Masa doze krvnog pripravka određuje tehničar Odsjeka za kontrolu kvalitete – OKK, vaganjem na preciznoj automatskoj vagi PB 3002 –s Mettler Toledo, u Odjelu za preradu i izdavanje krvi - OPI. Doza se važe na način da se cijeli sustav vrećica postavi na sredinu ploče i očita vrijednost mase u gramima (g). Iz očitane vrijednosti mase doze krvnog pripravka i specifične težine krvnog sastojka izračunava se volumen sadržaja doze:

$$\text{Volumen doze (mL)} = \frac{\text{masa doze (g) - masa vrećice(g)}}{\text{specifična težina}}$$

Uzorkovanje za određivanje broja trombocita i leukocita

Uzorkovanje mora ispunjavati određene uvjete:

a) Reprezentativan uzorak
b) Osigurana identifikacija i sljedivost
c) Očuvanje kvalitete krvnog pripravka
d) Adekvatan volumen uzorka
e) Validirana metoda

Uzorkovanje za određivanje broja trombocita i leukocita izvodi tehničar OKK u prostorima OPI. Uzorkuju se doze starosti 2 sata nakon završene proizvodnje. Na praznu transfer vrećicu zalijepi se naljepnica sa odgovarajućim imenom pripravka i masom doze u gramima. Zatim se pomoću aparata za sterilno zavarivanje na vrećicu sa pripravkom zavari transfer vrećica. Vrećica sa pripravkom se jednoliko promiješa da se sadržaj homogenizira i u transfer vrećicu se istoči 5 ml. Tada se vrećica sa uzorkom odvoji. U OKK se na plastičnu epruvetu s 3 ml suhim EDTA zalijepi naljepnica sa ID brojem i ostalim podacima. U tako označenu epruvetu se istoči sadržaj iz transfer vrećice. Epruveta se začepi i stavi 10 minuta na miješalicu, dok se transfer vrećica baci u kontejner za biološki otpad. Broj trombocita u dozi koncentrata trombocita ovisi o:

a) Broju trombocita u krvi DDK
b) Volumenu darovane krvi
c) Gubitku trombocita zbog aktivacije sustava zgrušavanja tijekom uzimanja krvi
d) Gubitku trombocita uzrokovanog proizvodnjom, skladištenjem, rukovanjem i transportom

Mjerenje na automatskom hematološkom analizatoru

Mjerenje na automatskom hematološkom analizatoru Abbott Cell Dyn 3200 se radi iz prethodno pripremljenog uzorka. Mjerenja se rade otvorenim sustavom, što znači da iznad vrijednosti od 1750 $x10^9$ /L analizator ne očitava rezultat već ga zamjenjuje znakom „>>>>>“. Takav uzorak je potrebno razrijediti u epruveti s 5 ml diluentom u omjeru 1:2, ponovo izmjeriti i dobivenu vrijednost pomnožiti sa 2. U dokumentaciji se pohranjuju oba dva rezultata.

Brojanje ostatnih leukocita

Brojanje ostatnih leukocita se mjeri isključivo na analizatoru ADAMrWBC jer ne može biti pouzdano izmjereno na analizatoru Abbott Cell Dyn 3200. Priprema uzorka za mikroskopsko brojanje leukocita, postupak brojanja i izračuna broja ostalih leukocita u dozi krvnog pripravka opisani su u RU-OKK-026.

Uzorkovanje za mikrobiološku kontrolu primjenom sustava BacT/Alert

Za mikrobiološku kontrolu se uzimaju cijele doze (na isteku roka valjanosti) ili uzorci koncentrata trombocita sa smanjenim brojem leukocita „pool“ više doza iz sloja leukocita i trombocita (starosti najmanje 48 sati od uzimanja krvi) u sterilno navarene vrećice za uzorkovanje. Uzimanje uzorka i kontra-uzorka se odvija na način da se na

plastičnu vrećicu, sustavom cjevčica navare dvije spojene transfer vrećice prethodno pravilno označene. U svaku se vrećicu istoči 20 ml sadržaja doze. Tako se uzeti uzorak koristi za mikrobiološko ispitivanje, a kontra-uzorci se čuvaju u horizontalnim agitatorima na polici „kontrola kvalitete“ do završetka mikrobiološkog ispitivanja.

