



## Simpozij 1 – Dobrovoljno davalatstvo i uzimanje krvi

### DARIVANJE KRVI U DOBA KORONE ISKUSTVA HRVATSKOG ZAVODA ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU

TOPIĆ ŠESTAN P.<sup>1</sup>, Čeđec V.<sup>1</sup>, Mušlin T.<sup>1</sup>, Repušić Babacanli M.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• *Odjel za davalatstvo krvi*

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• *Ravnateljstvo*

**Uvod:** Dana 21. veljače 2020. godine nulti bolesnik od COVID-19 u RH pristupio je akciji darivanja krvi u „Ericssonu“ i odbijen je radi povratka iz Italije (17. veljače 2020. godine obavijest liječnicima na pregledu o odgodi darivatelja nakon povratka iz zemalja u kojima je potvrđen SARS-CoV-2 među kojima je i bila Italija). 26. veljače nadležni epidemiolog obavještava HZTM o potrebi samoizolacije djelatnika koji su bili u kontaktu sa oboljelim te izdvajanja doza pune krvi bliskih kontakata oboljelog. Od toga dana dolazi do bitnih promjena u funkcioniranju Odjela za davalatstvo krvi koje uključuju usklađivanje organizacije rada i akcija darivanja krvi sa epidemiološkim mjerama, brojne apele radi smanjenih zaliha krvi, smanjen odaziv darivatelja na akcije radi bolesti i samoizolacije, poteškoće u nabavi materijala za rad (dezinficijensi), izolacije i samoizolacije terenskih ekipa, otkazivanje planiranih akcija i prikupljanje konvalescentne plazme. Pandemija COVID-19 ima veliki utjecaj na sve segmente rada u Odjelu za davalatstvo krvi i u konačnici je rezultirala smanjenim zalihama krvnih pripravaka.

**Cilj:** Prikazati utjecaj pandemije COVID-19 na provedbu i ostvarenje planiranih akcija darivanja krvi, broj prikupljenih doza i stanje zaliha krvi u 2020. godini u usporedbi sa rezultatima iz predpandemijske 2019. godine te izazove s kojima smo se susreli u Odjelu za davalatstvo krvi.

**Metode:** Prikazani su podaci iz Godišnjeg izvješća Odjela za davalatstvo krvi za 2020. godinu te uspoređeni sa podacima iz predpandemijske 2019. godine.

**Rezultati:** U 2020. godini pet terenskih ekipa i dvije stacionirane u HZTM-u prikupile su 86 354 doze pune krvi što je za 11 869 doza manje nego 2019. godine, kada su prikupljene 98 223 doze pune krvi. Godišnji plan potreba za krvnim pripravcima iskazan od strane bolnica prema kojima HZTM ima obvezu opskrbe s krvnim pripravcima u 2020. godini nije zadovoljen, prikupljeno je 10 251 doza manje od iskazane potrebe, koja je iznosila 96 605 doza krvi. Za razliku od 2020. godine u 2019. godini prikupljeno je 488 doza više od zahtijevanog (97 775). U 2020. godini isporučeno je 88 865 koncentrata eritrocita što je za 7 704 manje nego u 2019. godini kada je isporučeno 96 569 koncentrata eritrocita. Na darivanje krvi pristupilo je 12163 darivatelja manje (u 2020. godini 106 741 darivatelj, u 2019. godini 118 904 darivatelja krvi). Udio odbijenih darivatelja je za 1,71% veći u 2020. godini kada je odbijeno 20 387 (19,10 %) u usporedbi sa 2019. godinom kada je odbijeno 20 681 (17,39 %) darivatelja krvi. U 2020. godini organizirane su 892 akcije, 40 manje nego u 2019. godini (organizirane 932 akcije). Od toga je 728 akcija bilo u organizaciji vanjskih Gradskih društava Crvenog križa, kod kojih radi organiziranja izvanrednih akcija bilježimo porast (2019. godine organizirano 725 akcija). Gradsko društvo Crvenog križa Zagreb organiziralo je 135 akcija, što je 29 akcija manje nego 2019. godine (organizirali 164 akcije). HZTM u 2020. godini također bilježi 14 akcija darivanja manje u vlastitoj organizaciji (TEZA). U 2020. godini organizirano je 29 akcija dok su 2019. organizirane 43 akcije. Za razliku od pune krvi u HZTM-u na 3 stanična separatora Haemonetics MCS+ i 3 Amicusa izvedeno je 87 trombafereza više u 2020. (3 298) u usporedbi sa 2019. (3 211). U 2020. godini započeli smo prikupljanje konvalescentne plazme i izvedeno je 39 procedura.

**Zaključak:** Unatoč značajno smanjenom broju prikupljenih doza krvi u 2020. godini, smanjenom odazivu darivatelja na akcije, otkazivanju velikog broja akcija darivanja krvi, nemogućnošću uključivanja maturanata u prvo darivanje krvi i brojnim drugim problemima s kojima smo se susreli brzom prilagodbom novonastaloj situaciji koja je uključivala svakodnevno praćenje epidemiološke situacije u zemlji i svijetu te organizaciju rada

prema epidemiološkim preporukama, davanje pravovremenih informacija liječnicima na terenu, kontakte sa epidemiolozima radi procjene ugroženosti djelatnika izloženih oboljelima, organizaciju rada „fiksni“ terenskih ekipa, povlačenje većih zaliha materijala potrebnih za rad, povećanje broja trombafereza radi zadovoljenja potreba za koncentratima trombocita i uvođenje novog postupka prikupljanja konvalescentne plazme za liječenje COVID-19 bolesnika, uspjeli smo osigurati sigurne krvne pripravke.

U ovim izazovnim vremenima kada COVID-19 mijenja čitavi svijet, pa tako i davalaštvo krvi, još jednom je dokazana uloga darivatelja krvi kao bazičnog čimbenika transfuzijske medicine.

## POSTDONACIJSKE INFORMACIJE

VUKT.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Služba upravljanja kvalitetom u transfuzijskoj medicini

### Uvod

Zbog cijelog niza svojih karakteristika, transfuzijska medicina zauzima posebno mjesto u području medicinske znanosti. Iz ovakvog položaja proizlazi i posebna skrb društvene zajednice ali i odgovornost transfuzijske službe za osiguranjem dostupnog, kvalitetnog i sigurnog transfuzijskog liječenja.<sup>1</sup>

Povijest transfuzijske medicine obilježena je stalnim tehnološkim napretkom i inovacijama. Primjena visoko osjetljivih testova u probiru davatelja, leukofiltracija krvnih pripravaka, postupci redukcije patogena i sustav hemovigilancije među najistaknutijim su mjerama koje su doprinijele značajnom smanjenju učestalosti brojnih rizika i unapređenju sigurnosti transfuzijskog liječenja.<sup>2</sup>

Postupak odabira davatelja koji obuhvaća predonacijsko informiranje, prikupljanje podataka upitnikom i razgovorom te procjenu zdravstvenog stanja pregledom ostaje međutim jedan od ključnih faktora sigurnosti, kako krvnih pripravaka za transfuzijsko liječenje tako i davatelja. Nažalost, postupak odabira nije potpuno učinkovit u dobivanju svih relevantnih informacija koje bi rezultirale pravovremenim odbijanjem davatelja. Neke informacije ostaju neotkrivene ili se za njih dozna tek naknadno, često na slijedećoj donaciji ili nakon više njih. Učestalost neotkrivenih informacija o davateljima koja bi rezultirala njihovim odbijanjem procjenjivana je anonimnim upitnicima u nekoliko studija. Kanadsko istraživanje provedeno na 40 000 davatelja koji su zamoljeni da ispune anonimni upitnik nekoliko tjedana nakon donacije, pokazalo je da je neotkriveni rizik možda bio prisutan u 4,3% davatelja koji prvi puta daruju krv i u 3,4% višestrukih davatelja.<sup>3</sup>

Postdonacijske informacije (PDI) su, unatoč njihove redovite i učestale pojave, rijetka tema stručnih skupova i publikacija. Objavljene studije dolaze prije svega iz SAD i Kanade. Europske studije su rijetke i uglavnom ih objavljuju francuski autori. To je posljedica činjenice da je Francuska kolijevka hemovigilancije i ima veliko iskustvo u promicanju sigurnosti transfuzijskog liječenja. Praćenje učestalosti, vrste i uzroka postdonacijskih informacija iznimno je važno za donošenje mjera koje će unaprijediti učinkovitost postupka odabira davatelja.

### Definicija i učestalost PDI

PDI se može definirati kao bilo koja informacija dobivena od davatelja nakon donacije, a koja bi, da je bila poznata transfuzijskoj ustanovi tijekom procesa odabira, rezultirala odbijanjem davatelja.<sup>2</sup> U situacijama kada je ovakva informacija dobivena od neke druge osobe, pouzdanost iste treba biti pažljivo procijenjena. Neke definicije mogu se u određenoj mjeri razlikovati od navedene, što prije svega ovisi o tome da li je u vrijeme donacije rizik bio poznat davatelju ili ne. Neki autori definiciju PDI ograničavaju na informacije koje su u vrijeme postupka odabira bile poznate davatelju, ali zbog različitih razloga nisu otkrivene. Razumljiv je interes stručnjaka upravo za ovaj tip PDI, jer je identifikacijom i uklanjanjem uzroka istih moguće unaprijediti postupak odabira davatelja. Međutim, termin „postdonacijska informacija“ odnosi se i na bolesti i stanja čiji simptomi nastaju tek nakon davanja krvi, najčešće unutar nekoliko sati ili dana. Uglavnom se radi o simptomima zarazne bolesti, a informiranje transfuzijske ustanove o razvoju ovakvih simptoma predstavlja odgovorno ponašanje davatelja, sukladno uputama koje im ustanove koje prikupljaju krv pružaju.

Podaci o učestalosti PDI su rijetki, a njihovu usporedbu dodatno otežavaju i različite definicije. Prema izvješćima FDA, PDI su najčešće prijavljivano odstupanje bioloških proizvoda (eng. blood product deviation – BPD). U 2017. godini je 74,6% svih BPD bilo vezano uz prikladnost davatelja za davanje krvi, a gotovo u cijelosti

(97,1%) posljedica PDI.<sup>4</sup> Prema rezultatima objavljenih studija iz Kanade i USA<sup>5</sup>, Hrvatske<sup>6</sup> i Francuske<sup>7</sup>, učestalost PDI kretala se od 0,11% do 0,44% donacija.

### Karakteristike davatelja povezanih s PDI

Prema literaturnim podacima, PDI su učestalije kod muških davatelja, koji su stariji i višeg stupnja obrazovanja od propisno odbijenih davatelja.<sup>8</sup> Oni su predominantno višestruki davatelji, a jedno od mogućih objašnjenja je kako višestruki davatelji vjeruju da znaju sva pitanja i odgovarajuće odgovore, zbog čega površno čitaju upitnik. Prema Glynnu, davanje krvi motivirano testiranjem i povjerljivo isključivanje donacije (eng. „*confidential unit exclusion*“) rjeđi su kod davatelja u programu afereza u odnosu na višestruke davatelje pune krvi.<sup>9</sup> Obiteljski davatelji često nisu adekvatno informirani o stanjima koja ih čine neprikladnima za davanje krvi.<sup>10</sup>

### Klasifikacija PDI

PDI mogu biti klasificirane prema vremenu njihove detekcije. Vuk i suradnici pri tome razlikuju rane i kasne PDI, pri čemu u kategoriju ranih PDI uključuju informacije zaprimljene nakon donacije, ali prije slijedeće donacije.<sup>6</sup> Uglavnom se ove informacije zaprimaju u kratkom vremenu nakon donacije i odnose se na razvoj simptoma zarazne bolesti. U ovu kategoriju Vuk i suradnici ubrajaju i informacije dobivene tijekom donacije, u razgovoru s djelatnicima na uzimanju krvi. Kasne PDI otkrivaju se na slijedećoj donaciji ili nakon više njih i odraz su nesavršenosti postupka odabira. Prema rezultatima studije provedene u RH, 76,4% PDI identificirano je prilikom slijedećih donacija.<sup>6</sup> Za razliku od ranih PDI, većina priprema vezanih uz kasne PDI više nije dostupna na skladištu transfuzijske ustanove.

Velika većina PDI može se prema svojem tipu klasificirati u slijedeće kategorije: zarazne bolesti ili kontakt sa zaraženim osobama, povijest putovanja, kirurški zahvati, endoskopija/invazivni dijagnostički postupci, seksualni rizici, neseksualni rizici zaraze (tetovaža, piercing...), drugi medicinski razlozi (lijekovi, cjepiva, itd.). Tri najčešća tipa PDI u hrvatskoj studiji bili su neseksualni rizici kao što su tetoviranje i piercing (17,5%), kirurški zahvati (17,1%) i povijest putovanja (16,1%).<sup>6</sup>

Prema neobjavljenim podacima HZTM, PDI povezane s pandemijom COVID-19 postale su vodeće, uz smanjenje učestalosti drugih tipova PDI (posljedica edukacije, ali i smanjenja putovanja i drugih faktora povezanih s pandemijom COVID-19). Na učestalost PDI utječu i neki društveni trendovi, poput učestalijeg tetoviranja kod mlađe populacije.

### Uzroci PDI i mjere za smanjenje učestalosti neotkrivenih rizika

PDI mogu nastati kao posljedica čimbenika povezanih s davateljima, osobljem i organizacijom te edukacijskim materijalima i upitnikom. Neki uzročni čimbenici međusobno su ovisni i isprepleteni, što otežava procjenu utjecaja svakog od njih zasebno. Važan izvor informacija o uzrocima neotkrivanja različitih informacija tijekom postupka odabira su ankete među davateljima s povijesti PDI, anonimne ankete među davateljima te postdonacijsko savjetovanje davatelja pozitivnih na biljege krvlju prenosivih bolesti. U nastavku su navedeni vodeći uzroci pojave PDI te mjere kojima se njihova učestalost može smanjiti. Detaljniji pregled ovih uzroka i preventivnih mjera dostupan je u nedavno objavljenoj studiji.<sup>2</sup>

Čimbenici koji se odnose na davatelje uključuju: površno čitanje informativnih materijala i upitnika, manje pažnje posvećeno pitanjima koja se pojavljuju kasnije u upitniku, otežano prisjećanje datuma putovanja i drugih aktivnosti, pogrešno tumačenje ili nerazumijevanje pitanja, nerazumijevanje opasnosti, neispravna procjena razine vlastitih rizika, nelagoda u iznošenju informacija povezanih s pojedinim rizicima, želja za testiranjem, stav da se „sva krv ionako testira“ a testovi smatraju apsolutno pouzdanima, slobodni dani kao motivacija za davanje krvi, izrazita želja za davanjem krvi, izostanak uočavanja promjena u kriterijima odabira, i sl. Navedeni uzroci sugeriraju važnost trajnog ulaganja u edukaciju davatelja.

Od čimbenika vezanih uz edukacijske materijale treba izdvojiti: suviše opsežne materijale s puno informacija, nisku motiviranost za čitanje materijala (osobito kod višestrukih davatelja), previd/pogrešno shvaćanje edukacijskih materijala i sl. Edukacijski materijali pomoć su davateljima u razumijevanju upitnika, ali i ostalih aspekata vezanih uz davanje krvi i zakonska su obveza u mnogim zemljama. Važno je da ovi materijali budu razumljivi, informativni i zanimljivi davateljima različitih dobnih skupina i razina obrazovanja. Ne smiju biti suviše dugački, a poželjno je i uključivanje slika. Važno je da ovi materijali sadrže informaciju kako testovi koji se koriste u ispitivanju biljega krvlju prenosivih bolesti ne mogu otkriti uzročnike u ranoj fazi infekcije te da naglase rizike infekcija čiji se uzročnici rutinski ne testiraju. Edukacijski materijali trebali bi biti validirani prije primjene.

Čimbenici primarno vezani uz upitnik uključuju: osjetljivu prirodu pojedinih pitanja, neodgovarajuću strukturu upitnika ili formulaciju pitanja, neadekvatno definirane pojmove, više pitanja unutar jednog pitanja, dugačka pitanja, pitanja temeljena na vremenu događaja/postupaka/aktivnosti koja nisu u kronološkom slijedu, način primjene upitnika i sl. Sve stroži zahtjevi pri odabiru davatelja rezultirali su povećanjem broja pitanja, što može imati negativan utjecaj na pažnju i motivaciju davatelja, osobito višestrukih. Sukladno tome, slijedeće mjere mogu pomoći u smanjenju PDI uzrokovanih ovim čimbenicima: razumljiva, jednostavna i izravna pitanja, grupiranje/smanjenje broja sličnih pitanja, primjena individualiziranih upitnika (prema spolu, dobi, vrsti i učestalosti donacija, različiti upitnici za nove i višestruke davatelje), pitanja složena logičkim slijedom, važnija pitanja postavljena ranije, jedna stavka po pitanju, prikladna duljina upitnika, samostalno ispunjavanje upitnika i primjena audio-komputerski asistiranog intervjua (ACASI).

Prilikom izrade upitnika treba uzeti u obzir načela kognitivne psihologije, kako bi se povećala pouzdanost dobivenih odgovora. Jednako tako, važna je i validacija upitnika prije rutinske primjene.

Neki uzroci mogu se pripisati osoblju i organizacijskim pitanjima, kao što su npr. pitanje privatnosti tijekom razgovora i povjerljivost podataka, kompetencije i edukacija osoblja, okruženje na mjestu davanja krvi i sl. Mjere kojima se smanjuje rizik PDI u ovom području uključuju: osiguravanje privatnosti tijekom intervjua i povjerljivosti informacija, kontinuirano praćenje PDI i analiza podataka radi unapređenja prakse, izradu smjernica za upravljanje PDI, početnu i trajnu edukaciju i osposobljavanje osoblja odgovornog za odabir davatelja te osiguravanje alternativnih mjesta testiranja u slučaju sumnje na rizik.

## Upravljanje PDI

Učinkovito upravljanje PDI zahtijeva blisku suradnju različitih dionika uključenih u ovaj proces i uspostavu pisanih postupaka koji opisuju slijed aktivnosti i definiraju odgovornosti za njihovu provedbu. Nakon zaprimanja PDI, potrebno je prikupiti što je moguće više relevantnih informacija kako bi se pomoglo u procjeni rizika i donošenju odluka o daljnjim aktivnostima i njihovom opsegu. Utvrditi treba na koje se donacije (jednu ili više njih) odnosi PDI, te procijeniti potencijalne rizike za kvalitetu i sigurnost pripravaka iz zahvaćenih donacija, odnosno za sigurnost davatelja. Ovisno o vrsti PDI, mogu se analizirati parametri kao što su: vrijeme proteklo od potencijalnog rizika i donacije, osjetljivost korištenih testova, mogućnost izvođenja dodatnih testova, mogućnost dobivanja medicinske dokumentacije od davatelja krvi, vrsta krvnog pripravka (klinička upotreba ili frakcioniranje), karakteristike krvnih pripravaka proizvedenih iz zahvaćenih donacija i njihov utjecaj na određeni patogen (redukcija patogena, vrijeme skladištenja..), itd.

Akcijski plan uključuje donošenje odluke o karanteni dostupnih krvnih pripravaka, povlačenje izdanih krvnih pripravaka, moguće dodatno testiranje uzoraka davatelja itd. Treba napomenuti da odluke uvijek trebaju biti u skladu sa zakonskim zahtjevima u određenoj zemlji. Novija studija o povlačenju krvnih pripravaka u SAD, temeljena na izvješćima FDA za razdoblje 2013–2017, pokazala je kako je 60% od 4700 postupaka povlačenja bilo povezano s odstupanjima vezanim uz davatelje.<sup>11</sup> Vodeći uzrok povlačenja u ovoj kategoriji bile su PDI.

Važna je i kvalitetna suradnja s bolničkim transfuzijskim ustanovama i kliničarima u slučaju povlačenja pripravaka i kada je indiciran look-back postupak. Ugovor s centrom za frakcioniranje mora definirati način i kriterije obavješćivanja o PDI.

Nakon što su provedene sve hitne aktivnosti, ustanova koja prikuplja krv mora utvrditi da li je PDI rezultat greške u procesu odabira davatelja. Ako se utvrde propusti, potrebno je poduzeti odgovarajuće korektivne radnje. Također je važno procijeniti prikladnost davatelja povezanog s PDI za daljnje donacije te sukladno tome provesti savjetovanje davatelja. Sve aktivnosti treba dokumentirati i povremeno evaluirati kako bi se identificirale prilike za poboljšanje.

## Upravljanje PDI u Europi

PDI se spominju u Direktivi 2004/33/EC (Prilog II, dio A – Podaci koje treba dostaviti potencijalnim davateljima krvi ili krvnih sastojaka), te u Smjernicama dobre prakse (6.1.12), koje su sastavni dio EDQM Vodiča za krv Vijeća Europe.<sup>12,13</sup> Više pojedinosti o upravljanju PDI nalazi se u EDQM Vodiču (Poglavlje 2). U svom 20. izdanju više je pažnje posvećeno PDI u odnosu na prethodna izdanja, a planiraju se daljnja poboljšanja.<sup>13</sup>

Unapređenje sigurnosti transfuzijskog liječenja temeljeno na edukaciji, odabiru i savjetovanju davatelja također je podržano s dvije rezolucije Vijeća Europe. Rezolucija CM/Res (2008)/5 o odgovornosti davatelja i ograničenjima davanja krvi i krvnih sastojaka naglašava važnost pružanja jasnih i odgovarajućih informacija budućim



davateljima, uključujući potrebu prijavljivanja PDI ako postoji sumnja u njihovu prikladnost ili u slučaju da se zdravstveno stanje davatelja promijenilo nakon donacije, kao i o posljedicama nepružanja svih relevantnih podataka tijekom postupka odabira.<sup>14</sup> Rezolucija CM/Res (2013) 3 o seksualnom ponašanju davatelja krvi koja ima utjecaj na sigurnost transfuzije promiče prikupljanje podataka o rizičnom spolnom ponašanju kroz standardizirani postdonacijski intervju s davateljima za koje je potvrđeno da su pozitivni na HIV, HBV, HCV i sifilis.<sup>15</sup>

### PDI i emergentne infekcije

Kontinuirano praćenje i nadzor emergentnih infekcija važni su za pravovremenu reakciju transfuzijskih službi u zaštiti sigurnosti i dostupnosti krvnih pripravka za transfuzijsko liječenje. U prilog tome govori i najnovija pandemija SARS-CoV-2. Iako su prijašnja iskustva s respiratornim virusima pokazala da je transfuzijski prijenos samo teoretski rizik, sustav hemovigilancije odgovoran je aktivirati svoje mehanizme u procjeni rizika svake nove infekcije. Pri tome je osim ispitivanja sumnji na transfuzijski prijenos važno i adekvatno upravljati PDI.

### Zaključak

PDI su odraz nedostataka, ograničenja i složenosti trenutnog procesa odabira davatelja. Upravljanje PDI važan je segment sustava hemovigilancije i zahtijeva blisku suradnju između banaka krvi, bolničkih transfuzijskih jedinica i kliničara. Veliku pažnju treba pridavati prevenciji, osobito edukaciji davatelja o važnosti pravovremenog pružanja svih relevantnih informacija o njihovom zdravlju i faktorima koji mogu utjecati na sigurnost darovane krvi.

### LITERATURA

1. Vuk T. When things go badly – managing quality problems and complaints in transfusion medicine. *ISBT Science Series* 2019;14:84–89.
2. Vuk T, Garraud O, Politis C. Post-donation information management. *Transfus Clin Biol* 2021; <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2021.08.006>
3. Goldman M, Yi QL, Ye X, Tessier L, O'Brien SF. Donor understanding and attitudes about current and potential deferral criteria for high-risk sexual behavior. *Transfusion* 2011;51:1829–1834.
4. Food and Drug Administration (FDA). Biological product and HCT/P deviation reports—annual summary for fiscal year 2017. Available at: <https://www.fda.gov/media/114257/download>. Accessed: June 17, 2021.
5. Eder AF, Goldman M. Postdonation information and blood component retrievals: realigning blood center and hospital actions based on risk assessment. *Transfus Med Rev* 2014;28:226–234.
6. Vuk T, Ljubičić J, Gulan Harcet J, Očić T, Jukić I. Post-donation information management – contribution to the safety of transfusion treatment. *Transfus Clin Biol* 2019;26:353–354.
7. Hervé I, Simonet M, Rebibo D, Lecointe des Floris MF, Taouqi-Le Cann M, Jbilou S i sur. La gestion des informations post-don: un élément fondamental de la sécurité transfusionnelle. *Transfus Clin Biol* 2010;17:296–300.
8. Wilkinson SL, Steele WR, High PM, Wright DJ, NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Characteristics of post donation information donors and comparison with appropriately deferred donors. *Transfusion* 2011;51:1503–1510.
9. Glynn SA, Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Nass CC i sur. Demographic characteristics, unreported risk behaviors, and the prevalence and incidence of viral infections; a comparison of apheresis and whole blood donors. *The Retrovirus Epidemiology Donor Study*. *Transfusion* 1998;38:350–358.
10. World Health Organization & International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies. (2010). *Towards 100% voluntary blood donation: a global framework for action*. World Health Organization. ISBN 9789241599696.
11. Alqemlas I, Shankar S, Handagama W, Felse PA. A cross-sectional study of prevalence, distribution, cause, and impact of blood product recalls in the United States. *Blood Adv* 2020;4:1780–1791.
12. Commission Directive 2004/33/EC of 22 March 2004 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for blood and blood components. *OJ, L91, 30/3/2004, p29*.
13. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe): *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, 20th edn. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2020.
14. Resolution CM/Res (2008)5 on donor responsibility and on limitation to donation of blood and blood components. Dostupno na: [https://ekea.gr/wp-content/uploads/Resolution\\_CMRes20085\\_on\\_donor\\_responsibility\\_and\\_on\\_limitation\\_to\\_donation\\_of\\_blood\\_and\\_blood\\_components.pdf](https://ekea.gr/wp-content/uploads/Resolution_CMRes20085_on_donor_responsibility_and_on_limitation_to_donation_of_blood_and_blood_components.pdf). Pristupljeno: 19. travanj, 2021.
15. Resolution CM/Res (2013)3 on sexual behaviours of blood donors that have an impact on transfusion safety. Adopted by the Committee of Ministers on 27 March 2013 at the 1166th meeting of the Ministers' Deputies, 2013. Dostupno na: [https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/resolution\\_cmres20133\\_on\\_sexual\\_behaviours\\_of\\_blood\\_donors\\_that\\_have\\_an\\_impact\\_on\\_transfusion\\_safety.pdf](https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/resolution_cmres20133_on_sexual_behaviours_of_blood_donors_that_have_an_impact_on_transfusion_safety.pdf). Pristupljeno: 19. travanj, 2021.

## DARIVANJE KRVI TIJEKOM PANDEMIJE SARS-COV-2 I POTRESA U HRVATSKOJ

CRNJAK I.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>4</sup>, Hećimović A.<sup>3</sup>, Vuk T.<sup>2</sup>, Topić Šestan P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za davalatstvo krvi

<sup>2</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Služba upravljanja kvalitetom u transfuzijskoj medicini

<sup>3</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za pripremu testnih reagencija

<sup>4</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Ravnateljstvo

**Uvod:** Pandemija SARS-CoV-2 rezultirala je smanjenjem zaliha krvnih pripravaka u cijelom svijetu, pa i u Hrvatskoj. Na smanjenje broja darivatelja utjecali su brojni čimbenici (povećani broj oboljelih, samoizolacija, nemogućnost organiziranja akcija u pojedinim ustanovama, varijabilna potrošnja u bolnicama koja je ovisila o epidemiološkoj situaciji,...).

Od samog početka pandemije Hrvatska je suočena i sa brojnim potresima. Jedan od jačih pogodio je Zagreb krajem ožujka, a 29. prosinca potres jačine 6,2 stupnja s epicentrom u Petrinji uzrokovao je, osim rušenja kuća, na žalost i ozljede i smrti stanovnika. Od toga trenutka brojni ljudi pristižu na darivanje krvi u HZTM, a tijekom narednih dana svjedočimo nezapamćenom odazivu darivatelja na svim akcijama u cijeloj RH.

**Cilj:** Cilj ovog rada je prikazati utjecaj pandemije i potresa na broj prikupljenih doza krvi u prosincu 2020. u odnosu na isto razdoblje predpandemijske godine, te usporediti darivatelje glede spola, broja darivanja i odgode/odbijanja tijekom navedenih vremenskih razdoblja.

**Metode:** Svi rezultati dobiveni su statističkom analizom podataka iz informatičkog sustava e-Delphyn. Broju doza prikupljenih u HZTM-u pribrojene su i doze prikupljene na terenskim akcijama. U statističkoj analizi rezultata korišten je test razlike proporcije.

**Rezultati:** U prosincu 2020. godine prikupljeno je 8279 doza krvi, što je unatoč nepovoljnoj epidemiološkoj situaciji, za 4,6% više od 7912 doza prikupljenih u prosincu 2019. ( $P < 0,0001$ ). Potres je utjecao i na promjenu omjera zastupljenosti spolova među darivateljima krvi. Prosječna zastupljenost žena je oko 16%. Tijekom prosinca 2019. godine od ukupnog broja prikupljenih doza, njih 1329 (16,8%) darovale su žene, dok je tijekom prosinca 2020. ukupan udio žena bio 18,7% ( $P = 0,0016$ ). Izdvojeno gledajući sam dan 30. prosinca 2020. taj postotak bio 31,9% veći nego istoga dana godinu ranije. Tijekom pandemijskog prosinca i potresa evidentiran je i statistički značajan porast odbijenih darivatelja ( $P < 0,0001$ ) što je najvjerojatnije rezultat vrhunca epidemije, velikog broja novih davatelja te većeg broja žena, kao i značajna razlika u povećanju udjela osoba koje su prvi put darivale krv.

**Zaključak:** Iz prikazanih rezultata uočljivo je kako je u prosincu 2020. godine, unatoč nepovoljnoj epidemiološkoj situaciji, prikupljeno više doza krvi nego u istom razdoblju prethodne godine, posebno u posljednja 3 dana nakon potresa. Statistički značajan je porast udjela žena i novih darivatelja, te povećan broj odbijenih darivatelja. Sve to može se pripisati snažnoj motivaciji i solidarnosti građana koji su se uputili na brojne lokacije kako bi nakon razornog potresa u Petrinji osigurali dovoljne zalihe krvnih pripravaka.

## PRIKUPLJANJE KONVALESCENTNE PLAZME

MUŠLIN T.<sup>1</sup>, Hećimović A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za davalatstvo krvi

<sup>2</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za pripremu testnih reagencija

**Cilj:** Prikupiti dovoljne količine konvalescentne COVID-19 plazme za izravnu kliničku primjenu u indiciranim slučajevima ili za proizvodnju derivata plazme (specifični imunoglobulin – CoVIg).

**Metode:** Prikupljanje konvalescentne COVID-19 plazme postupkom afereze i/ili iz donacija pune krvi.

1. Animiranje dobrovoljnih darivatelja krvi

Početkom ljeta 2020. godine Odjel za prikupljanje krvi i promidžbu davalatstva je putem medija, web stranice HZTM-a, letka distribuiranog po bolnicama, izravnog upita tijekom darivanja pune krvi osobama koje su preboljele COVID-19 infekciju, započeo animiranje redovitih i potencijalnih darivatelja za darivanje konvalescentne plazme.

## 2. Odabir darivatelja

Darivatelji konvalescentne COVID-19 plazme moraju zadovoljiti kriterije kao i redoviti darivatelji krvi i krvnih sastojaka na staničnom separatoru, uz zadovoljenje nekih dodatnih kriterija:

- dijagnoza COVID-19 infekcije potvrđena pozitivnim RT-PCR testom, SARS-CoV-2 antigenskim testom ili testom na SARS-CoV-2 protutijela
- 28 dana od prestanka simptoma COVID-19 infekcije
- asimptomatski sa laboratorijski dokazanom SARS-CoV-2 infekcijom-28 dana od uzimanja uzorka
- osobe sa tipičnim simptomima SARS-CoV-2 infekcije, ali nepotvrđene niti jednim testom mogu darivati ovisno o anamnestičkim i epidemiološkim podacima
- cijepjene osobe koje su preboljele COVID-19 mogu darivati konvalescentnu plazmu (osobe koje su samo cijepjene ne).

Nakon inicijalnog liječničkog pregleda, kandidati za darivanje konvalescentne plazme postupkom afereze, daju uzorke krvi za KKS, jetrene probe (ALT, AST, ukupni proteini), te prema indikaciji uzorke za ALA/ATA (prethodne transfuzije/trudnoće/pobačaji), uzorke za testiranje na biljege krvlju prenosivih bolesti. Svim darivateljima koji nemaju krvnu grupu upisanu u e-Delphynu uzima se uzorak za imunohematološko testiranje. Tijekom same procedure uzima se uzorak za neutralizacijski test određivanje titra specifičnih protutijela na SARS-CoV-2 koji se provodi u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, uz paralelni test određivanja C19 anti IgG u Odjelu za krvlju prenosive bolesti u HZTM.

Postupkom afereze kod darivatelja koji prvi puta daruju krv uzima se 220 ml plazme (1 doza), a kod višestrukih 450 ml plazme (2 doze) na aparatu Amicus, odnosno 400 ml ako se radilo na Haemonetics separatoru. Kod višestrukih darivatelja kojima je razina trombocita veća od 220 uz pripravak konvalescentne plazme moguće je bilo uzeti i koncentrat trombocita. Prva procedura izvedena 28. srpnja 2020.

Zbog povećane potražnje za konvalescentnom plazmom u travnju 2021. započeli smo sa odvajanjem plazme iz pune krvi kod muških darivatelja koji nisu primili transfuzije krvi tijekom života, a preboljeli su COVID-19 infekciju u protekla 4 mjeseca ili duže, ukoliko su cijepjeni.

**Rezultati:** Od 28. srpnja 2020. do 01. rujna 2021. godine provedena je 231 procedura prikupljanja konvalescentne plazme postupkom trombafereze i prikupljeno je 80.635 ml plazme, te 589 doza konvalescentne plazme iz pune krvi ili 150.870 ml plazme.

**Zaključak:** Pravovremena uspostava metodologije, koja je uključivala promidžbu, edukaciju darivatelja, proces prikupljanja i skladištenja te uspostavu testiranja za procjenu neutralizacijskog kapaciteta pojedinih doza, omogućila je zadovoljavanje zahtjeva kliničara. U pravilu se plazma izdavala za bolesnike oslabljenog humoralnog imuniteta.

Kako je, na žalost, u tijeku četvrti val pandemije, uspostavljena metodologija omogućiti će nam vrlo brz odgovor na nove izazove.

## NAŠA ISKUSTVA U PRIKUPLJANJU KONVALESCENTNE PLAZME OD DOBROVOLJNIH DARIVATELJA KRVI

HADROVIĆ-PAVIŠIĆ Ž.<sup>1</sup>, Zubović Velepić S.<sup>1</sup>, Šerer Vičević M.<sup>1</sup>, Lukežić N.<sup>1</sup>, Buljević-Carević J.<sup>1</sup>, Balen S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KBC Rijeka

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Pojam konvalescentne plazme poznat je kroz povijest u liječenju bolesnika s akutnim infekcijama. Na razini Europske Unije od lipnja 2020. godine prikuplja se COVID 19 konvalescentna plazma (CCP) za potrebe liječenja oboljelih od COVID 19 infekcije uključivši i našu Ustanovu. U periodu od 07.04.2021. do 02.06.2021. u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Rijeka (KZTM) prikupljeno je ukupno 196 doza svježe plazme od 193 muških dobrovoljnih darivatelja krvi (DK) te proizvedeno 153 doze CCP.

**Cilj:** Cilj naše retrospektivne analize je utvrditi povezanost između visine zadovoljavajućeg titra Sars-2 Cov IgG protutijela u odnosu na: težinu kliničke slike COVID 19 infekcije DK, dobi DK i vremenskog odmaka od preboljenja COVID 19 infekcije do uzimanja plazme.

**Metode i materijali:** Utvrđivanje titra Sars-2 Cov IgG protutijela analizirano je kvantitativnom metodom (na uređaju VIDAS) u Kliničkom zavodu za kliničku mikrobiologiju KBC Rijeka. Titar veći od 1.000 NT ED<sub>50</sub>/ml (cut off 1.000–1.300 NT ED<sub>50</sub>/ml) proglašen je zadovoljavajućim titrom neutralizacijskih protutijela Sars-2 Cov IgG, te su plazme s titrom većim od 1.000 NT ED<sub>50</sub>/ml proglašene konvalescentnom plazmom (CCP).

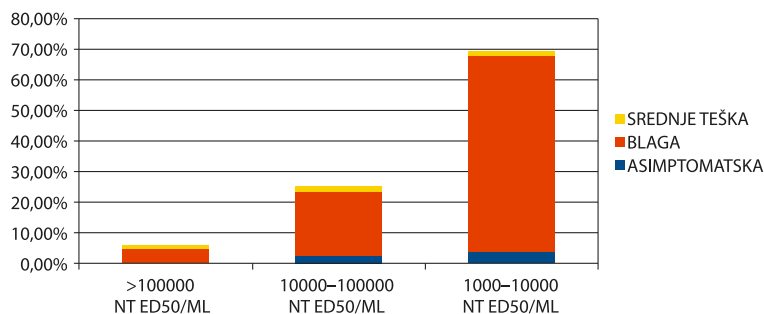
Kriterij odabira DK za uzimanje CCP bili su: muški spol i preboljenje COVID 19 infekcije više od mjesec dana. Podatke smo prikupili iz Registra davatelja krvi CCP KBC Rijeka, KZTM-a, u Jedinici prikupljanja krvi (JPK) koji sadrži potpisane pristanke DK za davanje plazme, obrasce o datumu pozitivnog testa na SARS-COV-2, težini kliničke slike, uključivši podatke o cjepljenju protiv COVID 19 infekcije. U navedenom periodu prikupljeno je 196 doza plazme od 193 DK, od kojih je 190 doza (96%) proizvedeno iz pune krvi (PUK), a 6 doza (4%) proizvedeno postupkom plazmaferenze. Od ukupno 196 doza plazme, 43 doze (22%) imale su titar Sars-2 Cov IgG protutijela manji od 1.000 NT ED<sub>50</sub>/ml te su proglašene plazmom za frakcije, dok su 153 doze (78%) s titrom većim od 1.000 NT<sub>50</sub>/ml proglašene CCP te su adekvatno skladištene i odvojene za kliničku uporabu. Prema vrijednosti visine titra neutralizacijskih protutijela Sars-2 Cov IgG podijelili smo na: nizak (1.000–10.000 NT ED<sub>50</sub>/ml), srednje visok (10.000–100.000 NT ED<sub>50</sub>/ml) i visok titar (više od 100.000 NT ED<sub>50</sub>/ml).

Prema stručnim smjernicama podjela kliničke slike COVID 19 infekcije dijeli se u 4 kategorije: asimptomatska, blaga, srednje teška i težak oblik bolesti. Uvidom u anamnestičke podatke DK iz Registra DK težina kliničke slike obuhvaćala je sve oblike bolesti osim težeg oblika.

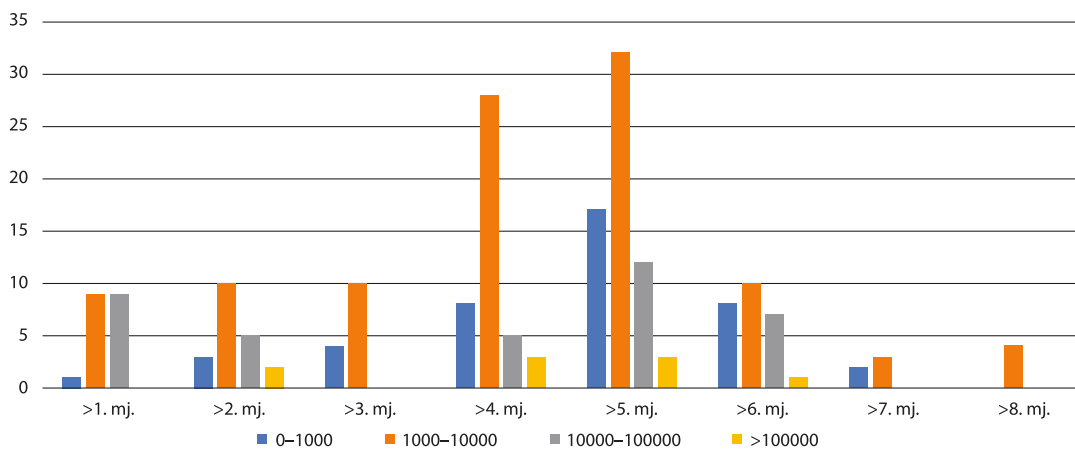
Dob DK podijelili smo u dvije skupine:

1. od 18–40 godina (mlađa dobna skupina),
2. od 40–65 godina (srednja životna dob).

**Rezultati:**



SLIKA 1. ODNOS VISINE TITRA NAUTRALIZACIJSKIH PROTUTIJELA SARS 2-COV I KLINIČKE SLIKE COVID 19 INFEKCIJE



SLIKA 2. ODNOS TITRA SARS CoV IgG U DK I ODMAKA OD PREBOLJENJA BOLESTI

**Zaključak:** U ispitivanoj populaciji DK najzastupljenija klinička slika preboljenja COVID 19 infekcije je blagi oblik (63,39%) s najčešćim titrom od 1.000–10.000 NT ED<sub>50</sub>/ml (Slika 1).

Uspoređivanjem visine titra Sars-2 Cov IgG neutralizirajućih protutijela kod ukupnog broja ispitivanih DK podjeljenih u dvije dobne skupine utvrđuje se da je titar viši u DK srednje životne dobi (38%) u odnosu na DK mlađe dobne skupine (23%), što se podudara s podacima s Up to date platforme.

Analizom dobivenih podataka zaključili smo da visina titra Sars-Cov 2 protutijela ne korelira s težinom kliničke slike COVID 19 infekcije, kao ni visina titra i vrijeme od preboljenja (Slika 2).



**Simpozij 2 – Proizvodnja krvnih pripravaka****BLOOD COMPONENTS PLANNING, PROCESSING AND REQUIREMENTS IN SPECIAL CIRCUMSTANCES**SAMARDŽIJA M.<sup>1</sup><sup>1</sup> University Hospital Osijek, Clinical Institute for Transfusion Medicine, University J. J. Strossmayer Osijek School of Medicine Osijek*“A unit of whole blood collected from a donor is a precious asset.”**Jonathan Hardwick*

A blood establishment is defined as any structure or body that is responsible for any aspect of the collection and testing of human blood or blood components, whatever their intended purpose, and their processing, storage, and distribution when intended for transfusion.

Blood establishments should establish and maintain quality systems involving all activities that determine the quality policy objectives and responsibilities and implement them by such means as quality planning, quality control, quality assurance, and quality improvement within the quality system, taking into account the principles of good manufacturing practice as well as the EC conformity assessment system.

Document Coronavirus Disease 2019 (COVID 19) aims to provide a risk assessment and management options for the safe and sustainable supply of substances of human origin (SoHo) to assist the EU / EEA Member States in responding to the threat. It has also been advocating for EU / EEA Member States to activate pandemic plans to prepare for large outbreaks and community transmission of COVID -19.

Blood and blood components are considered to be critical SoHo, as there usually no alternative therapies, they are often life – saving and there are limited possibilities for storage. Possible limitations in supply can be due to:

Temporary loss of donors – donors may be unable to donate because of:

1. Having COVID – 19,
2. Being in isolation,
3. Self – isolating after contact with a confirmed case of COVID – 19,
4. Practicing social distancing,
5. Restrictions in public transportation,
6. Work commitments,
7. Need to care for family members,
8. Reluctance to donate due to fear of being infected.

Other possible limitations in supply:

Temporary SoHo establishment staff absence

Clinical demand of SoHo (reduction in elective healthcare)

Supply of critical material and equipment (disrupted supply chain)

Mitigation measures:

- Donors information, donor selection, post – donation information and haemovigilance, quarantine of blood and blood components, temporary interruption or rescheduling of donations, pathogen reduction, etc.