Uzorkovanje za mjerenje pH

pH se određuje pri isteku roka valjanosti (zadnji dan skladištenja). Doze se izdvajaju iz skladišta koncentrata trombocita u OPI. Unaprijed označena transfer vrećica se navari pomoću aparata za sterilno povezivanje plastičnih cjevčica na vrećicu sa pripravkom. U transfer vrećicu se istoči 5 ml sadržaja te se odvoji. U OKK se plastična epruveta s 5 ml označi naljepnicom s ID brojem, nazivom pripravka i u nju se prebaci sadržaj transfer vrećice. Mjerenje se izvodi s pH-metrom S40 SevenMulti Mettler Toledo, prema uputi RU-OKK-025. (11) Određivanje fenomena vrtloženja *(engl. swirling)* (vizualni aspekt oblačića u koncentratu trombocita kada gleda prema svjetlu) može biti postupak kontrole kvalitete, ali i rutinska pretraga prije izdavanja koncentrata trombocita. Gubitak „swirling“ fenomena tumači se gubitkom diskoidnog oblika trombocita, a time i njihove funkcionalnosti.

3.2. Kontrola kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih trombaferezom

Koncentrat trombocita proizveden postupkom trombafereze sa smanjenim brojem leukocita je krvni pripravak dobiven od jednog davatelja na staničnom separatoru Haemonetics, koji sadrži setove s ugrađenim filtrima.

Svi parametri (tablica 2.) moraju zadovoljiti 75% rezultata kontrole kvalitete, broj leukocita 90%, a sterilitet odnosno mikrobiološka čistoća 100%.

Volumen

Volumen određuje svakoj dozi koja se uzorkuje za hematološka mjerenja. Masu doze krvnog pripravka određuje tehničar OKK, vaganjem na preciznoj automatskoj vagi PB 3002 –s Mettler Toledo, u OPI. Doza se važe na način da se cijeli sustav vrećica postavi na sredinu ploče i očita vrijednost mase u gramima (g). Iz očitane vrijednosti mase doze krvnog pripravka i specifične težine krvnog sastojka izračunava se volumen sadržaja doze:

$$\text{Volumen doze (mL)} = \frac{\text{masa doze (g) - masa vrećice(g)}}{\text{specifična težina}}$$

Uzorkovanje za određivanje broja trombocita i leukocita

Uzorkovanje za određivanje broja trombocita i leukocita izvodi tehničar OKK u prostorima OPI. Uzorkuju se doze 1,5 sat od završetka trombafereze. Koncentrat se izvadi iz horizontalnog agitatora iz OPI. Cijeli sustav vrećica (primarna, sekundarna i transfer vrećica) se izvažu na vagi (PB 3002-s Mettler Toledo) za krvne pripravke. Koncentrat trombocita iz primarne vrećice se dobro promiješa te se polovičan dio sadržaja prebaci u sekundarnu vrećicu. Za kontrolu kvalitete se u satelitsku vrećicu odvoji 3-4 ml koncentrata. Satelitska vrećica se odvoji sterilnim zavarivačem i nalijepi se naljepnica sa podacima ID doze i volumena doze. U OKK se sadržaj iz vrećice s uzorkom prebaci u označenu plastičnu epruvetu od 3 ml sa suhim EDTA. Epruveta se začepi i stavi 10 min na miješanje, a vrećica baci u kontejner za biološki otpad.

Mjerenje na automatskom hematološkom analizatoru

Mjerenje na automatskom hematološkom analizatoru Abbott Cell Dyn 3200 se radi iz prethodno pripremljenog uzorka. Mjerenja se rade otvorenim sustavom, što znači da iznad vrijednosti od 1750 $x10^9$ /L analizator ne očitava rezultat već ga zamjenjuje znakom „>>>>>“. Takav uzorak je potrebno razrijediti u epruveti s 5 ml diluentom u omjeru 1:2, ponovo izmjeriti i dobivenu vrijednost pomnožiti sa 2. U dokumentaciji se pohranjuju oba dva rezultata.

Brojanje ostatnih leukocita

Brojanje ostatnih leukocita se mjeri isključivo na analizatoru ADAMrWBC jer ne može biti pouzdano izmjereno na analizatoru Abbott Cell Dyn 3200 (10 uzoraka mjesečno). Priprema uzorka za mikroskopsko brojanje leukocita, postupak brojanja i izračuna broja ostalih leukocita u dozi krvnog pripravka opisani su u RU-OKK-026.

Uzorkovanje za mikrobiološku kontrolu primjenom sustava BacT/Alert

Za mikrobiološku kontrolu uzimaju se uzorci koncentrata trombocita dobivenih trombaferezom sa smanjenim brojem leukocita (starosti najmanje 48 sati od završetka trombafereze) uzeti u sterilno navarene transfer vrećice. Treba voditi računa o volumenu pripravka i broju trombocita. Uzimanje uzorka i kontra-uzorka se odvija na način da se na plastičnu cjevčica navare dvije spojene transfer vrećice prethodno pravilno označene. U svaku se vrećicu istoči 20 ml sadržaja doze. Tako se uzeti uzorak koristi za

mikrobiološko ispitivanje, a kontra-uzorci se čuvaju u horizontalnim agitatorima na polici „kontrola kvalitete“ do završetka mikrobiološkog ispitivanja.

Uzorkovanje za mjerenje pH

pH se određuje pri isteku roka valjanosti (zadnji dan skladištenja). Doze se izdvajaju iz skladišta koncentrata trombocita u OPI. Unaprijed označena transfer vrećica se navari pomoću aparata za sterilno povezivanje plastičnih cjevčica na vrećicu sa pripravkom. U transfer vrećicu se istoči 5 ml sadržaja te se odvoji. U OKK se plastična epruveta s 5 ml označi naljepnicom s ID brojem, nazivom pripravka i u nju se prebaci sadržaj transfer vrećice. Mjerenje se izvodi s pH-metrom S40 SevenMulti Mettler Toledo, prema uputi RU-OKK-025. (12)

3.3. Opis istraživanja i statistička obrada

Ovaj završni rad istražuje i uspoređuje rezultate kontrole kvalitete za krvni pripravak – koncentrat trombocita, proizvedenog dvjema različitim metodama. Za potrebe istraživanja uzeti su podaci iz 2017. godine iz OKOK, ZTM, KBC Split.

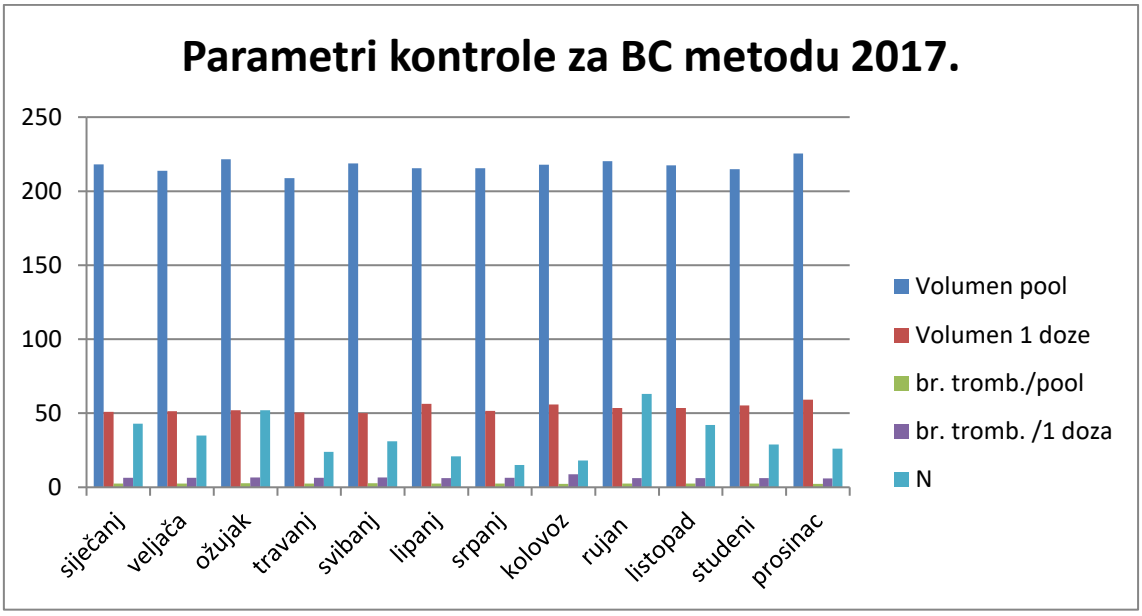
Iz metode proizvodnje koncentrata trombocita iz sloja leukocita i trombocita, *„pool“* više doza, praćeni su slijedeći parametri: volumen 1 doze (ml), broj trombocita u *„pool-u“* koncentrata trombocita ($x10^{11}$), volumen *„pool- a“* (ml) i broj trombocita u 1 dozi ($x10^{10}$). Svi su rezultati pojedinog parametra, koji su prethodno zadovoljili (tablica 2.), unutar pojedinog mjeseca zbrojeni i podijeljeni brojem uzoraka za taj mjesec. Na taj su način dobiveni mjesečni prosjeci za istraživane parametre.

Iz metode proizvodnje koncentrata trombocita trombaferezom praćeni su slijedeći parametri: volumen 1 doze (ml), broj trombocita u trombaferezi ($x10^{11}$), broj doza koncentrata trombocita u trombaferezi i broj trombocita u 1 dozi ($x10^{10}$). Svi su rezultati pojedinog parametra, koji su prethodno zadovoljili (tablica 2.), unutar pojedinog mjeseca zbrojeni i podijeljeni brojem uzoraka za taj mjesec. Na taj su način dobiveni mjesečni prosjeci za istraživane parametre.