Contingency planning and risk management must be implemented in transfusion services.

Blood establishments in Croatia produce blood components of high quality and safety for transfusion therapy. Red cell concentrate leukocyte depleted, aphaeresis plasma and platelets (buffy coats, additive solutions in components) Covid plasma, irradiated products and pathogen reduction or inactivation method are implemented in routine practice.

Education is a crucial component of lifelong learning and continuous improvement.

Without it, quality cannot be attained and maintained in a blood transfusion service, and professional capacity and leadership cannot be built for the future.

## MIRASOL® TEHNOLOGIJA REDUKCIJE PATOGENA U KONCENTRATIMA TROMBOCITA – ISKUSTVO HZTM-A

STRAUSS PATKO M.<sup>1</sup>, Radović M. K.<sup>2</sup>, Vinković M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Banka krvi

<sup>2</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za krvne pripravke

U HZTM-u su krajem 2013.g. instalirana dva aparata za Mirasol® iluminaciju, s namjerom uvođenja postupka redukcije patogena riboflavinom u koncentratima trombocita (KT), a po potrebi i u plazmi. Validacija postupka provedena je tijekom 2014. i 2015. godine, te su dobiveni rezultati pokazali zadovoljavajuću kvalitetu za KT i plazmu na način kako su se tada proizvodili, te je 2016. godine u HZTM-u uveden Mirasol® postupak za svježe zamrznutu plazmu (dobivenu iz pune krvi i aferezom) u rutinsku uporabu. Međutim, vrlo brzo je prekinuta proizvodnja jer nije bilo interesa od strane kliničara za takvim krvnim pripravkom.

Budući da je cilj implementacije redukcije patogena u KT bio produljenje roka valjanosti na 7 dana, a proizvođač je deklarirao takav rok samo za trombocite u hranjivoj otopini, dok su u HZTM-u tada KT bili u plazmi, morao se prvo promijeniti način proizvodnje KT.

Nakon što je proizvodnja KT u hranjivoj otopini uvedena u rutinski rad, početkom 2018.g. započela je validacija Mirasol® redukcije patogena za KT. Dobiveni rezultati su pokazali da dolazi do pada kvalitete trombocita u pripravcima iz pune krvi nakon 5 dana skladištenja u odnosu na kontrolne KT, iako su vrijednosti bile još uvijek unutar zadanih kriterija. Slični rezultati dobiveni su i za KT dobivene jednom vrstom staničnog separatora, dok za drugi tip separatora rezultati validacije nisu bili zadovoljavajući. Nakon višemjesečnog zajedničkog pokušaja prilagođavanja aparata od strane stručnjaka za Mirasol® tehnologiju, proizvođača separatora i djelatnika HZTM, došlo se do zaključka kako KT dobiveni tim separatorom nisu pogodni za Mirasol® redukciju patogena u KT.

Na kraju je donesena odluka kako će se Mirasol® postupak primijeniti samo na KT iz pune krvi. Za rutinski rad bilo je potrebno osigurati još dva aparata i ponoviti validaciju na njima, a budući da je od prethodne validacije prošlo više od dvije godine, odlučeno je i da se ponovi validacija na dva postojeća uređaja. Validacijom nisu uočene značajnije razlike u kvaliteti pripravaka dobivenih pojedinim aparatom, ali je uočen značajno lošiji swirling fenomen između 5. i 7. dana skladištenja u odnosu na validaciju provedenu dvije godine ranije. Zbog toga je dogovoreno da će se prije konačne odluke oko uvođenja ovog postupka, ponoviti validacija u uvjetima rutinske proizvodnje (ne koristeći pool and split metodu, te u vremenu – popodnevni sati – kada se KT rutinski rade) i provesti klinička studija s tako proizvedenim KT.

Sve navedene aktivnosti su provedene, iako zbog COVID-19 pandemije znatno otežano. Međutim, rezultati koji su na kraju dobiveni zajedno s onima u prethodnim validacijama postavili su sumnju na opravdanost uvođenja Mirasol® tehnologije u rutinski rad u proizvodnji krvnih pripravaka u HZTM-u, te je do daljnjega primjena odgođena

Razlog takve odluke je sljedeći:

1. Nije dokazana zadovoljavajuća kvaliteta KT dobivenih iz pune krvi (pool KT/BC/HO SBL) starosti do 7 dana, zbog čega nije zadovoljen kriterij da se produži rok s 5 na 7 dana (gubitak swirling fenomena).
2. Kako bi se kompenzirao gubitak trombocita samim postupkom redukcije patogena, mora se povećati broj doza slojeva leukocita i trombocita (engl. buffy coat, BC) u pripravku s 4 na 5 doza. To smanjuje ukupan broj pool-ova KT koji se dnevno može proizvesti iz prikupljenih doza pune krvi što značajno otežava upravljanje zalihama jer se održavanje potrebnih zaliha KT ne može kompenzirati produljenjem roka valjanosti, posebno pojedinih krvnih grupa.
3. Nemogućnost primjene postupka na jednom od aparata za trombaferezu.
4. Nemogućnost dorade tretiranih KT iz pune krvi (pranje i redukcija volumena) zbog pojava ireverzibilnih agregata i lažno pozitivnih mikrobioloških nalaza
5. Kliničkom studijom dokazan je značajno niži porast broja trombocita neposredno nakon transfuzije (CCI1, engl. corrected count increment, 1 sat nakon transfuzije) u odnosu na kontrolne KT.

Dodatni povod odluci je nedavno objavljen članak u stručnoj literaturi koji ukazuje na slabu/nedovoljnu učinkovitost postupka na neke klinički značajne bakterije u količinama koje se mogu naći u koncentratima trom-

bocita u realnoj situaciji, te iskustvo jednog europskog centra (koji smo kontaktirali) koji je ubrzo nakon implementacije Mirasol® postupka u KT, donio odluku o prekidu nezadovoljan njihovom kvalitetom.

## EVALUATION OF NEW NON-DEHP PLATELET POOLING KIT

FERENAC KIŠ M.<sup>2,1</sup>, Vitaić S.<sup>1</sup>, Glavaš K.<sup>1</sup>, Kujavec-Šljivac K.<sup>1</sup>, Matković D.<sup>2</sup>, Samardžija M.<sup>2,1</sup>, Samardžija M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> University Hospital Osijek

• *Clinical Institute of Transfusion Medicine*

<sup>2</sup> Faculty of Medicine

• *Josip Juraj Strossmayer University of Osijek*

<sup>3</sup> Diakonhjemmet Sykehus

**Introduction:** DEHP (di-(2-ethylhexyl) phthalate) is a plasticizer widely used in transfusion medicine medical devices to “soften” plastics and give PVC material the required flexibility. DEHP does not chemically bind to PVC so it leaches into blood products and in circulation of apheresis donors. It is metabolised mostly to monoethylhexyl phthalate (MEHP), which is a known toxin and endocrine disruptor. New regulatory restrictions for DEHP due to toxicity are incoming. In 2025, EC will ban DEHP with no exemption for medical devices including blood bags. Due to new regulation manufacturers are forced to make new bags without DEHP. The new pooling systems we tested are made entirely with non-DEHP components. All the tubing component dimensions and bag volumes are maintained the same as PVC-DEHP model that is presently used in routine.

**Aim:** Evaluate the quality of platelet pools (PP) prepared by using non-DEHP pooling kit.

**Methods:** 40 whole blood collections (Day 0) in quadruple top & bottom InLine CQ32250 (CompoFlow Quadruple, T&B, Fresenius Kabi) were performed on CompoGuard (Fresenius Kabi). Platelet pools (PP) were manufactured from 4 buffy coats (BC) on Day 1 with the non-DEHP CompoStop FLEX system (FT52600, Fresenius Kabi). PP were made by ABO group as in routine. After adding plasma all PP were centrifuged in the Thermo Scientific Cryofuge 6000i centrifuge and separated immediately after on CompoMAT G5 (Fresenius Kabi). Samples were tested for platelet content as well as residual WBCs and RBCs on Day 1 using Adam rWBC (NanoEnTek) and Mindray BC3600 (Shenzhen). On Day 6 we measured pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub> and glucose following the routine procedures.

**Results:** The 10 PLT pools were analyzed and results expressed as mean value +/- st. dev. Data given show mean volume of 331 +/- 9 ml, mean platelet yield 4.5 +/- 0.8 x10<sup>6</sup> cells/u. Residual leukocytes were all below 0.05 +/- 0.04. Mean pH for the 10 PP was 7.25 +/- 0.05, with a mean pO<sub>2</sub> 9.86 +/- 3.99, pCO<sub>2</sub> 2.95 +/- 0.21, HCO<sub>2</sub> 9.55 +/- 1.06 and glucose 15.7 +/- 1.16.

**Summary/Conclusions:** Platelet pools made by using non-DEHP pooling kit achieved excellent quality. All measured parameters complied with EDQM requirements and our internal standards. When more stringent regulation, concerning DEHP in blood bags, enters into force we will be obligated to use new products. According to EDQM standards all products and devices should be validated before use. By validating non-DEHP systems we contribute to the safety of future products, patients and blood donors.

## ISPITIVANJE KVALITETE KRVNIH PRIPRAVAKA PROIZVEDENIH IZ DOZA KRVI KOD KOJIH SU UOČENI SITNI UGRUŠCI NA IN-LINE FILTERU

VINKOVIĆ M.<sup>2,1</sup>, Radovčić M. K.<sup>1,3</sup>, Gulan-Harcet J.<sup>1</sup>, Ljubičić J.<sup>1</sup>, Vuk T.<sup>1</sup>, Tomičić M.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

<sup>2</sup> Medicinski fakultet Osijek

<sup>3</sup> Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Uvod:** Tijekom 2019. i 2020. godine u Odjelu za proizvodnju krvnih pripravaka Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) praćene su donacije kod kojih je tijekom leukofiltracije (LF) koncentrata eritrocita (KE) uočena pojava sitnih ugrušaka na leukofilteru koja nije ometala proces LF. Krajem 2020. i početkom 2021. godine provedeno je detaljnije ispitivanje takvih pripravaka. Prihvaćeno trajanje donacije ograničeno je na 12 minuta. Sve donacije koje traju dulje, označavaju se prilikom uzimanja krvi, a djelatnici u proizvodnji tako označene donacije detaljnije gledaju na prisutnost ugrušaka prije prerade. Za venepunkcije (VP) koje traju dulje od

15 minuta, *e-Delphyn* automatski blokira proizvodnju svježe zamrznute plazme. Doze pune krvi s makroskopski uočenim ugrušcima proglašavaju se nesukladnima prije prerade. Ponekad se tijekom proizvodnje KE na takvim dozama, ali i na dozama urednog trajanja VP, uoče sitni ugrušci na leukofilteru koji ne ometaju proces LF, ali nije niti jasno zašto se isti javljaju. Ukoliko LF protекne uredno, KE se izdaju za liječenje.

**Cilj:** Ispitati kvalitetu pripravaka KE i plazme iz donacija kod kojih su uočeni sitni ugrušci na leukofilteru.

**Metode:** Analizirano je vrijeme trajanja VP za donacije iz 2019., 2020. i dijela 2021. godine, a u kojima su uočeni sitni ugrušci na leukofilteru za KE. Krajem 2020. i početkom 2021. detaljno je analizirano 10 pripravaka KE i 11 pripravaka plazme. Za KE su ispitani: volumen, hemoglobin, hematokrit, leukociti, hemoliza na isteku roka valjanosti te hemoglobin u supernatantu. Za plazmu su ispitani FVIII nakon otapanja i fibrinogen. Dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima statističke kontrole krvnih pripravaka za 2020. godinu (isti parametri iz sukladnih doza kod kojih nisu uočeni ugrušci na leukofilteru). Za statističku analizu korišten je MedCalc® Statistical Software version 20.010; Ostend, Belgium.

**Rezultati:** Medijan trajanja VP u KE s uočenim ugrušcima na leukofilteru tijekom ispitivanog razdoblja bio je 11 minuta. Medijan trajanja VP na godišnjoj razini u HZTM (uključuje sve donacije pune krvi) tijekom 2019. i 2020. godine bio je 6 minuta.

Rezultati kontrole kvalitete za pripravke s ugrušcima i za standardne pripravke prikazani su u **Tablici 1.**

TABLICA 1. NALAZI KONTROLE KVALITETE ZA PRIPRAVKE S UOČENIM UGRUŠCIMA (U) I STANDARDNE PRIPRAVKE (S)

	Prosjeck (minimum – maksimum)		Broj testiranih doza	
	U	S	U	S
<b>Koncentrat eritrocita</b>				
volumen (mL)	259,6 (241 – 284)	255 (213 – 304)	10	978
hemoglobin (g/dozi)	52,1 (45 – 61)	51 (36 – 66)	10	978
hematokrit (%)	63,3 (60 – 66,2)	64 (57 – 70)	10	978
leukociti (x106 /dozi)	0,09 (0 – 0,31)	0,09 (0 – 1,27)	10	976
hemoliza (%)	0,27 (0,14 – 0,37)	0,15 (0,02 – 0,47)	10	38
hemoglobin u supernatantu	1,38 (0,9 – 2,1)	/	10	/
<b>Plazma</b>				
FVIII (IU/mL)	1,22 (1 – 1,7)	1,12 (0,72 – 1,7)	10	38
fibrinogen (g/L)	2,79 (1,9 – 4,2)	2,85 (2,1 – 4)	11	13

Mann-Whitney testom ispitano je postoji li statistički značajna razlika u ispitanim vrijednostima između te dvije skupine. Između KE nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima hematokrita ( $P = 0,566$ ), hemoglobina ( $P = 0,642$ ), volumena ( $P = 0,468$ ) niti leukocita ( $P = 0,945$ ). U dozama KE s uočenim ugrušcima uočena je statistički značajno veća hemoliza ( $Z = 3,443$ ,  $P < 0,001$ ).

Usporedbom pripravaka plazme iz dvije skupine nije nađena statistički značajna razlika u vrijednostima fibrinogena ( $P = 0,954$ ) niti FVIII ( $P = 0,216$ ).

**Zaključak:** Svi rezultati ispitanih parametara kontrole kvalitete kod pripravaka s uočenim ugrušcima bili su unutar vrijednosti zadanih specifikacijom. LF je jednako učinkovita kod svih pripravaka. Ipak, usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima statističke kontrole standardnih pripravaka, uočava se statistički značajno veća hemoliza (najveća vrijednost je upola manja od gornje granice dozvoljenih vrijednosti) u KE s uočenim ugrušcima na leukofilteru. Pripravci s uočenim ugrušcima također imaju dulje trajanje VP u odnosu na sve donacije (11 minuta u odnosu na 6 minuta). Brojni su čimbenici koji mogu utjecati na produljenje trajanja VP (tehničari s manje iskustva, davatelji s tankim venama, vazospazam koji nastaje zbog straha od darivanja krvi...), a koje ovom analizom nije bilo moguće ispitati.

Iako je ovo ispitivanje rađeno na malom broju pripravaka s uočenim ugrušcima, svi pokazatelji govore u prilog tome kako su pripravci KE i plazme proizvedeni iz takvih donacija (pod uvjetom zadovoljenih kriterija propisanog maksimalnog trajanja donacije za pripremu pojedinih vrsta KP) sukladni za izdavanje i sigurni za primjenu u bolesnika.

## PLATELET GEL OBTAINED FROM BUFFY COATS IN REGENERATIVE MEDICINE

VUCETIC D.<sup>1</sup>, Gojkov D.<sup>1</sup>, Kozarski J.<sup>2</sup>, Đorđević B.<sup>2</sup>, Stepić N.<sup>2</sup>, Abazović D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute for transfusiology and hemobiology of Military Medical Academy

• *Department for blood products*

<sup>2</sup>Clinic for Plastic Surgery and Burns of Military Medical Academy,

• *Department for burns*

<sup>3</sup>Renova Clinic

• *Department for blood products*

**Background:** Platelets contain a number of growth factors, cytokines and chemokines actively involved in spontaneous wound healing and significantly improve dermal repair and vascularization. A significantly improved level of transfusion safety has contributed to the use of allogeneic blood products and offers novel therapeutic options for patients who can not easily undergo autologous blood processing – those who cannot be subjected to repeated bleeding (infants), patients with septicemia or hematological disorders, elderly subjects affected by comorbidities, or emergency orthopedic surgery patients who could benefit from platelet gel (PG) treatment.

**Aim:** We evaluated the clinical efficacy of allogeneic PG prepared with standard blood banking procedures from routine platelet concentrates (PCs) obtained from buffy coats.

The first aim of the study was at developing the newest procedure for the preparation of allogeneic PG and the second aim was to test the allogeneic PG and its clinical efficacy.

**Method:** we obtain buffy coats (BC-PC) from a single blood donor of an identical ABO group, separated from 450 mL of whole blood unit given by blood donor negative for transfusion-transmitted diseases. After counting platelets number, we take units with a platelet count of around  $1000 \times 10^3/\mu\text{L}$  (which proved to be enough) and subdivide them into 15 mL aliquots as requested with the original set and frozen in a  $-80^\circ\text{C}$  mechanical freezer until use, for a maximum of 6 months.

To obtain the PG units, a frozen BC-PC aliquot was thawed at  $37^\circ\text{C}$  and activated with homemade allogeneic thrombin. PG was obtained by mixing 6 volumes of thawed BC-PC with one volume of calcium gluconate-activated plasma (allogeneic thrombin) and one volume of calcium gluconate (or, only calcium gluconate, 2 volumes, without thrombin). The activator solution was injected aseptically into the bag through a sterile bag port. After mixing the BC-PC aliquot and the activator by gentle agitation, the bag was let to rest at  $22-25^\circ\text{C}$  for 30–40 min, allowing for gelation to occur spontaneously.

**Results:** The chronic wound was treated with one or two PG applications per week, according to the clinical response and state of the wounds. Since PG recipients were likely to receive several aliquots across a period of some weeks, it was planned to use all 10 aliquots from a single BC-PC to treat one individual patient, thus minimizing residual infective risk and exposure to allogeneic constituents. The patient with the chronic wound (diameter 15cm length, 6cm width, and 1cm depth), Pemphigus (Imuran and Pronison treated), and diabetes mellitus, was treated during 12 platelet gel applications. A total of 26 platelet gel units were applied. After three months, the chronic wound was completely healed and the patient was discharged home.

**Conclusion:** platelet-derived wound healing factors were one of the first and most effective platelet-derived products successfully used for topical treatment of skin lesions. This novel kind of preparing platelet gel supports the efficacy and feasibility of allogeneic PG to treat chronic wounds in very elderly hypomobile patients for whom autologous blood processing was not possible.

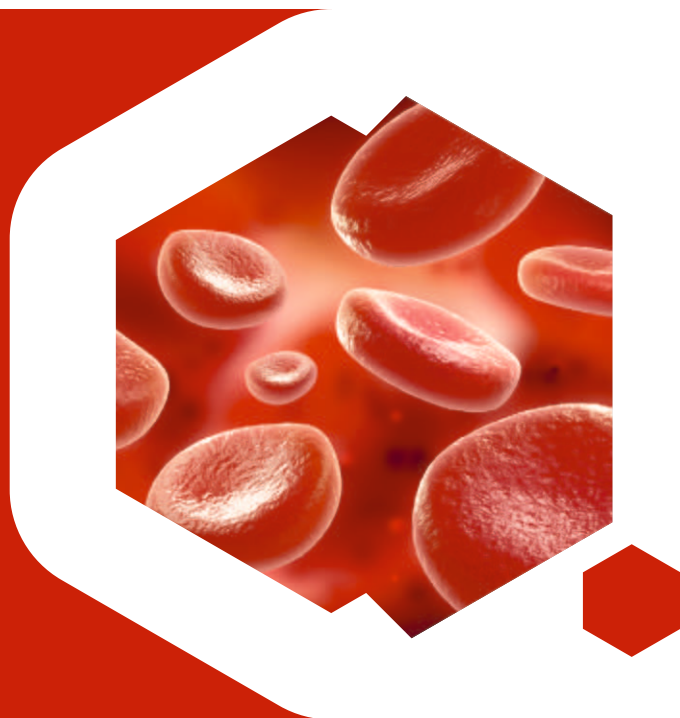




# AlphaChrom

a member of Altium Group

## TRANSFUSION WORKFLOW



SAMPLE TRANSPORT



SAMPLE PREPARATION



SAMPLE STORAGE



SAMPLE ANALYSIS

[www.alphachrom.hr/workflow/](http://www.alphachrom.hr/workflow/)

authorized distributor

**Ortho**  
Clinical Diagnostics

 **SARSTEDT**

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC



AlphaChrom d.o.o.  
Karlovačka cesta 24, Blato HR-10000 Zagreb, Croatia  
t: 01 550 2200 | e: prodaja@alphachrom.hr  
[www.alphachrom.hr](http://www.alphachrom.hr)

Asolutic d.o.o.  
[www.asolutic.hr](http://www.asolutic.hr)



## Simpozij 3 – Krvlju prenosiive bolesti

### INFEKTIVNI RIZICI TRANSFUZIJSKOG LIJEČENJA U 21. STOLJEĆU

LUKEŽIĆ N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KBC Rijeka

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

Sigurnost krvi ovisi o dobroj prevenciji prijenosa infektivnih bolesti. Zdravlje davatelja, tehnike uzimanja krvi, vrste testova koji se koriste za testiranje na biljege krvlju prenosivih bolesti i tehnologije inaktivacije patogena važni su čimbenici u osiguranju minimalnih rizika transfuzijskog liječenja u bolesnika.

Uzročnici krvlju prenosivih infektivnih bolesti su:

- Virusi: Hepatitis A, B, C, HIV ½, CMV, HTLV ½, Parvovirus B19, EBV, Herpes 6 i 8, West Nile, Zika, Torque Teno (TTV), Denga
- Bakterije: *Treponema pallidum*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydia pneumoniae*
- Paraziti: *Plasmodium malariae*, *Toxoplasma gondi*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia microti*
- Prioni (CJB, vCJB)

Testiraju se uzročnici koji se nalaze u davateljevoj krvi, imaju relativno dugu inkubaciju, tijek bolesti u davatelja je asimptomatski, prisutno je kliconoštvo, ne uginu u konzerviranoj krvi i derivatima plazme i većina se prenosi i spolnim kontaktom ili transplacentarno. Krajem 20. i u 21. stoljeću dokazan je prijenos novih uzročnika krvnim pripravicama.

Za sve uzročnike koji se obvezno testiraju (HBV, HCV, HIV, TP) postoji ostatni rizik i temelji se na sposobnosti testova da otkriju infekciju u ranoj akutnoj fazi i infekciju virusnim varijantama. Ostatni rizik za prijenos krvlju HBV, HCV i HIV je 1:2 milijuna transfundiranih doza, za HTLV-I/II, CMV, WNV, ZIKV, uzročnike malarije i *T. cruzi* manje od 1 na 3 milijuna transfundiranih doza, za TP gotovo nema rizika (minimalni za koncentrate trombocita). Rizik za prijenos bakterija krvlju postoji kod koncentrata trombocita i iznosi 1:100 000.

**Hepatitis B virus (HBV)** je DNA Hepadna virus, građen od Dane-ove čestice omotane lipidnim omotačem unutar kojeg je kapsida i dvostruka uzvojnica DNA. Površinski HBsAg je otkriven 1965. i tada je nazvan Australija antigen. Zakonski je obavezno testiranje ovog biljega u krvi davatelja od 1971. godine.

Testiranje:

- HBsAg, EIA 3. generacije: window razdoblje 46 dana
- NAT HBV-DNA skraćuje window razdoblje na 15 dana; otkriva okultni hepatitis B, HBV mutante

Poznato je da je i nakon uvođenja NAT testiranja problem prijenosa HBV-a transfuzijama krvi ostao predominantan i ostaje prisutan kao zdravstveni problem. Prevalencija HBV u Hrvatskoj je ispod 1% što nas svrstava u zemlje niske prevalencije (20–30 000 kronično zaraženih HBV-om). Prevalencija u Europi je između 0,5 i 2 % (oko 1,5 milijuna ljudi). Uvođenjem obveznog cijepljenja u RH početkom devedesetih za zdravstvene radnike, 1999. godine djece u 6. razredu osnovne škole i novorođenčadi 2007. godine, bilježimo pad broja novooboljelih (u posljednjih 5 god. godišnje 105 oboljelih od HBV, dok je 2020. zabilježeno 19 hepatitisa B).

U svijetu je oko 275 milijuna ljudi zaraženo hepatitisom B.

**Hepatitis C virus (HCV)** je jednolančani RNA flavivirus s lipidnim omotačem. Sastoji se od proteina jezgre ili core proteina, proteina omotača, E1 i E2, te niza nestrukturalnih proteina.

Testiranje:

- Anti-HCV, EIA testovi 3. generacije, u RH je obavezno testiranje od 1993. godine
- NAT HCV RNA skraćuje window period na 5–14 dana (od 2013.)
- HCV Ag/At 15 dana nakon zaraze može otkriti virus i/ili at-HCV

Prevalencija HCV u RH je 0,5–0,9% (globalno 2–5%). Godišnje od HCV prosječno oboli 195 osoba (2020. zbog COVID-a 99). Europa i mediteranske zemlje imaju 12 milijuna kronično inficiranih ljudi, Azija i Pacifička regija 20 milijuna, Afrika 9 milijuna i SAD 5 milijuna inficiranih.

Terapija: DAAs (pan-genotypic direct-acting antivirals).

**Virus humane imunodeficijencije (HIV)** je jednolančani RNA retrovirus s lipidnim omotačem. U RH je obvezno testiranje od 1987. godine. Koriste se EIA testovi treće generacije (HIV ½ Ag/At Combo test) kod kojih je serokonverzija 16 dana. U HIV NAT testu window period je 5–12 dana. Od 1985. do prosinca 2020. u RH je utvrđeno 1827 HIV pozitivnih osoba (527 oboljelih, 235 umrlih od AIDS-a). Prevalencija pozitivnih osoba u RH je manje od 0,1% (kod davatelja krvi 2018. nađena su 2 pozitivna na 195 563 testiranih), što nas svrstava u zemlje niske učestalosti HIV infekcije. U EU stopa pozitivnih je 5,4/100 000.

***Treponema pallidum* (TP)** je Gram negativna spiroheta koja obitava samo kod čovjeka i uzrokuje sifilis. Rizik prijenosa transfuzijama krvnih pripravaka je ekstremno malen jer TP ugibaju u skladištenoj krvi. Prijenos uzročnika primarno je spolnim putem, od majke na fetus i putem inficirane netestirane krvi (1. opisan slučaj 1941.) Testiranje je počelo 1945. godine. Koristi se TPHA hemaglutinacijski test ili EIA koji otkrivaju IgM i IgG at na TP. VDRL test otkriva sifilis lipoproteinska antitijela (IgG). Incidencija sifilisa u svijetu je 5,6 milijuna pozitivnih, a najugroženija je Afrika. U EU stopa pozitivnih je 5/100 000 i u porastu je 2015. – 2016. godine. EU je izdala prijedlog rezolucije o sifilisu jer su dva glavna soja uzročnika pokazala otpornost na azitromicin.

**Hepatitis D ili Delta (HDV)** je RNA virus koji oblaže HBsAg poput omotača i ne umnaža se bez njegova prisustva. Rasprostranjen je u Južnoj Americi, Africi, Rusiji, Aziji i mediteranskim zemljama. Otkriven je 1977. godine. Laboratorijski se dokazuje prisustvom anti-HDV antitijela IgG i IgM uz molekularnu dijagnostiku HDV RNA u ranoj fazi akutne infekcije. U kroničnoj infekciji znak je replikacije virusa. Prenosi se putem oštećene kože, inficiranim krvnim pripravcima i rijetko transplacentarno. Dijagnostika HDV-a se preporuča u HBsAg pozitivnih osoba s akutnom ili kroničnom infekcijom, posebice bolesnika na hemodijalizi, intravenskih narkomana i homoseksualaca. Kod tih skupina je ubrzana progresija kroničnog hepatitisa u jetrenu cirozu i hepatocelularni karcinom. 2020. WHO objavljuje da je oko 5% ljudi sa HBV infekcijom globalno koinficirano sa HDV-om.

**Hepatitis G (HGV)** je otkriven 1995. To je RNA Flavivirus visoko zastupljen u rizičnim skupinama (intravenski narkomani, hemofiličari, bolesnici na hemodijalizi i učestalo transfundirani bolesnici). U laboratorijskoj dijagnostici ovog virusa koristi se genomski PCR test kojim se dokazuje postojanje HGV RNA. Ne postoji odgovarajući screening test. Česta je koinfekcija sa HBV i HCV virusima ili s HIV-om.

**Hepatitis E (HEV)** je zaraza koja se većinom prenosi kontaminiranom vodom i nedovoljno termički obrađenom hranom. Uzročnik je RNA virus iz skupine Hepeviridae. Prijenos putem transfuzije krvi ili transplantiranim organima opisan je u imunokompromitiranih bolesnika. Prvi puta je opisan 2004. u Japanu u bolesnika koji je transfundiran tijekom kardiokirurškog zahvata te je istovjetan HEV genotip 4 detektiran u davatelja i primatelja krvi. Godine 2011. je u Kini dozvoljena uporaba HEV cjepiva (djeluje na genotip 1 i 4).

Rastući broj slučajeva prijenosa HEV doveo je do obaveze HEV RNA testiranja u Irskoj, UK, Nizozemskoj, Francuskoj, Njemačkoj, Španjolskoj, Austriji, Luksembourgu i Švicarskoj. U ostalim zemljama Europe razmatra se uvođenje ovog testa za davatelje krvi. Univerzalno testiranje se provodi u Irskoj, UK i Nizozemskoj, dok je u ostalim zemljama selektivno (za visoko rizične bolesnike). Danska i Švedska su u studijama zaključile da im na temelju incidencije HEV RNA u davatelja nije potrebno obvezno testiranje. HEV RNA detektirana je u 1:3 109 donacija u EU (testirano 3,2 milijuna uzoraka). Prevalencija HEV IgG u naših DDK je 20% (Grčka 0,3%, Francuska 52%).

WHO je u svibnju 2016. ustanovila Globalnu strategiju za hepatitis s ciljem da se do 2030. reducira broj novoinficiranih za 90% i smrtnih slučajeva za 65%.

**Humani T-limfotropni virus (HTLV) I i II** su onkogeni Delta retrovirusi koji se prenose inficiranim leukocitima, a moguće je i transfuzijski prijenos.

Japan, Karipske zemlje, Srednja i Južna Amerika, centralna i zapadna Afrika, Srednji Istok su endemska područja za ove viruse. Testiranje je u tim područjima obvezno od 1988. Globalno je ovim virusima inficirano 10–20 milijuna ljudi u kojih mogu uzrokovati leukemiju/ limfom T stanica, HTLV mijelopatiju, tropsku spastičnu paraparezu, infekcije. Ukoliko je prevalencija manje od 1:1 milijun donacija nije isplativo univerzalno testiranje, već treba razmišljati o leukofiltraciji i inaktivaciji patogena u krvnim pripravcima.

**Citomegalovirus (CMV)** je stanični patogen iz skupine herpesvirusa koji uzrokuje simptome slične mononukleozi (uz hepatitis). Prevalencija antitijela na CMV u populaciji je 50–80%. Moguća je intrauterina zaraza ovim virusom koji uzrokuje kongenitalne malformacije u novorođenčeta.

**Epstein-Barr virus (EBV)** je virus iz skupine herpesvirusa, otkriven 1964. god. u Burkittovom limfomu. Uzrokuje infektivnu mononukleozu, non-Hodgkin i Hodgkin limfom, T limfom. Prevalencija At je oko 90% kod davatelja krvi.

**Herpesvirus 6 i 8 (HHV 6,8)** su stanični patogeni (Ly, Mo) koji se prenose slinom, seksualnim kontaktom, transplantacijama i transfuzijama krvnih pripravaka. HHV 6 izaziva bolest exanthema subitum, a HHV 8 Kaposijev sarkom. Infekcije CMV, HHV i EBV predstavljaju opasnost za imunokompromitirane ili imunodeficientne osobe.

**Torque teno virus (TTV)** je virus iz obitelji Circoviridae i slučajno je otkriven 1997. u Japanu kod bolesnika s posttransfuzijskim hepatitisom. Prevalencija kod zdravih davatelja je 48–72%, u nekim zemljama do 100%, u davatelja krvi SAD-a i UK 10 %. Infekcija ovim virusom je često asimptomatska, ali su opisani slučajevi idiopatske upalne miopatije, karcinoma, lupusa, gastroenteritisa i aplastične anemije kod dokazanog TTV.

#### **Creutzfeld-Jakob-ova bolest, varijanta (CJD, vCJD)**

Prijenos uzročnika CJD krvlju opisan je u 3 slučaja u UK. Prenosi se transplantacijom dure mater i primjenom ljudskog hormona rasta. VCJB se javlja kod ljudi koji su konzumirali zaraženo govede meso. Problem je dugi window period kod priona (20-ak godina).

**Humani parvovirus B19** je eritrovirus bez ovojnice koji inficira hematopoetske stanice. U zdrave djece izaziva respiratornu infekciju sa eritemom (5. bolest), u odraslih groznicu, svrbež, mialgiju i artropatiju, te kroničnu hemolitičku anemiju. Opasnost za razvoj bolesti imaju osobe sa kroničnim hemolitičkim bolestima, kombiniranim imunodeficiencijama i AIDS-om.

Opisani su prijenos transfuzijama te intrauterini prijenos s posljedičnim fetalnim hidropsom i srčanom greškom. Prevalencija antitijela kod davatelja je 60%. Metode inaktivacije virusa nisu efikasne, stoga je veći rizik prijenosa virusa derivatima plazme.

**West Nile virus (WNV)** je RNA Flavivirus koji se prenosi ubodom komarca. Prvi put je izoliran 1937. u Ugandi, epidemija je 2002. bila u SAD-u i opisana su 23 slučaja prijenosa krvlju. U primatelja krvi se nakon 4 tjedna javljaju simptomi (povišenje temperature, groznica, bolovi u zglobovima, osip, glavobolja), u starijih i imunokompromitiranih neuroinvazivni simptomi (meningitis, encefalitis). Uvođenjem NAT testiranja (2003.) u mjesecima pojave komaraca reducira se transfuzijski rizik. Zadnjih 15-ak godina od kada se vrši testiranje u SAD-u se pronađe 300–1000 WNV RNA pozitivnih donacija godišnje.

**Zika virus (ZIKV)** je RNA Flavivirus prvi put izoliran 1947. kod majmuna u Ugandi. Prije 2007. bio je karakterističan samo za tropsku Afriku i JI Aziju. Godine 2015. je započela velika epidemija, te je sada proširen u 60-ak zemalja (Karibi, Južna i Latinska Amerika, Azija). Zabilježeni su slučajevi lokalnog prijenosa i u mnogim državama Europe (spolni put). WHO je 2016. proglasila Zika virusnu infekciju javnozdravstvenim događajem od međunarodnog značaja zbog grupiranja neuroloških poremećaja i malformacija u novorođenčadi. Od kolovoza 2016. u SAD-u se testiraju donacije na ZIKV RNA (na 4 milijuna je nađeno 9 pozitivnih). U Francuskoj Polineziji su u epidemiji zabilježena 73 slučaja Guillain-Barréov sindroma. Prenosi se ubodom komarca *Aedes*, transplantarno, krvlju, a čak su zabilježeni i prijenosi spolnim putem. Asimptomatskih slučajeva je 60–80%. Simptomi febrilne bolesti su osip, glavobolja, mialgije, artralgijske konjunktivitis.

**Denga arbovirus (DENV)** se rijetko prenosi krvlju. Uzrokuje Denga groznicu (hemoragijsku). Od 2016. u SAD-u je opisano 5 slučajeva prijenosa transfuzijom, u Brazilu 2012. šest slučajeva.

**Chikungunya arbovirus (CHIKV)** je sličan DENV i uzrokuje artralgičnu sliku bolesti. Raširen je u tropskim krajevima (J.Amerika i Karibi) i teoretski se može prenijeti krvlju (studija iz Tajlanda).

**Malarija** je bolest koju uzrokuje unutareritrocitni parazit *Plasmodium* koji inficira jetru i eritrocite uzrokujući masivnu hemolizu, groznicu, anemiju. Prvi put je opisan 1911. To je najčešći parazit koji se prenosi transfuzijom (globalno od 1911. do 2015. prijavljeno 100 slučajeva prijenosa krvlju u neendemičnim krajevima, 2 slučaja 2015. u SAD-u), a moguć je i intrauterini prijenos. Endemska je bolest u tropskom i subtropskom području centralne i južne Amerike, Afrike, jugoistočne Azije, a u ostatku svijeta su importirani slučajevi. Uzročnik preživljava u skladištenoj krvi, a kombinacija riboflavina i UV svjetlosti reducira mogućnost prijenosa malarije bez oštećenja eritrocita.

**Chagas-ovu bolest** uzrokuje parazit *Trypanosoma cruzi* koja obitava u centralnoj i Južnoj Americi i Meksiku. Više od 20 milijuna ljudi u SAD-u su kronični nosioci. Prenose ga stjenice, a moguć je prijenos transfuzijama i transplantacijama. Simptomi infekcije su lokalizirani bolni čvorčić – chagoma, groznica, limfadenopatija, hepatosplenomegalija anemija, miokarditis, simptomi GIT-a. U kroničnoj fazi se javlja kardiomiopatija. Rizik prijenosa transfuzijom ovisi o parazitemiji kod asimptomatskih davatelja, te o imunološkom stanju primatelja. Prvi puta je opisan prijenos 1952. Screening u neendemičnim zemljama se provodi u SAD-u, Kanadi, Španjolskoj, UK, Francuskoj, Švicarskoj i Australiji.

**Toxoplazmoza** je bolest uzrokovana Toxoplazmom gondii koja se razmnožava u crijevu mačaka. Seroprevalencija antitijela je 20–40% zdravih odraslih osoba. Simptomi su limfadenopatija, mialgije, hepatosplenomegalija. Rizične skupine su imunodeficientne osobe (AIDS) i fetusi zaražene majke.

Prevenција prijenosa HTLV I i II, CMV, EBV, HERPES VIRUSA 6 i 8, Trypanosome cruzi, Toxoplazme gondii je leukofiltracija krvnih pripravaka.

**Babesiosis** je bolest uzrokovana Babesiom microti koju prenosi inficirani krpelj. Uzročnik je unutareritrocitni parazit, a simptomi bolesti su slični malariji. Moguć je razvoj hemolitičke anemije, renalne insuficijencije, RDS-a, DIK-a, trombocitopenije i smrti (posebno u imunokompromitiranih i splenektomiranih bolesnika). Opisan je prijenos transfuzijama (prvi slučaj 1979.) i transplantacijama (SAD endemska transmisija od 2004. do 2008. 63 slučaja, do sada preko 200 sa smrtnošću 18–19%). Problem su asimptomatski DK i neefikasnost leukoredukcije. Nema laboratorijskih screening testova (serološke i PCR pretrage).

**Leishmania donovani** je uzročnik bolesti kala-azar čiji su simptomi hepatosplenomegalija, citopenija, gubitak težine, groznica, hipergamaglobulinemija. Obitava u zemljama Afrike, JI Azije, Indiji. Opasnost je koinfekcija u AIDS bolesnika.

**Bakterijske infekcije** prenesene krvnim pripravcima (TTBI) predstavljaju rastući problem u transfuzijskoj medicini, uglavnom zbog porasta potrošnje koncentrata trombocita. Učestalost infekcije ovisi o vrsti bakterije i patogenosti, te o kliničkom stanju bolesnika. Definicija TTBI se temelji na dokazu uzročnika u krvnom pripravku i primatelju.

Ostati rizik prijenosa bakterija koncentratima trombocita je 1:5000, odnosno 1:30 000 za koncentrate eritrocita. U SAD-u se temeljem rezultata studije (1999.–2017.) dokazalo smanjenje septičkih reakcija uzrokovanih koncentratima trombocita sa 492 na 82/1 milijun doza nakon uvođenja detekcije kontaminacije prije izdavanja (2004.). U zemljama Afrike je kontaminacija iznad 17%.

Bakterije davateljeve kože ili osoblja (*Propionibacterium acnes*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Serratia*) su najčešće identificirane kao uzročnici zaraze. *Staphylococcus aureus* je najbrojniji uzročnik smrtnih slučajeva zbog kontaminirane krvi.

Dobrom anamnezom davatelja, dobrom proizvođačkom praksom i primjenom brzih laboratorijskih metoda otkrivanja bakterija te metodama redukcije patogena moguće je prevenirati prijenos bakterijskih infekcija.

**Zaključak:** Rastućom globalnom migracijom stanovništva krajem 20. i u 21. stoljeću razvila se mogućnost prijenosa novih uzročnika krvlju.

U budućnosti su potrebne velike komparativne studije za pronalaženje sigurnih tehnika koje se mogu koristiti kod inaktivacije patogena u krvnim pripravcima, kao i pronalaženje sigurnih laboratorijskih dijagnostičkih testova u cilju prevencije prijenosa mnogobrojnih uzročnika krvlju.

## LITERATURA

1. Tapiwa Blessing M, Shi-Woei L. An economic reappraisal of hepatitis B virus testing strategy for blood donors in Taiwan. *Vox sanguinis*. 2020;116:564–573.
2. HZZJZ Svjetski dan hepatitisa 2021.
3. WHO Hepatitis C, D 2021.
4. CDC Symptoms, Diagnosis & Treatment West Nile virus 2021.
5. "<https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Mononukleoza&oldid=5830192> 2021.
6. "<https://hr.wikipedia.org/w/index.php?title=Alphatorquevirus&oldid=1032054120> 2021.
7. Busch M P, Bloch E M, Kleinman S. Prevention of transfusion-transmitted infections. *The American Society of Hematology. Blood* 2019;133:17.
8. Hao Bi, Ru Yang, Chunchen Wu and Jianbo Xia. Hepatitis E virus and blood transfusion safety. *Epidemiol Infect*. 2020;148.
9. Boland F, Martinez A, Pomeroy L, Flaherty ON. Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2019;46:95–103.
10. HZZJZ Zika virusna infekcija nove informacije 2016.
11. Radolf J D. Treponema, *Medical Microbiology*. 4th edition. 1996.
12. Roman L, Armstrong B, Smart E. Donation testing and transfusion transmissible infections. *ISBTScienc Series VoxSang*. 2020;15:192–206.



## PROCJENA ZNAČAJA ANTI-HBC TESTA U ALGORITMU TESTIRANJA NAT INICIJALNO REAKTIVNIH DONACIJA

BABIĆ I.<sup>1</sup>, Maslović M.<sup>1</sup>, Miletić M.<sup>4</sup>, Grubešić D.<sup>2</sup>, Bingulac-Popović J.<sup>1</sup>, Đogić V.<sup>1</sup>, Jagnjić S.<sup>2</sup>, Jukić I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za molekularnu dijagnostiku

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti

<sup>3</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Ravnateljstvo

<sup>4</sup> Dom zdravlja Zagrebačke županije, ispostava Velika Gorica

• Medicinsko-biokemijski laboratorij

**Uvod/cilj:** Okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI) u dijagnostičkom je smislu karakterizirana izostankom detekcije HBs antigena, izrazito niskom i fluktuirajućom količinom HBV DNA te prisutnim anti-HBc IgG protutijelima. Procleix Ultrio Plus i Procleix Ultrio Elite testovi za molekularni probir dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) na pojedinačnoj donaciji (ID-NAT, NAT engl. Nucleic Acid Testing) na nukleinske kiseline virusa HBV, HCV i HIV-a pokazuju visoku specifičnost u rutinskom izvođenju i nisku pojavnost lažno pozitivnih rezultata. Testiranje ukupnih anti-HBc protutijela kao biljega hepatitisa B sastavni je dio algoritma ID-NAT HBV/HCV/HIV probira DDK-a u RH. Provodi se za donacije s negativnim rezultatom serološkog probira, koje su inicijalno reaktivne (IR) u ID-NAT probiru. Niski titar HBV DNA u OBI infekciji uzrokuje smanjenu reproducibilnost rezultata ID-NAT probira u retestiranju te pozitivan rezultat anti-HBc testa dodatno upućuje na moguću prisutnost OBI. Dobrovoljni darivateli krvi sa zaključno pozitivnim rezultatom ID-NAT probira i/ili pozitivnim nalazom anti-HBc protutijela isključuju se iz davalštva. Cilj ovog rada bio je pregled rezultata i procjena vrijednosti testiranja ukupnih anti-HBc protutijela kao dodatnog testa u ID-NAT probiru, te usporedba skupine DDK-a s OBI infekcijom (zaključno ID-NAT pozitivan rezultat, IR:RR) i DDK-a koji su imali ID-NAT neponovljeno reaktivni rezultat (IR:NRR) uz anti-HBc IgG pozitivan rezultat.