4.REZULTATI

Tablica 3. Prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih BC metodom u 2017. godini

Vremensko razdoblje	**Broj koncentrata trombocita**	**Volumen 1 doze (ml)**	**Broj trombocita u „pool-u“ koncentrata trombocita (x 10^{11})**	**Volumen „pool-a“ (ml)**	**Broj trombocita u 1 dozi (x 10^{10})**
siječanj	43	50,93	2,63	217,98	6,4
veljača	35	51,37	2,55	213,71	6,4
ožujak	52	52,08	2,66	221,48	6,6
travanj	24	50,50	2,57	208,75	6,5
svibanj	31	50,19	2,67	218,71	6,7
lipanj	21	56,33	2,55	215,40	6,3
srpanj	15	51,67	2,55	215,40	6,4
kolovoz	18	55,83	2,36	217,78	8,9
rujan	63	53,62	2,52	220,32	6,1
listopad	42	53,52	2,49	217,50	6,2
studeni	29	55,24	2,44	214,93	6,1
prosinac	26	59,12	2,33	225,54	5,9

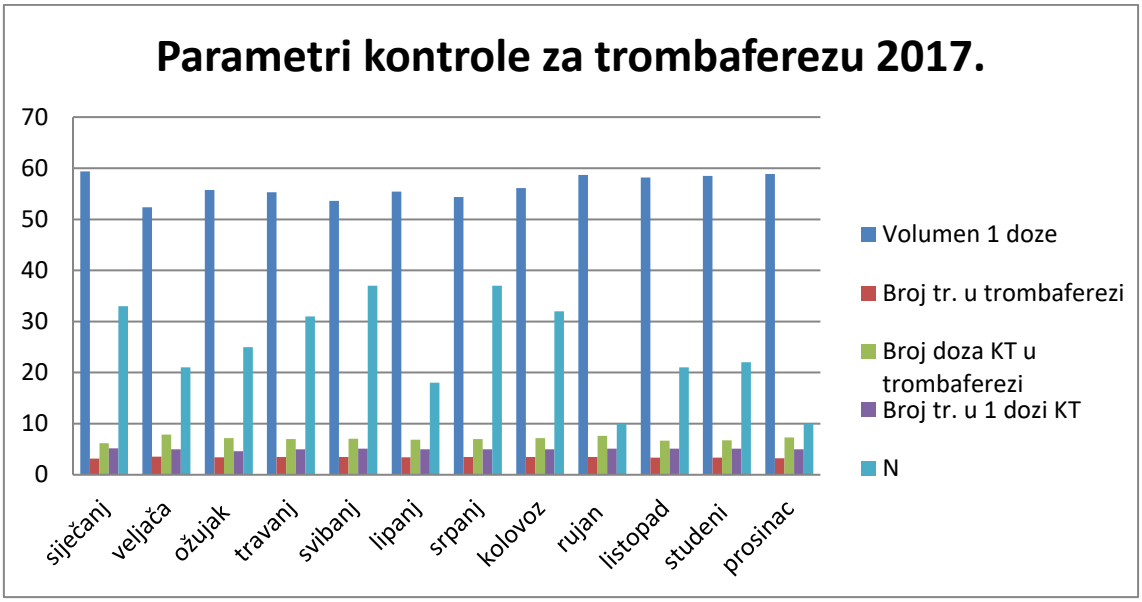


Slika 10. Grafički prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih BC metodom u 2017. godini

(na vodoravnoj osi x prikazano je vremensko razdoblje za prošlu godinu, a na okomitoj osi y prikazana je brojčana vrijednost volumena „pool-a“ (ml), volumena 1 doze (ml), broja trombocita u „pool-u“ ($x10^{11}$), broj trombocita u 1 dozi ($x10^{10}$) koncentrata trombocita i broj mjesečnih uzoraka)

Tablica 4. Prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih metodom trombafereze u 2017. godini

Vremensko razdoblje	**Broj koncentrata trombocita**	**Volumen 1 doze (ml)**	**Broj trombocita u trombaferezi (x 10^{11})**	**Broj doza koncentrata trombocita u trombaferezi**	**Broj trombocita u 1 dozi (x 10^{10})**
siječanj	33	59,36	3,2	6,18	5,2
veljača	21	52,35	3,56	7,87	5
ožujak	25	55,75	3,43	7,20	4,6
travanj	31	55,27	3,5	6,97	5
svibanj	37	53,58	3,49	7,05	5,1
lipanj	18	55,44	3,4	6,89	5
srpanj	37	54,36	3,47	6,97	5
kolovoz	32	56,14	3,47	7,19	5
rujan	10	58,71	3,48	7,60	5,1
listopad	21	58,16	3,38	6,67	5,1
studeni	22	58,50	3,36	6,77	5,1
prosinac	10	58,84	3,26	7,30	5