**Materijali i metode:** Korišteni su podaci o rezultatima ID-NAT i anti-HBc testiranja DDK-a za razdoblje od 2013. do 2019. godine te podaci o spolu i godištu DDK-a s pozitivnim rezultatima anti-HBc testiranja. Za DDK-a s pozitivnim rezultatom testa za ukupna anti-HBc protutijela, provodilo se dodatno testiranje na sve serološke biljege HBV infekcije. ID-NAT testiranje (Procleix Ultrio Plus, Procleix Ultrio Elite, Grifols, Španjolska) provedeno je u Odjelu za molekularnu dijagnostiku HZTM-a. Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti HZTM-a proveo je serološka testiranja na HBV biljege: anti-HBc ukupni (Architect Anti-HBc II, Abbott, SAD i Vidas Anti-HBc Total II, BioMerieux, Francuska) i anti-HBs testiranje (Architect, Abbott, SAD) te HBsAg (Monolisa HBsAg ULTRA, Bio-Rad, SAD), anti-HBc IgM, HBeAg, i anti-HBe (Vidas, BioMerieux, Francuska). Za obradu rezultata korišteni su statistički testovi statističkog softvera MedCalc v2.014.

**Rezultati:** DDK s OBI infekcijom su većinom muškarci (53/62, 85,5 %), prosječno stari 56 godina, dok su DDK s IR:NRR rezultatom ID-NAT probira i IgG anti-HBc protutijelima u prosjeku značajno mlađi (49 god.,  $p=0,0002$ ) te također većinom muškarci (70/77, 90,0 %). U skupini DDK koji su IgG anti-HBc pozitivni te im je titar anti-HBs negativan ili  $< 100$  IU/L, statistički je značajan veći broj DDK-a s OBI infekcijom ( $p<0,0001$ ). Incidencija detekcije OBI u DDK-a pokazuje značajni pad od 2013. do 2019. godine. Razlika između velikog broja novootkrivenih OBI slučajeva u prvim godinama nakon uvođenja ID-NAT probira značajna je kad se uspoređuju 2013. i 2014. godina s godinama koje slijede ( $p<0,0001$ ). Detekcija DDK-a s ID-NAT IR:NRR pozitivnim nalazom te pozitivnim anti-HBc IgG protutijelima ujednačena je iz godine u godinu za period od 2013. do 2019. godine.

**Zaključak:** Testiranje biljega anti-HBc predstavlja dodanu vrijednost u ID-NAT HBV/HCV/HIV probiru i povećava osjetljivost testiranja i detekcije slučajeva OBI infekcije kod DDK-a. Zaštitni titar anti-HBs protutijela ( $> 100$  IU/L) mogao bi se dovesti u vezu s izrazito niskim titrom virusa u OBI infekciji koji nije moguće detektirati Procleix Ultrio Plus i Procleix Ultrio Elite testovima u ponovljenim testiranjima nakon inicijalno pozitivnog rezultata ID-NAT probira (ID-NAT IR:NRR, anti-HBc pozitivan). Testiranje anti-HBc protutijela u algoritmu ID-NAT probira DDK predstavlja dodatni kriterij za izdvajanje nositelja OBI infekcije iz davalštva te sigurnije transfuzijsko liječenje.

## REZULTATI PROBIRNIH TESTOVA NA MALARIJU KOD DOBROVOLJNIH DARIVATELJA KRVI (DDK) U REPUBLICI HRVATSKOJ (RH) U PERIODU OD SIJEČNJA 2016. DO LISTOPADA 2021.

JAGNJIĆ S.<sup>1</sup>, Grubešić D.<sup>1</sup>, Jagić A.<sup>1</sup>, Račić K.<sup>1</sup>, Đurašković D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Malarija je ozbiljna i u nekim slučajevima smrtonosna zarazna bolest koju uzrokuje parazit *Plasmodium*. Prenosi se ubodom zaražene ženke komarca *Anopheles*, a može se prenijeti i transfuzijom zaražene krvi. Kod ljudi bolest uzrokuju četiri vrste: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* i *Plasmodium ovale*. U RH je malarija iskorijenjena još 1964. te se nakon toga bilježe samo uvezeni slučajevi tj. nastali u krajevima gdje je malarija endemična. Od 15.09.2015. u RH se provodi testiranje na malariju ELISA/EIA testovima za detekciju anti-*Plasmodium* spp. protutijela za davatelje krvi koji su bili izloženi riziku od zaraze nakon što je prošlo minimalno 4 mjeseca od povratka iz malaričnih područja ili 6 mjeseci od povratka, ako je osoba imala nespecifične febrilitete koji mogu upućivati na malariju. Testiranje se izvodi u HZTM-u. Cilj ovog rada je analizirati rezultate testova pretraživanja na malariju u periodu od 2016. do listopada 2021. godine u RH te odrediti udio pozitivnih uzoraka (davatelja) koji su dobili šifru MAL u transfuzijskom sustavu e-Delphyn i time su trajno odbijeni kao DDK.

**Metode:** U razdoblju od siječnja 2016. do listopada 2021. izvršeno je testiranje uzoraka iz svih transfuzijskih centara u RH testovima pretraživanja anti-*Plasmodium* spp. protutijela. U 2016. testiranje je provedeno s testom Malaria Ab (Dia.Pro), a od 2017. prvi test je Captia™ Malaria EIA (Trinity Biotech), dok Malaria EIA (Bio-Rad) i Malaria Ab (Dia.Pro) se koriste kod opetovano reaktivnih rezultata. Odabir uzoraka DDK kao i način testiranja je proveden prema Preporukama za postupanje s davateljima u riziku od malarije (2015), Preporukama za postupanje s davateljima u riziku od zaraze malarijom u transfuzijskoj djelatnosti RH (2016) i (2020).

**Rezultati:** Rezultati probirnih testova na malariju su prikazani u [Tablici 1.](#)

TABLICA 1. REZULTATI PROBIRNIH TESTOVA NA MALARIJU

Godina	Broj testiranih uzoraka DDK ukupno u RH	Broj inicijalno reaktivnih (IR) uzoraka (%)	Broj opetovano reaktivnih (RR) uzoraka (%)	Broj DDK sa šifrom MAL (%)
2016.	641	28 (4,3)	6 (0,93)	6 (0,93)
2017.	944	8 (0,84)	3 (0,31)	1 (0,1)
2018.	1297	2 (0,15)	1 (0,07)	1 (0,07)
2019.	1838	17 (0,92)	14 (0,76)	12 (0,65)
2020.	2136	17 (0,79)	12 (0,56)	9 (0,42)
Do 10. 2021.	1339	9 (0,67)	5 (0,37)	3 (0,22)
Ukupno	9384	81 (0,86)	41 (0,43)	31 (0,33)

U periodu od 5 godina i 10 mjeseci u HZTM-u je testirano 9384 uzorka na malariju. 81 uzorak je bio inicijalno reaktivan (0,86 %) dok je samo 31 uzorak na kraju proglašen pozitivan s testovima pretraživanja na anti-*Plasmodium* spp. protutijela što čini 0,33% svih primljenih uzoraka na testiranje. Ti darivatelji su dobili šifru MAL.

**Zaključak:** Broj uzoraka krvi DDK za testiranje na malariju je svake godine sve veći te je od 2016. do 2020. godine testirano 641, 944, 1297, 1838 odnosno 2136 uzoraka DDK. U 2021. godini do 10. mjeseca je testiran manji broj uzoraka (u odnosu na isto razdoblje u 2020.) vjerojatno zbog pandemije virusom SARS-CoV-2 koja je ograničila putovanja u druge zemlje pa tako i one koje su endemične za malariju. Uvođenjem 2017. god. još dva testa na anti-*Plasmodium* spp. protutijela povećala se specifičnost testa, a time i broj prihvaćenih donacija kao i DDK koji mogu darivati krv. U razdoblju od 5 godina i 10 mjeseci 31 darivatelju je dodijeljena šifra MAL koja znači da je DDK trajno odbijen za darivanje krvi.

## TRACE-BACK POSTUPAK: PRIKAZ SLUČAJA

ŠERER VIČEVIĆ M.<sup>1</sup>, Lukežić N.<sup>1</sup>, Čubelić I.<sup>1</sup>, Balen S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Rijeka  
• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu  
marta.serer.vicevic@gmail.com

Sigurnost transfuzijskog liječenja u 21. stoljeću dosegla je vrlo visoki stupanj, no i dalje postoji rizik od neželjenih transfuzijskih reakcija kao što su transfuzijom prenesene zarazne bolesti. Ukoliko kliničar posumnja da je bolesniku prenesena zarazna bolest transfuzijom krvnih pripravaka u transfuzijskoj djelatnosti pokreće se trace-back postupak. Pojam “TRACE-BACK” (hrv. praćenje) je postupak istraživanja izvješća o ozbiljnoj štetnoj reakciji kod primatelja krvnog pripravka kako bi se identificiralo davatelja/e krvnog sastojka (DK) kao mogući uzročnik ozbiljne štetne reakcije, odnosno trace back je skup postupaka koji se provode kada se za laboratorijski potvrđenu zarazu postavi objektivna sumnja da je uzrokovana transfuzijom zaraženog krvnog pripravka, a kako bi se ista isključila ili potvrdila. Svrha postupka je isključivanje zaraženog davatelja krvi iz davalatstva te obavještanje i ispitivanje svih primatelja krvnih pripravaka pripadajuće donacije ovog davatelja o mogućoj zarazi. Trace-back postupak uključuje: identifikaciju davatelja krvi za koje postoji sumnja da su transfuzijom prenijeli infekciju na primatelja krvi, povlačenje svih pripravaka koji su još na zalihama za izdavanje, a priređene su iz doza potencijalno zaraženog davatelja, blokiranje svih potencijalno zaraženih DK za daljnje davanje i njihovo testiranje te analiza rezultata i izvješćavanje. U transfuzijskom informatičkom sustavu e-Delphyn dostupni su svi podaci vezani uz DK koji se pozivaju na kontrolna testiranja krvi prema predviđenim algoritmima na biljege HBV/HCV/HIV, sifilis, malarija, bakterije ovisno o kojoj se infekciji radi. Po završetku postupka utvrđuje se jeli došlo do prijenosa zaraze transfuzijom krvnih pripravaka s davatelja na primatelja te se o tome obavijesti Klinika/Odjel/Bolnica koja je prijavila zarazu.

### PRIKAZ SLUČAJA KBC Rijeka

27.04.2020. hematolog usmenim putem prijavljuje sumnju na prijenos virusnog hepatitisa B krvnim pripravcima pacijentici V.B (1957.) iz Čabra. Bolesnica boluje od hematološke maligne bolesti (akutne mijeloidne leukemije pod kemoterapijom). Boravi na Klinici za internu medicinu. U laboratorijskim nalazima izdvaja se: alterirani hepatogram uz HBV DNA poz (6 000000 kopija), HBs Ag poz, HBc IgM poz, anti-HBe poz, anti-HBs poz 13.07 IU/ml što ukazuje na akutnu infekciju hepatitis B virusa.

22.04.2020. bolesnica je premještena u KBC Rijeka iz Sveučilišnog Kliničkog centra Ljubljana gdje je od 09.04.2021. liječena zbog febriliteta, hepatopatije, ikterusa, opće slabosti, anemije. Tada je transfundirana s dva koncentrata eritrocita.

Zbog osnovne maligne bolesti bolesnica je imunokompromitirana i višestruko transfuzijski liječena unatrag 2 godine.

Od 19.09.2019. do 04.03.2020. primila je 14 koncentrata eritrocita, 6 “pool-eva” trombocita (dobivenih iz graničnog sloja-24 donora) i 3 koncentrata trombocita dobivena postupkom trombaferoze.

28.04.2020. u KBC Rijeka, u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Rijeka pokrenut je TRACE-BACK postupak. Ukupan broj davatelja uključen u postupak je 41. Svi su se odazvali na testiranje.

25 DK pozvano je telefonskim i pisanim putem na kontrolno testiranje za HBV biljege (NAT i serološki testovi na HBV) jer nisu davali krv nakon inkriminiranih donacija. Kontrolni uzorci su testirani u našem Zavodu (HBsAg, anti-HCV, anti-TP, HIV Ag/At) a u HZTM-u su testirani NAT probirnim testom kao i serološkim testovima na HBV.

Kod 16 davatelja testirani su arhivski uzorci posljednjih donacija na HBV biljege (bez HBsAg) u HZTM-u.

Svi ispitivani DK su blokirani za davanje krvi do prispeća nalaza kontrolnog testiranja i testiranja arhivskih uzoraka. Niti u jednom uzorku nije pronađen pozitivitet u NAT testu ili serološkom testiranju (osim pozitivnih anti-HBs protutijela kao posljedica cijepljenja).

U Sveučilišnom kliničkom centru Ljubljana u kojem je bolesnica bila transfuzijski liječena pokrenut je TRACE BACK postupak te su utvrdili da nije došlo do prijenosa zaraze krvnih pripravcima.

TRACE BACK postupak u KBC Rijeka završen je 07.09.2020. Utvrđeno je da kod bolesnice nije došlo do prijenosa HBV infekcije putem trasfuzije krvnih pripravaka.

## LOOK-BACK POSTUPCI U HRVATSKOM ZAVODU ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU U PERIODU 2016.–2020. GODINE

STOJIC VIDOVIĆ M.<sup>1</sup>, Ljubičić J.<sup>1</sup>, Grubešić D.<sup>1</sup>, Babić I.<sup>1</sup>, Topić Šestan P.<sup>1</sup>, Vuk T.<sup>1</sup>, Strauss Patko M.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Look-back (LB) postupci se provode kada se utvrdi da je višestruki dobrovoljni davatelj krvi (DDK) zaražen uzročnikom krvlju prenosivih bolesti. U tom slučaju provjeravaju se pripravci proizvedeni iz njegove zadnje negativne donacije krvi. Look-back postupci provode se u HZTM prema „Preporukama za provođenje look-back i trace-back postupaka u transfuzijskoj djelatnosti RH“, HZTM 2016., na način da se pozivaju i testiraju primatelji zadnje negativne donacije sada zaraženog darivatelja. U slučaju nemogućnosti testiranja primatelja identificiranog krvnog pripravka u slijedećem koraku testira se arhivski uzorak donacije koja je prethodila zadnjoj negativnoj.

**Cilj:** Analizirati broj LB postupaka i zastupljenost pojedinih biljega krvlju prenosivih bolesti u njihovom ukupnom broju u periodu 2016.–2020., te utvrditi karakteristike darivatelja krvi uključenih u LB postupke. Utvrditi ukupan broj primatelja transfundiranih pripravaka priređenih iz zadnjih negativnih donacija DDK zahvaćenih LB postupcima, te odziv primatelja na testiranje kao i rezultate testiranja. Ovo istraživanje prikazuje biljege krvlju prenosivih bolesti za koje postoji obveza testiranja u RH iako se prema procjeni postupak provodi i za ostale uzročnike koji se prenose krvlju. Vremenski period između sadašnje donacije (darivatelj zaražen) i zadnje negativne čiji su primatelji pozivani u okviru L-B nije bio vremenski ograničen za period 2016.–2020.g. a najdulji vremenski period između trenutne i zadnje negativne donacije iznosio je 6 godina i 2 mjeseca.

**Metode:** Korišteni su arhivski podaci i baza podataka HZTM, e-Delphyn program.

**Rezultati:** U periodu 2016.–2020.g., provedeno je 15 LB postupaka, od kojih najviše 6 za primatelje krvnih pripravaka zadnje negativne donacije darivatelja kod kojih je otkrivena okultna infekcija virusom hepatitisa (HBV-OBI), 3 LB postupka za HIV, 3 za HCV, 2 za sifilis, te 1 LB postupak za HBV infekciju u window periodu (HBV DNA pozitivna/svi serološki biljezi negativni). Karakteristike DDK uključenih u LB postupke prikazane su u **Tablici 1**. Identificirano je 27 primatelja krvnih pripravaka od kojih je 11 (41%) preminulo od posljedica osnovne bolesti, prije provođenja LB postupka, a 14 ih (52%) je pristupilo testiranju, dok 2 (7%) primatelja nisu bila dostupna. U 12 primatelja transfuzijskog liječenja koji su pristupili testiranju nije bilo prijenosa krvlju prenosivih bolesti, dok je kod jednog primatelja postojala kronična HBV infekcija ranije dijagnosticirana. Kod jednog primatelja uočen je status ranijeg kontakta kojeg nije bilo moguće povezati s transfuzijskim liječenjem (anti-HBc i anti-HBe pozitivni, HBV DNA i HBsAg negativni).

TABLICA 1. KARAKTERISTIKE DDK UKLJUČENIH U LB POSTUPKE

Broj L-B postupaka 2016.-2020. (N) i karakteristike DDK uključenih u L-B	KRVLJU PRENOSIVA BOLEST				
	HBV-OBI	HBV	HIV	HCV	Sifilis
N	6	1	3	3	2
Prosječna dob DDK	56	30	30	41	30
Spol DDK	M	M	M	2M 1Ž	M
Prosječan broj donacija	55	12	12	20	8
Savjetovalište N (%) odaziva	4 (66%)	1 (100%)	2 (66%)	2 (66%)	2 (100%)
Mogući rizici (operacije, stomatološki zahvati..)	3	0	0	0	0
Ne navode rizik	1	0	0	1	1
Rizično spolno ponašanje	0	1	2	1	1

**Zaključak:** U LB postupcima koje je proveo HZTM u periodu 2016.–2020.g., uočava se najveći broj HBV-OBI LB postupaka koji su pronađeni u prve dvije godine, te smanjenje njihovog broja u tri zadnje godine našeg istraživanja. LB postupci za HIV, HCV i sifilis su podjednake učestalosti. U navedenom periodu nije bilo prijenosa bolesti s darivatelja na primatelje što među ostalim može ukazivati na dobru selekciju darivatelja pri pregledu kao i izvrsne osjetljivosti odabranih testova.

Tijekom provođenja LB postupaka uočena je dobra suradnja sa specijalistima transfuzijske medicine koji su zaposleni u bolničkim sustavima, koja se zasnivala na težnji da se postupci provedu u cijelosti.

## Simpozij 4 – Hemostaza

## TROMBOZA I KRVARENJE U BOLESNIKA S KARCINOMOM I KRONIČNOM BOLESTI JETRE

VUČEMILO T.<sup>1</sup><sup>1</sup> KBC Sestre Milosrdnice  
• Zavod za transfuzijsku i regenerativnu medicinu

Venska tromboembolija (VTE) čest je uzrok morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s rakom (22). Takvi bolesnici imaju četiri do sedam puta veći rizik za početni VTE od bolesnika bez raka. Nadalje, bolesnici s rakom imaju tri puta veći rizik od ponavljanja VTE, dvostruko veći rizik od krvarenja povezanog s antikoagulantnim lijekovima i 10 puta veći rizik od smrti od pacijenata s VTE koji nemaju rak (22,23). Slijedom toga, prevencija i liječenje VTE u bolesnika s rakom bili su i jesu u središtu značajnih istraživanja.

Objavljene su brojne smjernice i dokumenti sa smjernicama usredotočeni na trombozu povezanu s rakom koji se primjenjuju u svakodnevnom rutinskom radu s bolesnicima kod kojih se provodi bilo koji od oblika onkološkog liječenja (operacija, kemoterapija, radioterapija) (23). Ciroza jetre, završni stadij svake kronične bolesti jetre nije samo glavni čimbenik za razvoj hepatocelularnog karcinoma već i ograničavajući čimbenik za antikancerogenu terapiju. Ciroza jetre može ograničiti kirurške i intervencijske pristupe liječenju raka, utjecati na farmakokinetiku lijekova protiv raka, povećati nuspojave kemoterapije, učiniti pacijente osjetljivima na hepatotoksičnost i na kraju rezultirati konkurentnim rizikom za morbiditet i mortalitet.

Znanje o koagulacijskom poremećaju u bolesnika s kroničnom bolesti jetre mijenjalo se zadnjih desetak godina. Dugo se smatralo da bolesnici s cirozom jetre imaju tendenciju ili sklonost epizodama krvarenja zbog smanjene sinteze čimbenika koagulacije (1,2). Jetra ima nekoliko uloga i u primarnoj i u sekundarnoj hemostazi. To je mjesto gdje se sintetiziraju fibrinogen i faktori koagulacije II, V, VII, IX, X, XI, XII i XIII (2). Faktor VIII sintetiziraju prvenstveno sinusoidne endotelne stanice te u manjoj mjeri endotelne stanice pluća, bubrega, slezene i mozga (25). Sustav koagulacije sastoji se od složene ravnoteže između prokoagulantnih i antikoagulantnih komponenti i fibrinolitičkog sustava. Ovaj sustav funkcionira tijekom hemostatskog procesa i nudi vrlo brz odgovor na endotelne ozljede s naslagama fibrina, agregacijom trombocita i stvaranjem ugrušaka. U zdravog pojedinca, događaji koagulacije suzbijaju se antikoagulantnim djelovanjem endogenih inhibitora koagulacije koji sprječavaju širenje ugrušaka, minimiziraju lokalnu ishemiju i potiču lizu nakon što se postigne hemostaza. U kontekstu bolesti jetre ova ravnoteža se mijenja što rezultira dominacijom jedne od dvije komponente. To se u nekih bolesnika može manifestirati kao hiperkoagulacija, a u drugih kao prekomjerno krvarenje (3). Iako nedostatak prokoagulantnog faktora u kroničnoj bolesti jetre može biti odgovoran za sklonost krvarenja bolesnika s cirozom, također je dokazana smanjena proizvodnja endogenih antikoagulansa poput proteina C, proteina S, trombomodulina i tPA (1,2,3). Ciroza jetre također smanjuje proizvodnju proteina što rezultira smanjenjem pričuvnih čimbenika s obje strane sustava. To smanjuje sposobnost kompenzacije čak i malih varijacija u hemostazi krvi što u nekim okolnostima može pogodovati hiperkoagulabilnosti. Primjer za to može biti smanjenje rezervi proteina C. Ciroza predstavlja konstantno stanje sistemske vazodilatacije koja posebno pogađa splahnhičko korito što doprinosi razvoju vaskularne staze. To je popraćeno visokim koncentracijama prokoagulantnih čimbenika koji pridonose velikoj prevalenciji tromboze portalne vene (26). Istodobno smanjenje prokoagulantnih i antikoagulantnih čimbenika, zajedno s povećanom razinom faktora VIII (tablica 1), mogla bi objasniti zašto bolesnici s kroničnom bolesti jetre nisu zaštićeni od arterijske i venske tromboze (6).

TABLICA 1.

Changes that alter hemostasis	Changes that promote hemostasis
Thrombocytopenia High production of ON and prostacyclins Low levels of factors II, V, VII, IX, X and XI	High concentration of FVW High levels of VIII factor
Disfibrinogenemia Deficiency of vitamin K Low levels of $\alpha$ 2 antiplasmin, XIII and TAFI factors High levels of tPA.	Reduction of protein C Protein S, antithrombin and $\alpha$ 2 macroglobulin Low levels of plasminogen
Alterations in the hemostatic system in patients with liver disease (taken and modified from: Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, Northup PG, Senzolo M, Stravitz RT, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. J Hepatol. 2010 Aug; 53(2):362–71).	



Klinička manifestacija prevladavanja hiperkoagulabilnosti je i makrovaskularna tromboza koja se može pojaviti kao plućna tromboembolija, kao duboka venska tromboza ili kao tromboza portalne vene. Budući da u kliničkoj praksi dajemo veći značaj abnormalnostima zgrušavanja koje potiču krvarenje, ove se komplikacija rjeđe dijagnosticiraju prije nego se razviju (4,19).

Sve više se u literaturi opisuje hemostatski „rebalans“ u cirozi jetre. Bolesnici s kroničnom bolešću jetre imaju abnormalnosti duž prokoagulantnog i antikoagulantnog puta (4). Iako rutinski hemostatski testovi, kao što su broj trombocita, protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno trombotoplastinsko vrijeme (APTV) i međunarodni normalizirani omjer (INR), mogu ukazivati na sklonost krvarenju, različita su istraživanja pokazala da njihove vrijednosti nisu povezane i ne predviđaju rizik od tromboze ili krvarenja. Njihova učinkovitost i klinička korelacija su loši, osobito ako se uzme u obzir činjenica da trenutni laboratorijski testovi ne daju sveobuhvatan uvid u sustav koagulacije (20).

Sustav hemostaze bolesnika s cirozom je „uravnotežen“ budući da promjene na jednom putu koagulacije uzrokuju kompenzacijske promjene na drugom putu (vidi tablicu 1) (1,3). U cirozi jetre uobičajeno je pronaći trombocitopeniju i nedostatke u funkcijama trombocita (14), koji su nadoknađeni visokim razinama von Willebrandovog faktora (30) i smanjenom razinom proteaze (koja degradira ovaj čimbenik) (15). Rezultat toga je poboljšanje prijanjanja trombocita što je dokazano in vitro ispitivanjem (15,14). Tripodi i njegovi suradnici pokazali su da je stvaranje trombina u bolesnika s cirozom normalno i da se ne razlikuje značajno od osoba bez poremećaja jetre, kada je broj trombocita između 50.000 i 60.000 trombocita po mililitru, iako je optimalna proizvodnja 100.000 trombocita ili više po mililitru (1,3).

Rezultati konvencionalnih testova slabo su povezani s početkom i trajanjem krvarenja nakon biopsije jetre ili drugih potencijalno hemoragičnih postupaka (8,15). Rezultati tih testova također slabo koreliraju s pojavom gastrointestinalnog krvarenja, prototipa hemoragičnih događaja u bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti jetre. Dodatni dokazi koji govore protiv kliničke važnosti koagulacijskih defekata otkrivenih konvencionalnim laboratorijskim pretragama pri određivanju sklonosti krvarenja kod ovih bolesnika mogu se izvući iz povijesti transplantacije jetre. U prošlosti je ovaj veliki kirurški zahvat zahtijevao masivne transfuzije plazme i drugih krvnih proizvoda kako bi se ispravile uočene abnormalnosti u testovima hemostaze (procjene koagulacije, trombocita i fibrinolize) napravljeni prije operacije. Potreba za transfuzijom je, međutim, s vremenom znatno opala, ne zbog neke značajne promjene u lijekovima, već zbog poboljšanih kirurških zahvata (1,15). Randomizirana klinička ispitivanja koja su uključivala bolesnike s kroničnom bolesti jetre pokazala su da snažni prokoagulansi, poput rekombinantnog aktiviranog faktora VII, ne uspijevaju kontrolirati krvarenje iz gornjeg probavnog trakta (12,13) ili krvarenje tijekom transplantacije jetre. Studije pokazuju da plazma bolesnika s cirozom stvara toliko trombina (konačni enzim koagulacije) kao i plazma zdravih ispitanika, pod uvjetom da se trombin mjeri metodom koja odražavaju djelovanje prokoagulansa i antikoagulansa (24). Proizvodnju trombina in vivo i in vitro regulira trombomodulin, transmembranski protein smješten na vaskularnim endotelnim stanicama koji djeluje kao glavni fiziološki aktivator proteina C (26). Plazma i reagensi koji se koriste za mjerenje protrombinskog vremena ne sadrže trombomodulin. Sukladno tome, ovaj test mjeri količinu trombina koji se stvara u plazmi u funkciji pokretača prokoagulansa, ali ne i trombin koji inhibiraju pokretači antikoagulansa, osobito protein C, koji se u potpunosti ne aktivira u odsutnosti trombomodulina. Vjerojatno je i ovo razlog zašto test protrombinskog vremena i srodni testovi uistinu ne predstavljaju ravnotežu koagulacije in vivo te su nedovoljni za procjenu rizika od krvarenja u tim stečenim stanjima, kao što su koagulopatije u bolesti jetre i neonatalne koagulopatije, u kojima postoji ravnoteža hemostaze zbog istodobnog smanjenja prokoagulansa i antikoagulansa (2).

Bez sumnje, bolesnici s uznapredovalim stadijem bolesti jetre imaju izražene simptome krvarenja, osobito u gastrointestinalnom traktu. Ipak, evaluaciju te tendencije krvarenja samo na temelju abnormalnih razina konvencionalnih biomarkera koagulacije treba razmotriti s oprezom. Budući da su testovi koji se obično koriste za procjenu ravnoteže koagulacije usredotočeni na abnormalnosti prokoagulansa, ne pokazuju tu „ravnotežu“ i ne bi se trebali smatrati korisnim alatima za predviđanje krvarenja ili drugih trombotičnih komplikacija. Iz tog razloga oni nisu prikladni alati za donošenje odluka za pacijente s cirozom jetre (6,17).

Kad se bolesnici procjenjuju pomoću testa stvaranja trombina, rezultati ne pokazuju hipokoagulabilnost. Objašnjenje sklonosti krvarenju trebalo bi potražiti u temeljnim stanjima poput portalne hipertenzije, endotelne disfunkcije, bakterijske infekcije i zatajenja bubrega (15).

Procjena hemostaze u bolesnika s kroničnom bolešću jetre na osnovi kliničkih zbivanja u različitim situacijama dovodi u pitanje tvrdnju da velika koagulopatija u tih bolesnika vodi dosljedno do krvarenja. U određenim okolnostima kao što je prisutna maligna bolest i operacija maligne bolesti rizik od tromboembolijskih događaja može biti veći od rizika krvarenja. Tromboza portalne vene ili drugo sjelo VTE ograničava mogućnosti liječenja

onkološkog bolesnika s cirozom te treba razmisliti o primarnoj prevenciji niskomolekularnim heparinom ili antagonistima vitamina K (20,15).

Protein C je protein ovisan o vitaminu K, pa bi liječenje antagonistima vitamina K moglo dodatno smanjiti razinu ovog prirodno prisutnog antikoagulansa u bolesnika s cirozom jetre, povećavajući rizik od tromboze (1). Svakako treba razmotriti i ovu činjenicu, pogotovo kod uznapredovalog stadija jetrene bolesti. Noviji izravni inhibitori trombina i inhibitori faktora X (npr. Dabigatran, rivaroksaban i apiksaban) za razliku od antagonistia vitamina K ne smanjuju razinu proteina C, ne zahtijevaju praćenje, ne ovise o antitrombinu kao niskomolekularni heparini, međutim bolesnici s bolesti jetre nisu uključeni u studije za ispitivanje ovih lijekova.

Prema najnovijim smjernicama, antikoagulacijske mogućnosti koje se preporučuju za liječenje VTE-a povezanog s rakom uključuju sheme s jednim lijekom (npr. LMWH ili DOAC-i) (monoterapija) i režime s više od jednog lijeka (npr. LMWH + DOAC-i) (kombinirana terapija). LMWH, UFH, fondaparinuks, rivaroksaban ili apiksaban mogu se koristiti za početnih 5 do 10 dana antikoagulacije u bolesnika s rakom s akutno dijagnosticiranom VTE u odsutnosti teškog oštećenja bubrega. LMWH je preferiran u odnosu na druge. DOAC se mogu koristiti u bolesnika s rakom bez teškog oštećenja bubrega, gastrointestinalnog ili genitourinarnog maligniteta ili rizika od krvarenja, prethodnih operacija tankog crijeva ili jakih interakcija između lijekova (23).

Relativni nedostatak oba pokretača koagulacijskog sustava čini ravnotežu krhkom u bolesnika s jetrenom bolešću i može je dovesti do krvarenja ili tromboze, ovisno o prevladavajućim čimbenicima rizika. Bolesnike s kroničnom bolešću jetre, VTE i uz prisutnu malignu bolest treba liječiti antikoagulansima kao i svakog drugog bolesnika.

## LITERATURA

1. Tripodi A, Primignani M, Mannucci PM. Abnormalities of hemostasis and bleeding in chronic liver disease: the paradigm is challenged. *Intern Emerg Med* 2010;5(1): 7–12.
2. Northup PG. Hypercoagulation in liver disease. *Clin Liver Dis* 2009;13(1):109–16.
3. Tripodi A. The coagulopathy of chronic liver disease: is there a causal relationship with bleeding? No. *Eur J Intern Med* 2010;21(2): 65–9.
4. Gomez K, McVey JH. Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci* 2006;11:1349–59.
5. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl 1): 95–101.
6. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, Northup PG, Senzolo M, Stravitz RT *i sur*. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *J Hepatol* 2010;53(2):362–71.
7. Tellez-Avila FI, Chavez-Tapia NC, Torre-Delgado A. [Coagulation disorders in cirrhosis]. *Rev Invest Clin* 2007;59(2):153–60.
8. Ewe K. Bleeding after liver biopsy does not correlate with indices of peripheral coagulation. *Dig Dis Sci* 1981;26:388–93.
9. Vieira da Rocha EC, D'Amico EA, Caldwell SH *i sur*. A prospective study of conventional and expanded coagulation indices in predicting ulcer bleeding after variceal band ligation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:988–93.
10. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F *i sur*. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology* 2004;127:1123–30.
11. Bosch J, Thabut D, Albillos A *i sur*. Recombinant factor VIIa for variceal bleeding in patients with advanced cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008;47:1604–14.
12. Lodge JP, Jonas S, Jones RM *i sur*. Efficacy and safety of repeated perioperative doses of recombinant factor VIIa in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:973–9.
13. Planinsic RM, van der Meer J, Testa G *i sur*. Safety and efficacy of a single bolus administration of recombinant factor VIIa in liver transplantation due to chronic liver disease. *Liver Transpl* 2005;11:895–900.
14. Giannini EG, Savarino V. Thrombocytopenia in liver disease. *Curr Opin Hematol* 2008;15:473–80.
15. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V *i sur*. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2009;137:2105–11.
16. Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med* 2010;362:823–832[Erratum, *N Engl J Med* 2011;364:490.]
17. Northup PG, McMahon MM, Ruhl AP *i sur*. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thromboembolism. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1524–152.
18. Sogaard KK, Horvath-Puho E, Gronbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sorensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2009;104:96–101.
19. Saleh T, Matta F, Alali F, Stein PD. Venous thromboembolism with chronic liver disease. *Am J Med* 2011;124:64–8.
20. Aldawood A, Arabi Y, Aljumah A *i sur*. The incidence of venous thromboembolism and practice of deep venous thrombosis prophylaxis in hospitalized cirrhotic patients. *Thromb J* 2011;9:1–1.
21. Zocco MA, Di Stasio E, De Cristofaro R *i sur*. Thrombotic risk factors in patients with liver cirrhosis: correlation with MELD scoring system and portal vein thrombosis development. *J Hepatol* 2009;51:682–9.
22. Streiff MB, Holmstrom B, Angelini D, Ashrani A, Bockenstedt PL, Chesney C *i sur*. NCCN guidelines insights: Cancer-associated venous thromboembolic disease, version 2.2018. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2018;16(11):1289–303.

23. Key NS, Khorana AA, Kuderer NM, Bohlke K, Lee AYY, Arcelus JI i sur. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with Cancer: ASCO clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2020;38(5):496–520.
24. Tsoukalas N, Tsapakidis K, Galanopoulos M, Karamitrousis E, Kamposioras K, Tolia M. Real world data regarding the management of cancer-associated thrombosis. *Curr Opin Oncol.* 2020;32(4):289–94.
25. Hollestelle MJ, Geertzen HG, Straatsburg IH, van Gulik TM, van Mourik JA. Factor VIII expression in liver disease. *Thromb Haemost* 2004;91(2): 267–75.
26. Artiko V, Obradovic V, Petrovic M, Perisic M, Stojkovic M, Sobic-Saranovic D i sur. Hepatic radionuclide angiography and Doppler ultrasonography in the detection and assessment of vascular disturbances in the portal system. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(75):892–7.

## PRIMJENA SREDNJIH DOZA NISKOMOLEKULARNIH HEPARINA ZA PREVENCIJU TROMBOEMBOLIJA U COVID-19 BOLESNIKA

BOŠNJAK B.<sup>1</sup>, Samardžija M.<sup>1</sup>, Major Radin A.<sup>1</sup>, Mitka A.<sup>1</sup>, Vidović S.<sup>1</sup>, Perković D.<sup>1</sup>, Brkić Barbarić D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KBC Osijek

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Od početka pandemije uočena je visoka učestalost tromboembolija u pacijenata hospitaliziranih radi COVID-19. Stručna javnost je odmah prihvatila potrebu primjene tromboprolifakse u svih hospitaliziranih bolesnika. I nadalje je otvoreno pitanje doziranja niskomolekularnih heparina (NMH) u prevenciji tromboembolizma i smrtnosti.

**Cilj:** Ispitati učinkovitost i sigurnost tromboprolifakse srednjim dozama NMH u COVID-19 bolesnika sa srednje teškom i teškom bolesti.

**Ispitanici i metode:** Retrospektivnom analizom obuhvaćeno je 98 pacijenata koji su liječeni prema internom algoritmu tromboprolifakse za COVID-19 bolesnike. Za bolesnike sa srednje teškim i teškim oblikom bolesti predviđeno je korištenje srednjih doza NMH. Kada se koristio enoksaparin, standardna profilaktička doza podrazumijevala je 20, 40, 60 mg za pacijente tjelesne mase <50, 50–90, >90 kg. Terapijska doza je 1 mg/kg/2x dnevno. Doze između ovih predstavljaju srednje profilaktičke doze. U slučaju težeg bubrežnog zatajenja i povećanih rizika krvarenja doze su u svakoj kategoriji bile reducirane za 25–50%. U slučaju korištenja drugog NMH doze su ekvivalentno prilagođene. Primarna mjera ishoda je pojava tromboembolijskog događaja u arterijskoj ili venskoj cirkulaciji te diseminirano. Sekundarni ishodi su pojava krvarenja i smrt bilo kojeg uzroka.

**Rezultati:** Istraživanje je provedeno na 98 ispitanika, od kojih je 55 (56,1 %) muškaraca i 43 (43,9 %) žena, bez značajne razlike u raspodjeli prema težini bolesti. Od ukupno 88 (89,8 %) ispitanika starijih od 50 godina, njih 59 (95,2 %) ima teški oblik COVID-19 (Fisherov egzaktan test,  $P = 0,04$ ). Nema značajne razlike u tromboembolijskim događajima u odnosu na težinu COVID-19 (Tablica 1).

TABLICA 1.

	Broj (%) ispitanika prema težini COVID-19			P*
	Srednje teški oblik	Teški oblik	Ukupno	
	(n = 36)	(n = 62)	(n = 98)	
Spol				
Muškarci	17 (47,2)	38 (61,3)	55 (56,1)	0,21
Žene	19 (52,8)	24 (38,7)	43 (43,9)	
Dob				
≤ 50 godina	7 (19,4)	3 (4,8)	10 (10,2)	<b>0,04</b>
> 50 godina	29 (80,6)	59 (95,2)	88 (89,8)	
Duboka venska tromboza	1 (2,8)	0	1 (1)	0,37
ICV/IM	0	1 (1,6)	1 (1)	> 0,99
DIK	0	3 (4,8)	3 (3,1)	0,3

\*Fisherov egzaktan test

Od 98 ispitanika njih 9 (9,2 %) je primalo profilaktičku dozu NMH, 60 (61,2 %) je primalo srednju dozu, a na terapijskoj dozi NMH bilo je 29 (29,6 %) ispitanika. Ukupno se bilježi 5 (5 %) trombotičkih nuspojava, po 1 (1 %) ispitanik s dubokom venskom trombozom i moždanim udarom, dok ih je 3 (3,1 %) imalo DIK, bez značajne razlike u raspodjeli u odnosu na razinu tromboprotikse. Niti jedan ispitanik nije imao plućnu emboliju niti ostale arterijske tromboze. S obzirom na prisutna krvarenja, blaga krvarenja su značajnije prisutna kod ispitanika na terapijskoj dozi, kod 4 (13,8 %) ispitanika (Fisherov egzaktan test,  $P = 0,01$ ). Ozbiljno ali ne ugrožavajuće krvarenje imao je jedan ispitanik na profilaktičkoj dozi. Ukupno je 26 (26,5 %) pacijenata umrlo, nešto manje kod primjene srednjih doza, no razlike u raspodjeli, iako postoje, nisu statistički značajne (Tablica 2).

TABLICA 2.

	Broj (%) ispitanika				P*
	Profilaktičke doze	Srednje doze	Terapijske doze	Ukupno	
	(n = 9)	(n = 60)	(n = 29)	(n = 98)	
Duboka venska tromboza	1 (11,1)	0	0	1 (1)	0,09
ICV/IM	1 (11,1)	0	0	1 (1)	0,09
DIK	0	0	3 (10,3)	3 (3,1)	0,07
Krvarenja					
Blaga	0	0	4 (13,8)	4 (4,1)	<b>0,01</b>
Ozbiljna	1 (11,1)	0	0	1 (1)	0,09
Smrtni ishod					
Ne	5 (55,6)	49 (81,7)	18 (62,1)	72 (73,5)	0,06
Da	4 (44,4)	11 (18,3)	11 (37,9)	26 (26,5)	

\*Fisherov egzaktan test

**Zaključak:** Ukupno mali broj ispitanika ne dopušta nam zaključivati o utjecaju intenziviranja tromboprotikse na pojavnost tromboembolija i smrtnost, te je istraživanje potrebno napraviti na više ispitanika.

## IZAZOV U LIJEČENJU TROMBOEMBOLIZMA KOD PACIJENATA S NASLJEDNOM HIPODISFIBRINOGENEMIJOM – ISKUSTVA KBC OSIJEK

PERKOVIĆ D.<sup>1</sup>, Brkić Barbarić D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Osijek  
• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Urođeni nedostatak ili poremećaj funkcije fibrinogena je rijedak koagulacijski poremećaj. Klasificira se kao kvantitativni i kvalitativni oblik. Kvantitativni oblik podrazumijeva hipofibrinogenemiju i afibrinogenemiju, a karakteriziran je smanjenom razinom ili potpunim nedostatkom fibrinogena. Kvalitativni oblik definira se kao disfibrinogenemija, a karakteriziran je normalnom razinom disfunkcionalnog fibrinogena ili hipodisfibrinogenemija, koji je karakteriziran sniženom razinom disfunkcionalnog fibrinogena.

Fibrinogen je glikoprotein veličine 340 kD, građen je od 3 polipeptidna lanca A- $\alpha$ , B- $\beta$  i  $\gamma$ , a ima ključnu ulogu u prokoagulantnom i fibrinolitičkom putu (4). Sintezu fibrinogena kodiraju 3 gena (FGA, FGB, FGG), koji se nalaze na četvrtom kromosomu (4q).

Mehanizam nastanka tromboze kod nasljedne hipodisfibrinogenemije nije u potpunosti razjašnjen. Prema jednoj hipotezi zbog nedostatka/disfunkcije fibrinogena dolazi do povećane koncentracije slobodnog trombina u cirkulaciji, koji zatim uzrokuje pojačanu aktivaciju trombocita, te izostaje kompetitivna inhibicija agregacije trombocita slobodnim fibrinogenom.

**Prikaz slučaja:** Pacijentica (68 godina) hospitalizirana 01.05. 2021. na Zavod za kardiologiju radi neprocirane duboke venske tromboze desne noge. U lab.nalazima po prijemu evidentirana je snižena razina fibrino-

gena (<0.3 g/L) uz produljen PV (0.26, 2.38 INR) i povišene D-dimere (6543 ug/L FEU). Nakon supstitucije krioprecipitatom započeto je liječenje terapijskim dozama NMH. Četrnaest dana po otpustu u terapiju je uveden oralni antikoagulans-rivaroksaban a 20 mg 1x dnevno. Dosadašnja antikoagulantna terapija nije komplicirana krvarenjem.

Dodatnom obradom sustava hemostaze pacijentici je isključena nasljedna trombofilija i antifosfolipidni sindrom.

Iz osobne anamneze: imala je dvije uredne trudnoće i dva operacijska zahvata, nakon kojih nije pojačano krvarila. Unazad nekoliko godina poznat kolitis uz polipozu kolona.

Iz obiteljske anamneze: sinu (30 godina) tijekom prijeoperacijske obrade tumora testisa verificirana hipodisfibrinogenemija.

**Rasprava:** Klinička slika pacijenata sa nasljednom hipodisfibrinogenemijom prema istraživanju Casini i sur. varira od asimptomatskih slučajeva (22%) preko sklonosti krvarenju (45%) do paradoksalno tromboembolijskih incidenata(43%) (1). Asimptomatski slučajevi se najčešće dijagnosticiraju tijekom pripreme za operacijski zahvat ili tijekom rutinskih kontrola. Laboratorijska dijagnostika osim fibrinogena u plazmi (koagulacijska metoda) i fibrinogen antigena (imunohistokemijska metoda) uključuje i određivanje kompletnog koagulograma: protrombinskog vremena, trombinskog vremena, aktivnog parcijalnog protrombinskog vremena, te broja trombocita. Na nasljednu hipodisfibrinogenemiju ukazuje niska razina fibrinogena u plazmi i niska razina fibrinogen antigena (omjer funkcija/antigen<0.7).

Za konačnu potvrdu hipodisfibrinogenemije potrebno je genetičko testiranje mutacija gena za fibrinogen.

Dosad su identificirane 32 mutacije u tri gena koja kodiraju za fibrinogen; 10 (31%) u FGA genu, 5 (16%) u FGB genu i 17(53%) u FGG genu. Određene mutacije gena za fibrinogen su povezane sa sklonošću arterijskim i venskim trombotskim incidentima (Dusart, Caracas, Ijmuden, NewYork, Napulj).

Krvarenje kod pacijenta sa hipodisfibrinogenemijom je u najvećim slučajevima blago. Sklonošću krvarenju su najviše pogođene žene generativne dobi (opstetričke komplikacije) i pacijenti sa pridruženim drugim koagulopatijama uključujući hemofilije i trombocitopatije.

Prikazana pacijentica je član jedne od dvije obitelji na području istočne Hrvatske kod kojih je više članova razvilo tromboembolijske komplikacije. Kod ukupno osam članova iz obje obitelji dijagnosticirana je hipodisfibrinogenemija. (Tablica 1)

TABLICA 1.

	Fbg/Akt Ref. vrijed. (1,8–4,4 g/L)	Fbg/Ag Ref. vrijed. (1,8–3,5 g/L)	KOMPLIKACIJE KRVARENJA	TROMBOEMBOLIJSKE KOMPLIKACIJE	ANTIKOAGULANTNA TERAPIJA
<b>1. OBITELJ</b>					
PACIJENTICA (1953.)	1,0, najniže 0,3	–	NE	DVT phemoropoplitealis (5/2021.)	Rivaroksaban a 20 mg 1x dnevno
SIN (1991.)	0,6	1,3	NE	NE	
<b>2.OBITELJ</b>					
PACIJENTICA (1948.)	0,7		NE	DVT cruris recidivans (2004., 2019.)	2004. varfarin/6 mj., 2019. rivaroksaban a 20mg 1x dnevno /1.5 god., potom apiksaban 2.5 mg 2x dnevno.
KČER (1975.)	–	–	NE	NE	
BRAT (1957.)	0,6			DVT cruris	Rivaroksaban a 20 mg 1x dnevno
NEČAK (1981.)	0,6	1,4		DVT cruris recidivans (2001., 2015.)	Apiksaban a 2.5 mg 2x dnevno
NEČAK (1988.)	0,6	1,3		NE	
NEČAK (1997.)	0,6	1,2		NE	



**Zaključak:** U našim kliničkim slučajevima u liječenju duboke venske tromboze kod pacijenata sa hipodisfibrinogenemijom odabrali smo antikoagulanse iz skupine DOAC-a (rivaroksaban i apiksaban). U liječenju smo koristili pune terapijske doze navedenih lijekova, te prema našem iskustvu nisu zabilježene značajnije komplikacije krvarenjem.

Prema istraživanjima kod pacijenata sa hipodisfibrinogenemijom, koji su razvili tromboembolijski incident indicirana je dugotrajna antikoagulantna terapija.

S obzirom na primjenu antikoagulantne terapije u koagulopatiji, koja se može prezentirati i krvarenjem, takvi pacijenti zahtijevaju redovite kontrole i dugotrajno praćenje.

## TESTIRANJE ANTIHEPARINSKIH PROTUTIJELA U BOLESNIKA NA IZVANTJELESNOJ MEMBRANSKOJ OKSIGENACIJI

GOJČETA K.<sup>1</sup>, Tomac G.<sup>1</sup>, Rimac V.<sup>1</sup>, Raos M.<sup>1</sup>, Lukić M.<sup>1</sup>, Bojanić I.<sup>1</sup>, Golubić Ćepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** Izvantjelesna membranska oksigenacija (engl. *Extracorporeal Membrane Oxygenation, ECMO*) postupak je izvantjelesne mehaničke cirkulacijske ili respiracijske potpore kod bolesnika sa životno ugrožavajućim oblicima zatajivanja srca ili pluća. Za bolesnike na ECMO-u važno je sprječavanje zgrušavanja krvi u uređaju radi održanja protoka krvi i izmjene plinova. Dodatni rizik je kontakt bolesnikove krvi s umjetnim površinama što pogoduje pokretanju koagulacijske kaskade. Smjernice preporučuju kontinuiranu primjenu nefrakcioniranog heparina što u bolesnika može izazvati heparinom uzrokovanu trombocitopeniju (engl. *Heparin-induced thrombocytopenia, HIT*) kao tešku imunosno posredovanu nuspojavu primjene lijeka. HIT je uzrokovan protutijelima koja su usmjerena na kompleks heparina i trombocitnog faktora 4 (engl. *platelet factor 4, PF4*).

**Cilj:** Budući da se u bolesnika na ECMO-u standardno primjenjuje heparin radi sprječavanja zgrušavanja krvi, oni imaju povećan rizik za razvoj HIT-a. Cilj ove studije je utvrditi učestalosti antiheparinskih protutijela u bolesnika na ECMO-u.

**Materijali i metode:** Studija je provedena u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u razdoblju od siječnja 2018. do rujna 2021. godine. Uključeni su bili odrasli kardiološki bolesnici na ECMO-u u kojih je postavljena sumnja na HIT. Za sve bolesnike napravljena je procjena vjerojatnosti HIT-a prema sustavu bodovanja 4T zbroj (engl. *T4 score*) prema kojem su bolesnici podijeljeni u 3 skupine: skupina 1 – bolesnici s malenom (zbroj  $\leq 3$ ), skupina 2 – umjerenom (zbroj 4–5) i skupina 3 – velikom (zbroj 6–8) vjerojatnošću za HIT. Svim bolesnicima učinjeno je određivanje antiheparinskih protutijela ELISA testom (IgG anti-heparin/PF4 antibody-based ELISA, LIFECODES; Immucor, USA). Test je pozitivan ako je izmjerena optička gustoća (engl. *optical density, OD*)  $>0,400$ . Prema OD bolesnici su podijeljeni u skupinu malog rizika trombogenih komplikacija i HIT-a (OD od 0,400 do 0,999) i skupinu visokog rizika (OD  $>1,000$ ). Svim pozitivnim bolesnicima napravljen je funkcijski test protočnom citometrijom kojim se mjeri aktivacija trombocita. Ako je izmjereno više od 10% CD62 pozitivnih trombocita u populaciji CD41 pozitivnih stanica pri niskoj koncentraciji heparina i  $\geq 50\%$  inhibicije trombocitne aktivacije pri visokoj koncentraciji heparina smatra se pozitivnim.

**Rezultati:** U studiju su bila uključena 62 kardiološka bolesnika na ECMO-u od kojih je 59 (95%) bilo na vensko-arterijskom uređaju, a 3 (5%) na vensko-venskom. Medijan dana na ECMO-u bio je 8,5 dana (2–51). Muškaraca je bilo 74%, a žena 26%. Medijan dobi ispitivane populacije bio je 63 (raspon 21–81) godine. Prema 4T zbroju 23 (37%) bolesnika su bila u skupini 1, 38 (61%) u skupini 2 i 1 (2%) u skupini 3. Medijan broja trombocita na dan testiranja bio je  $55 \times 10^9/L$  (raspon 15–250  $\times 10^9/L$ ).

Antiheparinska protutijela ELISA testom dokazana su u 9/62 (15%) bolesnika, od kojih je jedan prema 4T zbroju bio u skupini 1, a 8 u skupini 2. Od svih pozitivnih bolesnika, 3 ih je imalo OD  $<1,000$ , a 6 OD  $>1,000$ . U 2 bolesnika s OD 0,429 i OD 0,668 nije zamijenjen heparin s fondaparinuxom. Funkcijski test bio je pozitivan u 3/9 bolesnika s OD  $>1$ , svi prema 4T zbroju iz skupine 2. Umrlo je 4/9 bolesnika; oba u kojih nije ukinuta terapija heparinom, a niti jedan iz skupine s pozitivnim funkcijskim testom.

Zanimljivo je da bolesniku iz skupine 3 prema 4T zbroju nisu dokazana antiheparinska protutijela ELISA testom.

**Zaključak:** Učestalost antiheparinskih protutijela u bolesnika na ECMO-u u našoj studiji odgovara podacima iz literature. Funkcijski test je bio pozitivan samo u bolesnika s OD>1,000 s pozitivnom prediktivnom vrijednosti testa 50% pa kao i drugi autori predlažemo da se razmotri podizanje granične vrijednosti za ELISA test. Klinički sustav bodovanja za vjerojatnost HIT-a u ovoj skupini bolesnika nije korelirao s laboratorijskim rezultatima na što su upozorila i druga istraživanja. U skladu s time treba razmotriti uvođenje osjetljivijih kliničkih sustava bodovanja za vjerojatnost HIT-a za bolesnike na ECMO-u.

## VTE DURING CHEMOTHERAPY – WHEN TO SUSPECT AND WHEN TO PROTECT?

SKOKO M.<sup>1</sup>, Vucemilo T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Hospital Center Sestre Milosrdnice  
• Department for transfusion and regenerative medicine

**Introduction:** Patients with cancer have an increased risk of both arterial and venous thrombotic events compared with the general population. Chemotherapeutic agents contribute to that risk. Anticancer agents may damage the endothelium, decrease anticoagulants or increase procoagulants leading to activation of coagulation, or activate platelets. The incidence rate of arterial thromboembolism (ATE) and venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer is estimated to be 2% to 5% and 4% to 20%, respectively.

**Methods:** We reviewed profile of 35 patients who were treated with chemotherapy at the University hospital for Tumors from April 2020. until August 2021. and during that treatment clinically suspected for DVT. They were all clinically presented with unilateral swelling of an arm or a leg during chemotherapy. We reviewed and compared next data: the age, sex, type of tumor, type of chemotherapy, level of DD, Doppler results and Khorana score prior a chemotherapy treatment.

**Results:** Mean age was 64,4. There were 63% female patients and 27% male. Doppler confirmed 15 deep vein thrombosis (dvt) events, and 18 patient were diagnosed as no dvt. Mean value of the DD in patients with DVT was 7,5, from 1,4 mg/L to 26mg/L, and in group without dvt the mean value was 2,4, from 0,35 do 7,6. 28% patients were classified as Khorana score 2 but only 42% percent of them developed dvt, same percent of confirmed dvt among Khorana 0 risk patients. 65% of patients who were confirmed with dvt were treated for colorectal carcinoma. 46% were receiving capecitabine, and 23% received immunotherapy with classic oral chemotherapy.

**Conclusion:** After clinical suspicion of dvt the levels of DD in most cancer patients were increased. Significant difference was shown among confirmed and unconfirmed dvt patients. Levels of DD in patients with no signs of dvt were also elevated, like previously studied by Jing Yu and al. It is suggested that the current D-dimer reference range is unsuitable for cancer patients, which limits the application of D-dimer testing in laboratory diagnosis and the prevention of tumor venous thrombosis and venous thromboembolism (VTE). Most of the cancer patient on chemotherapy have increased level of D-dimers. Diluted tests for D-dimers help to differentiate high-risk patients but the imaging diagnostic test are necessary for the confirmation.

Khorana score in most patients who developed dvt was 0. That rise the question of periodic evaluation of risk factors for dvt in patient receiving chemotherapy. Individual evaluation is necessary for including prophylaxis at the right time using available applications like ISTH app for treatment and prophylaxis of VTE in cancer patients (<https://www.itaccme.com/>).

When to suspect – cancer patient receiving chemotherapy with unilateral swelling of a lower or upper limb, pain is usually absent, D-dimer in diluted range, usually over 5mg/L.

When to protect – periodical evaluation during chemotherapy. Clinical symptoms, stage of disease, type of therapy, D-dimer level and, if needed, Doppler ultrasound imaging.

**Keywords:** chemotherapy, D-dimer (DD), venous thromboembolism (VTE)

## USPOREDBA METODE IMUNOFLUORESCENCIJE (PSIFT-M) I METODE VEZANJA TROMBOCITNIH ANTIGENA POMOĆU MONOKLONSKIH PROTUTIJELA (MAIPA-EIA) ZA ODREĐIVANJE ANTITROMBOCITNIH AUTOPROTUTIJELA U BOLESNIKA S IMUNOM TROMBOCITOPENIJOM (ITP)

NOVOSEL M.<sup>1</sup>, Brkić N.<sup>2</sup>, Kajfeš M.<sup>1</sup>, Kovačević M.<sup>1</sup>, Mitrović Z.<sup>3</sup>, Kruhonja Galić Z.<sup>4</sup>, Jagnjić S.<sup>5</sup>, Tomičić M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HZTM

• Odjel za dijagnostiku trombocita, leukocita i hemostazu

<sup>2</sup>Opća županijska bolnica Vinkovci

• Odjel za transfuziju

<sup>3</sup>Klinička bolnica Dubrava

• Odjel za hematologiju

<sup>4</sup>HZTM

• Odjel za eritrocitnu dijagnostiku

<sup>5</sup>HZTM

• Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti

**Uvod:** Imuna trombocitopenija (ITP) je imunološki posredovan smanjen broj trombocita u krvi bolesnika. Prema međunarodnim preporukama za dijagnostiku i liječenje ITP-a, na bolest se treba posumnjati kada je vrijednost broja trombocita  $\leq 100 \times 10^9/L$ , bez drugih poznatih razloga za trombocitopeniju. Laboratorijsko ispitivanje prisutnosti antitrombocitnih autoprotutijela, vezanih na trombocite i slobodnih u plazmi ispitanika, metodom vezanja trombocitnih antigena pomoću monoklonskih protutijela (MAIPA), može doprinijeti konačnom postavljanju dijagnoze ITP-a.

**Cilj:** Cilj ovog ispitivanja je retrospektivno analizirati i usporediti rezultate određivanja antitrombocitnih autoprotutijela IgG razreda kod bolesnika sa ITP-om pomoću dvije metode (imunofluorescencija i MAIPA). Prema rezultatima određivanja glikoproteinske specifičnosti autoprotutijela odabrati monoklonska protutijela za rutinsku primjenu u MAIPA testu.

**Materijal i metode:** U razdoblju od početka 2011. godine do ožujka 2020. godine u Odjelu za dijagnostiku trombocita, leukocita i hemostazu Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, učinjeno određivanje antitrombocitnih autoprotutijela (ATA) za 88 bolesnika sa dijagnozom ITP-a, upućenih iz Zavoda za hematologiju KB Dubrava, Zagreb. Raspon broja trombocita u krvi bolesnika tijekom liječenja bio je od 0 do  $122 \times 10^9/L$ .

Uzorci krvi ispitanika: po 2 epruvete od 6 mL s antikoagulansom EDTA za svakog bolesnika.

U svim uzorcima krvi određen je broj trombocita na hematološkom brojaču stanica KXN21, Sysmex i određena ATA.

ATA su određena primjenom dvije metode. Metoda I bila je manualni test imunofluorescencije (PSIFT-M), direktni (DT) i indirektni test (IT), mod. prema von dem Borne-u. Metoda II bila je enzimsko-immunološki test s monoklonskim protutijelima, usmjerenim na trombocitne glikoproteinske komplekse (MAIPA-EIA, GPIIb/IIIa i GPIb/IX), DT i IT, mod. prema Kiefel-u. Od siječnja 2011. do rujna 2017. godine, metoda za dokazivanje ATA bila je metoda I (55 bolesnika). Od listopada 2017. godine ona je zamijenjena Metodom II (33 bolesnika). Rezultat testa za ATA izviješten je kao pozitivan ako je DT i/ili IT bio pozitivan. Rezultat testa za ATA bio je negativan ako je DT i IT bio negativan, ili je IT bio negativan, a DT nije učinjen. MAIPA-EIA (DT i/ili IT) test može biti pozitivan sa oba ili jednim monoklonskim protutijelom: anti-CD41a (GPIIb/IIIa), anti-CD42a (GPIb/IX).

**Rezultati:** Test za ATA učinjen je za 88 bolesnika. U 55 od 88 (62%) bolesnika izveden je metodom I (PSIFT-M, DT, IT), a u 33 od 88 (38%) metodom II (MAIPA-EIA, DT, IT).

Test za ATA izveden metodom I (PSIFT-M, DT, IT) bio je pozitivan u 19 od 55 (35%) bolesnika, a metodom II (MAIPA-EIA, DT, IT) u 25 od 33 (76%) bolesnika s ITP-om.

Srednja vrijednost broja trombocita u skupini ispitanika kod kojih su dokazana ATA metodom PSIFT-M bila je  $34 \times 10^9/L$ , a u skupini ispitanika čiji su uzorci testirani metodom MAIPA-EIA bio je  $35 \times 10^9/L$ . Rezultati pokazuju značajno veću osjetljivost MAIPA-EIA metode.

Rezultati pozitivnog MAIPA-EIA testa (direktnog i/ ili indirektnog) u 25 bolesnika, prema trombocitnoj glikoproteinskoj specifičnosti za oba primijenjena monoklonska protutijela; anti-CD41a (GPIIb/IIIa) i anti-CD42a (GPIb/IX) prikazani su u [Tablici 1](#).

TABLICA 1. RASPODJELA ISPITANIKA PREMA GLIKOPROTEINSKOJ SPECIFIČNOSTI AUTOPROTUTIJELA DOKAZANIH U MAIPA METODI (DT I/ILI IT) (N=25)

Rezultat MAIPA-EIA testa:		Broj ispitanika
DT +	IT	
MAIPA-DT pozitivan s	MAIPA-IT pozitivan s	2
GPIIb/IIIa, GP b/IX	GPIIb/IIIa, GPIb/IX	
GPIIb/IIIa, GPIb/IX	GPIIb/IIIa	
GPIIb/IIIa	GPIIb/IIIa	
GPIb/IX	GPIb/IX	
GPIIb/IIIa; GPIb/IX	MAIPA-IT negativan	
GPIIa/IIIb	negativan	4
GPIb/IX	negativan	4
MAIPA-DT negativan	MAIPA-IT pozitivan s	3
negativan	GPIIb/IIIa	
negativan	GPIb/IX	
Ukupno		25

MAIPA-EIA=Test vezanja trombocitnih antigena pomoću monoklonskih protutijela; EIA=enzimsko imunološki esej, DT- direktni test; IT-indirektni test; GP=trombocitni glikoproteinski kompleks IIb/IIIa i Ib/IX- trombocitni glikoproteinski kompleks Ib/IX

U 19 od 25 (76%) ispitanika test MAIPA-EIA bio je pozitivan s monoklonskim protutijelom na GPIIb/IIIa, a samo s GPIb/IX bio je pozitivan u 6 od 25 (24 %).

Oba monoklonska protutijela, anti-CD41 i anti-CD42a, pokazala su zadovoljavajuću specifičnost.

**Zaključak:** Test za određivanje antitrombocitnih autoprotutijela IgG razreda (ATA) izveden metodom I (PSIFT-M, DT, IT) bio je pozitivan u 19 od 55 (35%) bolesnika, a metodom II (MAIPA-EIA, DT, IT) u 25 od 33 (76%) bolesnika s ITP-om. Metoda MAIPA izvedena kao direktni i indirektni test, u usporedbi s metodom PSIFT-M, pokazala je značajno veću osjetljivost. Ona omogućuje i određivanje glikoproteinske specifičnosti autoprotutijela. Oba monoklonska protutijela, anti-CD41a (GPIIb/IIIa) i anti-CD42a (GPIb/IX), zadovoljavajuće su specifičnosti i mogu se koristiti u rutinskoj primjeni.

## Simpozij 5 – Imunohematologija

### SEROLOŠKE KARAKTERISTIKE AUTOPROTUTIJELA I DIJAGNOSTIKA AUTOIMUNOSNE HEMOLITIČKE ANEMIJE

RAOS M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

#### Uvod

Autoimunosna hemolitička anemija (AIHA) je rijetka autoimunosna bolest karakterizirana hemolizom povezanom s prisustvom imunoglobulina (Ig) G, IgM ili IgA i/ili komponenata komplementa sustava na eritrocitima bolesnika. Učestalost AIHA-e procjenjuje se od 1 do 3 na 100 000 stanovnika godišnje. Mehanizmi koji su uključeni u razvoj AIHA-e nisu u potpunosti poznati<sup>1</sup>.

Prema serološkim karakteristikama autoprotutijela, može podijeliti na toplu (65% do 70%), hladnu (20% do 25%) i miješanu (8%) AIHA-u (tablica 1). Klasično, toplu AIHA-u karakterizira prisustvo IgG na eritrocitima bolesnika i/ili u serumu koji reagira u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT), a hladnu AIHA-u karakterizira prisutnost C3d na eritrocitima bolesnika te IgM autoprotutijela u visokom titru na 4°C (> 64) i/ili temperaturnom rasponu od 30°C ili većim u serumu bolesnika. Međutim, svi slučajevi AIHA-e se ne uklapaju u ove kategorije. Hladna AIHA se može podijeliti na bolest hladnih aglutinina uzrokovanu hladnim IgM autoprotutijelima (eng. Cold Agglutinin Disease, CAD) i parkosizmalnu hladnu hemoglobinuriju (eng. Paroxysmal Cold Haemoglobinuria, PCH) uzrokovanu bifazičnim IgG autoprotutijelima. Klinički, AIHA može biti primarna (50%) ili sekundarna, najčešće u sklopu limfoproliferativnih poremećaja (20%), autoimune bolesti (20%), tumora i infekcija (tablica 2)<sup>2</sup>.

TABLICA 1. SEROLOŠKE KARAKTERISTIKE AUTOPROTUTIJELA U BOLESNIKA S AUTOIMUNOM HEMOLITIČKOM ANEMIJOM

	Topla AIHA	CAD CAS	PCH	Miješana AIHA
Ig	IgG	IgM	IgG	IgG+IgM
DAT poly	+	+	+	+
DAT mono anti-IgG	+	-	-	+
DAT mono anti-C3d	+ ili -	+	+	+
IAT	+	-	-	+
Eluat	+	-	-	+
Temperaturni raspon	Optimalno na 37°C	Optimalno na 4°C	Bifazično 4°C→37°C	Obično ≥30°C
Titar protutijela	Nije primjenjivo	≥64	<64	≥64 (<64)
Specifičnost protutijela	Polispecifično Rh/ostali	I/i	P	Polispecifično Rh/ostali, I/i

CAD (eng. Cold Agglutinin Disease), bolest hladnih aglutinina; CAS (eng. Cold Agglutinin Syndrome), sindrom hladnih aglutinina; PCH (eng. Paroxysmal Cold Haemoglobinuria), parkosizmalna hladna hemoglobinurija; Ig, imunoglobulin; DAT poly, polispecifični direktni antiglobulinski test; DAT mono, monospecifični direktni antiglobulinski test; IAT, indirektni antiglobulinski test

Osnovni test za dijagnostiku AIHA-e je direktni antiglobulinski test (DAT), kojim se primjenom polispecifičnog antihumanog gamaglobulina (AHG) otkrivaju na eritrocite vezana IgG protutijela i/ili aktivirane komponente komplementa. Primjenom monospecifičnog antihumanog gamaglobulina otkrivaju se na eritrocite vezani IgG, IgM, IgA i C3d/C3c komponente komplementa. Nužno je naglasiti da negativan DAT, ukoliko su prisutni znakovi hemolize, ne isključuje AIHA-u. U tom slučaju potrebno je prethodno isključiti ostale nasljedne i stečene uzroke hemolize.

DAT nije specifičan test za AIHA-u, već može biti pozitivan uslijed nekih stanja i bolesti (maligne bolesti, autoimunosne bolesti, infekcije, bolesti jetre i bubrega), kao posljedica liječenja imunoglobulinima (intravenski gamaglobulini, Rh imuni gamaglobulini, antitimocitni globulini), a može se raditi i o aloprotutijelima u nedavno



TABLICA 2. PODJELA AUTOIMUNOSNIH HEMOLITIČKIH ANEMIJA

<b>Toplo reaktivno autoprotutijelo</b>
– Primarna topla AIHA
– Sekundarna topla AIHA – maligna bolest (CLI, limfom, solidni organ), infekcija (HCV, HIV, CMV, VZV), autoimmune bolesti (SLE, RA, PBC, ulcerozni kolitis), imunodeficijencije (CVID), stanje nakon transplantacije
<b>Hladno reaktivno autoprotutijelo</b>
<b>a) Posredovano hladnim aglutinimima</b>
– Primarna bolest hladnih aglutinina (Cold Agglutinin Disease, CAD)
– Sekundarni sindrom hladnih aglutinina (Cold Agglutinin Syndrome, CAS) – maligna bolest (CLI, limfom, solidni organ) infekcija ( <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , virusne infekcije – IM, EBV, CMV, HCV, HIV, VZV, Rubella virus, Parvo B19), autoimmune bolesti
<b>b) Posredovano hladnim hemolizinima</b>
– Primarna paroksizmalna hladna hemoglobinurija (Paroxysmal Cold Haemoglobinuria, PCH)
– Sekundarna paroksizmalna hladna hemoglobinurija (Paroxysmal Cold Haemoglobinuria, PCH) – infekcija (Influenza, CMV, IM, Adenovirus, VZV, Morbilli virus, Mumps virus, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Hamophilus influenzae</i> , <i>E. coli</i> )
<b>Miješana hladno i toplo reaktivna autoprotutijela</b>
– Primarna miješana AIHA
– Sekundarna miješana AIHA – maligna bolest (limfom), autoimmune bolesti (SLE), infekcija

CLL, kronična limfocitna leukemija; CMV, citomegalovirus; CVID, obična varijabilna imunodeficijencija; EBV, Epstein Barr virus; HCV, virus hepatitisa C; HIV, virus humane imunodeficijencije; VZV, varicella zoster virus; IM, infekciozna mononukleoza; PBC, primarna bilijarna ciroza; RA, reumatoidni artritis; SLE, sistemski lupus eritematosus

transfundiranih pacijenata kod odgođene hemolitičke transfuzijske reakcije (engl. Delayed Haemolytic Transfusion Reaction, DHTR), u pacijenata nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica zbog prenešenih limfocita darivatelja (engl. Lymphocyte Passinger Syndrome, LPS) i u novorođenčadi kod hemolitičke bolesti novorođenčadi (eng. Haemolytic Disease of the Foetus and Newborn, HDFN)<sup>3</sup>.

Indirektnim antiglobulinskim testom (IAT) se otkrivaju u plazmi prisutna slobodna IgG protutijela. U otprilike jedne trećine pacijenata uz autoprotutijela, prisutna su i aloprotutijela, koja ukoliko ostanu neotkrivena, mogu uzrokovati hemolitičku transfuzijsku reakciju (eng. Haemolytic Transfusion Reaction, HTR). Specifičnim i vrlo kompleksnim metodama imunohematološkog ispitivanja, posebice metodama adsorpcije i određivanjem eritrocitnih antigena fenotipiranjem, odnosno genotipiranjem eritrocitnih sustava krvnih grupa, moguće je razlikovati prisutna aloprotutijela od autoprotutijela.

Za dijagnostiku hladnih AIHA-a potrebno je napraviti titar i temperaturni raspon IgM protutijela (4°C, 20°C, 30°C i 37°C) ili Donath-Landsteinerov test za otkrivanje bifazičnih IgG protutijela (prvo inkubacija na 0°C, potom na 37°C).

Ostale pretrage uključuju krvnu sliku (snižene vrijednosti hemoglobina uz povišen broj retikulocita, kao znak povećanog stvaranja eritrocita u koštanoj srži, ili snižen broj retikulocita u stanjima iscrpljenog kapaciteta koštane srži, npr. u infekcijama ili nakon kemoterapije, biokemijske pokazatelje hemolize (povišenu laktat dehidrogenazu, povišeni bilirubin, posebice nekonjugirani, sniženi haptoglobin) i periferni razmaz krvi (pojava sferocita). Obzirom da AIHA može biti sekundarna bolest u sklopu neke primarne bolesti, obavezno je utvrditi i osnovnu bolest<sup>4</sup>.

Pravilo rukovanje uzorcima i precizna imunohematološka dijagnostika vrlo je važna za razlikovanje pojedinih vrsta AIHA i njihovo liječenje. Liječenje se uglavnom temelji na nacionalnim smjernicama, a 2019. godine izdane su smjernice međunarodnih stručnjaka za liječenje AIHA-e.<sup>5</sup> U liječenju toplih AIHA najčešće se primjenjuju kortikosteroidi, a u težim slučajevima i rituksimab. Kod hladnih AIHA liječenje je potrebno u težim slučajevima, a sastoji se od primjene rituksimaba, uz ili bez primjene bendamustina. Kod životno ugroženih pacijenata, kojima se navedenom terapijom ne može održati prihvatljiva vrijednost hemoglobina, kao pomoćna terapija

moгу se primijeniti intravenozni imunoglobulini (IVIG), postupci plazmafereze, transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima i eritropoetin (EPO), samo u slučajevima retikulocitopenije. U kliničkim istraživanjima je nekoliko lijekova za liječenje tople i haldne AIHA-e, npr. inhibitori kinaze koji su odobreni za liječenje imune trombocitopenije (ITP) i inhibitori komplementa koji se uspješno primjenjuju za liječenje paroksizmalne hoćne hemoglobinurije (eng. Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria, PNH).

## Vrste autoimunskih hemolitičkih anemija

### Topla autoimunosna hemolitička anemija

Kod tople AIHA-e autoprotutijela optimalno reagiraju na temperaturi od 37°C. U gotovo svim slučajevima na eritrocitima bolesnika prisutna su samo IgG autoprotutijela, koja su najčešće usmjerena na eritrocitne antigene Rhesus (Rh) sustava krvnih grupa. Aktivacija komponenata komplementa se pojavljuje u gotovo polovici slučajeva tople AIHA-e, što je karakterizirano prisutnim C3d komponentama komplementa na eritrocitima. Uz IgG autoprotutijela, na eritrocitima bolesnika mogu biti prisutna IgA ili IgM autoprotutijela, a u iznimno rijetkim slučajevima eritrociti su obloženi samo s IgA ili IgM autoprotutijelima<sup>6</sup>.

Obzirom su IgM autoprotutijela niskog afiniteta, često budu odvojena od eritrocita, a na eritrocitima ostaju aktivirane samo C3d komponente komplementa, ili rijetko DAT može biti negativan. Topla IgM autoprotutijela optimalno reagiraju na 37°C u serumu i eluatu, ali imaju nizak titar (<64) na 4°C<sup>7</sup>. AIHA uzrokovana toplim IgM autoprotutijelima može se lako pomiješati s miješanom AIHA-om ili s AIHA-om uzorkovanom hladnim IgM autoprotutijelima širokog temperaturnog raspona djelovanja.

Dok je za toplu AIHA-u karakteristična ekstravaskularna hemoliza potaknuta IgG autoprotutijelima, gdje bolesnici uz osnovnu bolest najčešće razvijaju simptome anemije, kod intravaskularne hemolize, uzrokovane toplim IgM autoprotutijelima, simptomi su teži i veći je postotak smrtnosti.

U bolesnika s toplom AIHA-om opažaju se smetnje određivanja eritrocitnih antigena zbog obloženosti eritrocita IgG autoprotutijelima, te smetnje otkrivanja klinički značajnih aloprotutijela zbog prisutnih IgG autoprotutijela u serumu bolesnika. Kod vezanih IgG autoprotutijela, u testiranju se mogu koristiti serumu s niskim sadržajem proteina (monoklonski reagensi), koji ne zahtijevaju IAT za određivanje eritrocitnih antigena ili metode za odvajanje IgG s eritrocita, kao što je obrada sa ZZAP-om (kombinacija DTT-a i papaina), klorokin difosfatom (CPD) i EDTA glicinskom kiselinom<sup>8</sup>. Zbog smetnji određivanja fenotipa, kod bolesnika s AIHA-om danas je sve više u primjeni određivanje genotipa eritrocitnih sustava krvnih grupa.

Specifični postupci testiranja koji se koriste za otkrivanje klinički značajnih aloprotutijela uz prisutna autoprotutijela, uključuju adsorpcijske testove. Autolognom (nakon uklanjanja IgG protutijela s eritrocita bolesnika) i alogenom (ukoliko bolesnik nije transfundiran <3 mjeseca) adsorpcijom uklanjaju se autoprotutijela iz seruma bolesnika, ostavljajući aloprotutijela u adsorbiranom serumu radi njihovog otkrivanja i identifikacije. Određivanje eritrocitnih antigena je korisno za predviđanje koja klinički značajna aloprotutijela mogu biti potencijalno prisutna u serumu bolesnika. Uslijed visoke stope aloimunizacije u transfuzijskom liječenju bolesnika s AIHA-om preporuča se primijeniti transfuzijsko liječenje antigen podudarnim eritrocitnim pripravcima, najmanje po CcEe, K, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, te po mogućnosti Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> i Ss antigenima<sup>9</sup>. Genotipiranje se sve više primjenjuje za transfuzijsko liječenje antigen podudarnim eritrocitnim pripravcima po cijelom fenotipu (CcEe, K, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> i Ss), umjesto zahtjevnih adsorpcijskih postupaka<sup>10</sup>.

### Hladna autoimunosna hemolitička anemija

#### Bolest hladnih aglutinina

CAD je uzrokovan hladnim IgM autoprotutijelima u titru ≥64 (najčešće >1024), čija je optimalna temperatura djelovanja na 4°C, ali može biti >30°C. U vrlo rijetkim slučajevima CAD-a, titar autoprotutijela može biti <64, ali su IgM autoprotutijela širokog temperaturnog raspona djelovanja (>30°C). Hladna IgM autoprotutijela sa širim temperaturnim rasponom djelovanja jače su patogena<sup>11</sup>.

IgM autoprotutijela usmjerena su na „I“ ili „i“ antigene na eritrocitnoj membrani. IgM autoprotutijela aktiviraju komplement i mogu uzrokovati ekstravaskularnu ili intravaskularnu hemolizu. IgM autoprotutijela se odvajaju od eritrocita, stoga se na eritrocitima otkrivaju samo aktivirane komponente komplementa.

Većina bolesnika s CAD-om ima kroničan oblik AIHA-e koji ovisi o sezoni, npr. izlaganju hladnoći ili virusnoj infekciji. Uz uobičajene simptome anemije kod bolesnika se često javlja Raynaudov sindrom i akrocijanoza koja uključuje prste, nos i uši.

Hladna IgM autoprotutijela uzorkuju smetnje u određivanju krvne grupe. Uslijed oblaganja eritrocita s IgM autoprotutijelima, u uzorku se može opaziti fenomen spontane aglutinacije. IgM autoprotutijela se mogu uklopiti s eritrocita pranjem u fiziološkoj otopini zagrijanoj na 37°C ili obradom eritrocita s 0,01 M ditiotreitolom (DTT) ili 2-merkaptotanolom (ME)<sup>8</sup>. Jaka hladna autoprotutijela također mogu praviti smetnje u otkrivanju klinički značajnih aloprotutijela. Smetnje se mogu izbjeći primjenom zagrijane tehnike, a umjesto AHG seruma, predlaže se primijeniti anti-IgG<sup>8</sup>. Međutim, potreban je oprez jer slabo reaktivna aloprotutijela i aloprotutijela koja aktiviraju komplement mogu biti propuštena. Za uklanjanje hladnih autoprotutijela rijetko je potrebno napraviti hladnu adsorpciju.

### Paroksizmalna hladna hemoglobinurija

PCH karakteriziraju bifazična autoprotutijela IgG razreda koja se na niskim temperaturama vežu za eritrocite, a na višim temperaturama aktiviraju komponente komplementa i uzrokuju intravaskularnu hemolizu. IAT je obično negativan, a samo komponente komplementa su vezane za eritrocite. Bifazični IgG može se otkriti samo ako se eritrociti operu u hladnoj fiziološkoj otopini i testiraju hladnim reagensom<sup>8</sup>. Za otkrivanje bifazičnih IgG autoprotutijela potrebno je napraviti Donath-Landsteiner test. Važno je napomenuti da je zbog nedostatka komplementa testiranjem moguće dobiti lažno negativne rezultate<sup>8</sup>.

PCH se najčešće pojavljuje kod djece kao sekundarna prolazna akutna bolest. Nekoliko minuta ili sati nakon izlaganja hladnoći, bolesnik razvija bolove u leđima ili nogama, grčeve u trbuhu i glavobolju. Nakon pojave simptoma može se opaziti hemoglobinurija, hemoglobinemija i hiperbilirubinemija. Osim toga, anemija je teška i progresivna. Svi simptomi mogu proći za par sati ili mogu potrajati par dana.

Za dijagnostičku obradu hladne AIHA; CAD i PCH, potrebno je uzimanje uzorka, transport i rukovanje na 37° C, sve dok se serum i eritrociti ne odvoje<sup>8</sup>.

### Miješana autoimunosna hemolitička anemija

Miješana AIHA ima obilježja tople i hladne AIHA-e, a sastoji se od kombinacije toplih IgG i hladnih IgM autoprotutijela. IgM autoprotutijela najčešće su širokog temperaturnog raspona djelovanja (>30°C)<sup>12</sup>. Jaka hladna autoprotutijela ili ona sa širom reaktivnošću mogu ometati reaktivnost toplih autoprotutijela koja su prisutna u slučajevima miješane AIHA-e. Tipično se nalazi reaktivnost u svim fazama testiranja, pa se za toplu autoprotutijela testiranje preporuča provesti zagrijanom tehnikom uz primjenu anti-IgG reagensa, ili se rijetko mora napraviti hladna adsorpcija. Bolesnici s miješanom AIHA-om najčešće imaju kronični oblik bolesti s teškom hemolizom.

### DAT-negativna autoimunosna hemolitička anemija

U rijetkim slučajevima, DAT može biti negativan kod bolesnika s AIHA-om. Razlog negativnog DAT-a može biti vrlo mala količina vezanih IgG, odnosno na eritrocite vezana samo IgA ili IgM autoprotutijela što se ne može otkriti standardnim testiranjem<sup>12</sup>. U DAT-negativnim AIHA-ama, pranje eritrocita na 4°C ili u otopini niske ionske jakosti omogućava otkrivanje IgG niskog afiniteta<sup>8</sup>. U testiranju je često potrebno primijeniti druge metode koje mogu otkriti niže količine vezanih IgG protutijela, npr. protočnu citometriju ili koncentriranje eluata, odnosno, primijeniti IgA ili IgM monospecifične reagentse.

### Zaključak

AIHA je rijetka bolest imunskog sustava koju karakterizira hemoliza vlastitih eritrocita uzrokovana autoprotutijelima i/ili aktiviranim komponentama komplementa. Ovisno o osnovnoj bolesti, AIHA može biti primarna ili sekundarna, a prema serološkim karakteristikama autoprotutijela, dijeli se na toplu, hladnu i miješanu. Dijagnoza bolesti postavlja se na temelju pozitivnog rezultata direktnog antiglobulinskog testa i prisutnih laboratorijskih pokazatelja hemolize. Za liječenje, uz pravilno rukovanje uzorcima i preciznu imunohematološku dijagnostiku nužnu za razlikovanje pojedinih vrsta AIHA, potrebna je i dijagnostika osnovne bolesti.

### LITERATURA

1. Petz LD, Garratty C. Immune hemolytic anemia. 2nd ed. 2004. Churchill Livingstone.
2. Raos M, Pulanić D, Lukić M, Vinković M, Golubić Čepulić B. Klasifikacija autoimunosnih hemolitičkih anemija. Bilten Krohema 2019;2(11):29–30.
3. Barcellini W. Pitfalls in the diagnosis of autoimmune haemolytic anaemia. Blood Transfus. 2015;13(1):3–5.

4. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A; *British Society for Haematology*. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2017;176(3):395–411.
5. Jäger U, Barcellini W, Broome CM *i sur*. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Rev* 2020;41:100648.
6. Klein HG and Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 12th ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2014.
7. Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serologic findings in autoimmune hemolytic anemia associated with immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion*. 2009;49(2):235–42.
8. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. *AABB Technical Manual*. 18th ed. Bethesda, Maryland: AABB; 2014.
9. Sapatnekar S, Figueroa PJ. How to use molecular red blood cell antigen typing to supplement pretransfusion testing? *Transfusion* 2014;54:1452–8.
10. Raos M, Lukic M, Pulanic D, Vodanovic M, Golubic Cepulic B. The role of serological and molecular testing in the diagnostic and transfusion treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus*. 2021; DOI: 10.2450/2021.0235-21. Ahead of print.
11. Berentsen S. Cold Agglutinin disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 2016(1):226–31.
12. Mayer B, Yürek S, Kiesewetter H, Salama A. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia: differential diagnosis and a critical review of reported cases. *Transfusion*. 2008;48(10):2229–34.
13. Sachs UJH, Röder L, Santoso S, Bein G. Does a negative direct antiglobulin test exclude warm autoimmune haemolytic anaemia? A prospective study of 504 cases. *British Journal of Haematology*. 2006;132:651–661.

## MOGUĆA POVEZANOST ALELA SUSTAVA HLA U OSOBA S ANTIERITROCITNIM AUTOPROTUTIJELIMA RAZREDA IgG

KRUHONJA GALIĆ Z.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>2</sup>, Jagnjić S.<sup>3</sup>, Bingulac-Popović J.<sup>4</sup>, Đogić V.<sup>4</sup>, Kundid R.<sup>4</sup>, Kirin V.<sup>4</sup>, Hećimović A.<sup>5</sup>, Lukić M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za eritrocitnu dijagnostiku

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Ravnateljstvo

<sup>3</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za krvlju prenosive bolesti

<sup>4</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za molekularnu dijagnostiku

<sup>5</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
• Odjel za proizvodnju testnih reagensija

**Uvod:** Humani leukocitni antigeni (HLA) reguliraju imunološke reakcije. Dosadašnja istraživanja utvrdila su povezanost polimorfizama gena sustava HLA s nastankom autoimunih bolesti. Autoimuna hemolitička anemija (AIHA) je rijetka multigenska autoimuna bolest u kojoj različiti tipovi autoprotutijela usmjereni na antigene eritrocitne membrane uzrokuju smanjenje životnog vijeka eritrocita. Češće se javlja u osoba s limfoproliferativnim i autoimunim bolestima, ali antieritrocitna autoprotutijela razreda IgG detektiraju se tijekom prijetransfuzijskog ispitivanja bolesnika s različitim dijagnozama sa i bez znakova hemolize kao i kod trudnica, ali i kod zdravih osoba bez poznatog razloga. Dosadašnja istraživanja nisu dokazala povezanost antieritrocitnih autoprotutijela s određenim alelom sustava HLA.

**Cilj:** Ispitati alele sustava HLA u skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (skupina AA) i usporediti ih s alelima sustava HLA u dobrovoljnih darivatelja krvi (kontrolna skupina) te utvrditi moguću povezanost alela sustava HLA s antieritrocitnim protutijelima razreda IgG.