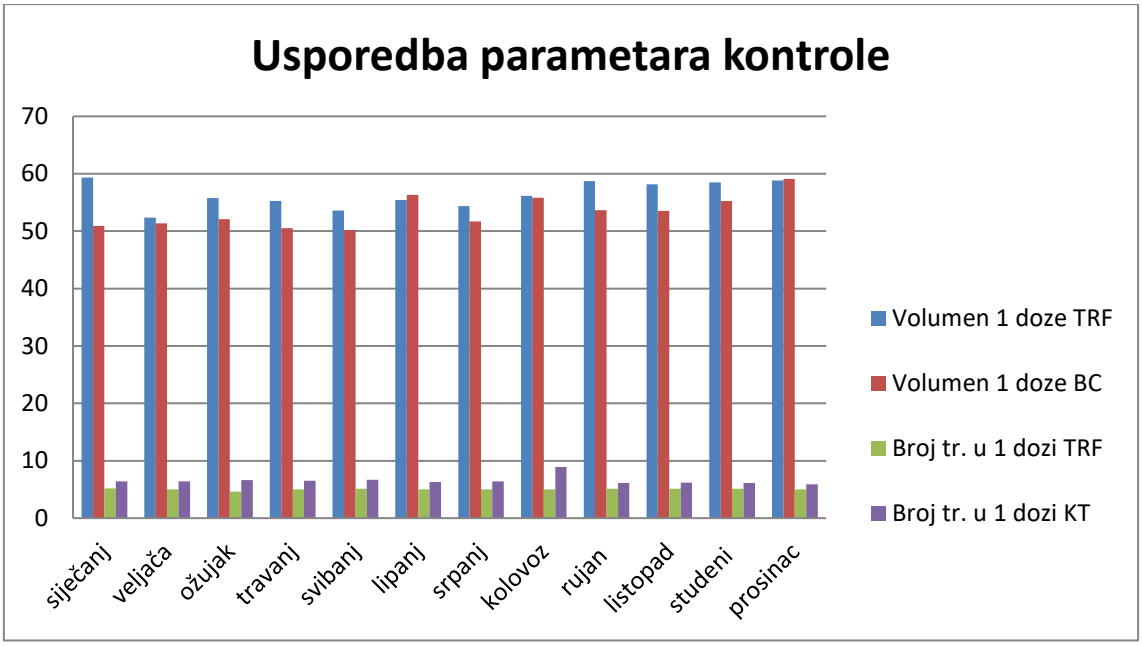


Slika 11. Grafički prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih metodom trombafereze u 2017. godini

(na vodoravnoj osi x prikazano je vremensko razdoblje za prošlu godinu, a na okomitoj osi y prikazana je brojčana vrijednost volumena 1 doze koncentrata trombocita (ml), broja trombocita u trombaferezi ($x10^{11}$), broj doza koncentrata trombocita, broj trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita ($x10^{10}$) i broj mjesečnih uzoraka)

Tablica 5. Usporedba parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze

Vremensko razdoblje	**Volumen 1 doze KT**		**p**	**Broj trombocita u 1 dozi (x 10^{10})**		**p**
	„buffy coat“	**trombafereza**		**„buffy coat“**	**trombafereza**	
2017. god	53,37	56,37	0.0086	6,54	5,02	<0.0001



Slika 12. Grafički prikaz usporedbe volumena i broja trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze
(na vodoravnoj osi x prikazano je vremensko razdoblje za prošlu godinu, a na okomitoj osi y prikazana je brojčana vrijednost volumena (ml) i broja trombocita (x10^{10}) po 1 dozi koncentrata trombocita za BC metodu i metodu trombafereze)

Korištenjem statističke metode t-testa za 2 nezavisna uzorka, rezultati pokazuju statistički značajnu razliku ($p<0,05$) u volumenu 1 doze i broja trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita, između BC metode i metode trombafereze.

Prosječni volumen 1 doze koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom je 53,37 ml, dok je prosječan volumen u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog metodom trombafereze 56,37 ml ($p=0,0086$), razlika u prosječnim volumenima koncentrata trombocita je 3 ml.

Broj trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom je 6,54 $x10^{10}$/L, dok je prosječan broj trombocita po 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog metodom trombafereze 5,02 $x10^{10}$/L ($p<0,0001$), razlika u prosječnom broju trombocita po dozi trombocita je 1,52 $x10^{10}$.

5. RASPRAVA

Na temelju dobivenih i statistički obrađenih rezultata dokazano je postojanje statistički značajne razlike u volumenu 1 doze koncentrata trombocita i broja trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze. Volumen 1 doze koncentrata trombocita veći je u pripravku proizvedenom metodom trombafereze. Za razliku od navedenog, broj trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog metodom trombafereze je znantno manji od broja trombocita u pripravku proizvedenom BC metodom. U prethodnim istraživanjima rezultati su uglavnom sukladni s rezultatima našeg istraživanja.