**Metode:** Skupinu AA činilo je 100 ispitanika, a kontrolnu skupinu 190 dobrovoljnih darivatelja krvi s negativnim rezultatom direktnog antiglobulinskog testa. Za imunohematološko ispitivanje korištene su LISS/Coombs, DC Screening I i IgG1/IgG3 mikrokartice (BioRad, Cressier sur Morrat, Švicarska). Ispitani su aleli lokusa HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQA1,-DQB1, metodom lančane reakcije polimerazom, korištenjem specifične oligonukleotidne početnice specifične za sekvencu (SSP, *engl. Sequence Specific Primer*) (Olerup SSP, Švedska). Specifičnost svake pojedine amplifikacije provjerena je pomoću tablica za interpretaciju, koje su priložene uz svaki komercijalni HLA-SSP set i pomoću HELMBERG SCORE Software. Usporedba rezultata je učinjena pomoću aplikacije MedCalc – version 16.2.1. Učestalost gena i alela dobivena je direktnim brojanjem. Za usporedbu dobivenih rezultata korišten  $\chi^2$  test. Kao granica razine statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p < 0,05$ . Zbog izraženog polimorfizma gena sustava HLA, dobivena  $p$  vrijednost korigirana je po Bonferroniju. Snaga testa izračunata je kao omjer izgleda (*engl. odds ratio, OR*) uz interval pouzdanosti (*engl. confidence interval, CI*) od 95%.

**Rezultati:** U usporedbi s kontrolnom skupinom, statistički značajno češći u skupini AA bili su alel *HLA-B\*57* ( $p=0,0003$ ,  $p_k=0,008$ , OR 5,05, 95% CI 1,93 – 13,24) i alel *HLA-DQB1\*03:03* ( $p=0,001$ ,  $p_k=0,017$ , OR 5,21, 95% CI 1,83 – 14,84). U skupini AA nađena je veća učestalost alela *DRB1\*07* ( $p=0,018$ ,  $p_k=0,210$ ) i alela *DQA1\*02* ( $p=0,018$ ,  $p_k=0,103$ ), ali bez statističke značajnosti. Aleli *HLA-B\*57*, *DRB1\*07:01*, *DQA1\*02:01* i *DQB1\*03:03* su bili u neravnoteži udruživanja te su se pojavili u istom haplotipu. U skupini AA češće se pojavio haplotip B\*57-DRB1\*07:01-DQA1\*02:01-DQB1\*03:03, ali ne na razini statističke značajnosti.

**Zaključak:** Usporedbom rezultata HLA PCR-SSP tipizacije uzoraka skupine AA te zdravih ispitanika kontrolne skupine, utvrđena je moguća povezanost alela *B\*57* i *DQB1\*03:03* s pojavom antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG odnosno sa stvaranjem autoimunog odgovora na eritrocitne antigene.

## MOLEKULARNO ODREĐIVANJE ALELA RHD U POPULACIJI RHD NEGATIVNIH DAVATELJA KRVI SJEVEROZAPADNE HRVATSKE

LILIĆ M.<sup>1</sup>, Jaklin G.<sup>2</sup>, Gojčeta K.<sup>3,4</sup>, Raos M.<sup>3,4,5</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>3,4,5,6</sup>

<sup>1</sup> Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

• Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

<sup>2</sup> Opća bolnica Varaždin

• Odjel za transfuzijsku medicinu

<sup>3</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

<sup>4</sup> Zdravstveno veleučilište Zagreb

<sup>5</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>6</sup> Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu

**Uvod:** Cilj ovog istraživanja bio je opisati varijante alela *RHD* u populaciji sjeverozapadne Hrvatske, njihovu učestalost i haplotipove s genom *RHCE* kod pojedinog ispitanika.

**Metode:** U dvogodišnjem razdoblju krv je u Općoj bolnici Varaždin darovalo 11688 dobrovoljnih davatelja, od kojih je 2301 (19,68%) proglašeno RhD negativnima.

Serološko određivanje RhD antigena radilo se prema Nacionalnim smjernicama za imunohematološko testiranje davatelja krvi. U ovom istraživanju sudjelovalo je ukupno 735 nesrodnih davatelja iz Međimurske i Varaždinske županije. Nasumično odabranih 704 davatelja bilo je RhD negativno, dok ih je 31 bio negativan u direktnoj aglutinaciji, a pozitivan u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT).

Svi davatelji su testirani na prisutnost egzona gena *RHD* metodom PCR-a u stvarnom vremenu, FluoGene (Inno-train Diagnostik, Njemačka). Uzorci fenotipa ccee testirani su najprije probirnim testom za egzone 3, 5 i 10 gena *RHD*. Svim uzorcima s C+ i/ili E+ testirani su svi egzoni gena *RHD*. Onim uzorcima koji su bili pozitivni za pojedine egzone napravljen je i test za zgotnost, te test za panel klinički najznačajnijih slabih alela *RHD*. Svim uzorcima pozitivnim na barem neke od egzona gena *RHD* sekvencirana je DNA.

Kod uzoraka u skupini RhD negativnih davatelja kod kojih je otkrivena varijanta gena sustava Rh naknadno je napravljen i test adsorpcije / elucije.

**Rezultati:** Od 704 serološki RhD negativnih uzoraka, njih 589 (83,7%) fenotipa ccee, bilo je negativno za egzone 3, 5, i 10 gena *RHD* u probirnom testiranju, te su proglašeni *RHD* negativnima (delecija gena *RHD*, *RHD\*01N.01*).

U ostalih 115 uzoraka (16,3%) metodom PCR u realnom vremenu potvrđen je serološki nalaz Rh fenotipa (C+ i/ili E+). I u toj je skupini 112 uzoraka bilo potvrđeno *RHD* negativno, jer nije utvrđena reaktivnost za bilo koji egzon gena *RHD*. U dva hemizigotna uzorka fenotipa Ccee pronađene su DEL varijante gena *RHD*: *RHD\*DEL44* (*RHD\*01EL.44*, hibridni alel strukture *RHD-D-CE(4-9)-D*) i *RHD\*DEL32* (*RHD\*01EL.32*, s točkastom intronskom mutacijom u intronu 1, c.149-29 G>C). Jedan uzorak koji je potvrđen kao homozigot za deleciju gena *RHD*, pokazivao je pozitivan signal za egzon 1 gena *RHD*. Radi se o varijanti gena *RHCE*, hibridu s genom *RHD*, strukture *RHCE\*D-CE(2-10)*.

Kod sva tri uzorka s varijantama gena Rh sustava testom adsorpcije / elucije je dokazana prisutnost RhD epitopa kod pojedinog davatelja.

Učestalost svakog alela u populaciji RhD negativnih davatelja iznosi po 0,07% odnosno 1:1408 (uz 95% interval pouzdanosti 1:55608 – 1:253). Učestalost svakog alela unutar skupine D- C+ i/ili E+ ispitanika iznosi po 0,43% odnosno 1:230 (uz 95% interval pouzdanosti 1:1626 – 1:33).



U populaciji 31 serološki slabih D uzoraka, većina je slabi D tip 1 (*RHD\*01W.01*, 64,5%), a od ostalih sedam pronađenih alela *RHD* značajno je istaknuti slabi D tip 40 (*RHD\*01W.40*, 3,2%).

**Zaključak:** Pronađeni aleli gena Rh sustava prvi puta su opisani u Hrvatskoj.

Prema podacima iz literature, ovo je prvi puta da je u populaciji europskog porijekla dokazana ekspresija antigena RhD za alel *RHD\*DEL44*.

Alel *RHCE\*D-CE(2-10)* dosad je sporadično opisan u Kini i u Sloveniji. U ovom istraživanju po prvi puta je kod osobe s tim alelom dokazana prisutnost RhD epitopa. S obzirom na zemljopisnu blizinu slovenskog slučaja, moguće je da postoji lokalni bazen ovog alela.

U skupini IAT pozitivnih uzoraka je također po prvi puta u Hrvatskoj pronađen iznimno rijedak slabi D tip 40.

Molekularno testiranje davatelja krvi omogućit će sigurniju primjenu krvnih produkata, te spriječiti neželjenu imunizaciju stvarno RhD negativnih pacijenata RhD pozitivnom dozom krvi koja je u serološkom testiranju reagirala neaktivno.

## NESTANAK KLINIČKI ZNAČAJNIH ANTIERITROCITNIH ALOPROTUTIJELA

BOGDANIĆ D.<sup>1</sup>, Raos M.<sup>1</sup>, Lukić M.<sup>1</sup>, Plenković F.<sup>1</sup>, Liker M.<sup>1</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** Poznato je kako klinički značajna antieritrocitna protutijela mogu s vremenom pasti ispod praga osjetljivosti testa što može dovesti do odgođene hemolitičke transfuzijske reakcije (DHTR). Postojanost protutijela i njihovo otkrivanje *in vitro*, ovisi o karakteristikama pacijenata i antieritrocitnih protutijela, te o učestalosti i tehnikama prijetransfuzijskog ispitivanja. Razumijevanje vremenske dinamike antieritrocitnih protutijela u krvi pacijenta može pridonijeti pravodobnom otkrivanju antieritrocitnih protutijela.

**Cilj:** Cilj ovog rada bio je istražiti nestajanje klinički značajnih antieritrocitnih protutijela u aloimuniziranih pacijenata radi unapređenja algoritma prijetransfuzijskog ispitivanja.

**Metode:** Retrospektivno su analizirani podaci aloimuniziranih pacijenata u KBC-a Zagreb u razdoblju od 2011. do 2019. godine. Od ukupno 1504 aloimuniziranih pacijenata, u analizu su uključeni samo oni pacijenti kojima je nakon početne aloimunizacije učinjen barem još jedan test pretraživanja antieritrocitnih protutijela u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT). Pacijenti s višestrukim imunizacijama koji su imali više datuma imunizacije i/ili nestanka protutijela izuzeti su iz analize. Budući da komercijalni test eritrociti ne izražavaju uvijek rijetke antigene, pacijenti s anti-C<sup>w</sup> ili -Lu<sup>a</sup> također su isključeni iz analize. Ako je IAT naknadnim testiranjem bio negativan, smatralo se da aloprotutijelo više nije prisutno u krvi pacijenta. U slučaju svakog daljnjeg pozitivnog IAT-a tijekom prijetransfuzijskog ispitivanja je napravljena identifikacija antieritrocitnih protutijela ( $\geq 72$  sata) i zabilježene su nove aloimunizacije.


**Rezultati:** U istraživanje su uključena 584 aloimunizirana pacijenata s 748 protutijela, od kojih 65,8% žena. Medijan dobi bio je 65 (0–93) godina, a 61,9% pacijenata bilo je  $\geq 60$  godina. Od ukupno aloimuniziranih pacijenata, njih 449 (76,9%) je imalo jednostruku, a 135 (23,1%) višestruku imunizaciju; 110 (18,8%) dvostruku, 21 (3,6%) trostruku i 4 (0,7%) četverostruku imunizaciju. Postojanost protutijela zabilježena je u 425 (73,3%) pacijenata, od čega se u većini slučajeva (65,4%) radilo o pacijentima koji su bili aloimunizirani prije bolničkog liječenja. Najčešće postojano protutijelo bilo je anti-D specifičnosti. Medijan praćenja postojanosti protutijela iznosio je 147 (1 do 6589) dana. Nestanak protutijela zabilježen je u 159 (27,2%) pacijenata, od kojih se u većini slučajeva (63,5%) radilo o aloimuniziranim pacijentima imuniziranim tijekom bolničkog liječenja. Najčešće je nestalo protutijelo anti-Jk<sup>a</sup> specifičnosti. Medijan praćenja nestanka protutijela iznosio je 105 (1 do 3433) dana.

**Zaključak:** Mnoga antieritrocitna protutijela ne budu otkrivena prijetransfuzijskim ispitivanjem. Razlozi su što se prijetransfuzijsko ispitivanje provodi ne vodeći računa o vremenskom okviru imunogenog odgovora na strane eritrocitne antigene i nedostaje kontrolni IAT-a nakon transfuzijskog liječenja i trudnoća u optimalnom vremenskom okviru za dokazivanje protutijela. Broj imuniziranih pacijenata može se smanjiti preventivnom primjenom antigen podudarnih eritrocitnih pripravaka.



# IH-Complete. Create Your World.




## Because Your Staffing Needs are Changing

-  Walk-away systems
-  Reduced maintenance time
-  Ready-to-use reagents and diluents
-  Streamlined training





## Because Productivity is Your Concern

-  Improved processing time
-  Enhanced security and traceability
-  Reduced hands-on-time

## Because in Transfusion, Uncertainty is not an Option

-  Delivering safe and accurate results
-  Optimized productivity with IH-Central
-  Maximized efficiency

## Because in Transfusion, Emergency does not Wait

-  Technology innovations to reduce turnaround time
-  Fully integrated back-up systems
-  24/7 ready-to-start availability
-  Intelligent STAT management

## Simpozij 6 – COVID-19

**TEST NEUTRALIZACIJE SARS-COV-2 KAO KLJUČ ZA UVOĐENJE SEROTERAPIJE U LIJEČENJU COVID-19 U HRVATSKOJ**HALASSY B.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Sveučiliste u Zagrebu

• Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

<sup>2</sup> Centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva

• CIPZB

Plazma preboljelih se upotrebljava danas, kao i više puta u povijesti u razdobljima epidemija, da bi se liječili pacijenti oboljeli uslijed zaraze novim i nepoznatim patogenima. Iako se takav oblik terapije generalno smatra korisnim i učinkovitim na temelju niza opisanih primjera, znanstvena i medicinska zajednica još uvijek nema definitivan dokaz njezine učinkovitosti na temelju pažljivo dizajniranih i randomiziranih kliničkih studija. Kad su takve provedene u nekoliko navrata, nisu uspjele pokazati korist plazme u odnosu na placebo. Razlozi leže većinom u specifičnim okolnostima u kojima se plazma koristi. U epidemijskim vremenima borimo se protiv nepoznatog uzročnika, kada ne postoje reagensi, standardi, i metodologija za ispitivanje djelotvornosti antitijela, ili se tek razvijaju. Stoga se rezultati dobiveni različitim, nestandardiziranim testovima ne mogu adekvatno procjenjivati i otežavaju usporedbe kako unutar jedne studije, tako posebice među različitim. Protekle dvije godine bile su period široke i obilate primjene plazme u liječenju pacijenata s COVID-19, ali do sada dostupni rezultati različitih studija nisu međusobno usporedivi zbog razlika u načinima procjene količine i kvalitete antitijela u plazmama korištenim za liječenje, od kojih niti jedna metoda nije kalibrirana prema međunarodnom standardu.

U predavanju će biti opisan pristup uspostavi karakterizacije antitijela u epidemijskim vremenima, na način koji omogućava iskazivanje svih rezultata testiranja u jedinicama međunarodnog standarda za antitijela na SARS-CoV-2 virus, onog trenutka kad on postane dostupan znanstvenoj i stručnoj javnosti. Uspostavili smo test neutralizacije divljeg tipa virusa SARS-CoV-2 (BSL3 patogen), kao najrelevantniji u procjeni zaštitne moći antitijela. Da bi se osigurala maksimalna ponovljivost, koristili smo sistem izrade banki svih bioloških komponenti: SARS-CoV-2 virusa, stanica i vlastitog (in-house) standarda specifičnih antitijela. Upotreba vlastitog standarda za anti-SARS-CoV-2 antitijela i njegova kalibracija prema prvom WHO međunarodnom standard, čim je postao dostupan u proljeće 2021, omogućila je iskaz rezultata u međunarodno usporedivim jedinicama.

Neutralizirajuća antitijela za SARS-CoV-2 virus u osoba koje su COVID-19 preboljele bila su u rasponu od 4 do 2869 mL<sup>-1</sup> (0.55 to 3.46 log IU mL<sup>-1</sup>), i značajno su korelirala s težinom simptoma u razdoblju bolesti. Količina neutralizirajućih antitijela u oboljelih polagano opada odmakom vremena, u prosjeku 1.4 x u mjesec dana. Inaktivacija temperaturno-labilnih komponenti seruma zagrijavanjem uzrokovala je pad neutralizirajuće moći od 2.3x, ukazujući da antitijela induciraju aktivnost temperaturno labilnog komplementa i regrutiraju i proteine komplementa u borbi protiv virusa.

U Hrvatskoj je prikupljanje konvalescentne plazme započelo u srpnju 2020 u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, uspostava metodologije za karakterizaciju antitijela u rujnu 2020, a prve doze plazme za liječenje su upotrebljene u prosincu 2020. Do danas je iz tog transfuzijskog centra izdano oko 700 doza COVID-19 konvalescentne plazme, kojima je liječeno oko 130 pacijenata. 99% svih pripravaka korišteno je u liječenju bolesnika s hematološkim malignitetima, čiji je imunološki sustav značajno oslabljen uslijed osnovne bolesti i njenog liječenja. Pacijenti bez vlastitih antitijela u krvi bili su pogodan eksperimentalni sustav u kojem smo pokazali uspješnost transfuzije neutralizirajućih antitijela jednom ili više doza konvalescentne plazme, koje sadrže minimalno 35 IU mL<sup>-1</sup>.

Istraživanje je rezultat zajedničke suradnje Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, te Klinike za infektivne bolesti dr. Fran Mihaljević. Financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (projekt IP-CORONA-04-2053) i Europskog fonda za regionalni razvoj (projekt KK.01.1.1.01.0006 "Jačanje kapaciteta CERVirVac-a za istraživanja u virusnoj imunologiji i vakcinologiji).

## STVARANJE PREDUVJETA ZA PRIKUPLJANJE COVID-19 KONVALESCENTNE PLAZME U HRVATSKOM ZAVODU ZA TRANSFUZIJSKU MEDICINU

HEČIMOVIĆ A.<sup>1</sup>, Halassy B.<sup>2</sup>, Vinković M.<sup>1</sup>, Ravlić S.<sup>2</sup>, Mušlin T.<sup>1</sup>, Radovčić M. K.<sup>1</sup>, Novosel M.<sup>1</sup>, Topić Šestan P.<sup>1</sup>, Vuk T.<sup>1</sup>, Jukić I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

<sup>2</sup>Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

**Uvod:** Malo je dostupnih terapijskih mogućnosti bilo početkom pandemije. Nisu postojali specifični lijekovi, o cjepivu se tek razmišljalo i tražila su se gotova rješenja. Iskustvo iz prethodnih izbijanja s koronavirusima pokazuje da konvalescentna plazma (KP) sadrži neutralizacijska antitijela (NAb) te da je njihova primjena bila korisna. Pandemija COVID-19 bila je jasna situacija gdje bi plazma preboljelih, a kasnije i cijepljenih osoba bila vrijedan resurs u liječenju oboljelih. S vremenom je objavljeno više randomiziranih kontroliranih studija koje nisu pokazale korist primjene ovog oblika liječenja u imunokompetentnih osoba. No, postoje jasni pokazatelji i brojna pojedinačna izvješća u korist njene primjene u bolesnika s oslabljenim humoralnim imunitetom. Temeljem toga dopušta se upotreba KP samo visokog titra, u ranom tijeku bolesti te kod bolesnika s oslabljenim humoralnim imunitetom.

Na natječaj kojeg je Republika Hrvatska interventno raspisala „Upravljanje zaraznim bolestima uzrokovanim koronavirusima te društvenim i obrazovnim aspektima pandemije (IP-CORONA-2020-04)” prijavljen je i prihvaćen za financiranje projekt pod nazivom Stvaranje preduvjeta za uvođenje SARS-CoV-2 seroterapije u Hrvatskoj (CoVIg). Projekt je ostvaren suradnjom Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu.

**Cilj:** Predstaviti uspostavu metodologije za prikupljanje plazme osoba koje su preboljele bolest te vrednovanje njihove sposobnosti neutraliziranja SARS-CoV-2 i procijeniti povezanost demografskih karakteristika i ozbiljnost bolesti darivatelja (DDK) s razinom protutijela.

**Materijali i metode:** Uvjet za prikupljanje KP bio je preboljenje COVID-19 unazad 4 mjeseca ili neograničeno ukoliko je DDK i cijepljen. Svi ostali kriteriji za DDK morali su biti ispunjeni. Svaka donacija bila je podvrgnuta testiranju neutralizacijskim testom za kvantifikaciju SARS-CoV-2 NAb, a kasnije VIDAS SARS CoV-2 serološkim testom koji je prethodno usklađen s neutralizacijskim testom. Neutralizacijska sposobnost plazme potvrđena je ako su vrijednosti bile iznad 1400 ED50/ml ili 1,3 TV (test value). Analizirane su plazme prikupljene postupkom afereze (AF) u razdoblju od 28. srpnja 2020. do 28. ožujka 2021. te iz pune krvi (PUK), prikupljene od 03.05. do 30.06.2021.

Za procjenu titra i demografskih karakteristika, ozbiljnosti bolesti kao i procijepljenosti u statističkoj analizi korišteni su Mann-Whitney, Kruskal-Wallis i  $\chi^2$  test. Statistička značajnost prihvaćena je uz  $P < 0,05$ .

**Rezultati:** Tablica 1.

TABLICA 1. BROJ DOZA KONVALESCENTNE PLAZME, KARAKTERISTIKE DARIVATELJA PREMA DOBI, SPOLU I TITRU

	Afereza		Puna krv	Ukupno
broj doza	256		464	720
nesukladne	64		140	204
(nizak titar, ostalo) broj (%)	-25%		-30,20%	-28,30%
medijan dobi	36 (18–62)		40 (18–67)	
spol	60,60%	30,40%	100%	
	muškarci	žene	muškarci	
visok titar	75%		91,20%	

Razina titra nije se statistički razlikovala po spolu: AF ( $P = 0,262$ ,  $Z = 1,12$ ).

Titar se nije razlikovao između krvnih grupa (za AF  $P = 0,842$ ,  $\chi^2 = 0,83$ ; za PUK  $P = 0,693$ ,  $\chi^2 = 1,45$ ).

Titar se nije razlikovao s obzirom na težinu simptoma (za AF  $P = 0,072$ ,  $\chi^2 = 6,99$ ; za PUK  $P = 0,279$ ,  $\chi^2 = 2,56$ ).



Od sukladnih KP dobivenih iz PUK, 66% doza prikupljeno je od cijepljenih DDK. Medijan titra kod necijepljenih DDK bio je 6,03 (0 – 63,87), a kod cijepljenih 42,26 (0,44 – 66,07),  $P < 0,001$ ,  $Z = 15,59$ .

**Zaključak:** Od proglašenja epidemije 11.03.2020. pa do uspostave procesa prikupljanja i uspostave neutralizacijskog testa u BSL3 uvjetima prošlo je manje od četiri mjeseca. Prva KP izdana je 17. prosinca 2020. i do 30.06.2021 izdano je 416 doza za 126 bolesnika.

Procjena neutralizacijske sposobnosti VIDAS SARS CoV-2 testom značajno je, zbog bolje protočnosti testa u odnosu na neutralizacijski test, pridonijela povećanju zaliha i bržem izdavanju pripravaka.

Zbog konstantnog rasta zahtjeva za KP prikupljanje KP iz PUK bio je iskorak u zadovoljavanju zahtjeva.

91,2 % plazmi iz PUK te 75% plazme dobivene AF zadovoljavalo je titrom. Razlika u udjelima visokog titra posljedica je većeg broja cijepljenih DDK u drugom tromjesečju 2021. godine.

Uspostavljanje metodologije prikupljanja i testiranja KP u vrijeme pandemije iskustvo je koje će doprinijeti kvalitetnom i brzom odgovoru u slučaju pojave novih pandemija.

## FATALNO INTRAKRANIJALNO KRVARENJE U BOLESNIKA S TROMBOCITOPENIJOM I POZITIVNIM PF4 PROTUTIJELIMA NAKON CIJEPLJENJA PROTIV COVID-19 CJEPIVOM CHADOX1 NCOV-19 – PRIKAZ SLUČAJA

BOBAN A.<sup>1</sup>, Tomac G.<sup>2</sup>, Rimac V.<sup>2</sup>, Grgić Medić M.<sup>1</sup>, Zibar K.<sup>1</sup>, Kraljević I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinika za unutarnje bolesti

<sup>2</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** U Europskoj uniji registrirana su četiri cjepiva protiv COVID-19, akutne zarazne bolesti s multiorgan-skim komplikacijama uzrokovane virusom prvi puta opisanim 2019. godine, nazvanim teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2). Cijepljenje cjepivom koje kao vektor koristi adenovirus, kao što je ChAdOx1 nCoV-19 (Astra Zeneca) i Ad26.COV.2.S (Johnson&Johnson), u vrlo malog broja bolesnika dovodi do razvoja trombocitopenije praćene po život opasnim venskim trombozama na neuobičajenim mjestima, te ponekad intrakranijalnim krvarenjem. Ovaj novi sindrom je prozvan cjepivom inducirana trombotična trombocitopenija, engl. VITT (vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia). VITT karakteriziraju pozitivna trombotična PF4 protutijela u odsutnosti heparina, kao što je ranije opisano u rijetkim "spontanim" ili autoimunim heparin induciranim trombocitopenijama (HIT).

Ovdje prikazujemo slučaj bolesnika koji je nakon cijepljenja ChAdOx1 nCoV-19 cjepivom razvio trombocitopeniju, krvarenje u obje nadbubrežne žlijezde, te masivno intrakranijalno krvarenje s fatalnim završetkom.

**Prikaz slučaja:** Tridesetjednogodišnji do tada zdravi bolesnik javio se u bolnicu zbog bolova u donjem dijelu leđa. Deset dana ranije je primio ChAdOx1 nCoV-19 cjepivo, nakon čega je postao febrilan uz simptome slične gripi u trajanju od 24h. Četvrtog dana od cijepljenja je dobio proljev, a sedmog egzacerbaciju kroničnog sinusitisa, zbog čega je uzimao azitromicin. Po prijemu u bolnicu desetog dana od cijepljenja verificirana je trombocitopenija ( $\text{Trc } 77 \times 10^9/\text{L}$ ), te povišeni d-dimeri (12.6 mg/L). Na MSCT-u abdomena je opisano krvarenje u obje nadbubrežne žlijezde, te je bolesnik zbog rizika nastanka adrenalne insuficijencije premješten u našu ustanovu.

Po premještanju se kod bolesnika bilježi produbljivanje trombocitopenije (trombociti  $66 \times 10^9/\text{L}$ ), uz d-dimere 17.62 mg/L i uredan koagulogram (PV 0,85, APTV 25,8, fibrinogen 5,2 g/L). Zbog prokoagulantnog statusa i suspektne venske tromboze prema nalazu MSCT-a, u terapiju je uveden enoksaparin. Drugog dana boravka u našoj ustanovi bolesnik postaje smeten i dezorijentiran, te se hitnom neuroradiološkom obradom verificira obilno intrakranijalno krvarenje i suspektna tromboza sagitalnog sinusa. Bolesnik je primio transfuziju koncentrata trombocita i rFVIIa, međutim postaje anizokoričan i komatozan (GCS 4). Učinjen je hitni neurokirurški zahvat kojem se odstrani hematoma, međutim nekoliko sati po zahvatu bolesnik postaje nestabilan i umire unatoč potporim mjerama.

Obdukcijski nalaz je opisao difuzni edem mozga, akutno krvarenje lijeve fronto-temporalno-parijetane regije i cerebeluma, te difuzno subarahnoidalno krvarenje. Nije nađeno znakova tromboze cerebralnih sinusa, kao niti bubrežnih ili mezenterijalnih vena. Mikroskopske analize nisu našle znakova mikroangiopatskih promjena mozga niti ostalih parenhimskih organa.



Nalaz vezanih i slobodnih antitrombocitnih protutijela kod bolesnika je bio negativan, dok je testiranje na HIT protutijela učinjeno 47 dana nakon smrti, nakon što je publiciran rad koji opisuje pozitivna HIT protutijela u bolesnika koji su razvili trombocitopeniju i venske tromboze nakon cijepljenja protiv COVID-19. Enzimsko imunološki test za otkrivanje antitrombocitnih protutijela (PF4 IgG Kit; GTI Diagnostics, Waukesha, Wisconsin, USA) je pokazao pozitivan rezultat (OD (450 nM): 1.618; granica pozitivnog testa >0.400). Učinjen je i funkcijski test na protočnom citometru, kojim su dokazana protutijela na PG4 koja aktiviraju trombocite.

**Zaključak:** Ovo je prvi opisani slučaj VITT-a kod kojega nije došlo do razvoja venske tromboze. Klinička slika po život opasnog krvarenja i nedostatak tromboze opisani ovdje upućuju na široki spektar prezentacije VITT-a, te ukazuju na potrebu razlikovanja ovog sindroma od imunotrombocitopenije, koja je također opisana kao nuspojava nakon cijepljenja protiv COVID-a.

## TRANSFUZIJSKO LIJEČENJE SARS-COV-2 POZITIVNIH BOLESNIKA U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU ZAGREB

LUKAČ A.<sup>1</sup>, Liker M.<sup>1</sup>, Plenković F.<sup>1</sup>, Lukić M.<sup>1</sup>, Raos M.<sup>1</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** Od 28. prosinca 2020. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (KBC Zagreb) organizirana su dva odjela za liječenje SARS-CoV-2 pozitivnih bolesnika u Klinici za plućne bolesti Jordanovac (COVID odjel i COVID odjel intenzivne i postintenzivne skrbi). Prema dosadašnjim podacima potrošnja krvnih pripravaka (KP) u COVID-19 bolesnika relativno je mala, 3,4 %, a podataka o potrošnji KP u skupini hematoloških bolesnika nema.

**Cilj:** Cilj je rada retrospektivno analizirati potrošnju KP u SARS-CoV-2 pozitivnih bolesnika i utvrditi primijenjeni udio KP u liječenju ove skupine bolesnika u odnosu na ukupnu potrošnju KBC-a Zagreb, indikacije za njihovo liječenje te razlike u transfuzijskom liječenju hematoloških i ostalih bolesnika.

**Metode:** Koristeći bolnički informacijski sustav (BIS) i transfuzijski informatički sustav (Hemotools), analizirani su podatci o bolesnicima hospitaliziranim u COVID odjelima te podatci o transfundiranim KP od 1. siječnja 2021. godine do 12. srpnja 2021. godine. Bolesnici su dalje praćeni u dvjema skupinama (hematološki i ostali bolesnici). Koncentrati trombocita (KT) računati su u broju pripravaka. Težina bolesti procijenjena je u pet kategorija (asimptomatska infekcija, blagi oblik, srednje teški, teški i kritični oblik bolesti) prema kliničkim kriterijima definiranim prema Smjernicama za liječenje oboljelih od koronavirusne bolesti 19 (COVID-19) Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. P vrijednost računata je koristeći t-test, Mann-Whitney test i Fisherov egzaktan test u GraphPad Prism 9.2.0. statističkom softveru.

**Rezultati:** Ukupno je hospitalizirano 348 SARS-CoV-2 pozitivnih bolesnika, od kojih je 112 (32%) liječeno KP. Njima je transfundirano 985 KP, što čini 3% (985/36570) ukupno transfundiranih KP u KBC-u Zagreb u istom razdoblju. Hematološki bolesnici činili su 42 % bolesnika (47/112) te su primili 53 % (519/985) KP. Imunokompromitiranih bolesnika bilo je 52 % od ukupnog broja bolesnika (58/112). Hematološki bolesnici činili su 79 % (46/58) ukupnog broja imunokompromitiranih bolesnika te su primili većinu (89 %, 90/101) pripravaka konvalescentne plazme. U skupini hematoloških bolesnika manji je broj onih sa srednje teškom, teškom i kritičnom kliničkom slikom (45 %, 21/47) u usporedbi s ostalim bolesnicima (62 %, 40/65), no ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,13$ ). Ukupna je smrtnost u skupini transfundiranih bolesnika 37% (41/112). Smrtnost u skupini hematoloških bolesnika (43 %, 20/47) nije značajno veća ( $p=0,32$ ) u odnosu na skupinu ostalih bolesnika (32 %, 21/65). Broj bolesnika na mehaničkoj ventilaciji nije se značajno razlikovao među skupinama (hematološki bolesnici 30 %, 14/47; ostali bolesnici 28%, 18/65;  $p=0,16$ ). Bolesnici su ukupno primili 504 koncentrata eritrocita (KE), 304 KT, 72 svježe smrznute plazme (SSP) i 4 krioprecipitata (tablica 1). U skupini hematoloških bolesnika najčešća indikacija za transfuziju KE i KT bila je anemija (84 %, 145/172), odnosno trombocitopenija (93 %, 229/247), a u skupini ostalih bolesnika krvarenje (KE 60 %, KT 86 %). U obje je skupine SSP najčešće transfundirana zbog krvarenja (hematološki 60 %, ostali 79%). Svi pripravci krioprecipitata transfundirani su zbog krvarenja kod jednog bolesnika u skupini ostalih bolesnika.

TABLICA 1. TRANSFUNDIRANI KRVNI PRIPRAVCI (N UKUPNO 985)

Krvni pripravak	Svi bolesnici		Hematološki bolesnici		Ostali bolesnici	
	N doza (N bolesnika)	median (min – max)	N doza (N bolesnika)	median (min – max)	N doza (N bolesnika)	median (min – max)
Koncentrat eritrocita	504 (89)	3 (1–92)	172 (32)	3 (1–28)	332 (57)	3 (1–92)
Koncentrat trombocita	304 (36)	5 (1–43)	247 (25)	7 (1–43)	57 (11)	3 (1–25)
Svježe zamrznuta plazma	72 (20)	3 (1–15)	10 (4)	2 (1–5)	62 (15)	2 (1–15)
Svježe zamrznuta plazma – C19	101 (34)	2 (1–9)	90 (26)	2,5 (1–9)	11 (8)	1 (1–2)
Krioprecipitat	4 (1)	4 (4–4)	0		4 (1)	4 (4–4)
<b>Ukupno</b>	<b>985</b>		<b>519 (52,7%)</b>		<b>466 (47,3%)</b>	

**Zaključak:** Potrošnja KP u SARS-CoV-2 pozitivnih bolesnika mala je u odnosu na potrošnju u KBC-u Zagreb, međutim, više od trećine ovih bolesnika bilo je liječeno KP. Suprotno očekivanju, hematološki bolesnici nisu dobili značajno više KP, ali su očekivano primili više KT, dok su ostali bolesnici primili više KE. Konvalescentna plazma uglavnom je transfundirana hematološkim bolesnicima. Najčešća indikacija za KE i KT kod hematoloških bolesnika bile su anemija i trombocitopenija, a u ostalih je bolesnika najčešća indikacija bila krvarenje, najviše iz gastrointestinalnog trakta.

## COVID-19 CONVALESCENT PLASMA AS LONG-TERM THERAPY IN IMMUNODEFICIENT PATIENTS?

RNJAK D.<sup>1</sup>, Ravlić S.<sup>2</sup>, Šola A.<sup>3</sup>, Halassy B.<sup>2</sup>, Šemnički J.<sup>3</sup>, Šuperba M.<sup>3</sup>, Hećimović A.<sup>4</sup>, Kurolt I.<sup>5</sup>, Mačak Šafranko Ž.<sup>5</sup>, Polančec D.<sup>6</sup>, Bendelja K.<sup>2</sup>, Mušlin T.<sup>4</sup>, Jukić I.<sup>4</sup>, Vuk T.<sup>4</sup>, Zenić L.<sup>6</sup>, Artuković M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Klinika za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb

• Pulmologija

<sup>2</sup> Sveučilište u Zagrebu

• Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

<sup>3</sup> Specijalna bolnica za plućne bolesti

• Pulmologija

<sup>4</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Transfuziologija

<sup>5</sup> Klinika za zarazne bolesti "Dr Fran Mihaljević"

• Infektologija

<sup>6</sup> Dječja bolnica Srebrnjak

• Pedijatrija

The patients with hematological malignancies are a vulnerable group to COVID-19, due to the immunodeficiency resulting from the underlying disease and oncological treatment that significantly impair cellular and humoral immunity. For this group of patients, there is growing evidence that COVID-19 convalescent plasma therapy might be an effective treatment, although exact proof is missing since they are mostly excluded from clinical trials. This is the therapeutic principle that is most widely used only in the early period of encountering the novel infective pathogen, when the methods of antibody assessment, as well as other relevant methodology for the disease diagnostics and monitoring, have not been properly developed and validated yet.

Here we report on the beneficial impact of passive immunotherapy with convalescent plasma to treat a prolonged, active COVID-19. A 53-year old man was diagnosed with nasopharyngeal diffuse large B-cell lymphoma in 2018. Chemotherapy following autologous stem cell transplantation and radiotherapy of Waldeyer's ring was administered, and maintenance therapy with an antiCD20 monoclonal antibody rituximab was continued. Five weeks after the last rituximab administration COVID-19 was diagnosed, and on the fifth day of the disease, the patient was hospitalized. Chest RTG revealed bilateral interstitial lung infiltrates with respiratory insufficiency; oxygen therapy with prophylactic LMWH, dexamethasone, and proton-pump inhibitor was initiated. During

the hospitalization, the patient was constantly febrile with a gradual worsening of dyspnea and clinical deterioration. The control tests showed the progression of bilateral pneumonia in chest RTG and an increase in CRP with neutropenia. All blood cultures were sterile, head, neck, chest, abdomen and pelvic computed tomography did not show any signs of lymphoma relapse. In serology testing, specific SARS-CoV-2 antibodies were not detected, SARS-CoV-2 RT-PCR test of the nasopharyngeal swab on day 45 was still positive and an infective virus was detected in nasopharyngeal culture. Considering all the above-described and still active COVID-19 even after 45 days from the onset of symptoms, therapy with ABO-compatible COVID-19 convalescent plasma was applied. A total of six units of COVID-19 convalescent plasma, and the therapy with remdesivir. Following COVID-19 convalescent plasma therapy, the patient was afebrile, with a decline in CRP and regression on chest RTG. On the 98th day of the disease, the patient presented again with a fever, dyspnea, and yellow sputum expectoration. A chest RTG showed bilateral pneumonia progression. The patient was hospitalized, there were no specific SARS-CoV-2 antibodies in control tests, while SARS-CoV-2 was detected by RT-PCR test of blood, nasopharyngeal swab, and culture. Due to a still active COVID-19, after more than 100 days from the onset of symptoms, two units of COVID-19 convalescent plasma were administered, along with the antibiotic therapy following the sputum antibiogram. After the convalescent therapy, oxygen therapy was reduced, CRP level decreased and the patient was afebrile with regression of pneumonia in chest RTG. Besides the standard of care monitoring, neutralizing antibody titers in patients' serum samples were quantified.

During the immunotherapy period, peripheral blood flow cytometry immunophenotyping was conducted to characterize lymphocyte subpopulations. The phases of clinical improvements and worsening coincided with transfused neutralizing antibodies rises and drops in the patient's systemic circulation, proving their contribution in controlling the disease progress. A therapeutic approach based on convalescent plasma transfusion transformed a prolonged, active COVID-19 into a partly manageable chronic disease.

**Simpozij 7 – Stanična terapija****STANIČNA TERAPIJA – OD KOŠTANE SRŽI DO PERSONALIZIRANE IMUNOTERAPIJE**BOJANIĆ I.<sup>1</sup><sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod**

Stanične terapije jedna su od najuzbudljivijih inovacija u medicini u posljednjem desetljeću budući da nude izlječenje bolesti za koje se dosadašnja klinička praksa pokazala neuspješnom. Razvoj ovih terapija omogućen je istovremenim napretkom biotehnoloških metoda i poboljšanim razumijevanjem bioloških mehanizama na kojima se zasniva njihova učinkovitost i sigurnost. Upravo je dugogodišnje iskustvo u području transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS) pomoglo u prikupljanju ključnih informacija o biologiji krvotvornih matičnih stanica (KMS), histokompatibilnosti i interakciji imunskih stanica koje upravljaju sudbinom transplantiranih stanica (1).

Transplantacija KMS se godinama uspješno koristi u liječenju mnogih bolesti krvotvornog i imunskog sustava i prvi je primjer primjene regenerativne medicine u kliničkoj praksi. Danas se kao adoptivna imunološka terapija uspješno primjenjuju mnoge stanice imunskog sustava, a odnedavno kao oblik personalizirane imunoterapije koriste se i genetski modificirane imunostanice i to kao dodatak ili zamjena za TKMS.

**Povijest transplantacije krvotvornih matičnih stanica**

Prva istraživanja KMS-a potaknula je potreba za liječenjem zatajenja koštane srži i leukemije nakon bombardiranja u Hirošimi i Nagasakiju kada su prepoznati biološki učinci zračenja (2,3). Koštana srž identificirana je kao izvor stanica koje se mogu transplantirati i regenerirati hematopoezu. Donnall Thomas i suradnici prvi su 1959. godine infundirali koštanu srž dvojici bolesnika s uznapredovalom leukemijom nakon supraletalnih doza zračenja i dokazali oporavak hematopoeze. Za uspjeh transplantacije ključno je bilo otkriće glavnog sustava tkivne podudarnosti HLA (engl. Human Leucocyte Antigen), koji omogućuje odabir HLA podudarnog darivatelja. Prisutnost KMS-a u perifernoj krvi u mišjim modelima opisana je 1960-tih, a nakon razvoja uređaja za aferezu dokazano je da leukociti prikupljeni iz periferne krvi sadrže jedinice koje stvaraju kolonije (eng. colony forming units, CFU) za koje se danas zna da su kratkotrajni krvotvorni progenitori. Otkriće granulocitnog faktora koji stimulira stvaranje kolonija (G-CSF) 1984. godine dovelo je do njegove primjene u mobilizaciji KMS-a u perifernu krv. Danas se najčešće koriste periferne KMS zbog jednostavnijeg načina prikupljanja i bržeg oporavka hematopoeze u odnosu na koštanu srž (1).

Krv iz pupkovine kao treći izvor KMS-a otkrivena je 1980-ih nakon nuklearne nesreće u Černobilu. Prva transplantacija krvi iz pupkovine učinjena je 1988. godine za liječenje dječaka s Fanconijevom anemijom. Iako je uspjeh transplantacije krvi iz pupkovine u djece potaknuo njezinu primjenu i u odraslih, glavno ograničenje bio je i ostao mali broj KMS i spor oporavak hematopoeze (4).

Kako bi se pronašli davatelji za čak 70% pacijenata koji nemaju HLA potpuno podudarnog srodnika, organizirani su registri dobrovoljnih darivatelja KMS-a koji međusobno surađuju i podatke o svojim potencijalnim darivateljima prijavljuju u Svjetsku organizaciju darivatelja koštane srži (eng. World Marrow Donor Association, WMDA) (1). Unatoč naporima registara, samo 50% pacijenata pronađe nesrodnog darivatelja, a taj je udio promjenjiv među različitim etničkim skupinama. Otkriće krvi iz pupkovine kao alternativnog izvora KMS-a potaknulo je organizaciju javnih banaka nesrodne krvi iz pupkovine koje su značajno povećale broj nesrodnih darivatelja, osobito za pacijente pedijatrijske dobi. Kako je sve više nesrodnih darivatelja dostupno diljem svijeta, broj alogenih TKMS povećao se za gotovo 30% u posljednjem desetljeću. Transplantacijske aktivnosti uvelike se razlikuju između razvijenih zemalja i zemalja u razvoju budući da zahtjevaju visoku razinu medicinske infrastrukture i ljudskih resursa potrebnih za uspješnu provedbu ovog složenog postupka (5).