Prema jednogodišnjoj prospektivnoj studiji koja je obuhvaćala 400 pripravaka trombocita od kojih je 50% proizvedenih BC metodom, a 50% metodom trombafereze, utvrđeno je da metoda proizvodnje koncentrata trombocita utječe na kvalitetu pripravka. Mallhi i suradnici su utvrdili veći volumen kod koncentrata trombocita proizvedenih trombaferezom te pozitivni učinak viška volumena plazme na održavanje pH tijekom skladištenja zbog njenog puferskog kapaciteta. Broj trombocita u pripravku trombocita veći je kod pripravaka proizvedenim BC metodom, a razina ostatnih leukocita približno ista obzirom na leukofiltraciju svih koncentrata trombocita. Zaključak je u navedenom istraživanju da koncentrati trombocita proizvedeni metodom trombafereze imaju prednost u liječenju bolesnika koji su imunokomprimitirani, iz razloga bolje funkcionalnosti i vijabilnosti trombocita. Nadalje, koncentrati trombocita proizvedeni metodom trombafereze imaju svoje prednosti jer se primatelji izlažu manjem riziku prijenosa zaraznih bolesti i manja je učestalost nastanka nuspojava. Ipak, metoda trombafereze je skuplji način proizvodnje koncentrata trombocita zbog dodatnih troškova za separatore, instrumente, setove i edukacije osoblja. (13)

O razlikama između koncentrata trombocita proizvedenim različitim metodama i rizika za prijenos zaraznih bolesti govori i rad autora Hitzler-a WE. Pokazano je da je rizik za prijenos zaraznih bolesti veći u slučaju transfundiranih trombocita proizvedenih BC metodom, a mogućnost otkrivanja rizika manja obzirom na način proizvodnje. Razlog je u tome što BC metoda tijekom pripreme koncentrata trombocita spaja 4 doze dobivene od 4 različita darivatelja. Stoga, ako pacijent treba 8 doza koncentrata trombocita i primi trombocite proizvedene metodom trombafereze od istog donora, rizik za prijenos zaraznih bolesti ostaje isti, dok primanjem 8 doza koncentrata trombocita proizvedenih

BC metodom rizik za prijenos zaraznih bolesti se povećava 8 puta. Jedini način da se rizik prevenira ili smanji je češće transfundiranje pripravaka proizvedenih metodom trombafereze. To se može postići povećanjem donacija tom metodom. Potrebno je povećati broj DDK u populaciji i zadržati postojeću učestalost darivanja krvi ovom metodom. Hitzler WE zaključuje da unatoč učinkovitosti u liječenju, razlike za rizik prijenosa zaraznih bolesti između koncentrata trombocita proizvedenih na oba načina ipak postoje. (14)

Zanimljivo je i istraživanje Bashir i suradnika prema kojem je napravljena usporedba koncentrata trombocita skladištenih u plazmi i hranjivoj otopini PAS (*engl. Platelet Additive Solution*). Polovici nasumično odabranim koncentratima trombocita je uklonjena plazma i u istom volumenu zamijenjen PAS-om, dok drugoj polovici nije uklonjena plazma i hranjiva otopina nije stavljena. Koncentrati su skladišteni tijekom 10 dana i uočene su razlike u broju, srednjem volumenu i vrtloženju trombocita. U vrećicama s PAS-om broj trombocita se beznačajno smanjio, srednji volumen je gotovo svih 10 dana skladištenja ostao nepromijenjen, a vrtloženje trombocita je pokazalo bolje rezultate, odnosno očuvanost morfologije trombocita. Zaključno, parametri kvalitete trombocita imaju bolje rezultate ukoliko se čuvaju u vrećicama s PAS-om. (15)

Istraživanje koje ide u prilog dosad navedenom je istraživanje Taldukdar-a i suradnika. Od 105 doniranih doza krvi proizvedeno je 105 koncentrata trombocita, od toga 40 BC metodom, 40 iz PRP, a 25 metodom trombafereze. Mjereni su slijedeći parametri kontrole: volumen, vrtloženje, broj trombocita, ostatni leukociti i pH. Volumeni trombocita dobivenih iz BC i PRP metodom su približno jednaki, dok je volumen kod trombocita dobivenih metodom trombafereze nekoliko puta veći. Vrtloženje je na skali mjerenja za sve tri vrste pripravka imalo rezultate 3. Broj trombocita je kod BC i PRP metode proizvodnje bio sličan i nije bilo statistički značajne razlike. Ostatnih leukocita je bilo najmanje kod trombocita dobivenih metodom trombafereze. Konačno, BC i PRP metoda su usporedive u svim parametrima i varijacije su minimalne. Trombociti proizvedeni metodom trombafereze su imali najbolje rezultate prema parametrima kontrole kvalitete. (16)