**Izvori krvotvornih matičnih stanica i metode optimizacije prinosa i sadržaja stanica**

Aspirati koštane srži, mobilizirana periferna krv i krv iz pupkovine danas se rutinski koriste kao izvori za TKMS-a i kao ishodišne stanice za proizvodnju drugih staničnih terapija (3). Broj cirkulirajućih KMS-a pove-

ćava se korištenjem mobilizirajućih sredstava, poput G-CSF-a i/ili pleriksafora, antagonista CXC kemokinskog receptora 4CR4. Sadržaj CD34+ stanica najmanji je u krvi iz pupkovine, a najveći u mobiliziranim perifernim KMS prikupljenim aferezom. Sva tri izvora sadrže T-stanice koje mogu izazvati GVHD kada se koriste za alogenu transplantaciju. T-stanice prisutne su u najmanjem broju u krvi iz pupkovine, a uz to se smatraju imunološki naivnima. Apsolutni broj limfocita, monocita, T-stanica i dendritičnih stanica kao i omjer CD4/CD8 T-stanica značajno je veći u pripravcima perifernih KMS mobiliziranih G-CSF-om nego u koštanoj srži. Ako su darivatelj i primatelj podjednake tjelesne težine u koštanoj srži nalazi se u pravilu dovoljan broj CD34+ stanica, ali oporavak hematopoeze je dulji nego nakon perifernih KMS. Primjena G-CSF-a prije vađenja koštane srži može ubrzati oporavak hematopoeze, a smanjiti GVHD. S obzirom na stanične karakteristike, HLA podudarnost najmanje je restriktivna za transplantaciju krvi iz pupkovine, a prati ju i najniža stopa akutnog i kroničnog GVHD-a. Nažalost, KMS iz pupkovine zbog malog broja CD34+ stanica prati i najsporiji oporavak hematopoeze. Mnogi su agensi testirani za ex vivo ekspanziju krvi iz pupkovine, ali većina nije uspjela povećati količinu KMS-a odgovornih za dugotrajnu repopulaciju hematopoeze pa je jedina opcija za njenu primjenu kod odraslih za sada istodobna transplantacija dvije doze (4).

Rutinska obrada transplantata KMS provodi se radi optimizacije volumena i uklanjanja krvnih komponenti u slučaju nepodudarnosti u ABO sustavu krvnih grupa (3). Složenije obrade koriste se za optimizaciju staničnog sastava prema zahtjevima individualnih protokola transplantacije. Obrada transplantata KMS-a uglavnom je usmjerena na uklanjanje T-stanica kako bi se prevladala HLA barijera i smanjila aloreaktivnost. Rana istraživanja koristila su selekciju CD34+ stanica kao ex vivo metodu obrade, međutim potpuno uklanjanje T-stanica, uključujući donorske memorijske T-stanice, rezultiralo je odgođenim oporavkom hematopoeze i imunskih stanica te posljedično visokom smrtnosti povezanom s transplantacijom zbog teških infektivnih komplikacija. Posljednjih godina selektivno uklanjanje neželjenih stanica poput CD3+/CD19+ stanica ili TcRαβ+/CD19+ stanica pruža mogućnost prilagodbe transplantata potrebama pojedinog pacijenta, a budući da nakon obrade preostaju NK stanice, γδ T-stanice, T memorijske stanice i T regulatorne stanice imunološki oporavak je brži, a učestalost GVHD-a manja.

### Indikacije za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica

**Transplantacija autogenih KMS-a** najčešće se koristi za liječenje pacijenata s multiplim mijelom, limfomima i nekim solidnim tumorima. Princip liječenja autolognom TKMS je primjena visokih, supraletalnih doza kemoterapije ili kemoradioterapije s ciljem nadvladavanja rezistencije tumora i postizanja izlječenja, dok se transplantacijom prethodno uzetih KMS-a samo prevladava ireverzibilna toksičnost intenzivne terapije za krvotvorni sustav. Kako je imunosni sustav dio krvotvornog sustava, autolognom TKMS nastoje se korigirati i autoimuni poremećaji (6). Dosadašnja istraživanja su pokazala da primjena visokih doza citostatika i transplantacije autogenih KMS-a uspješno modulira reaktivnost imunoloških stanica protiv autogenih tkiva i poboljša kliničko stanje pacijenata s multiplom sklerozom, sistemskom sklerozom i Chronovom bolesti rezistentnim na standardne metode liječenja. Protokoli za autoimune bolesti koriste selekciju CD34+ stanica u pripremi autogenih transplantata s ciljem uklanjanja imunokompetentnih limfocita i drugih vrsta stanica koje potencijalno mogu uzrokovati bolesti. Uništavanjem disfunkcionalnog autoreaktivnog imunološkog sustava i njegovom obnovom pomoću auto-TKMS, dokazano je ponovno pokretanje “resetiranje” imunskog sustava koje se očituje promjenama u repertoaru T i B stanica kao i u regulaciji staničnih funkcija.

**Transplantacijom alogeni KMS-a** većinom se liječe pacijenti s malignim hematološkim bolestima, uglavnom akutnim leukemijama iako se indikacije sve više proširuju te uključuju nemaligne bolesti kao što su hemoglobinopatije, sindrome kongenitalne ili stečene insuficijencije koštane srži, primarne imunodeficijencije i nasljedne metaboličke poremećaje kojima nedostaje učinkovita nadomjesna enzimaska terapija (7). Za uspješno presađivanje alogeni KMS-a, pacijent mora prije transplantacije primiti neki oblik kondicioniranja, a u hematološkim malignim bolestima obično se koristi kemoterapija i zračenja cijelog tijela, koji također djeluju protiv osnovne bolesti. Glavna prednost alogene TKMS je kontrola zaostalih malignih stanica njihovim prepoznavanjem od strane imunskih stanica darivatelja, tzv. graft vs leukemia (GVL) učinak, što je povezano s nižom stopom relapsa, ali nažalost i većom toksičnošću od autogene TKMS. Klinički rizici koji prate alogenu TKMS su produljena imunodeficijencija, odbacivanje transplantata i bolest transplantata protiv domaćina (GVHD). Kako se bolje razumije GVL reakcija, češće se koristi priprema s manje intenzivnim dozama kemoterapije i zračenja, što smanjuje toksičnost i mortalitet povezan s transplantacijom i omogućuje primjenu kod starijih i pacijenata s komorbiditetima koji ne bi mogli podnijeti mijeloablativnu terapiju. Primjena “megadoza” CD34+ stanica i



modificiranih imunosupresivnih protokola, osobito poslijetransplantacijskog ciklofosfamida kojim se provodi in vivo deplecija T-stanica, dopustila je kršenje donedavno općeprihvaćene dogme kako je transplantacija alogenih KMS moguća samo u slučaju potpune podudarnost u HLA antigenima darivatelja i primatelja (8). Mogućnost transplantacije KMS-a prikupljenih od haploidentičnih srodnih darivatelja sada omogućuje pronalaženje jednog ili više potencijalnih darivatelja za gotovo sve primatelje.

### Primjena imunoloških efektornih stanica

Alogena TKMS smatra se imunoterapijom jer je antitumorska učinkovitost, tzv. GVL reaktivnost posredovana međudjelovanjem imunoloških efektornih stanica darivatelja i primatelja. Glavna populacija stanica odgovorih za uspjeh i neuspjeh TKMS potječe iz  $\alpha\beta$  T-stanica. Međutim i druge efektorne stanice kao što su NK stanice i regulatorne T-stanice (Treg) moduliraju učinkovitost GVL-a (9). Infuzije limfocita darivatelja (DLI) koriste se profilaktički ili kao preventivno liječenje trajne minimalne ostatne bolesti, dok se u kombinaciji s kemoterapijom koriste za liječenje recidiva nakon TKMS-a.

U kliničkoj praksi, transplantati alogenih KMS većinom se primijenjuju bez dodatne obrade i sadrže veliki broj T-stanica. Potpuno uklanjanje T-stanica dovodi do izostanka GVHD-a, ali po cijenu povećane učestalosti recidiva i odgođenog imunološkog oporavka, što često uzrokuje neprihvatanje ili odbacivanja transplantata. Iskušane su mnoge već spomenute tehnike selektivnog uklanjanja neželjenih podskupina T-stanica metodama negativne i/ili pozitivne selekcije kako bi se unaprijedila kvaliteta i učinkovitost pripravka KMS i DLI-a. One predstavljaju inovativne pristupe staničnoj terapiji, koji su danas dostupni i u rutinskoj kliničkoj praksi zbog automatizacije obrade stanica in vitro. Tehnologije prijenosa gena nude dodatne mogućnosti promicanja korisnog GVL-a uz obuzdavanje štetnog GVHD-a. Infuzija darivateljevih T-stanica koje izražavaju suicidalni gen timidin kinazu ili ikaspazu 9 pokazala se učinkovita u akutnom GVHD-u (1).

### Imunoterapija u liječenju GVHD-a

Budući da je GVHD u velikoj mjeri refraktoran na konvencionalno liječenje, idealan je za ispitivanje novih staničnih terapija kao što su ekstrakorporalna fotofereza, Treg-stanice i mezenhimske stanice. Ekstrakorporalna fotofereza je imunomodulatorna terapija i danas je neizostavan postupak liječenja GVHD-a koji ne reagira na medikamentoznu terapiju, a učinak se ostvaruje putem limfocita i monocita izloženih psoralenu i UVA zračenju. Treg-stanice su snažni posrednici imunološke tolerancije, a primijenjene u profilaksi smanjuju incidenciju akutnog GVHD-a bez neželjenih učinaka (10). Mezenhimske stanice također imaju snažnu imunosupresivnu aktivnost, ali za razliku od Treg-stanica koje mogu prevenirati nastanak GVHD-a, pokazale su se djelotvornima samo u liječenju GVHD-a (11).

### Antivirusna adoptivna terapija T limfocitima

Nepotpun oporavak T-stanica nakon TKMS pogoršan GVHD-om povezan je s oslabljenim odgovorima na reaktivaciju herpes virusa poput CMV-a i EBV-a i adenovirusa, a to je potaknulo razvoj antivirusnih staničnih terapija proizvedenih od darivateljevih stanica. Nakon prve uspješne primjene CMV-specifičnih klonova T-stanica još 1992. godine, ubrzo su slijedile T-stanice specifične za EBV i adenoviruse. Kako in vitro izolacija specifičnih T-stanica nije uspješna kod darivatelja koji nisu bili izloženi uzročnicima bolesti, proizvode se i djelomično podudarne, virusno specifične T-stanice dobivene od zdravih ispitanika, tzv. treće strane koje su odmah dostupne. Budući da su samo djelomično HLA podudarne, ove virusno specifične T-stanice obično ne prežive dugo u primatelju, ali je najčešće to dovoljno dugo da se premosti period do imunološkog oporavka (12).

### Modificirane T-stanice s antitumorskim učinkom

Napredak u razumijevanju imunoloških reakcija rezultirao je razvojem staničnih terapija izvan okruženja TKMS-a. Adoptivna antitumorska terapija ex vivo ekspanziranim ili modificiranim autolognim T-stanicama intenzivno se istražuje (13). Međutim, relativno niska učestalost imunoloških stanica s antitumorskim djelovanjem, poput limfocita koji infiltriraju tumor, ograničila je njihov klinički uspjeh. Jedna od najatraktivnijih mogućnosti koju nude suvremene tehnologije prijenosa gena je genetsko preusmjeravanje autolognih ili alogenih T-stanica protiv tumorskih antigena ekspresijom ili tumor specifičnih receptora T-stanica (eng. T cell receptor, TCR) ili kimeričnih antigenih receptora (eng. chimeric antigen receptor, CAR). Posljednjih godina zabilježeni su impresivni klinički uspjesi CAR T-stanica usmjerenih na CD19 u djece i odraslih oboljelih od malignih bolesti B stanica i za sada su odabrana dva takva lijeka koja sadrže autologne CAR T-stanice. Intenzivno se

istražuju alogene CAR T-stanice koje bi bile odmah dostupne, ali i otvorile pitanja učinkovitosti, sigurnosti zbog pojave GVHD-a, kao i in vivo postojanosti.

Personalizirani lijekovi kao što su CAR T-stanice proizvode se iz pripravaka stanica prikupljenih u bolničkim ustanovama, a budući da su tijekom proizvodnje stanice podvignute značajnim modifikacijama finalni proizvodi svrstavaju se u područje medicinskih proizvoda za naprednu terapiju i moraju se proizvoditi prema dobroj proizvođačkoj praksi uobičajenoj za farmaceutsku industriju. Komercijalizacija ovih inovativnih terapija otvara dosad neviđena medicinska, etička, financijska pitanja dostupnosti lijeka, te odgovornosti svih dionika, dok regulatorna tijela traže praćenje sigurnosti i učinkovitosti u “stvarnim” uvjetima (14).

## Zaključak

Tijekom posljednjeg desetljeća znanstvena i biotehnoška otkrića omogućila su procvat stanične terapije i njenu primjenu u brojnim medicinskim disciplinama. Suvremene stanične terapije ne samo da dio svog razvoja duguju TKMS-u, već obećavaju i poboljšanje primjenjivosti, sigurnosti te učinkovitosti TKMS-a, a mogle bi ju čak i zamijeniti. Hoće li one ostvariti očekivanja ovisi ne samo o znanstvenom i biotehnoškom razvoju, već i o tome hoće li se prevladati logistički, ekonomski i regulatorni izazovi koje njihova proizvodnja i primjena donose (1).

## LITERATURA

1. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A *i sur.* Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med.* 2018 Apr 11;10(436):eaap9630.
2. Barriga F, Ramírez P, Wietstruck A, Rojas N. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res* 2012;45:307–16.
3. Panch SR, Szymanski J, Savani BN, Stroncek DF. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:1241–9.
4. Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:621–6.
5. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C *i sur.*; *European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)*. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* 2021;56:1651–64.
6. Snowden JA, Badoglio M, Labopin M *i sur.*; *EBMT Autoimmune Diseases Working Party; Paediatric Working Party; JACIE-ISCT*. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Adv* 2017;1:2742–55.
7. Mahmoud HK, Elhaddad AM, Fahmy OA *i sur.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant hematological disorders. *J Adv Res.* 2015;6:449–58.
8. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13: 10–24.
9. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348:62–8.
10. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J *i sur.* D4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting GVHD after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144–50.
11. von Dalowski F, Kramer M, Wermke M *i sur.* Mesenchymal stromal cells for treatment of acute steroid-refractory GVHD: Clinical responses and long-term outcome. *Stem Cells* 2016;34:357–66.
12. O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN *i sur.* Virus-specific T-cell banks for ‘off the shelf’ adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:1163–72.
13. Cui X, Liu R, Duan L *i sur.* CAR-T therapy: Prospects in targeting cancer stem cells. *J Cell Mol Med.* 2021 Sep 28. Epub ahead of print.
14. Chabannon C, Hildebrandt M, Scheding S *i sur.* Regulation of advanced therapy medicinal products will affect the practice of haematopoietic SCT in the near future: A perspective from the EBMT cell-processing committee. *Bone Marrow Transplant* 2015;50:321–3.

## UTJECAJ TALIDOMIDA U UVODNOJ TERAPIJI NA MOBILIZACIJU I PRIKUPLJANJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA U BOLESNIKA S MULTIPLIM MIJELOMOM

JURENEC S.<sup>1</sup>, Mandac Smoljanović I.<sup>2</sup>, Zatezalo V.<sup>2</sup>, Radić-Krišto D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinička bolnica Merkur

• Odjel za anesteziju, reanimatologiju i intenzivno liječenje

<sup>2</sup> Klinička bolnica Merkur

• Zavod za hematologiju

**Uvod:** Multipli mijelom je maligna bolest porijekla B limfocita, karakterizirana proliferacijom monoklonalnih plazma stanica u koštanoj srži koje proizvode monoklonalni imunoglobulin te posljedičnom disfunkcijom organa. Pacijenti podobni za transplantaciju KMS primaju indukcijsku terapiju, tri do četiri ciklusa. Nakon postizanja barem vrlo dobre parcijalne remisije (VDPR) pristupa se mobilizaciji perifernih KMS. **Talidomid** je derivat glutaminske kiseline. Ima antiangiogenu i imunomodulatornu aktivnost te direktan utjecaj na mijelomske stanice. Postupak prikupljanja perifernih KMS se provodi nakon primjene visokih doza ciklofosfamida, uz primjenu G-CSF-a. Cilj je prikupiti dva puta po  $\geq 3,5 \times 10^6$  CD 34+/kg TT, minimalno dva puta po  $2 \times 10^6$  CD34+/kg TT.

**Cilj:** Analizirati i usporediti uspješnost i učinkovitost mobilizacije i prikupljanja KMS nakon provedene uvodne terapije s i bez talidomida u ovisnosti o dobi bolesnika i broju linija uvodne terapije (LUT). Kod bolesnika koji su primili više LUT analizirati utjecaj dobi na navedene parametre.

**Metode:** Retrospektivno smo analizirali podatke 169 bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma koji su od 01.01.2015. do 15.09.2021., nakon primljene uvodne i mobilizacijske kemoterapije i čimbenika rasta pristupili postupku prikupljanja KMS. S obzirom na broj LUT koju su dobili, bolesnike smo podijelili u dvije grupe: bolesnici s jednom i više LUT. Bolesnike liječene jednom LUT podijelili smo na one koji u uvodnoj terapiji jesu ili nisu dobili talidomid. Skupine smo podijelili po dobi, odnosno starije i mlađe od 60 godina. Analizirali smo trajanje mobilizacije, broj CD34+ stanica u krvi na dan leukafereze, broj postupaka leukafereze, broj prikupljenih CD34+ stanica, vrstu GCSF-a. Najčešće korišteni uvodni protokoli su VCD, VTD, VAD. Nakon uvodne terapije kojom se postigla barem VDPR, provodi se mobilizacija KMS. Mobilizaciju smo provodili kombinacijom kemoterapije (ciklofosfamid) i čimbenika rasta granulocita (filgrastima, pegfilgrastima, lipegfilgrastima, plerixafora). Dan poslije kemoterapije bolesniku je primijenjen pegfilgrastim ili lipegfilgrastim. Kada broj leukocita poraste iznad  $1 \times 10^9/L$ , određuje se broj CD34+ stanica u krvi, a kada apsolutni broj bude  $\geq 10 \times 10^6/L$ , pristupa se leukaferezi. Ako ne dođe do adekvatnog porasta broja KMS u krvi, mobilizacija se potakne filgrastimom i eventualno plerixaforom. U postuku leukafereze procesuirano je dva do pet volumena krvi.

**Rezultati:** Samo **jednu LUT** primilo je 128 bolesnika. Nije bilo značajne razlike u trajanju mobilizacije između onih koji su primili talidomid, mlađi (9,6 dana), stariji (10,03 dana) i onih koji nisu, mlađi (9,23 dana),

TABLICA 1.

	Primili jednu LUT			
	Bez talidomida		S talidomidom	
	≤ 60 godina	Stariji od 60 god	≤ 60 godina	Stariji od 60 god
Broj bolesnika	51	58	13	6
Trajanje mobilizacije u danima	9,6 (8-14)	10,03 (7-15)	9,23 (8-10)	9,3 (8-10)
Prosječan broj CD34+ stanica u krvi na dan leukafereze ( $\times 10^6/L$ )	55,49 (7,25-249,3)	49,96 (6,74-191,22)	70,61 (9-211,24)	63,14 (12,56-165,36)
Prosječan broj postupaka leukafereze po pacijentu	1,2 (1-2)	1,3 (1-3)	1,3 (1-3)	1,3 (1-2)
Prosječan broj prikupljenih CD34+ stanica ( $\times 10^6/kg$ TT)	10,18 (1,07-36,99)	9,56 (0,84-31,47)	10,46 (1,11-17,66)	9,8 (3,75-12,11)
Vrsta GCSF – broj mobiliziranih pacijenata	peg.filgrastim– 48  peg.filgrastim+ filgrastim– 3	peg.filgrastim– 41 peg.filgrastim+ filgrastim– 16 peg. filgrastim+ +filgrastim+ + plerixafor– 1	peg.filgrastim– 11  peg.filgrastim+ filgrastim– 2	peg.filgrastim– 4  peg.filgrastim+ filgrastim– 2

TABLICA 2.

	Primili više LUT	
	≤ 60 godina	Stariji od 60 god
Broj bolesnika	24	17
Trajanje mobilizacije (dani)	9,79 (8-17)	10,11 (8-13)
Prosječan broj CD34+stanica u krvi na dan leukaferoze ( $\times 10^6/L$ )	50,33 (11,18-184)	28,44 (7-144)
Prosječan broj postupaka leukaferoze po pacijentu	1,3 (1-2)	1,59 (1-3)
Prosječan broj prikupljenih stanica ( $\times 10^6/kg$ TT)	9,54 (0,61-25,41)	8,46 (0,5-15,78)
Vrsta GCSF – broj mobiliziranih pacijenata	peg.filgrastim– 17 peg.filgrastim+ filgrastim– 5 peg.filgrastim+filgrastim+ + plerixafor– 3	peg.filgrastim– 11 peg.filgrastim+ filgrastim– 5 peg.filgrastim+ +filgrastim+ + plerixafor– 1

stariji (9,3 dana). Na dan leukaferoze prosječan broj KMS u krvi bio je viši kod bolesnika koji su primali talidomid (mlađa skupina  $70,61 \times 10^6/L$ , starija  $63,14 \times 10^6/L$ ) u odnosu na one koji nisu (mlađa skupina  $55,49 \times 10^6/L$ , starija  $49,96 \times 10^6/L$ ), bez značajnije razlike među dobnim skupinama. Broj postupaka leukaferoze bio je podjednak u svim skupinama kao i prosječan broj prikupljenih stanica po bolesniku ( $9,6$  do  $10,5 \times 10^6/kgTM$ ). U mobilizaciji 16 starijih bolesnika koji nisu primali talidomid dodatno je primijenjen filgrastim, a kod jednog bolesnika, uz filgrastim je primijenjen i plerixafor. Zbog malog broja bolesnika u starijoj skupini s talidomidom (6), ne može se raditi usporedba sa skupinom bez talidomida s obzirom na vrstu GCSF-a korištenog u mobilizaciji. U skupini bolesnika koji su liječeni s **više linija uvodne terapije** analiziran je 51 bolesnik. Trajanje mobilizacije je u obje dobne skupine bilo podjednako (mlađa 9,8 dana, starija 10,1 dan). U skupini starijih bolesnika broj KMS u krvi na dan leukaferoze bio je manji u odnosu na mlađe ( $28,44$  vs.  $50,33 \times 10^6/L \times 10^6/L$ ), kao i prosječan broj prikupljenih stanica ( $8,46$  vs.  $9,54 \times 10^6/kg$ ). Prosječan broj postupaka leukaferoze u starijoj skupini je bio veći ( $1,59$  vs  $1,3$ ). (tablice 1. i 2.)

**Zaključak:** Naši rezultati retrospektivne analize potvrđuju da talidomid ne utječe na uspješnost mobilizacije. Kod **pretretiranih pacijenata** dob je bila značajan faktor koji je utjecao na broj CD34+ stanica u krvi, prosječan broj prikupljenih stanica kao i trajanje mobilizacije.

## NEŽELJENE REAKCIJE PRILIKOM TRANSPLANTACIJE ALOGENIČNIH KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA

FRIŠČIĆ N.<sup>1</sup>, Bojanić I.<sup>1</sup>, Mazić S.<sup>1</sup>, Duraković N.<sup>2</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KBC Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

<sup>2</sup>KBC Zagreb

• Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti

**Uvod:** Iako se transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) smatra općenito sigurnim postupkom, neželjene reakcije (NR) prilikom infuzije pripravka krvotvornih matičnih stanica (KMS) i dalje su česte kod pacijenata podvrgnutima postupku TKMS. Učestalost pojave NR prilikom infuzije pripravka KMS ovisi o obilježjima primatelja KMS (npr. spol, dob, dijagnoza) kao i sastojcima pripravka: staničnim (npr. granulociti) i/ili nestaničnim sastojcima (npr. dimetil-sulfoksid (DMSO)). NR mogu biti u rasponu od blagih pa do životno ugrožavajućih reakcija kao što su respiratorne i kardiovaskularne reakcije te imunološke reakcije poput sindroma otpuštanja citokina. Cilj ovog rada je, na temelju retrospektivne obrade podataka, odrediti incidenciju, stupanj i

potencijalne prediktivne čimbenike za pojavu NR prilikom alogenične TKMS u odraslih i pedijatrijskih pacijenata u KBC Zagreb.

**Metode:** Istraživanje je obuhvatilo analizu podataka o tijeku infuzije pripravaka stanica za pacijente transplantirane pripravicima koštane srži te svježih i krioprezerviranih perifernih KMS u razdoblju od srpnja 2013. do srpnja 2021. godine upisanih u informacijski sustav T.C.S. i bolnički informacijski sustav BIS. Periferne KMS prikupljene su postupkom leukafereze nakon mobilizacije granulocitnim faktorom rasta (G-CSF), a KS je prikupljena standardnim postupkom prikupljanja u operacijskoj sali. Pripravci perifernih KMS krioprezervirani su uz dodatak krioprotektivne otopine koja sadrži 5% ljudski albumin i DMSO te pohranjeni u plinovitoj fazi tekućeg dušika. Za infuziju pripravaka KMS korišten je standardni sistem za transfuziju, a krioprezervirani pripravci su prethodno odmrznuti u vodenoj kupelji ili uređaju za suho odmrzavanje. Svi pacijenti su prije infuzije pripravka primili premedikaciju prema standardnom bolničkom protokolu. Nadzor tijeka TKMS kod pacijenata uključivao je praćenje vitalnih znakova i znakova toksičnosti tijekom postupka TKMS. NR su razvrstane prema *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)* verzija 5.0.

**Rezultati:** Analizirani su podaci 507 pacijenata kojima je infundirano ukupno 780 pripravaka KMS-a; 110 ih je primilo pripravak svježe koštane srži (KS), 298 pripravak svježih perifernih KMS i 99 pripravak krioprezerviranih perifernih KMS. Obilježja pacijenata navedena su u Tablici 1. NR su se javile kod 14,5% pacijenata koji su primili KS, 13,1% pacijenata koji su primili pripravke svježih perifernih KMS te 23,2% pacijenata koji su primili krioprezervirane periferne KMS ( $p=0,051$ ). Spol, dijagnoza i ABO podudarnost nisu utjecali na pojavu reakcija nakon infuzije KS, svježih perifernih KMS ni krioprezerviranih perifernih KMS, ali pokazalo se da dob utječe na pojavu NR kod infuzije pripravka krioprezerviranih perifernih KMS ( $p=0,03$ ) (Tablica 1.).

TABLICA 1. OBILJEŽJA PACIJENATA I NEŽELJENE REAKCIJE TIJEKOM TRANSPLANTACIJE ALOGENIČNIH KMS

Pacijenti (n)		Koštana srž			Periferne KMS svježe			Periferne KMS krioprezervirane		
		DA	NE	<i>p</i>	DA	NE	<i>p</i>	DA	NE	<i>p</i>
		110			298			99		
NR*		DA	NE	<i>p</i>	DA	NE	<i>p</i>	DA	NE	<i>p</i>
Spol	M	7 (11,5%)	54 (88,5%)	<b>0,308</b>	20 (12,8%)	136 (87,2%)	<b>0,886</b>	7 (14,6%)	41 (85,4%)	<b>0,059</b>
	Ž	9 (18,4%)	40 (81,6%)		19 (13,4%)	123 (86,6%)		16 (31,4%)	35 (68,6%)	
Dob		35,5(1-67)	27,5 (0-70)	<b>0,277</b>	49,0 (6-62)	49,0(1-70)	<b>0,96</b>	37,0 (4-64)	51,0 (1-68)	<b>0,03</b>
ABO podudarnost	Identični	7(11,9%)	52 (88,1%)	<b>0,661</b>	22 (11,8%)	164 (88,2%)	<b>0,074</b>	12 (28,6%)	30 (71,4%)	<b>0,533</b>
	Mala	4(21,1%)	15 (78,9%)		6 (11,3%)	47 (88,7%)		5 (22,7%)	17 (77,3%)	
	Obostrana	1 (9,0%)	10 (91,0%)		6 (33,3%)	12 (66,6%)		1 (8,3%)	11 (91,7%)	
	Velika	4 (19,0%)	17 (81%)		5 (12,2%)	36 (87,8%)		5 (21,7%)	18 (78,3%)	
Dijagnoze	ALL	0	21(100%)	<b>0,334</b>	9 (14,3%)	54 (85,7%)	<b>0,781</b>	4 (23,5%)	13 (76,5%)	<b>0,167</b>
	AML	7 (20,6%)	27 (79,4%)		18 (12,9%)	122 (87,1%)		10 (23,3%)	33 (76,7%)	
	Mb Hodgkin	1(11,1%)	8 (88,8%)		1 (16,6%)	5 (83,3%)		0	0	
	NHL	0	12 (100%)		0	12 (100%)		1 (25%)	3 (75%)	
	MDS	3 (25%)	9 (75%)		6 (20%)	24 (80%)		4 (30,8%)	9 (69,2%)	
	Ostalo**	5 (20%)	16 (80%)		4 (9,5%)	38 (90,5%)		3 (15,8%)	16 (84,2%)	

\* NR = neželjene reakcije; \*\* Aplastična anemija, CML, CLL, BAL, MM, OMF, OMS, SCID, hemofagocitna histiocitoza kronična granulomatozna bolest

Prema CTCAE klasifikaciji zabilježene su NR od 1. stupnja do 4. stupnja (Tablica 2.), od kojih su NR 1. stupnja bile najčešće unutar sve tri skupine pripravaka. NR 1. stupnja čine 61,5%, NR 2. stupnja 33,3%, NR 3. stupnja 2,6%, a NR 4. stupnja 2,6 % od ukupnog broja NR. Nije zabilježena niti jedna NR 5. stupnja. Najčešće NR 1. stupnja bile su porast temperature do 39,0 stupnjeva, mučnina i crvenilo kože/osip, a porast tlaka do 160/100 mmHg, povraćanje i porast temperature iznad 39,0 stupnjeva bile su najčešće NR 2. stupnja. NR 3. i 4. stupnja uključivale su teške poremećaje kardiovaskularnog, respiratornog i imunološkog sustava koji su zahtjevali zbrinjavanje pacijenata u Jedinici intenzivnog liječenja.



TABLICA 2. STUPANJ I VRSTA NEŽELJENIH REAKCIJA TIJEKOM TRANSPLANTACIJE ALOGENIČNIH KMS

Stupanj NR*	Vrsta NR*	Koštana srž	Periferne KMS svježe	Periferne KMS krioprezervirane	Ukupno
1. stupanj	porast temperature 38,0–39,0°C	4	14	0	18
	mučnina	2	3	2	7
	crvenilo kože/osip	1	2	3	6
	zimica	1	2	0	3
	vrućina	0	0	3	3
	kašalj/grebanje u grlu	0	0	3	3
	bol (u prsima/trbuhu)	1	0	2	3
	glavobolja	0	1	1	2
	asimptomatski pad tlaka	0	0	1	1
2. stupanj	porast temperature 39,0–40,0	0	9	0	9
	povraćanje	1	2	6	9
	hipertenzija ≤ 160/100 mmHg	5	3	2	10
3. stupanj	hipertenzija > 160/100 mmHg	0	1	0	1
	Takotsubo kardiomiopatija	1	0	0	1
4. stupanj	sindrom otpuštanja citokina	0	2	0	2
5. stupanj	smrtni ishod	0	0	0	0
Pacijenti (n)		16	39	23	78

\*NR = neželjene reakcije

**Zaključak:** Prilikom TKMS može doći do pojave NR, a najčešće su se javile kod pacijenata koji su primili krioprezervirane periferne KMS. Iako se najčešće radi o NR 1. stupnja koje prolaze spontano ili na primjenu minimalne terapije, potreban je poseban oprez s obzirom da su zabilježene i teške, životno ugrožavajuće reakcije. Smatramo da je nadzor pacijenata prilikom TKMS od strane medicinskog osoblja nužan kako bi se navedene NR na vrijeme prepoznale i liječile s ciljem sprječavanja razvoja daljnjih komplikacija ili smrtnog ishoda.

## EKSTRAKORPORALNA FOTOFEREZA NAKON TRANSPLANTACIJE PLUĆA U KBC ZAGREB (2014–2021.)

MAZIĆ S.<sup>1</sup>, Bojanić I.<sup>1</sup>, Burnać I. L.<sup>1</sup>, Džubur F.<sup>2</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup><sup>1</sup>KBC Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

<sup>2</sup>KBC Zagreb

• Klinika za plućne bolesti Jordanovac

**Uvod:** Transplantacija pluća je terapijska opcija za pacijente s terminalnom plućnom bolesti međutim uspjeh transplantacije je narušen razvojem kronične disfunkcije transplantata (CLAD, engl. Chronic lung allograft dysfunction). Najčešći oblik CLAD-a je sindrom obliterirajućeg bronhiolitisa (BOS, engl. Bronchiolitis obliterans syndrome) koji razvije gotovo polovica pacijenata unutar 5 godina te je ujedno i vodeći uzrok smrtnosti nakon jedne godine od transplantacije. Kod BOS-a se, zbog fibroproliferativnog odgovora na razini malih dišnih puteva, razvija funkcionalni defekt ventilacije koji se definira kao smanjenje forsiranog respiratornog volumena u 1 sekundi (FEV<sub>1</sub>) na ≤80% koje traje duže od 3 tjedna uz isključenje drugih uzroka plućne disfunkcije. Inicijalna terapija BOS-a uključuje pojačanu imunosupresiju uz imunomodulaciju makrolidnim antibioticima. Prema

preporukama američkog stručnog društva za aferezu (ASFA) ekstrakorporalna fotoferza (ECP) se uključuje u drugoj terapijskoj liniji kod pacijenata s teškim refraktornim BOS-om kako bi se stabilizirao ili usporio gubitak plućnih funkcija.

ECP ostvaruje imunomodulacijski učinak putem vlastitih mononuklearnih stanica (MNS) koje, nakon izlaganja psoralenskoj fotoaktivnoj tvari i UV-A svjetlu, odvodi u apoptozu. Daljnim, kompleksnim i ne sasvim razjašnjenim interakcijama postiže se promjena citokinskog profila iz proupalnog u protuupalni uz razvoj T regulacijskih limfocita i diferencijacije monocita u dendritičke stanice.

Cilj ovog rada je prikazati primjenu ECP kod pacijenata nakon transplantacije pluća u proteklih 7 godina u KBC Zagreb.

**Metode:** ECP se u KBC Zagreb provodi od 2006. godine “off-line” tehnikom (otvoreni sustav). Ovaj postupak zahtjeva prikupljanje produkta MNS leukaferezom na staničnom separatoru Spectra Optia, kojem se, nakon razrjeđivanja fiziološkom otopinom dodaje fotoaktivna tvar 8-methoxypsoralen (Uvadex). Pripravak se ozračuje u uređaju za UV-A zračenje (Macogenic-Macopharma) i potom reinfundira pacijentu. Postupak traje 5–6 sati. Od 2019.g. na raspolaganju je i zatvoreni sustav ECP; “in line” tehnika na separatoru Therakos Cellex koji kroz 2–3 sata izdvoji, ozrači i reinfundira MNS pacijentu. Provodi se 6 ciklusa ECP svaki drugi tjedan, potom se pacijenti reevaluiraju i prema potrebi ponavljaju terapiju.

**Rezultati:** U periodu od 2014.–2021. godine ECP je provedena kod 13 pacijenata s transplantiranim plućima od kojih je bilo 8 žena i 5 muškaraca medijana dobi 54 godine (raspon 26–70). Razlozi za transplantaciju bili su cistična fibroza (N 2), idiopatska plućna fibroza (N 5), sekundarna plućna fibroza (N 1), idiopatska plućna hipertenzija (N 3), sekundarna plućna hipertenzija (N 1) i alveolarna mikrolitijaza (N 1). Kod većine pacijenata (N 12, 92%) se radilo o razvoju kroničnog BOS-a uz pogoršanje plućnih funkcija dok je jedna pacijentica upućena zbog akutnog odbacivanja dva mjeseca nakon transplantacije. Medijan vremena od transplantacije do prve ECP iznosio je 48 mjeseci (raspon 2–104).

Venski pristup je kod većine pacijenata ostvaren putem perifernih vena (11, 85%), jedna pacijentica je zahtjevala postavljanje centralnog venskog katetera a kod druge je korištena kombinacija periferne vene i IV uvednice. Ukupno su učinjena 223 postupka ECP, medijan provođenja terapije bio je 3 mjeseca (raspon 1–24) a medijan broja provedenih postupaka po pacijentu iznosio je 14 (raspon 3–46). Otvorenim sustavom je tretirano 7 pacijenata (54%) a zatvorenim 6 (46%) pacijenata.

Kod 5 pacijenata je nastupilo pogoršanje (retransplantacija ili smrtni ishod unutar 1 g.), 5 pacijenata je stabilizirano a kod 3 pacijenta su predviđeni ciklusi ECP još u tijeku.

**Zaključak:** ECP svoj terapijski učinak ostvaruje kroz duže vrijeme te zahtjeva suradnju pacijenta, pulmologa i tima na odjelu za aferezu kako bi se održala motiviranost tijekom višemjesečne terapije. ECP se pokazala sigurnom i dobro podošljivom terapijom. Uvođenje zatvorenog sustava ECP skraćuje vrijeme boravka pacijenta na našem zavodu i dodatno olakšava organizaciju ambulantnog liječenja. Novije spoznaje ukazuju da bi ECP mogla ostvariti povoljan učinak i kod pacijenata u ranijim fazama BOS-a što otvara mogućnost preventivnog djelovanja i boljih ishoda.

## PROJEKT TRANSPLANTACIJE KRVOTVORNIH MATIČNIH STANICA ZA AUTOLOGNU PRIMJENU – KBC SPLIT

BOGDANIĆ D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zavod za transfuzijsku medicinu, Klinički bolnički centar Split  
• Odjel za citaferezu i krioprezervaciju

Pripreme za ostvarivanje mogućnosti liječenja hematoloških bolesnika transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (KMS) u KBC Split započele su osnivanjem multidisciplinarnog tima za provođenje transplantacije u veljači 2008. god. uz vodstvo i pomoć prof.dr.sc. Borisa Labara, pročelnika Zavoda za hematologiju KBC Zagreb. U prosincu 2008. god. potpisan je ugovor o međusobnoj suradnji između KBC Zagreb i KBC Split u svrhu edukacije djelatnika za postupke prikupljanja, obrade, čuvanja i reinfuzije KMS. U lipnju 2010. god. obavljena je primopredaja prostora u prizemlju na lokaciji Križine koji je adaptiran za potrebe transfuzijskog dijela transplantacijskog programa. U studenom 2010. god. završena je edukacija djelatnika, nabavljena potrebna oprema i u ožujku 2011. osnovan je novi Odjel za citaferezu i krioprezervaciju. Riješenje za ispunjavanje uvjeta i odobrenje

za obavljanje djelatnosti izdano je 24. lipnja 2011. god. U siječnju 2012. god. prijavljen je ozbiljan štetan događaj u OCK-u koji je onemogućio početak rada već akreditirane djelatnosti uzimanja, obrade i pohrane KMS u KBC Split. Nepravilnosti su otklonjene u listopadu 2012. god., ali su svi instalirani uređaji kao i ventilacijski sustav stavljani u stanje mirovanja iz razloga financijske uštede i nije se započelo s radom te je uslijedio gubitak Odo-brenja za rad 24. lipnja 2015. god. U 2016. god. dolazi do reaktivacije projekta i ponovne edukacije djelatnika te nabave potrebne opreme. Konačno slijedi ponovno odobrenje za obavljanje djelatnosti prikupljanja, uzimanja, testiranja, obrade, očuvanja, pohrane i raspodjele krvotvornih matičnih stanica za autolognu primjenu 20. listo-pada 2020. god. Prva bolesnica, primljena radi prikupljana matičnih stanica u studenom 2020. god. imala je pozitivan nalaz SARS-Cov-19 te nije obavljeno prikupljanje.

Prvi postupak prikupljanja, obrade i zamrzavanja KMS obavljen je 24. 01. 2021. god. kod bolesnice s multi-plim mijelom nakon primjene ciklofosfamida i filgrastima. Tijekom dva dana prikupljeno je  $8,48 \times 10^9/L$  CD34+ stanica po kilogramu tjelesne težine što je zamrznuto u 4 vrećice. Nakon kondicioniranja prema protokolu MEL200 bolesnicije 23.02. učinjena reinfuzija matičnih stanica. Tijekom neutropenije bolesnica je primala filgrastim, zbog anemije jednu dozu ozračenih koncentrata eritrocita a zbog trombocitopenija 2x8 doza ozrače-nih koncentrata trombocita. Broj granulocita  $>0,5 \times 10^9/L$  postignut je 12. dan od reinfuzije, broj trombocita  $>50 \times 10^9/L$  postignut je 34. dan nakon reinfuzije.

Do sada je obrađeno 8 bolesnika s ukupno 18 postupaka prikupljanja KMS te 5 reinfuzija prema dogovoru s hematologima.

S obzirom na sadašnje mogućnosti planiramo provoditi 10–15 transplantacija godišnje, prvenstveno u bole-snika s multiplim mijelomom. U ovom trenutku ograničavajući čimbenik je postojanje samo dvije sterilne jedi-nice pri Zavodu za hematologiju.