Nedostatak ovog istraživanja je u tome što nije urađena procjena funkcionalnosti i vijabilnosti trombocita u svrhu procjene kvalitete trombocita. Bez obzira na veći broj trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenim BC metodom u odnosu na

one koncentrate trombocita proizvedenim metodom trombafereze, ne možemo zaključiti bolju kliničku iskoristivost. Trombociti proizvedeni BC metodom su podvrgnuti dvostrukim centrifugiranjem i pri tom moguće deaktivirani. Time se smanjuje njihov funkcionalan kapacitet u cirkulaciji primatelja. Tema budućeg istraživanja mogla bi biti procjena funkcionalnosti trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze.

6. ZAKLJUČCI

Na kraju ovog istraživanja zaključeno je slijedeće:

1. Utvrđena je statistički značajna razlika u volumenu 1 doze koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom i metodom trombafereze u 2017. godini u ZTM, KBC Split
2. Utvrđena je statistički značajna razlika u broju trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom i metodom trombafereze u 2017. godini u ZTM, KBC Split
3. Koncentrati trombocita proizvedeni na oba načina zadovoljavaju zahtjeve kontrole kvalitete
4. Nije utvrđeno značajno odstupanje u parametrima volumena koncentrata trombocita i broja trombocita u 1 dozi na mjesečnoj razini u 2017. g.

7. LITERATURA

1. Labar B, Hauptmann E i sur: *Hematologija*. Zagreb: Školska knjiga; 2007.

2. Jukić I, Pleša Golubović V i sur: *Promidžba i organizacija akcija dobrovoljnog davalaštva krvi*. Zagreb: Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske; 2001.

3. *Pravilnik o posebnim tehničkim zahtjevima za krv i krvne pripravke*, NN 80/2007
   Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_80_2516.html (02.07.18.)

4. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu. O darivanju. Dostupno na: http://www.hztm.hr/hr/content/2/darivanje-krvi/14/o-darivanju/ (02.07.2018.)

5. Za*kon o krvi i krvnim pripravcima*, NN 79/2006
   Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_07_79_1916.html (02.07.18.)

6. Redovniković A, Skodlar J, Grgičević D, Dorić A: *Preporuke za pripravu, uporabu i osiguranje kvalitete krvnih pripravaka*. Zagreb: Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske; 2002.

7. Jukić M, Gašparović V, Husedžinović I, Majerić Kogler V, Perić M, Žunić J: *Intenzivna medicina*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.

8. Jakšić B, Labar B, Grgić D: *Hematologija i transfuziologija*. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada; 1989.

9. *Pravilnik o sustavu sljedivosti krvnih pripravaka i praćenju ozbiljnih štetnih događaja i ozbiljnih štetnih reakcija*, NN 63/2007
   Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_06_63_1975.html (02.07.18.)

10. Grgičević D i sur: *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.

11. Radna uputa RU-OKK-023, KBC Split, ZTM, OKOK, OKK

12. Radna uputa RU-OKK-024, KBC Split, ZTM, OKOK, OKK

13. Mallhi R. S, Kumar S, Philip J: *A comparative assessment of quality of platelet concentrates prepared by buffy coat poor platelet concentrate method and apheresis derived platelet concentrate method.* Indian J Hematol Blood Transfus, 2015 dec;31(4):453-9.
Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542762/ (02.07.18.)

14. Hitzler WE: *Single-donor (apheresis) platelets and pooled whole-blood-derived platelets – significance and assessment of both blood products*. Clin lab. 2014;60(4):51-39
Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779310 (02.07.18.)

15. Bashir S, Mohsin S, Amin H, Rehman M, Hussain S, Saeed T: *Comparison of changes in platelet count, mean platelet volume and swirling in stored platelet concentrates with and without platelet additive solution.* Journal of applied hematology. 2014, DOI: 10.4103/1658-5127.131819
Dostupno na: http://www.jahjournal.org/article.asp?issn=1658-5127;year=2014;volume=5;issue=1;spage=10;epage=14;aulast=Bashir (02.07.18.)

16. Talukdar B, Chakraborty S, Hazra R, Biswas K, Bhattacharya P: *Quality assessment of platelet concentrates: A comparative study using three different methods.* International Journal of Biomedical Research, 2017; 8(04):194-199
Dostupno na : https://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/4032/2762 (02.07.18.)

8. SAŽETCI

Cilj: Cilj ovog rada je utvrditi postoji li statistička razlika u volumenu i broju trombocita 1 doze koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze.