## Simpozij 8 – Tkivno bankarstvo

### RAD BANKE TKIVA U OKVIRU U HRVATSKE BANKE TKIVA I STANICA

VIDOVIĆ I.<sup>1</sup>, Rončević Krajina M.<sup>1</sup>, Golemović M.<sup>1</sup>, Škifić M.<sup>1</sup>, Leskovar I.<sup>1</sup>, Tutić Lazić S.<sup>1</sup>, Popović T.<sup>1</sup>, Brezak J.<sup>2</sup>, Crnogaća K.<sup>3</sup>, Delimar D.<sup>3</sup>, Šafradin I.<sup>4</sup>, Biočina B.<sup>4</sup>, Škegro I.<sup>5</sup>, Kalauz M.<sup>5</sup>, Šarić D.<sup>6</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Hrvatska banka tkiva i stanica

<sup>2</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Odjel za koordinaciju transplantacija i eksplantacije

<sup>3</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinika za ortopediju

<sup>4</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinika za kardijalnu kirurgiju

<sup>5</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinika za očne bolesti

<sup>6</sup> Klinička bolnica Sveti Duh

• Klinika za očne bolesti

Potrebe za transplantacijom tkiva u našoj zemlji, kao i u cijelom svijetu u svakodnevnom su porastu. Iako transplantacija tkiva najčešće ne spašavaju život, presadci tkiva omogućuju najveću terapijsku dobit i unaprjeđenje kvalitete života primatelja. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije trenutno je oko 20 milijuna osoba slijepo zbog različitih bolesti rožnice. Prema podacima iz Nacionalne transplantacijske mreže (NTM) u Hrvatskoj na listi čekanja za transplantaciju rožnice nalazi se oko 350 pacijenta. S ciljem ujednačavanja kvalitete i sigurnosti tkiva i stanica za presađivanje te uspostavljanja jedinstvenog modela upravljanja djelatnostima uzimanja, pohranjivanja i raspodjele darovanih tkiva na nacionalnoj razini, Vlada Republike Hrvatske 2011. donijela je Nacionalni plan razvoja tkivnog bankarstva kojim se predviđa osnivanje nacionalne banke tkiva. Trebalo je proći još nekoliko godina da se ona i ustroji. Obzirom da je Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) imao dugogodišnje iskustvo u pohrani tkiva i stanica, na zahtjev Ministarstva zdravstva unutar Kliničkog zavoda 2016. godine osnovana je Hrvatska banka tkiva i stanica (HBTS). U sklopu HBTS djeluje Banka tkiva, Odjel za prikupljanje i pohranu stanica, Banka krvi iz pupkovine, Banka reproduktivnog tkiva, Banka humanog mlijeka i Odjel za kontrolu kvalitete tkiva i stanica. Banka tkiva prikuplja očno, kardiovaskularno i koštano-mišićno tkivo, te amnijsku membranu. Osnovni ciljevi Banke tkiva su povećanje dostupnosti i kvalitete liječenja presađivanjem tkiva, prikupljanje i raspodjela tkiva sukladno nacionalnim potrebama te razvijanje svijesti cjelokupnog stanovništava o potrebama za tkivima i važnosti darivanja tkiva. Neophodan uvjet za uspješnu transplantaciju tkiva je pronalaženje darivatelja i prikupljanje odgovarajućeg tkiva. Zakonski propisi koji određuju način prikupljanja tkiva razlikuju se od zemlje do zemlje. Većina europskih zemalja, među kojima je i Hrvatska, odlučila je slijediti preporuke Europskog vijeća iz 1978. kojima se preporučuje princip tzv. pretpostavljenog pristanka (eng. *opting-out*), koji polazi od pretpostavke da je osoba pristala na darivanje organa i tkiva ako za života nije dala izričitu pisanu zabranu. U Hrvatskoj se mogućim darivateljem organa i tkiva smatra svaka preminula osoba koja se za života tome nije izričito protivila. Iako naš zakon ne propisuje obvezu traženja dozvole za uzimanje organa i tkiva od obitelji umrle osobe, u praksi se poštuje stav obitelji. S obzirom na nedostatak tkiva za presađivanje i listu čekanja za transplantaciju rožnica Ministarstvo zdravstva u listopadu 2015. donijelo je odluku o imenovanju nacionalnog tima za tkiva te uspostavlja program uzimanja ocnog tkiva od darivatelj nakon prestanka rada srca (eng. *Donor after Cardiac Death – DCD*) u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom bolničkom centru Sestara milosrdnica, Kliničkoj bolnici Sveti Duh i Kliničkoj bolnici Dubrava u kojima su imenovani koordinatoru za prikupljanje tkiva. Sustav dojave u navedenim ustanovama treba osigurati da svaka umrla osoba u donorskoj bolnici bude prepoznata kao mogući darivatelj u vremenskom okviru koji dozvoljava uzimanje tkiva. Program je uvelike doprinio unaprijeđenu darivanja i dostupnosti ocnog tkiva za transplantaciju ali i razvijanju svijesti o potrebama za tkivom i među zdravstvenim djelatnicima, boljoj organizaciji i provođenju aktivnosti u okviru kontinuirane edukacije iz područja uzimanja tkiva te stvaranje čvršće koordinacijske mreže za uzimanje i presađivanje tkiva na nacionalnoj razini. Banka tkiva aktivno surađuje s transplantacijskim koordinatorima i/ili

koordinatorima za tkiva u postupku prikupljanja odgovarajućih podataka o karakteristikama darivatelja potrebnih da bi se ocijenila njegova prihvatljivost za darivanje tkiva, u svrhu omogućavanja pravilne procjene rizika i smanjenje rizika za primatelja te učinkovite dodjele tkiva kao i s timovima za uzimanje (eksplantaciju) tkiva u donorskoj bolnici. Obzirom da HBTS djeluje kao središnja banka za raspodjelu tkiva i stanica unutar Republike Hrvatske prikuplja, pohranjuje i raspodjeljuje više vrsta tkiva uključujući očno, kardiovaskularno i mišićno-koštano tkivo sukladno važećim zakonskim direktivama i pravilnicima. Očno tkivo uzima se isijecanjem rožnica *in situ* ili uzimanjem očnih jabučica od darivatelj nakon smrti mozga (eng. Donor after Brain Death – DBD) i DCD darivatelja. Rožnice se uzimaju *in situ*, isijecanjem kornoskleralnog prstena te izravnom pohranom u mediju za hipotermičku pohranu. Očne jabučice se nakon uzimanja pohranjuju u vlažnu komoru te se u Banci obrađuju i nakon isijecanja korneoskleralnog prstena pohranjuju u isti medij. Rožnice se u mediju za hipotermičku pohranjuju na temperaturi 4 °C, do maksimalno 7 dana te se tijekom pohrane evaluiraju; procjena svih slojeva rožnice na biomikroskopu, endotela rožnice na spekularnom mikroskopu i određivanje debljine rožnice. Kriterij prihvatljivosti rožnice za kliničku primjenu je gustoća endotelnih stanica  $\geq 2200$  st/mm<sup>2</sup> te promjer čiste centralne zone  $\geq 8$  mm. Rožnice koje kvalitetom zadovoljavaju uvjete za pohranu prebacuju se u kulturu tkiva te se čuvaju u mediju koji sadrži antibiotike (penicilin i streptomici) i antimikotik (amfotericin B) na temperaturi 31°C, najduže 28 dana. Sterilnost rožnice čuvane u kulturi tkiva kontrolira se tri puta uzimanjem uzorka medija u kojem se čuva. Sve mikrobiološke kontrole tkiva moraju biti sterilne prije izdavanja. Rožnica se čuva u mediju za kulturu tkiva do trenutka kada se dodjeljuje pacijentu, potom se neposredno prije izdavanje na završetku pohrane u kulturi tkivo dodatno evaluira; procjenjuje se vijabilnosti (tripansko modriilo), morfologija i gustoća endotelnih stanica koristeći invertirni svjetlosni mikroskop te se uzima druga mikrobiološka kontrola medija. Nakon čega se rožnice pohranjene u transportni medij (medij sadrži dekstran) na sobnoj temperaturi, tijekom 5 dana. Banka tkiva priprema rožnice za lamelarnu keratoplastiku (eng. Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty, DSAEK) uz korištenje mikrokeratoma Gebauer. Bjeloočnica se obrađuje nakon isijecanja rožnice i pohranjuje u 70 %-tnom etilnom alkoholu na temperaturi od 22 °C. Rok valjanosti presadaka je 12 mjeseci. Prilikom obrade tkiva, uzimaju se uzorci za mikrobiološku kontrolu tkiva koja mora biti sterilna prije izdavanja bjeloočnica. U suradnji sa Klinikom za ženke bolesti i porode KBC Zagreb, 2019. godine Banka je započela postupak obrade posteljice i proizvodnje presadaka amnijske membrane za kliničku primjenu. Amnijska membrana se pohranjuje u krioprotektivnu otopinu (50 %-tni glicerol) na temperaturi od –80°C tijekom 12 mjeseci. Mikrobiološki se testira svaka faza obrade, nalazi mikrobioloških kontrola uzoraka tkiva nakon dekontaminacije te dekontaminacijska i krioprotektivna otopina moraju biti sterilni. Prosječno se iz jedne posteljice može proizvesti 10 do 15 presadaka amnijske membrane promjera 4,7 cm (postavljene na okruglom nitroceluloznom nosaču). U sklopu Banke tkiva 2016. pokrenut je program prikupljanja glave bedrene kosti od živih darivatelja na Klinici za ortopediju KBC-a Zagreb. Glave (GBK) i spongioze (SBK) bedrene kosti su kirurški ostaci i prikupljaju se za vrijeme operacije od bolesnika kojima se ugrađuje endoproteza kuka. Prilikom samog postupka uzimanja GBK i SBK radi pohrane za alogenu primjenu aseptično se uzimaju uzorci za mikrobiološku kontrolu i patohistološku analizu koji se dostavljaju u Banku tkiva zajedno s tkivom te se po zaprimanju tkiva šalju u Klinički zavod za mikrobiologiju KBC Zagreb. Svježe zamrznuti koštani presadci GBK i SBK pohranjuju se na temperaturi od –80 °C tijekom 5 godina. Za izdavanje tkiva, svi nalazi mikrobiološkog testiranja moraju biti sterilni. Kardiovaskularno tkivo se uzima od 2011. godine od dvije vrste darivatelja; DBD i živih darivatelja (primatelji transplantata srca; recipient of heart transplant; RHT). Samo u KBC Zagreb se prikuplja tkivo RHT darivatelja, a tkivo DBD darivatelja se prikuplja putem Nacionalne transplantacijske mreže od darivatelja organa čija srca nisu pogodna za transplantaciju, a njihova mehanička funkcija je očuvana. U Banci se nakon kirurške obrade, anatomskog pregleda i mjerenja tkiva, funkcijskih testova (u slučaju srčanih zalistaka) i uzimanje kontrolnih uzoraka za mikrobiološke i patohistološke analize, tkivo se mikrobiološki dekontaminira tijekom 24–48 sata. Ukoliko je tkivo morfološki zadovoljavajuće, nakon dekontaminacije uranja se u krioprotektivnu otopinu (10% DMSO u mediju TCM199), dvostruko pakira te se kontrolirano zamrzava u uređaju za zamrzavanje prema zadanom protokolu te se pohranjuje u plinovitoj fazi tekućeg dušika (<140°C). Rok valjanosti je tkiva je 5 godina.

U razdoblju od 2016. do 2020. godine Banka tkiva je ukupno je zaprimila 3395 tkiva od 1730 darivatelja, od čega je zaprimljeno 2590 (76,2%) presadaka očnog tkiva, 730 (21,5%) GBK i SBK, te 67 (1,97%) kardiovaskularnog tkiva. Za kliničku primjenu ukupno je izdano 2097 presadaka od čega je 1594 presadka očnog tkiva (rožnica N 1546 i bjeloočnica N 48), 44 amnijske membrane, 417 koštano-mišićnog tkiva (417 (GBK N 209, SBK 208) i 43 presadka kardiovaskularnog tkiva. Najveći broj rožnica raspodjeljeno je u Kliniku za očne bolesti Kliničke bolnice Sveti Duh (N 802) i Kliničkog bolničkog centra Zagreb (N 343).



Tijekom proteklih pet godina Banka tkiva susrela se s dva velika izazova; s jedne strane ima društvenu obvezu omogućiti povećanje dostupnosti i kvalitete presađivanja tkiva, a s druge strane nedovoljno informacija o postupku darivanja tkiva, potrebama za tkivom i važnosti darivanja tkiva među cjelokupnim stanovništvom Hrvatske. Djelovanje HBTS pa tako i Banke tkiva u okviru Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC Zagreb pokazalo je brojne prednosti; prije svega medicinsko znanje specijalista transfuzijske medicine u procjeni darivatelja, praćenju sigurnosti i ishoda liječenja; poznavanje tehničkih zahtjeva i infrastrukture potrebne za obradu i čuvanje tkiva, razumijevanje postupaka proizvodnje presađivanja tkiva iz ljudskog tiva, te dugogodišnje iskustvo u području osiguranja kvalitete. Ne može se zanemariti niti znanje i iskustvo magistara molekularne biologije i prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike koji su nezamjenjivi članovi tima. To se zasigurno odrazilo na povećanje prikupljanja tkiva i dostupnosti presađivanja tkiva te kvalitetu liječenja presađivanjem tkiva. Kako bi u budućnosti ostvarili naš osnovni cilj, a to je samodostatnost na nacionalnoj razini kojom se osigurava dostupnost presađivanja tkiva svim pacijentima kojima treba liječenje transplantacijom, nužno je ne samo kontinuirano razvijati djelatnosti Banke tkiva već treba razviti društvenu svijesti o potrebama za tkivom i mogućnostima darivanja. Za aktivnosti u zajednici posebno je značajna suradnja s medijima i korištenje suvremenih komunikacijskih kanala kao što je internet i društvene mreže u cilju informiranja građana o važnosti darivanja tkiva. Potrebna je i bolja organizacija u edukaciji svih zdravstvenih djelatnika u okviru njihove trajne izobrazbe. Također je nužno uspostaviti bolji sustav kvalitete u presađivanju tkiva; ustrojiti praćenje indikatora kvalitete u prepoznavanju, realizaciji darivatelja i uzimanju tkiva, te procjeni indikacija, racionalnoj primjeni kao i u ishodima transplantacije.

## LITERATURA

1. Plan razvoja tkivnog bankarstva („Narodne novine“ broj 60/11)
2. Odluka o imenovanju nacionalnog tkiva za tkiva, Klasa: 011-02/15-01/205, Urbroj: 534-02-2-2/1-15-2, Zagreb, 28. listopada 2015.
3. Rješenje o uspostavi Hrvatske banke tkiva i stanica, Klasa: UP/I-543-02/16-02/01, Urbroj: 534-06-2/1-16-01, Zagreb, 19. veljače 2016.
4. Zakon o primjeni ljudskih tkiva i stanica („Narodne novine“ broj 144/12)
5. Pravilnik o načinu rada koordinatora u postupcima uzimanja i presađivanja dijelova tijela u svrhu liječenja („Narodne novine“ broj 51/06)
6. Pravilnik o uvjetima u pogledu prostora, stručnih radnika, medicinsko-tehničke opreme i sustava kvalitete za obavljanje djelatnosti prikupljanja, uzimanja, testiranja, obrade, očuvanja, pohrane i raspodjele ljudskih tkiva i stanica („Narodne novine“ broj 80/13)
7. Pravilnik o načinu praćenja ozbiljnih štetnih događaja i ozbiljnih štetnih reakcija u području primjene ljudskih tkiva i stanica, načinu vođenja evidencije i rokovima izvješćivanja te sadržaju i obliku tiskanice godišnjeg izvješća („Narodne novine“ broj 54/13)
8. EDQM Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application 4th Edition 2019

## OSNIVANJE PRVE BANKE JAJNIKA U SUSTAVU JAVNOG ZDRAVSTVA U HRVATSKOJ

VILAJ M.<sup>1</sup>, Bilić K.<sup>2</sup>, Popović T.<sup>1</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>, Ježek D.<sup>4,3,1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• *Zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju*

<sup>2</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

• *Medicinski fakultet*

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

• *Zavod za histologiju i embriologiju*

<sup>4</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

• *Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu*

**Uvod:** Učestalost pojavljivanja dobroćudnih i zloćudnih tumora u Hrvatskoj kod pacijenata u odrasloj kao i u mladoj, tzv. predpubertetskoj dobi, sve je veća. Radi se o bolestima koje zahtijevaju žurno i sveobuhvatno liječenje koje, ovisno o prirodi tumora, može između ostalog uključivati i kemoterapiju i/ili zračenje. Kemoterapija i zračenje mogu imati gonadotoksični učinak na spolne žlijezde što dovodi do njihovog preuranjenog zatajenja te, u konačnici, neplodnosti. Tkivo jajnika posebno je osjetljivo na agresivne tretmane liječenja tumora i nekih benignih bolesti pa očuvanje plodnosti u tih pacijentica postaje novi prioritet u reproduktivnoj medicini. Naime, kod onkoloških pacijentica kod kojih gonadotoksično liječenje mora započeti odmah kao i kod pacijentica predpubertetske dobi, jedina mogućnost očuvanja plodnosti je kriopohrana neoštećenih dijelova tkiva jajnika.

Metode kriopohrane tkiva jajnika i njegovog autolognog presađivanja uspostavljene su u brojnim reproduktivnim centrima diljem Europe (Slika 1.). Njihovom primjenom rođeno je već više od 200 djece. Upravo zbog obećavajućih rezultata, u Hrvatskoj već dulje vrijeme postoji veliki interes za uvođenje pohrane tkiva jajnika u kliničku praksu. U tu svrhu, 2020. godine osnivana je Banka reproduktivnog tkiva unutar Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC-a Zagreb. Navedena Banka za sada obuhvaća Banku sjemenika koja prikupljanja i pohranjuje tkiva sjemenika, dok su završne pripreme za Banku jajnika u tijeku.



SLIKA 1. BANKE TKIVA JAJNIKA UNUTAR EUROPSKE UNIJE I UJEDINJENOG KRALJEVSTVA; PREUZETO IZ BILIĆ I SUR., 2021.

**Metode:** Prvi korak u osnivanju Banke jajnika napravljen je 2019. godine održavanjem radionice o kriopohrani tkiva jajnika za djelatnike Hrvatske banke tkiva i stanica u KBC-u Zagreb. Radionica je u teorijskom dijelu pružila uvid u uvjete koje treba zadovoljiti za osnivanje Banke jajnika. U praktičnom dijelu radionice djelatnici su obučeni za obradu i kriopohranu tkiva jajnika.

Jedan od kritičnih postupaka u pohrani tkiva jajnika je transport tkiva od ustanove u kojoj je tkivo prikupljeno do ustanove u kojoj će biti obrađeno. Za preživljenje folikula i izbjegavanje ishemijskog oštećenja transportiranog tkiva, prijenos tkiva treba biti u kontroliranim uvjetima na temperaturi od 2°C do 8°C. U tu svrhu, validirani su spremnici za prijenos tkiva jajnika kako bi se odredilo maksimalno vrijeme trajanja transporta u različitim ambijentalnim uvjetima.

Obrada tkiva jajnika radi se unutar mikrobiološkog sigurnosnog kabineta smještenog u čistoj sobi klase B. Postupak pripreme tkiva za kontrolirano zamrzavanje uključuje odvajanje kore jajnika u kojoj su smještene folikule od srži i podjelu očišćene kore na manje dijelove. Ovaj postupak radi se na rashladnim pločama. Stoga je učinjena validacija rashladnih ploča za obradu tkiva kako bi se utvrdio vremenski okvir u kojem ploče održavaju temperaturu pogodnu za obradu tkiva.

**Rezultati:** Djelatnici su teorijski i praktično obučeni za obradu, zamrzavanje i kriopohranu tkiva jajnika.

Učinjena je validacija spremnika za transport tkiva jajnika koja je pokazala da u uvjetima sobne temperature (20–25°C) transport može trajati maksimalno 17 sati ako se u spremnik (Blueline bag volumena 10 L) smjesti rashladno tijelo (delta T TempShell, 2–8°C) hladeno 48h na 4°C.

Rezultati provedene validacije rashladnih ploča za obradu tkiva pokazuju da je rashladno tijelo koje se stavlja u rashladnu ploču dovoljno ohladiti 48h na –20°C kako bi obrada tkiva jajnika bila u optimalnim temperaturnim uvjetima.

**Zaključak:** Osnivanje Banke jajnika sa ciljem uvođenja zaštite fertiliteta u onkoloških bolesnika pohranom tkiva jajnika sve je bliže realizaciji. Kriopohrana tkiva jajnika zahtijeva specijaliziranu opremu i obučeno osoblje za pripremu, zamrzavanje te pohranjivanje kore jajnika. Do sada nabavljena oprema i kritični postupci su validi-

rani kako bi se omogućili optimalni uvjeti pripreme i pohrane tkiva. Završni koraci koju su trenutno u tijeku uključuju nabavu opreme koja nedostaje i konačnu pripremu dokumentacije za dobivanje odobrenja za rad nadležnog tijela.

## OBILJEŽJA PRVIH 112 DARIVATELJICA HRVATSKE BANKE HUMANOG MLIJEKA

NOVOSELAC J.<sup>1</sup>, Leskovar I.<sup>1</sup>, Radović N.<sup>1</sup>, Nuić M.<sup>1</sup>, Mihojević V.<sup>1</sup>, Jelečki A.<sup>1</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

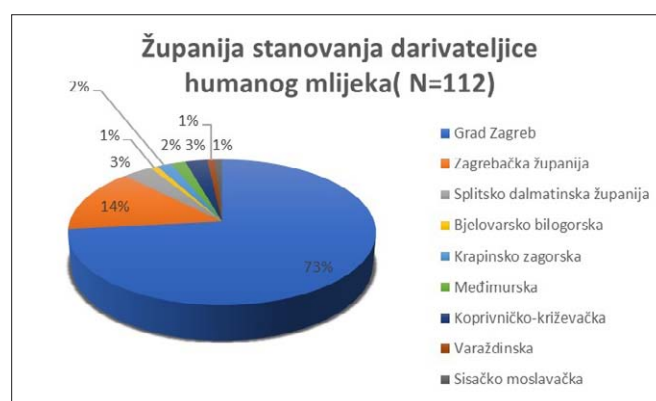
• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** Pasterizirano humano mlijeko je hrana i lijek za prijevremeno rođenu djecu. Banka humanog mlijeka (Banka) osnovana je u studenom 2019. unutar Hrvatske banke tkiva i stanica Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. S pasterizacijom mlijeka se započelo nakon dobivanja dozvole inspekcije Ministarstva zdravstva u siječnju 2020. Rad Banke počiva na dobroj volji i višku mlijeka koje daruju majke djece do navršene godine dana. Da bi postala darivateljicom humanog mlijeka (DHM), majka treba zadovoljiti opće kriterije probira i testiranja živih darivatelja tkiva, te one specifične koje se odnose na darivateljice mlijeka. Prije početka te kroz cijelo razdoblje darivanja, važno je pratiti rizike i okolnosti iz njihovih života koje mogu utjecati na kvalitetu mlijeka.

**Cilj:** Cilj istraživanja je prikazati obilježja DHM u prvoj hrvatskoj Banci humanog mlijeka s odobrenjem za rad prema Zakonu o primjeni ljudskih tkiva i stanica.

**Metode:** U ovom retrospektivnom opservacijskom istraživanju analizirali smo prikupljene podatke o prvih 112 DHM koje su završile ciklus darivanja do 1. listopada 2021. Podaci su prikupljeni iz upitnika koje ispunjavaju darivateljice te dokumentacije koju vode djelatnici Banke.

**Rezultati:** DHM su bile prvenstveno iz grada Zagreba i Zagrebačke županije, kao što prikazuje [slika 1](#). Za to područje postoji organiziran prijevoz i prikup mlijeka te vađenje krvi u domu darivateljice. Za dostavu mlijeka darivateljica iz drugih županija prijevoz je organiziran individualno i uglavnom u privatnoj organizaciji. Prosječna dob DHM je 31 godina (raspon 21–43), a mlijeko su počele darivati u prosjeku 13 tjedana nakon poroda (raspon 0 do 47), a prestale s 27 tjedana (raspon 1 do 52). Porod većine darivateljica bio je vaginalni (71%), djeca rođena iz prve trudnoće (57%). Od 112 DHM, njih 15 (13%) rodilo je djecu prije navršenih 37 tjedana gestacije. Upravo iz te skupine majki imamo dvije s najvećom ukupnom količinom darovanog mlijeka. Obje su rodile u 26 tjednu gestacije, te darovale 41,7 odnosno 25,5 L mlijeka. Od tri DHM djeca su preminula nakon poroda, po dvoje djece rođene iz blizanačke trudnoće prije termina, jedno iz jednoplodne trudnoće u terminu.



SLIKA 1.

Ukupna količina mlijeka koju je ovih 112 DHM darovalo je 933 L, što je prosječno 8,3 L (medijan 6,5 raspon 0,5– 41,7 L).

Načini na koji su majke čule za Banku su za njih 62 (55%) internetske objave odnosno društvene mreže, televizija i radio 12 (11%), rodilište 9 (8%), primarna zdravstvena služba (pedijatrija, ginekologija, patronaža) 18 (16%), prijatelji 8 (7%), nije poznato u 3 slučaja (2%).

Načini izdavanja bili su električnom izdajalicom 54 DHM (48%), mehaničkom 43 (38%) te ručno 12 (11%).

Najčešći razlog prestanka darivanja je nedostatak viška mlijeka: 64 DHM (57%), vlastitom odlukom zbog nedostatka vremena 14 (12%), zbog navršenih godinu dana starosti djeteta 12 (11%), 2 (2%) zbog ranijeg povratka na posao, organizacijski razlozi (žive izvan Zagreba, privremeno ili stalno), nemogućnost pohrane/dostave mlijeka 12 (11%), nezadovoljavajuće mikrobiološke kontrole mlijeka 3 (3%) (jedna je sama odlučila, dvjema je Banka predložila prestanak darivanja), epidemiološki razlozi 3 (3%) (obustava prikupljanja za vrijeme općeg zatvaranja u ožujku 2020. zbog SARS-CoV-2 pandemije), zbog privremenog odbijanja za vrijeme kojeg su DHM smanjile laktaciju 2 (2%).

**Zaključak:** Banka već je u prvim mjesecima rada opravdala svoje postojanje i pokazala postojanje velikog interesa majki za darivanje, kao i pedijatrijskih odjela za korištenje darovanog mlijeka.

Poznavanje načina dobivanja informacija o Banci važno je zbog daljnje promidžbene aktivnosti darivanja i unaprjeđenja rada.

Banka djeluje kao nacionalna banka i izdaje mlijeko u sve hrvatske bolnice. Međutim mlijeko prikuplja većinom u Zagrebu. Nadamo se da će se u budućnosti to promijeniti te da će svaka majka sa viškom vlastitog mlijeka u Hrvatskoj biti u mogućnosti ga darivati.



## Simpozij 9 – Transfuzijsko liječenje

### PATIENT BLOOD MANAGEMENT MIT ILI STVARNOST

TOMIĆ MAHEČIĆ T.<sup>1</sup>, Karmelić D.<sup>1</sup>, Bračun L.<sup>1</sup>, Lojna K.<sup>1</sup>, Šitum I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KBC Zagreb

• Klinika za anesteziologiju reanimatologiju i intenzivno liječenje

#### PBM definicija

Patient Blood Management (PBM) je opće prihvaćen internacionalni pojam bez zadovoljavajućeg prijevoda na hrvatski jezik. „Upravljanje krvlju pacijenta“, ili „Suvremena perioperativna skrb“ su nedovoljno adekvatni termini za razumijevanje koncepta. PBM je skup postupaka, utemeljenih na znanstvenim dokazima, za optimiziranje ishoda bolesnika, kod medicinskih i kirurških procedura, koji uključuju dobro planiranje i kliničke intervencije za očuvanje bolesnikove vlastite krvi. (1) Ovaj koncept ima za cilj, kroz multidisciplinarnu koordiniranu skrb za svakog bolesnika, otkriti i liječiti anemiju, minimalizirati rizik od gubitka i potrebu za nadoknadom krvi. Recentni znanstveni dokazi pokazuju kako PBM značajno poboljšava ishode i sigurnost bolesnika uz smanjenje troškova liječenja i duljinu boravka u bolnici. (2) Unatoč ogromnom potencijalu za poboljšanje zdravstvenih sustava (3), rezoluciji 63.12 Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2010. kojom se podržava PBM kao koncept, te objavljivanja jednog od strateških ciljeva „Okvira djelovanja WHO-a za krvne pripravke 2020.–2023.“ u veljači 2020. koji poziva na „učinkovitu provedbu PBM-a“ (4), PBM još nije široko prihvaćen.

#### PBM kao mit?

Kako objasniti sve poteškoće kod implementacije PBM unatoč svim znanstvenim dokazima? Govorimo li ovdje o mitu? PBM i mitovi imaju doista zajedničkih crta: širenje i implementacija ideje PBMa/ ključna društvena, vjerska i kulturna uloga mita potiče njegovo širenje; međukulturalnost ideje PBM-a/ situacije u koje junaci ulaze s drugim likovima zapravo svojom stereotipnošću nadilaze granice pojedinih kultura; dokazi / znamo kako znanost nije neosjetljiva na mitsko mišljenje (op.a. Edip). Slikovito, PBM je daleko od mita osim iz kuta onoga tko implementira koncept u zajednicu sa ustaljenim navikama, iz osobnog iskustva mogu reći kako je to angažman jednog Sizifa. S istom ustrajnošću ali sa modificiranim završetkom.

#### PBM kao stvarnost?

Od prve uporabe termina PBM, kada je australski hematolog James Isbister shvatio kako fokus transfuzijske medicine treba preorijentirati s krvnih proizvoda na pacijente (5), danas, uz osiguranje sigurnosti i kvalitete krvi i njenih komponenti, se orijentiramo prema širem konceptu, holističkoj i multidisciplinarnoj skrbi za svakog pacijenta. Individualizirano transfuzijsko liječenje i farmakoterapija, nisu ograničeni samo na perioperativni period, nego se mogu primijeniti na sve terapijske mjere i discipline gdje je gubitak krvi moguć i gdje su krvni derivati dio osnovnog liječenja (6).

PBM primarno prepoznaje pacijente s potencijalnim rizikom za transfuziju i optimizira ih kako bi se reducirao rizik anemije i alogene transfuzije.

#### PBM u perioperacijskom periodu

U razvijenim zemljama 5% resursa za zdravstvo troši se na transfuzijsko liječenje i liječenje komplikacija transfuzije, što ga svrstava među skuplje terapije u medicini općenito.

Kod elektivnih operacija, 94% svih transfuzija koncentrata eritrocita (KE) se može predvidjeti analiziranjem 3 parametra:

- preoperativne razine hemoglobina (Hb),
- mogućeg gubitka krvi zbog prirode zahvata te
- vrijednosti Hb koji je prag za transfuziju. (7)

Transfuzija krvi je terapijska mjera koja u dobroj indikaciji spašava život, ali većina novih retrospektivnih analiza i studija povezuje nekritičnu primjenu krvnih derivata s povećanom učestalošću perioperativnih komplikacija (8), kao povećani rizik za srčani udar, alergijske i imunološke transfuzijske reakcije, infekcije, TACO (sa



transfuzijom povezano cirkulatorno preopterećenje), TRALI (sa transfuzijom povezana akutna ozljeda pluća) i transfuzijom povezana imunomodulacija (TRIM). (9)

### Tri temeljna stupa PBM-a

1. preoperativna optimalizacija volumena eritrocita
2. redukcija uzorkovanja krvi i intraoperativnog gubitka krvi
3. povećanje individualne tolerancije na anemiju te standardizacija pragova za transfuzijsko liječenje.

#### 1. stup – optimalizacija volumena eritrocita

Prevalencija anemije ( $Hb \leq 130$  g/L) u populaciji je više od 30 % te ima značajne medicinske i ekonomske posljedice. Preoperativna anemija kod bolesnika u većini slučajeva je blage do umjerene težine, a ovisi o dobi bolesnika, osnovnoj bolesti te planiranom kirurškom zahvatu. (10) Prisutnost preoperativne anemije negativno utječe na ishod pacijenta bez obzira na ostale pridružene bolesti, te ju je važno rano dijagnosticirati. Najčešći uzroci preoperativne anemije su nedostatak željeza i anemija kronične bolesti, što nutritivnim i farmakološkim mjerama kojima potičemo eritropoezu, možemo korigirati, te bi kirurški zahvat trebalo odgoditi kada je god to moguće do optimalizacije bolesnika. (11,12)

Anemični bolesnici koji idu na kirurški zahvat kod kojih se očekuje gubitak krvi veći od 500 ml, odnosno procijenjena mogućnost transfuzije KE veća od 10%, upućuju se u ambulantu za perioperativnu optimalizaciju bolesnika, što ranije, a najmanje 3 do 4 tjedna prije planiranog zahvata. Svaku postojeću anemiju bi trebalo korigirati, čak i ukoliko je vezana direktno uz razlog za kirurški zahvat.

U svakodnevnoj praksi preoperativna anemija se ponekad ignorira i planirane operacije se nastavljaju bez ikakvih korektivnih terapijskih mjera, jednako tako se anemične pacijente nedovoljno informira prije operacije o povećanom riziku kirurškog i anesteziološkog postupka te o dijagnostičkim i terapijskim mogućnostima.

#### 2. stup – kontrola gubitka krvi

Perioperativni gubitak krvi je neovisni rizični čimbenik za povećani morbiditet i mortalitet, ovisno o vremenu trajanja krvarenja i brzini gubitka krvi te je imperativ zaustaviti krvarenje što prije kako bi se spriječio svaki daljnji gubitak krvi (1,13).

U operacijskoj sali kod elektivnih kirurških bolesnika, možemo utjecati na veliki dio čimbenika koji značajno smanjuju rizik krvarenja. Preoperativno planiranje kirurške intervencije, odabir kirurškog pristupa, moderne tehnike kao minimalno invazivna kirurgija te intraoperativno korištenje modernih uređaja, korištenje fibrinskog ljepila te drugih suvremenih hemostatika lako se implementiraju u svakodnevnu praksu.

Profilaktička primjena antifibrinolitika dovodi do smanjenja perioperativnog gubitka krvi i do smanjenja potreba za transfuzijom. Traneksamična kiselina se danas rutinski primjenjuje u kardijalnoj i transplantacijskoj kirurgiji te kod velikih vaskularnih zahvata i u poli-traumatiziranih bolesnika. (14) U profilaktičkim dozama nuspojave su vrlo rijetke.

Dvojna antitrombotična terapija, koja se danas često koristi kao i novi antitrombotici povećavaju rizik perioperativnih krvarenja pa ih je važno pravovremeno preoperativno dokinuti.

Nužno je posebnu pozornost posvetiti održavanju normotermije, acido-bazne ravnoteže, normokalcemije te stabilne cirkulacije intraoperativno. Kratkotrajna provokacija višim tlakovima prije kirurškog zatvaranja rane služi kako bi se evidentirala mjesta potencijalnih krvarenja.

Korištenje uređaja za intraoperativno sakupljanje krvi te retransfuziju dodatno smanjuje potrebu za alogeničnim transfuzijama. Ponovnu transfuziju intraoperativno skupljene krvi ograničava činjenica da se značajno gube faktori zgrušavanja krvi i trombociti. Stabiliziranje koagulacijske neravnoteže je ponekad uz dostupne analitičke metode vrlo zahtjevan posao. Uređaji uz bolesnika, odnosno POC (point-of-care) uređaji (kao npr ROTEM) omogućuju analizu viskoelastičnih svojstava krvi, uključujući i fibrinolitički kapacitet. Korištenjem tih uređaja zajedno s adekvatnim perioperacijskim planiranjem i procjenom rizika krvarenja u konačnici se značajno reducira primjena krvnih pripravaka.

Kod masivnih krvarenja, ukoliko je gubitak značajan te iznosi više od 50% ukupnog volumena krvi, situaciju dodatno pogoršava agresivna terapija tekućinama koja uzrokuje dilucijsku koagulopatiju te posljedično može dovesti do multiorganskog zatajenja, uz hitnu kiruršku hemostazu nužna je rana primjena koagulacijskih faktora. (13)

### 3. stup-optimalizacija tolerancije na anemiju

Pad u vrijednostima hemoglobina u krvi ima za posljedicu smanjeni transportni kapacitet kisika i smanjenu dostavu kisika na periferiji. To dodatno opterećuje kardiovaskularni sistem i koronarnu opskrbu. Preoperativno je važno adekvatno i na vrijeme prevenirati kardijalne rizične faktore. Posebna se pozornost mora posvetiti i plućnoj funkciji te se bolesnik može preoperativno oksigenirati u svrhu poboljšanja tkivne oksigenacije i bolje tolerancije na anemiju. (15)

Kako je primarni cilj transfuzijskog liječenja poboljšanje transportnog kapaciteta za kisik i posljedično porast tkivne i sistemske dostupnosti kisika, uz dobar perioperativni monitoring možemo u elektivnih bolesnika primjenjivati restriktivnije pragove za transfuzijsko liječenje.

Posebna se pozornost posvećuje i antibiotskoj profilaksi te pravovremenom liječenju infekcija.

Po današnjim spoznajama, odluka o transfuzijskom liječenju mora biti kombinirana procjena kliničkih parametara i procjena promjena tkivne oksigenacije. (16) Nužno je izbjegavati bespotrebne transfuzije te standardizirati i unaprijediti transfuzijsku praksu.

#### PBM u Hrvatskoj

Najčešće veliki projekti, kao što je implementacija PBMa počinju kao manji pilot projekti, lakše ostvarivi, sa ciljem kako bi poboljšani ishod bolesnika i ostvarene uštede dodatno motivirali timove za konkretnije i opsežnije formalne projekte. (17)

Kako bi bila uspješna implementacija programa PBM na nivou bolnice, potrebna je multidisciplinarna suradnja i podrška bolničkog vodstva. PBM može rezultirati uštedom troškova u cijeloj bolnici, jer se očekuje da će PBM smanjiti dugoročne zdravstvene troškove kroz manje izravne izdatke, smanjenje komplikacija i kraće vrijeme hospitalizacije ali potrebna je i svijest o početnim troškovima implementacije PBMa. (18) Kako bi se koncept učinio primjenjivim i sveobuhvatnim, treba započeti s lakše ostvarivim ciljevima kao što su povećanje svijesti o PBM-u, multidisciplinarna suradnja (specijalisti transfuzijske medicine, kirurzi, anesteziolozi, hematolozi i intenzivisti), minimaliziranje perioperacijskog gubitka krvi, racionaliziranje upotrebe krvi i krvnih derivata, te, što je najvažnije, stalno educiranje kliničara. Na KBC Zagreb uspješno smo ostvarili i dio težih ciljeva; poboljšali smo protokole za masivnu transfuziju, primjenjujemo restriktivne kriterije transfuzije, primjenjujemo strategije transfuzije s jednom dozom KE i ažurirali smo maksimalne količine naručene krvi po pojedinom kirurškom zahvatu.

Nekoliko je područja još uvijek potrebno unaprijediti. Prvi je nedostatak baze podataka odnosno adekvatne evidencije PBMa za sustavno prikupljanje i evaluaciju podataka. Drugi veliki problem u Hrvatskoj je što je krv "besplatna" (prikupljanje, testiranje i čuvanje krvi imaju svoju cijenu) za bolničke ustanove te su ostali troškovi i intervencije (na primjer terapija željezom) dodatno financijsko opterećenje. Druga prepreka u liječenju anemije najčešće je kratak vremenski okvir za preoperativnu procjenu anemije kod pacijenata za elektivne kirurške zahvate, te pritisak da se operacija ne odgodi. Ambulanta za perioperacijsku optimalizaciju bolesnika, zbog nedostatka anesteziologa u pandemijskim vremenima, zasad omogućava ispravljanje preoperativne anemije barem jednom dijelu bolesnika.

S poboljšanjem epidemiološke situacije i novim EU projektima na temu PBMa, cilj je za KBC Zagreb razviti se kao „centar izvrsnosti“ za PBM.

#### Zaključak

U vremenu pandemije i vremenu smanjenog proizvodnog učinka, osim na balans ponude i potražnje krvi i krvnih derivata treba misliti i na sigurnost krvnih derivata, odnosno mogući prijenos virusa putem darovane krvi. Dio populacije će biti zaražen SARS-CoV-2, a asimptomatski. U nedostatku ispitivanja nukleinskih kiselina (NAT) davatelja krvi na SARS-CoV-2, ne možemo isključiti, iako u ovom trenutku teoretski, mogući prijenos transfuzijom krvi. Stoga se suočavamo sa značajnim nepoznanicama, a samo će buduće studije razjasniti stvarne rizike od SARS-CoV-2 koji se prenosi transfuzijom, ako ih ima (19–21). Kao potporu konceptu Europska komisija izdala je smjernice za izradu nacionalnih programa „Building national programmes of Patient Blood Management in the EU“. Odgađanje implementacije PBM znači da zdravstveni sustavi odustaju od uštede makroekonomskih razmjera na razini cijelog sustava. (22) To je alarmantnije u zemljama s ozbiljnim ograničenjima resursa. Zbog velike heterogenosti u EU, usporedba strategija implementacije PBMa u zemljama s niskim, srednjim i visokim BDPom trebala poticati međusobno učenje i razmjenjivati inovativne strategije u samoj implementaciji (23). PBM je svakako „novo normalno“, naša realnost, jučer, danas i sutra.

## LITERATURA

1. Shander A, Van Aken H, Colomina MJ, Gombotz H, Hofmann A, Krauspe R i sur. Patient blood management in Europe. *Br J Anaesth.* 2012 Jul;109(1):55–68. doi: 10.1093/bja/aes139.
2. Althoff FC, Neb H, Herrmann E, Trentino KM i sur. Multimodal Patient Blood Management Program Based on a Three-pillar Strategy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg.* 2019 May;269(5):794–804. doi: 10.1097/SLA.0000000000003095.
3. Kleinerüschkamp A, Meybohm P, Straub N, Zacharowski K, Choorapoikayil S. A model-based cost-effectiveness analysis of Patient Blood Management. *Blood Transfus.* 2019 Jan;17(1):16–26. Doi: 10.2450/2018.0213-17.
4. World Health Organization. WHO Action framework to advance universal access to safe, effective and quality assured blood products. 2020–2023. 2020. p. 48.
5. Isbister JP. Clinicians as gatekeepers: what is the best route to optimal blood use? *Dev Biol (Basel).* 2007;127:9–14.
6. Desai N, Schofield N, Richards T. Perioperative Patient Blood Management to Improve Outcomes. *Anesth Analg.* 2018 Nov;127(5):1211–1220. Doi: 10.1213/ANE.0000000000002549.
7. Gombotz H, Rehak PH, Shander A, Hofmann A. Blood use in elective surgery: the Austrian benchmark study. *Transfusion.* 2007 Aug;47(8):1468–80. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01286.x.
8. Meier J, Kozek-Langenecker S, Filipescu D, Pitarch JVL, Mallett S, Martus P i sur. ESA clinical trials network 2012: ETPOS--European transfusion practice and outcome study. *Eur J Anaesthesiol.* 2013;30(5):199–201. doi: 10.1097/EJA.0b013e32835f0052.
9. Isbister JP, Shander A, Spahn DR, Erhard J, Farmer SL, Hofmann A. Adverse blood transfusion outcomes: establishing causation. *Transfus Med Rev.* 2011;25(2):89–101. doi: 10.1016/j.tmr.2010.11.001.
10. Krishnasivam D, Trentino KM, Burrows S, Farmer SL, Picardo S, Leahy MF i sur. Anemia in hospitalized patients: an overlooked risk in medical care. *Transfusion.* 2018;58(11):2522–2528. doi: 10.1111/trf.14877.
11. Piednoir P, Allou N, Driss F i sur. Preoperative iron deficiency increases transfusion requirements and fatigue in cardiac surgery patients: a prospective observational study. *Eur J Anaesthesiol.* 2011;28:796–801.
12. Miles LF, Kunz SA, Na LH i sur. Postoperative outcomes following cardiac surgery in non-anaemic iron-replete and iron-deficient patients—an exploratory study. *Anaesthesia.* 2018;73:450–458.
13. Kozek-Langenecker SA, Ahmed AB, Afshari A, Albaladejo P, Aldecoa C, Barauskas G i sur. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European society of anaesthesiology: first update 2016. *Eur J Anaesthesiol.* 2017;34(6):332–395. doi: 10.1097/EJA.0000000000000630.
14. Ker K, Edwards P, Perel P i sur. Effect of tranexamic acid on surgical bleeding: systematic review and cumulative meta-analysis. *BMJ.* 2012;344:e3054.
15. Meier J, Gombotz H. Pillar III--optimisation of anaemia tolerance. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2013 Mar;27(1):111–9. doi: 10.1016/j.bpa.2013.02.005.
16. Tomic Mahecic T, Dünser M, Meier J. RBC Transfusion Triggers: Is There Anything New? *Transfus Med Hemother.* 2020 Oct;47(5):361–368. doi: 10.1159/000511229. Epub 2020 Sep 24.
17. Gombotz H, Hofmann A, Norgaard A, Kastner P. Supporting patient blood management (PBM) in the EU – a practical Implementation guide for hospitals. Luxembourg: European Commission – Directorate-General for Health and Food Safety; 2017. p. 67.
18. Hofmann A, Norgaard A, Kurz J, Choorapoikayi S, Meybohm P, Zacharowski K i sur. Building national programmes of Patient Blood Management (PBM) in the EU. A guide for health authorities. Luxembourg: European Commission; 2017. p. 87.
19. Shander A, Goobie SM, Warner MA, Aapro M, Bisbe E, Perez-Calatayud AA i sur.; International Foundation of Patient Blood Management (IFPBM) and Society for the Advancement of Blood Management (SABM) Work Group. Essential Role of Patient Blood Management in a Pandemic: A Call for Action. *Anesth Analg.* 2020 Jul;131(1):74–85. doi: 10.1213/ANE.0000000000004844.
20. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: coronaviruses and blood safety. *Transfus Med Rev.* 2020;S0887–7963(20)30014–30016.
21. AABB Interorganizational Task Force on Domestic Disasters and Acts of Terrorism. Statement on Coronavirus and Blood Donation. AABB (Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide). Available at: [www.aabb.org/advocacy/regulatorygovernment/Pages/Statement-on-Coronavirus-and-Blood-Donation.aspx](http://www.aabb.org/advocacy/regulatorygovernment/Pages/Statement-on-Coronavirus-and-Blood-Donation.aspx). Accessed March 23, 2020.
22. Spahn DR. Patient Blood Management: What Else? *Ann Surg.* 2019 May;269(5):805–807. doi: 10.1097/SLA.0000000000003186.
23. Hofmann A, Spahn DR, Holtorf AP; PBM Implementation Group. Making patient blood management the new norm(al) as experienced by implementors in diverse countries. *BMC Health Serv Res.* 2021 Jul 2;21(1):634. doi: 10.1186/s12913-021-06484-3.