Metode: Podaci o parametrima kontrole kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih na oba načina za vremensko razdoblje od 1 godine (2017.g.) prikupljeni su u ZTM, KBC Split. Uspoređeni su prosječni mjesečni rezultati za volumen i broj trombocita po 1 dozi koncentrata trombocita korištenjem t-testa za 2 nezavisna uzorka.

Rezultati: Dokazano je postojanje statistički značajne razlike u volumenu 1 doze koncentrata trombocita i broja trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita uspoređivanjem 2 metoda proizvodnje koncentrata trombocita. Prosječni volumen 1 doze koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom je 53,37 ml naspram 56,37 ml 1 doze koncentrata trombocita proizvedenog metodom trombafereze (p=0,0086). Broj trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom je 6,54 $x10^{10}$/L naspram 5,02 x10 ^{10}/L po 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog metodom trombafereze (p<0,0001).

Zaključci: Ovim istraživanjem dokazane su razlike u volumenu i broju trombocita po 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenog BC metodom i metodom trombafereze u ZTM, KBC Split.

Ključne riječi: koncentrat trombocita, sloj leukocita i trombocita, trombafereza, kontrola kvalitete

SUMMARY

Objective: The aim oft his study was to determine statistically significant difference in volume and platelet count per 1 dose of platelet concentrates produced by buffy-coat method and plateletpheresis.

Methods: All data about quality control of platelet concentrates from 2017. produced by buffy coat method and plateletpheresis method were taken from ZTM, KBC Split. There were compared monthly average of volume per 1 dose of platelet concentrate and number of platelets per 1 dose of platelet concentrate. Statistic method t-test for two independent samples was used.

Results: The results showed statistic significant difference in volume per 1 dose of platelet concentrate and number of platelets per 1 dose of platelet concentrate. The average volume per 1 dose of buffy coat produced platelet concentrate was 53,37 ml, while 56,37 ml was per 1 dose of plateletpheresis produced platelet concentrate ($p=0.0086$). The number of platelets per 1 dose of platelet concentrate produced by buffy coat was 6,54 $x10^{10}$/L, while 5,02 $x10^{10}$/L was per 1 dose of plateletpheresis produced platelet concentrate ($p<0,0001$).

Conclusions: This research proved some differences in volume and number of platelets per 1 dose of platelet concentrates produced by buffy coat and plateletpheresis at ZTM, KBC Split.

Keywords: platelet concentrate, buffy-coat method, plateletpheresis, quality control

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Josipa Matenda

Datum rođenja: 29.02.1996. god.

Adresa i mjesto stanovanja: Stanka Vraza 15, 21 000 Split

Kontakt: 095 393 49 70

E-mail: jmatenda96@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- Osnovna škola: Visoka, Split (2002.-2010.)
- Srednja škola: 1. jezična gimnazija, Split (2010. -2014.)
- Zdravstveno veleučilište, Zagreb – MLD (2014. -2015.)
- Odjel zdravstvenih studija, Split – MLD (2015. -2018.)

AKTIVNOSTI:

- Sudjelovanje na 4. Kongresu strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost (HKZR), Medicinsko-laboratorijska dijagnostika u praksi, Zagreb (7.-9. lipnja 2018. god.)

Prilozi slika i tablica

Slike:

Slika 1. Prikaz stvaranja trombocita
Slika 2. Prikaz građe trombocita
Slika 3. Prikaz adhezije i agregacije trombocita
Slika 4. Prikaz sadržaja alfa granula i gustih granula
Slika 5. Prikaz poremećaja funkcije (adhezije, agregacije, sekrecije i prokoagulantne aktivnosti) trombocita sa pripadajućim bolestima
Slika 6. Prikaz liječenja koncentratima trombocita, u svrhu sprječavanja i zaustavljanja krvarenja
Slika 7. Grafički prikaz postotaka općeg korištenja transfuzijskih pripravaka po odjelima
Slika 8. Prikaz svih faza rada laboratorija
Slika 9. Algoritam postupanja u slučaju nesukladnog nalaza kontrole kvalitete
Slika 10. Grafički prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih BC metodom u 2017. godini
Slika 11. Grafički prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih metodom trombafereze u 2017. godini
Slika 12. Grafički prikaz usporedbe volumena i broja trombocita u 1 dozi koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze

Tablice:

Tablica 1. Opća pravila za DDK
Tablica 2. Parametri kontrole kvalitete, zahtjevi kvalitete i učestalost kontrole
Tablica 3. Prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih BC metodom u 2017. godini
Tablica 4. Prikaz parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita dobivenih metodom trombafereze u 2017. godini
Tablica 5. Usporedba parametara kontrole kvalitete koncentrata trombocita proizvedenih BC metodom i metodom trombafereze