## EVALUATION OF PLATELET COUNT AND PLATELET FUNCTION ANALYZER – 100 TESTING FOR PREDICTION OF PLATELET TRANSFUSION FOLLOWING CORONARY BYPASS SURGERY

BOGDANIĆ D.<sup>1</sup>, Bogdanić N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University Hospital Center Split  
• Department of Transfusion Medicine

<sup>2</sup> University Hospital for Infectious Diseases “Dr Fran Mihaljević”  
• Department of Infectious Diseases

**Background:** Platelet transfusions are commonly administered to treat bleeding in cardiac surgery. The platelet count following administration of PLT units is the standard method for assessing effectiveness of PLT transfusion therapy. It is difficult to use standard methods for assessing the effectiveness of PLT transfusions in cardiac surgery patients due to the complexity of hemostasis disorders, heparinization, hemodilution, and residual effect of antiplatelet therapy.

**The aim of this study** was to compare platelet (PLT) count and values of collagen adenosine diphosphate closure time (cADP-CT) measured by Platelet Function Analyzer (PFA) for prediction of PLT transfusion therapy following coronary bypass surgery.

**Materials and methods:** For this prospective observational study, 66 patients scheduled for coronary artery bypass grafting (CABG) who received early PLT transfusions (within 60 minute after operation) were enrolled. To assess changes in platelets, count and function, two time points were selected: 15 minutes (min) before and 30 – 60 min after end of PLT transfusion. The patients were divided into transfused and non-transfused with further PLT in the 48 h postoperatively.

We used the receiver operating characteristics (ROC) curve to investigate whether the PLT count and cADP-CT values were predictors of PLT transfusion.

**Results:** Out of 80 cardiac surgery patients, 8 patients were excluded due to the insufficient blood sample for PFA-100 testing and 6 patients due to re-operation for postoperative bleeding. The majority of patients were men (83%), the median age was 67 years, and high percentage of patients had a history of hypertension (74%) and hyperlipidemia (62%). Blood loss postoperatively was 470 (range 100–1860) mL/24 h and 265 (range 45–1000) mL/25–48 h. Of the 66 patients, 15 (23%) received FFP, 23 (35%) PLT, and 28 (42%) received two or more RBC units in the first 48 hours of the postoperative period. The positive predictive values (PPV) of PLT count and cADP-CT after PLT transfusion for further PLT transfusion were 33% and 86% respectively, with a PLT count threshold of  $\leq 200 \times 10^9/L$  and cADP-CT threshold of  $\geq 118$  s. The comparison among the ROC curves showed statistical difference ( $p=0.0002$ ). In multiple regression analysis cADP-CT was the strongest predictor for number of PLT transfusion doses in the 48 h postoperatively.

**Discussion/Conclusion:** In CABG patients, the results of cADP-CT after PLT transfusion have a better predictive capacity for further PLT transfusions than the PLT count. We concluded that the incorporation of cADP-CT into transfusion algorithms in CABG patients would be useful to guide PLT transfusions. This test can be used to set the indications for PLT transfusions, to assess the effectiveness of PLT transfusions therapy and to estimate the number of PLT transfusions doses with respect to the values of cADP-CT before PLT transfusion.

## KRETANJE UČESTALOSTI ODGOĐENIH SEROLOŠKIH I ODGOĐENIH HEMOLITIČKIH TRANSFUZIJSKIH REAKCIJA U PROŠLOM DESETLJEĆU

MAJČEN K.<sup>1</sup>, Bojanić I.<sup>2</sup>, Lukić M.<sup>2</sup>, Plenković F.<sup>2</sup>, Raos M.<sup>2</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>OB "Dr. Ivo Pedišić"

• Odjel za transfuzijsku medicinu

<sup>2</sup>Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

**Uvod:** Odgođena serološka ili odgođena hemolitička transfuzijska reakcija (engl. delayed serologic transfusion reaction – DSTR i delayed hemolytic transfusion reaction – DHTR) posljedica su sekundarnog imunogenog odgovora kod osoba koje su ranije imunizirane na eritrocitne antigene a u vrijeme prijetransfuzijskog ispitivanja razina protutijela u krvi bolesnika je ispod praga osjetljivosti testa. Javljaju se 24 sata do 28 dana nakon transfuzije.

**Cilj:** Cilj rada je bio utvrditi kretanje učestalosti DSTR i DHTR u desetogodišnjem razdoblju u populaciji bolesnika liječenih koncentratima eritrocita u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (KBC Zagreb).

**Metode:** U ovom istraživanju za DSTR i DHTR korištene su definicije:

DSTR je definirana razvojem novih, klinički značajnih antieritrocitnih protutijela u roku 24 sata do 28 dana nakon transfuzije, bez pojave kliničkih simptoma ili laboratorijskih znakova hemolize u primatelja.

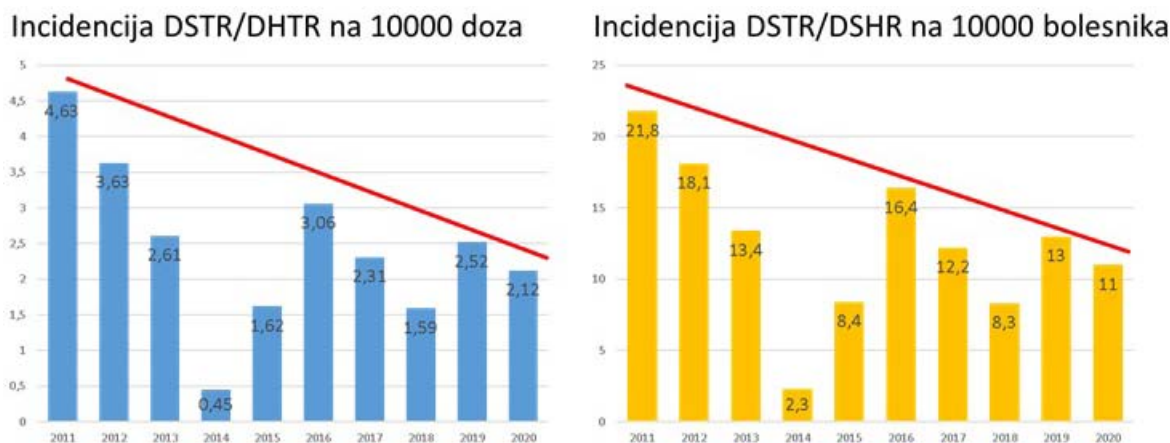
DHTR je definirana razvojem novih, klinički značajnih antieritrocitnih protutijela u roku 24 sata do 28 dana nakon transfuzije s kliničkim simptomima i/ili laboratorijskim znakovima hemolize

Radi prikupljanja podataka o DSTR/DHTR retrospektivno je analizirana informatička baza transfuzijskih reakcija u KBC Zagreb za razdoblje od 1. siječnja 2011. do 31. prosinca 2020. Ukoliko su bili potrebni, dodatni klinički podaci prikupljeni su iz bolničkog informacijskog sustava (BIS). Prikupljeni su podaci o dobi, spolu, dijagnozi, prethodnom transfuzijskom liječenju, ranijim imunizacijama, laboratorijskim znakovima hemolize (hemoglobin, broj retikulocita, LDH, bilirubin, haptoglobin), imunohematološkom testiranju (otkrivanje antieritrocitnih protutijela u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT), direktni antiglobulinski test (DAT), specifičnost aloprotutijela u krvi i eluatu), vremensko razdoblje koji je protekao od zadnje transfuzije do razvoja DSTR ili DHTR. U svakog bolesnika uspoređeni su imunohematološki nalazi prije i nakon transfuzijskog liječenja.

Iz analize su isključeni bolesnici koji su transfuzijski liječeni u drugim ustanovama, a DSTR/DHTR su otkrivene u KBC Zagreb.

**Rezultati:** U desetogodišnjem razdoblju 60 bolesnika je imalo DSTR/DHTR: 48 DSTR i 12 DHTR (omjer 4:1). U trenutku dijagnoze DSTR/DHTR u njihovoj krvi je otkriveno 70 antieritrocitnih protutijela od kojih je DSTR uzrokovalo 55 protutijela, a DHTR 14. Omjer DHTR i DSTR bio je 1:4.

Za desetogodišnje razdoblje incidencija DSTR/DHTR na 10.000 transfundiranih doza bila je 2,47. Najviša je na internističkim odjelima 2,93, a slijede kirurški 2,3 i ginekološki 2,2 dok na pedijatrijskim odjelima nije zabilježena niti jedna DSTR/DHTR. Kretanje incidencija na 10.000 transfundiranih doza i 10.000 transfundiranih bolesnika prikazana je na slici 1.



SLIKA 1. KRETANJE DSTR/DHTR U RAZDOBLJU 2011.–2020.



Specifičnosti antieritrocitnih protutijela koja su uzrokovala DSTR i DHTR prikazane su u **Tablici 1**. Anti-E protutijelo je najčešće uzrokovalo DSTR, anti-Jka DHTR. Anti-E je identificirano u ukupno 21 slučaj, od toga 19 slučajeva DSTR (19/48=39,50%) i 2 DHTR (2/12=16,6%). Anti-K je nađen u 18 slučajeva (17 DSTR-14/48=35,41% i 1 DHTR-1/12= 8,33%). Anti-Jka je identificiran u ukupno 16 slučajeva (8 DHTR-8/12=66,66% i 8 DSTR-8/48=16,66%).

**Zaključak:** Incidencija DSTR i DHTR u našoj ustanovi je u padu. Razlog tome je uvođenje osjetljivijih tehnika i automatizacije u prijetransfuzijsko ispitivanje kao i uvođenje profilaktične antigene podudarnosti (engl. *Prophylactic antigen match* – PAM) za skupine bolesnika kronično ovisnih o transfuzijama.

Najveća incidencija DSTR/DHTR je u internističkih bolesnika što ne čudi jer su oni češće ovisni o transfuzijama pa je rizik imunizacije veći. S druge strane zbog osnovne bolesti ili liječenja mogu imati smanjenu količinu protutijela što može biti razlogom nemogućnosti otkrivanja antieritrocitnih protutijela u prijetransfuzijskom ispitivanju. Važno je kritički razmotriti svaku indikaciju za transfuzijsko liječenje jer i kod negativnog IAT-a i podudarnih križnih reakcija postoji mogućnost razvoja DSTR ili DHTR.

TABLICA 1. SPECIFIČNOST ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA PREMA VRSTI REAKCIJE

Specifičnost	DSTR		DHTR	
	serum	eluat	serum	eluat
E	19	16	2	1
K	17	16	1	1
Jka	8	6	8	7
c	3	2	1	1
Jkb	0	0	1	0
Fyb	2	2	0	0
C	2	2	0	0
Fya	2	2	0	0
e	1	1	0	0
D	1	1	0	0

## INDIKACIJE I UČINKOVITOST LIJEČENJA HOSPITALIZIRANIH HEMATOLOŠKIH BOLESNIKA KONCENTRATIMA TROMBOCITA

LIKER M.<sup>1</sup>, Bašić Kinda S.<sup>2</sup>, Mikulić M.<sup>2</sup>, Rončević P.<sup>2</sup>, Boban A.<sup>2</sup>, Raos M.<sup>1</sup>, Duraković N.<sup>2</sup>, Bojanić I.<sup>1</sup>, Aurer I.<sup>2</sup>, Golubić Čepulić B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

<sup>2</sup> Klinički bolnički centar Zagreb

• Zavod za hematologiju

**Uvod:** Bolesnicima sa trombocitopenijom induciranom kemoterapijom transfuzije koncentrata trombocita (KT) primjenjuju se sa ciljem liječenja ili prevencije krvarenja. Prevencija krvarenja provodi se u bolesnika sa izrazito niskim brojem trombocita i prije invazivnih zahvata radi povećanog rizika krvarenja. KT primjenjuju se u prevenciji krvarenja ako je broj trombocita manji od  $10 \times 10^9/l$  odnosno  $20 \times 10^9/l$  ukoliko bolesnici imaju dodatne rizike za krvarenje (npr. infekcija, temperatura, koagulacijski poremećaji). Prije invazivnih zahvata kod trombocitopeničnih bolesnika minimalni broj trombocita ovisi o tome koliki rizik za krvarenje ima svaki pojedini zahvat.

Učinkovitost transfundiranih KT procjenjuje se izračunom porasta broja trombocita (eng. count increment, CI), korigiranog porasta broja trombocita (eng. corrected count increment, CCI) i međutransfuzijskim razmakom (eng. intertransfusion interval, ITI). Ukoliko je CCI nakon 1 sat  $\geq 7,5 \times 10^9/l$  ili nakon 24 sata  $\geq 4,5 \times 10^9/l$  smatra se da učinak transfuzije KT zadovoljavajući.

**Cilj:** Analizirati indikacije i pragove za transfuzije KT, usporediti CI i CCI nakon transfuzije 1 i 2 pool-a KT te kod različitih skupina hematoloških bolesnika: bolesnici koji su primali samo kemoterapiju, autotransplantirani i alotransplantirani.

**Metode:** Prospektivno su analizirane sve transfuzije KT na Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb od 14.02. do 14.04.2020. Bolesnicima je određivan broj trombocita 1 sat i 16–24 sata nakon transfuzije. Za izračun korištene su slijedeće formule:

CI = broj trombocita nakon transfuzije – broj trombocita prije transfuzije

CCI = broj trombocita nakon transfuzije – broj trombocita prije transfuzije x  $PT(m^2) /$  broj transfundiranih trombocita ( $10^{11}$ ),  $PT(m^2) = \sqrt{\text{visina (cm)} \times \text{težina (kg)} / 3600}$  (Mosteller formula)

ITI = broj dana do slijedeće transfuzije KT

Za izračun broja trombocita uzete su srednje vrijednosti dobivene mjerenjem u Odjelu kontrole kvalitete Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu za 2019. god., a koje za KT dobivene iz pune krvi (1 pool – 4 doze) iznosi  $3 \times 10^{11}$ , a za KT dobivene aferezom  $6 \times 10^{10}$ /dozi. Svi transfundirani KT bili su ozračeni u HZTM neposredno prije izdavanja.

**Rezultati:** U studiju je uključeno 64 bolesnika: 28 (43,7%) žena i 36 (56,3%) muškaraca, u dobi od 20 do 78 god (medijan 59 god). Inicijalno su bila uključena još tri bolesnika ali su zbog razvoja refraktornosti na transfuzije KT izuzeti iz studije. Bolesnici su dobili 277 transfuzije KT: 43 (15,5%) transfuzije KT dobivenih aferezom i 234 (84,5%) transfuzije KT dobivenih iz pune krvi. Od svih zahtjeva za transfuzije KT 172 (62,1%) je bilo na 1 pripravak (4 doze), a 105 (37,9%) na 2 pripravka (8 doza) KT. Indikacije za transfuzije su bile: 246 (88,8%) prevencija krvarenja zbog niskog broja trombocita 16 (5,8%) krvarenje, 15 (5,4%) prevencija prije zahvata. Pragovi za transfuzijsko liječenje bili su: u rasponu broja trombocita od  $0-9 \times 10^9$  33 (11,9%),  $10-19 \times 10^9$  131 (47,3%),  $20-29 \times 10^9$  52 (18,8%) i  $30-109 \times 10^9$  61 (22,0%) transfuzija. CI, CCI i ITI nakon transfuzije 1 i 2 pool-a KT prikazani su u tablici 1. Broj transfundiranih KT i CCI kod različitih skupina hematoloških bolesnika prikazani su u tablici 2.

TABLICA 1. UČINKOVITOST LIJEČENJA NAKON PRIMJENE 1 I 2 POOL-A KT

	1 pool			2 pool		
	Transfuzija (N)	mean $\pm$ SD	median (min-max)	Transfuzija (N)	mean $\pm$ SD	median (min-max)
CI nakon 1 sata	126	26,1 $\pm$ 15,9	23,0 (2,0 – 90,0)	47	50,5 $\pm$ 25,1	44,0 (–1 – 98,0)
CI nakon 24 sata	133	16,6 $\pm$ 14,2	14,0 (–6 – 96)	57	30,3 $\pm$ 21,3	28,0 (–9,0 – 94)
CCI nakon 1 sata	126	16,7 $\pm$ 9,6	15,3 (1,2 – 53,9)	47	16,9 $\pm$ 9,3	14,8 (–0,3 – 52,9)
CCI nakon 24 sata	133	10,5 $\pm$ 8,9	8,7 (–3,7 – 62,1)	57	9,3 $\pm$ 6,5	8,3 (–3,1 – 28,7)
ITI	109	2,2 $\pm$ 1,2	2,0 (0,0 – 7,0)	47	2,3 $\pm$ 1,6	2,0 (0,0 – 8,0)

TABLICA 2. BROJ TRANSFUNDIRANIH KT I CCI U RAZLIČITIH SKUPINA HEMATOLOŠKIH BOLESNIKA

Skupina bolesnika	Bolesnika (N)	KT/Bolesnik (N)	CCI nakon 1 sat						CCI nakon 24 sata					
			average $\times 10^9/l$	< $7.5 \times 10^9/l$		> $7.5 \times 10^9/l$		Ukupno transfuzija (N)	average $\times 10^9/l$	< $7.5 \times 10^9/l$		> $7.5 \times 10^9/l$		Ukupno transfuzija (N)
				Transfuzija		Transfuzija				Transfuzija		Transfuzija		
				N	%	N	%			N	%	N	%	
Autotransplantacija	15	3,3	16,1 $\pm$ 9,3	3	10,7	25	89,3	28	11,5 $\pm$ 8,2	4	14,8	23	85,2	27
Kemoterapija	22	5,0	15,9 $\pm$ 10,9	14	16,3	72	83,7	86	9,7 $\pm$ 9,0	27	28,4	68	71,6	95
Alotransplantacija	13	9,3	14,8 $\pm$ 8,7	12	21,4	44	78,6	56	6,7 $\pm$ 8,3	30	44,8	37	55,2	67
Ukupno	50	5,6	15,0 $\pm$ 9,6	29	17,1	141	82,9	170	8,7 $\pm$ 8,0	61	32,3	128	67,7	189

**Zaključak:** Najčešća indikacija za transfuziju KT bila je prevencija krvarenje zbog niskog broja trombocita, najčešći broj trombocita za koji je indicirano transfuzijsko liječenje bio je u rasponu od 10 do  $19 \times 10^9/l$ , a najčešće je naručen 1 pripravak. Sve skupine hematoloških bolesnika imale su veliki udio transfuzija s nezadovoljavajućim učinkom. Skupina alotransplantiranih bolesnika imala je najveću potrošnju KT po bolesniku, ali nažalost u prosjeku i najslabiji CCI i najveći udio transfuzija KT sa nezadovoljavajućim CCI.

## Simpozij 10 – Upravljanje kvalitetom u transfuzijskoj medicini

### UPRAVLJANJE RIZICIMA I ZNAČAJ U TRANSFUZIJSKOJ MEDICINI

VUKT.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Služba upravljanja kvalitetom u transfuzijskoj medicini

Murphy's law – *“If anything can go wrong it will...”*

#### Uvod

Život je sam po sebi rizičan i svaka naša aktivnost praćena je određenim stupnjem rizika. Rizici su prisutni posvuda (financijski, gospodarski, socijalni, ...). Svi rizici nisu jednako značajni, a različita je i individualna percepcija rizika, ovisno o prethodnim iskustvima u sličnim situacijama. Kada se suočimo s rizikom, moramo donijeti odluku o daljnjem postupanju. Ponekad smo u tome uspješni, a ponekad ne. Čini se, dakle, da je upravljanje rizikom ono što radimo u svakodnevnom životu. Možda ne koristimo formalne definicije i ne slijedimo strukturirane protokole, ali osnovni principi su isti.

Za razliku od privatnog života u kojemu postoji odgovornost za pojedinca, obitelj i sl., u profesionalnom životu postoji odgovornost za zaposlenike, kupce/korisnike, dobavljače i na kraju za cijelu zajednicu. To također implicira potrebu veće predanosti upravljanju rizicima. Stoga ne iznenađuje da brojne tvrtke imaju odjele za upravljanje rizicima i menadžere koji su u potpunosti predani ovom važnom poslu.

U zdravstvenom sustavu rizici mogu utjecati na zdravlje i živote ljudi, zbog čega je upravljanje rizicima u ovom sustavu od osobitog značaja. Stručnjaci u transfuzijskoj medicini oduvijek su ozbiljno razmatrali rizike. Najmoćnija pokretačka snaga u prevenciji rizika povezanih s transfuzijskim liječenjem bila je pojava HIV-a 80-ih godina prošlog stoljeća. Otkriće HIV-a promijenilo je percepciju sigurnosti krvnih pripravaka i rezultiralo usvajanjem principa predostrožnosti u transfuzijskoj medicini. Specifični rizici u području transfuzijske medicine također su doprinijeli implementaciji sustava kvalitete i sustava hemovigilancije.

#### Povijest upravljanja rizicima

Prema nekim povjesničarima, najraniji koncept upravljanja rizicima razvio se iz teorije igara i vjerojatnosti. Temelji moderne analize rizika postavljeni su u doba renesanse. Vjerojatno najvažnija bila je suradnja Blaisea Pascala i Pierrea de Fermata 1654. godine, koja je postavila temelje teorije vjerojatnosti. Bernoullijev zakon velikih brojeva iz 1713. godine bio je sljedeće veliko otkriće. Dvadeset godina kasnije (1733.), de Moivre je razvio normalnu distribuciju i teoriju vjerojatnosti. Godine 1763. objavljen je Bayes-ov matematički model koji vjerojatnost događaja temelji na prethodnom znanju. Rad ovih znanstvenika samo je dio povijesti upravljanja rizicima, ali od presudne važnosti za postignuća stručnjaka koji su nastavili istraživanja na ovom području. Knjiga „*Against the Gods: The Remarkable Story of Risk*“, koju je 1996. godine objavio Peter L. Bernstein, sveobuhvatan je pregled povijesti rizika.<sup>1</sup> U ovoj knjizi autor naglašava da je kontrola rizika temeljna razlika u pristupu upravljanju rizicima u moderno doba u odnosu na prošlost. Prema „*Risk Management: History, Definition, and Critique*“ (Dionne G), suvremeni pojmovi i studije o upravljanju rizicima javljaju se nakon Drugoga svjetskog rata.<sup>2</sup> Strategija upravljanja rizicima u početku je usvojena u gospodarstvu i ekonomiji. Upravljanje rizicima u zdravstvenom sustavu uvedeno je primarno radi poboljšanja sigurnosti pacijenata i kvalitete zdravstvene zaštite, ali i radi prevencije financijskih rizika i tužbi.

#### Kako definirati rizik i upravljanje rizicima?

Postoji nekoliko definicija rizika, a njihovo značenje i tumačenje mogu biti različiti za pojedince ili organizacije. Neke se definicije rizika temelje na vjerojatnostima, druge na očekivanim vrijednostima, neke na neizvjesnosti, a druge na ciljevima. Oxford English Dictionary definira rizik kao situaciju koja uključuje izloženost opasnosti, ISO 31000 kao učinak neizvjesnosti na ciljeve<sup>3</sup>, a ISO/IEC Guide 51 kao kombinaciju vjerojatnosti nastanka štete i ozbiljnosti te štete<sup>4</sup>. Rizik može nastati iz unutarnjih i vanjskih (gospodarskih, političkih...) čim-

benika. Važno je da svaka organizacija odredi vanjske i unutarnje čimbenike, ciljeve koje treba postići i rizike koji mogu nastati u njihovoj realizaciji.

Postoji i nekoliko definicija upravljanja rizicima. Prema ISO 31000, upravljanje rizicima definira se kao „koordinirane aktivnosti za usmjeravanje i kontrolu organizacije obzirom na rizike.”<sup>3</sup> Prema ICH Q9 – Quality Risk Management, upravljanje rizicima za kvalitetu je “sustavni proces za identifikaciju, procjenu i kontrolu rizika za kvalitetu farmaceutskog proizvoda kroz životni ciklus proizvoda.”<sup>5</sup> Prema „GPG for blood establishments“ (EDQM Blood Guide), upravljanje rizicima za kvalitetu dio je sustava kvalitete koji osigurava da se izvedba procesa, sustavi praćenja i ocjene kvalitete temelje na riziku.<sup>6</sup>

### Značaj upravljanja rizicima

U svijetu brzih promjena i razvoja, upravljanje rizicima sve je važnije. Upravljanje rizicima omogućava ostvarenje ciljeva organizacije i stabilnost poslovanja, kreiranje sigurnog okruženja za zaposlenike i korisnike. Svojim preventivnim pristupom omogućava pravovremeno prepoznavanje potencijalnih rizika i olakšava donošenje odluka kojima će oni biti spriječeni ili umanjeno njihov učinak.<sup>7</sup>

### Ciljevi upravljanja rizicima

Slično definiciji rizika, ciljevi upravljanja rizicima mogu biti različiti za pojedine djelatnosti i organizacije. Međutim, neki su ciljevi zajednički većini njih. To su na primjer:

- unapređenje kvalitete i sigurnosti
- smanjenje grešaka, incidenata, štetnih događaja
- smanjenje troškova i optimalno korištenje resursa
- smanjenje varijabilnosti u procesima
- smanjenje nesigurnosti u promjenama
- identifikacija prilika
- smanjeni rizik od tužbi
- korištenje stečenog znanja i iskustva u budućim sličnim situacijama
- usklađenost sa zakonskim propisima, zahtjevima za licenciranje i akreditaciju
- alat za edukaciju djelatnika (podizanje svijesti o rizicima)

### Mogući problemi i negativni učinci

Uz cijeli niz pozitivnih učinaka, upravljanje rizicima može biti praćeno određenim problemima i negativnim učincima, kao što su:

- složenost postupka
- odabir pogrešnih alata i tehnika
- subjektivnost procjene
- razina angažmana neproporcionalna razini rizika
- izostanak timskog rada
- nedostatna edukacija

### Klasifikacija rizika

Postoji nekoliko načina na koje se rizici mogu klasificirati. U literaturi se može pronaći podjela na rizike na strateškoj i na operativnoj razini. Oni mogu biti unutrašnji i vanjski, ovisno o faktorima koji na njih utječu. Prema pojavnosti, rizici se mogu klasificirati na statičke (stalno prisutne) i dinamičke (koji nastaju uslijed nepredvidljivih promjena). Također se koristi i podjela na mjerljive i nemjerljive rizike. Rizici se mogu klasificirati i prema tipu njihovog učinka (učinak na financije, zdravlje i sigurnost, okoliš, ugled organizacije i sl.).

### Karakteristike uspješnog upravljanja rizicima

Upravljanje rizicima pripada strateškim ciljevima organizacije i važan je segment sustava upravljanja. Provedbu upravljanja rizicima treba podržati uprava organizacije i smatrati je alatom za stalno unapređenje. Upravljanje rizicima treba biti integrirano u organizacijske procese i korišteno u procesu donošenja odluka. Pri tome treba naglasiti važnost timskog rada. Važno je da se upravljanje rizicima provodi kontinuirano, uključujući i

kontinuiranu evaluaciju. Znanje je važan preduvjet za postizanje uspješnog upravljanja rizicima. Zbog toga je važno da principi upravljanja rizicima budu predmet početne i trajne edukacije djelatnika. Upravljanje rizikom treba biti dinamično i reagirati na promjene.

Potrebno je definirati načine komunikacije, alate i sl. Oni moraju biti opisani u dokumentu organizacije. Primjena informacijske tehnologije omogućava lakše upravljanje rizicima u smislu prikupljanja i obrade podataka, brže komunikacije i sl.

### Metode i alati za upravljanje rizicima

Uz različite neformalne načine procjene i upravljanja rizicima, dostupan je i niz dobro definiranih alata, kao što su: Failure Mode Effects Analysis (FMEA), Failure Mode, Effects and Criticality Analysis (FMECA), Fault Tree Analysis (FTA), Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), Hazard Operability Analysis (HAZOP), Preliminary Hazard Analysis (PHA). Važno je odabrati prikladan alat koji adekvatno identificira i rangira rizike te dokumentira radnje za tretman rizika. Stupanj formalnosti upravljanja rizicima ovisi o složenosti i kritičnosti problema. Različiti statistički alati mogu podržati i olakšati proces upravljanja rizicima.

Failure Mode Effects Analysis (FMEA) jedan je od najpouzdanijih alata za upravljanje rizicima. Razvijen je od strane američke vojske 50-ih godina prošlog stoljeća, ima preventivni pristup, temelji se na poznavanju procesa i primjenjuje od dizajna, preko razvoja do završnog proizvoda/procesa. Razina potencijalnog rizika (RPR) funkcija je tri čimbenika: posljedice (P), vjerojatnosti pojavljivanja opasnosti (V) i mogućnosti detekcije opasnosti (D), a izračunava se prema jednostavnoj formuli:  $RPR = P \times V \times D$ .

Razina prihvatljivosti rizika procjenjuje se kao “nizak/srednji/visok” ili “prihvatljiv/prihvatljiv uz smanjenje/neprihvatljiv” i sl. Čest je prikaz u bojama radi lakše interpretacije (“semafor”) – uobičajeno zeleno, žuto, crveno, ali neki dodaju i nijanse (najčešće svijetlo zeleno, narančasto). Unutar pojedinih boja mogu se zadati dodatni uvjeti, što ovisi o samom procesu na koji se procjena rizika odnosi. Mreža matrice obično je 5 x 5, ali mogu biti manje (3 x 3, 4 x 4) ili veće (7 x 7, 10 x 10), ovisno o potrebama organizacije. Na temelju dobivenih brojčanih podataka za RPR, prema potrebi (razina rizika), radi se plan aktivnosti. Nakon provedbe plana aktivnosti niti jedna razina potencijalnog rizika ne bi smjela biti u crvenoj zoni.

Ocjenjivanje rizika ima svoja ograničenja. Iako određeni rizik može imati značajan negativan utjecaj, izračun može rezultirati nižom ocjenom zbog niske učestalosti. Ovo jasno ukazuje na važnost uključivanja kompetentnih stručnjaka kako bi se osiguralo da vjerojatnost takvog rizika bude svedena na minimum te na važnost razmišljanja izvan okvira dobivenih rezultata.

### Proces upravljanja rizicima

#### Identifikacija (prepoznavanje) rizika

Cilj je pronalaženje, prepoznavanje i opisivanje rizika koji mogu imati utjecaj na ostvarivanje ciljeva organizacije. Prepoznavanje rizika može biti reaktivno (prijava reklamacija, nesukladnosti, štetnih događaja, nalazi audita...) ili proaktivno (temeljem predviđanja, učenja iz tuđih iskustava i pogrešaka i sl.). Pri tome se mogu koristiti različiti alati i tehnike, kao što su: Brainstorming, Delphi tehnika intervjuiranja, analiza korijenskih uzroka (eng. root-cause analysis), SWOT analiza, analiza pretpostavki (eng. assumption analysis), dijagrami uzroka i posljedice (eng. cause and effect diagrams), dijagrami tijeka (eng. flowcharts).

#### Analiza rizika

Analiza rizika osigurava podatke za njihovo vrednovanje i donošenje odluka o istima. To se prije svega odnosi na karakteristike rizika, razinu rizika, izvor rizika, posljedice, vjerojatnost pojave i sl. Tehnike analize mogu biti kvalitativne, kvantitativne ili kombinacija ovih metoda. Treba imati na umu da čak i jednostavni događaji, ako su učestali i ponavljajući zahtijevaju pažnju.

#### Evaluacija rizika

Cilj evaluacije rizika je usporedba razine rizika utvrđene tijekom analize s utvrđenim kriterijima. Evaluacija rizika pomaže u donošenju odluke za koje je rizike potrebno poduzeti mjere te utvrditi prioritete u provedbi tih mjera. Odluke trebaju uzeti u obzir stvarne i percipirane posljedice za vanjske i unutarnje dionike. Odluke mogu uključivati: izostanak daljnjih postupanja, razmatranje mogućnosti postupanja (tretman rizika), provedbu daljnjih analiza, održavanje postojećih kontrola, preispitivanje ciljeva.



### **Kontrola rizika (djelovanje u odnosu na rizik)**

Rizik se može kontrolirati na nekoliko načina: izbjegavanje rizika (ne započeti ili prestati s obavljanjem aktivnosti koje povećavaju izgleda za rizik), uklanjanje izvora rizika, dijeljenje rizika – podjela rizika s nekom od zainteresiranih strana (npr. angažiranje vanjskih dobavljača za pojedine aktivnosti), smanjenje rizika (analiza i uvođenje mogućih zaštitnih mjera za smanjenje rizika, procjena preostalog rizika i donošenje odluke o prihvatljivosti ostatnog rizika), prihvaćanje rizika – donošenje odluke o nepoduzimanju radnji za otklanjanje ili smanjenje rizika informiranom odlukom. U nekim situacijama se rizik može prihvatiti i iskoristiti kao prilika.

### **Praćenje rizika**

Praćenje rizika je kontinuirani proces koji uključuje prikupljanje informacija i njihovu analizu (ovdje treba naglasiti važnost indikatora kvalitete) te procjenu potrebe za izmjenama statusa pojedinih rizika.

### **Dokumentiranje i izvještavanje**

Ciljevi ovih aktivnosti su:

- komunikacija o aktivnostima i rezultatima upravljanja rizicima u cijeloj organizaciji
- osiguranje informacija za donošenje odluka
- unapređenje aktivnosti upravljanja rizicima
- unapređenje kvalitete dijaloga s dionicima i pružanje podrške rukovodstvu u ispunjavanju njihovih odgovornosti

### **Upravljanje rizicima u transfuzijskoj medicini**

Osnovni ciljevi u transfuzijskoj medicini su kvalitetno, sigurno i učinkovito transfuzijsko liječenje. Sukladno tome, potrebno je prepoznati rizike koji prijete ostvarenju ovih ciljeva i poduzeti odgovarajuće mjere za njihovo uklanjanje/smanjenje.

Stručnjaci u transfuzijskoj medicini oduvijek ozbiljno razmatraju rizike. Pojava HIV-a 80-ih godina prošlog stoljeća promijenila je percepciju sigurnosti transfuzijskog liječenja i bila je najsnažnija pokretačka snaga u prevenciji rizika koja je učvrstila temelje načela predostrožnosti u transfuzijskoj medicini. Ovaj princip jedan je od prvih proaktivnih načina razmišljanja u javnoj sferi. Princip predostrožnosti daje smjernice za donošenje odluka na koje se odgovorna tijela mogu pozvati u okolnostima kada nedostaju znanstveni dokazi o određenom riziku. Naime, neuspjeh u aktivnom izbjegavanju rizika može dovesti do štete za ljude ali i povećati troškove.

Rizici u transfuzijskoj medicini mogu se grubo podijeliti na one vezane uz davatelje, pacijente, zaposlenike i procese. Većina rizika u transfuzijskoj medicini proizlazi iz biološkog porijekla krvnih pripravaka (krvlju prenosiive infekcije, imunološki uzrokovane transfuzijske reakcije) te mogućnosti nastanka grešaka (složenost procesa, brojni sudionici u transfuzijskom lancu, itd.).<sup>7</sup> Tijekom godina učinjen je značajan napredak u prevenciji i smanjenju rizika u transfuzijskoj medicini. To prije svega možemo zahvaliti dinamičnom znanstveno-tehnološkom napretku koji je rezultirao brojnim novim spoznajama i inovacijama te implementaciji sustava kvalitete koji uključuje Dobru praksu i upravljanje rizicima za kvalitetu. Značajan doprinos unapređenju sigurnosti bila je implementacija sustava hemovigilancije u cijelom transfuzijskom lancu.

Upravljanje rizikom nije dakle novi koncept u transfuzijskoj medicini, ali je njegov značaj dodatno naglašen posljednjih godina promocijom upravljanja rizicima i donošenja odluka temeljeno na riziku. Tako se primjerice u Good Practice Guidelines (GPG), čiji je zahtjev uspostava sustava kvalitete koji se temelji na riziku, riječ „rizik“ spominje čak 47 puta.<sup>6</sup>

Prema B-QM (Blood Quality Management) radnoj grupi EDQM, nalazi audita i inspekcija u proteklom godinama jasno pokazuju da zahtjevi za upravljanje rizikom, izmjenama te validacijom/kvalifikacijom podliježu različitim tumačenjima, kao i da transfuzijske ustanove, regulatorna tijela i inspektori imaju različita očekivanja u pogledu njihove praktične primjene. Tijekom konferencije održane 2017.g. u organizaciji EDQM, naglašen je značaj procjene rizika u aktivnostima validacije/kvalifikacije te kontroli izmjena.<sup>8</sup>

Procjena rizika pomaže u definiranju područja kvalifikacije, kritičnih elemenata i uspostavi kvalifikacijskih parametara. Jednako tako može pomoći i u standardizaciji postupaka kvalifikacije na način da je svaki tip opreme kategoriziran s unaprijed definiranim kvalifikacijskim parametrima. Pristup temeljen na riziku može svesti kvalifikacijski postupak na optimalnu mjeru (razina angažmana razmjerna razini rizika), a primjenjuje se i na

ponovnu provedbu postupka kvalifikacije. Tako se podaci o povijesti opreme, odstupanjima, popravcima, promjenama i održavanju koriste u definiranju opsega rekvalifikacije.

Veliki značaj u prevenciji rizika ima i sustav kontrole izmjena (eng. “change control”). Ovaj sustav omogućava procjenu učinka svake promjene na procese, kvalitetu i sigurnost proizvoda, implementaciju promjena na kontrolirani i koordinirani način te identifikaciju i smanjenje rizika. Nekontrolirane promjene predstavljaju značajan rizik gubitka validiranog statusa procesa/opreme.

Istraživanje nesukladnosti, odstupanja u kvaliteti i ostalih događaja također mora biti provedeno na principima upravljanja rizicima, što omogućava definiranje opsega istraživanja i analize korijenskih uzroka te provedbe odgovarajućih korektivnih mjera.

## Zaključak

Svaka djelatnost praćena je rizicima koji predstavljaju prijetnju ostvarenju ciljeva. U transfuzijskoj medicini i zdravstvenom sustavu u cijelosti, rizici mogu imati vrlo ozbiljne posljedice što dodatno nameće potrebu sustavnog bavljenja rizicima. To je osobito važno u današnje vrijeme kada je sustav zdravstvene zaštite složeniji nego ikada, uz dinamični razvoj novih tehnika i proizvoda, stalne promjene regulatornih zahtjeva, organizacijske promjene i ekonomske izazove. Aktivan pristup upravljanju rizicima, uz stalnu prilagodbu novim izazovima, garancija je stabilnosti poslovanja i zadovoljstva zaposlenika i korisnika proizvoda i usluga.

## LITERATURA

1. *Bernstein PL.* Against the Gods: The Remarkable Story of Risk, 1996.
2. *Dionne G.* Risk management: history, definition, and critique, 2013. Dostupno na SSRN: <https://ssrn.com/abstract=2231635> ili <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.2231635>
3. ISO 31000:2018 Risk management — Guidelines. Dostupno na: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:31000:ed-2:v1:en>
4. ISO IEC Guide 51:2014(en) Safety aspects — Guidelines for their inclusion in standards. Dostupno na: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:guide:51:ed-3:v1:en>.
5. *European Medicines Agency.* ICH guideline Q9 on quality risk management, EMA/CHMP/ICH/24235/2006. EMA 2015. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-3.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf)
6. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe): Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 20th edn. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2020.
7. *Vuk T, Qiu Y, Bust L, Strengers P, Seidl C.* Quality monitoring and risk management in blood transfusion services. ISBT Science Series 2018;13:284–289.
8. *EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe).* Sharing best practices: Quality risk management, change control, validation and qualification in blood establishments. Proceedings of the workshop 17–19. October 2017, Strasbourg, France.

## UPRAVLJANJE REKLAMACIJAMA U HZTM (2014 – 2020)

LJUBIČIĆ J.<sup>1</sup>, Gulan Harcet J.<sup>1</sup>, Vuk T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** Upravljanje reklamacijama važan je segment upravljanja kvalitetom. Sustavna analiza učestalosti i uzroka reklamacija, identifikacija potencijalnih rizika te provedba odgovarajućih korektivnih i preventivnih mjera doprinos su stalnog unapređenja kvalitete i sigurnosti proizvoda i usluga te zadovoljstva kupaca/korisnika.

**Cilj:** Cilj studije je prikazati rezultate upravljanja reklamacijama u Odjelu za osiguranje kvalitete u transfuzijskoj medicini Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i naglasiti važnost upravljanja reklamacijama kao alata za kontinuirano unapređenje kvalitete.

**Metode:** Retrospektivno su za period od 7 godina (2014–2020) analizirani zapisi o zaprimljenim reklamacijama, prema sljedećim kategorijama: raspodjela reklamacija prema njihovom tipu, stupnju kritičnosti, opravdanosti te udjelu pojedinog tipa reklamacije u odnosu na odgovarajući denominator.

**Rezultati:** U ispitivanom periodu zaprimljeno je ukupno 577 reklamacija, od kojih se većina (45,9%) odnosila na pozitivan direktni antiglobulinski test (DAT) u koncentratima eritrocita, a s opadajućom učestalosti slijedile su reklamacije na nalaze laboratorijskih testiranja (23,4%), kvalitetu krvnih pripravaka (13,9%), reklamacije vezane za uzimanje krvi/zadovoljstvo darivatelja krvi (4,5%), označavanje krvnih pripravaka (3,6%), distribuciju/izdavanje krvnih pripravaka (1,6%), pružanje usluga pacijentima (1,4%), sumnju na transfuzijski uzrokovanu bakterijsku infekciju (1,2%), sumnju na transfuzijom uzrokovanu virusnu infekciju (1,0%), i kategoriju „Ostalo“ (3,5%). Od ukupnog broja reklamacija, 78,9% njih ocijenjeno je opravdanima, 1% djelomično opravdanima, 11,1% neopravdanima, a za 9% nije bilo moguće utvrditi opravdanost. 16,8% reklamacija ocijenjeno je potencijalno opasnim.

Analizirajući ukupnu stopu reklamacija izraženu kao n/10.000, uz primjenu odgovarajućih denominatora, dobiveni su slijedeći rezultati: stopa reklamacija za pozitivan DAT eritrocita iznosila je 4,01, za nalaze laboratorijskih ispitivanja 3,67, za kvalitetu krvnih pripravaka 0,53, za označavanje krvnih pripravaka 0,14, za pružanje usluga pacijentima 0,34, a za pružanje usluga darivateljima krvi 0,31. Značajno niže stope zabilježene su kod sumnje na transfuzijski uzrokovanu bakterijsku infekciju (0,07), sumnje na transfuzijski uzrokovanu virusnu infekciju (0,06) te distribuciju/izdavanje krvnih pripravaka (0,06).

Kada se dobiveni rezultati usporede s povijesnim podacima objavljenim za period 1998–2010<sup>1</sup>, zamjetna je podjednaka stopa reklamacija vezanih uz pozitivan DAT te značajno smanjenje reklamacija koje se odnose na obilježnost krvnih pripravaka, distribuciju/izdavanje krvnih pripravaka, sumnju na transfuzijski uzrokovanu bakterijsku infekciju i sumnju na transfuzijski uzrokovanu virusnu infekciju. Značajniji porast stope reklamacija bilježi se jedino za reklamirane nalaze laboratorijskih testiranja, što se objašnjava akreditacijom laboratorija i posljedično boljim sustavom bilježenja ovog tipa reklamacija.

**Zaključak:** Upravljanje reklamacijama jedan je od ključnih segmenata upravljanja kvalitetom i vrijedan alat za unapređenje kvalitete proizvoda i usluga i njihovo stalno usklađivanje sa zahtjevima kupaca.

Niske stope reklamacija u pojedinim kategorijama pokazatelj su kontinuirano pozitivnog učinka na sigurnost transfuzijskog liječenja. Iako su reklamacije na laboratorijske nalaze drugi po učestalosti tip reklamacija, za očekivati je skorašnje smanjenje njihove učestalosti u ukupnom broju, obzirom da je u 2021. došlo do povezivanja sustava CEZIH i e-Delphyn uz posljedično smanjenje mogućnosti nastanka administrativnih grešaka.

## LITERATURA

1. Vuk T, Barišić M, Očić T i sur. Management of complaints in blood establishments: thirteen years of experience at the Croatian Institute of Transfusion Medicine. *Blood Transfus.* 2012;10(3):302–310.

## SKRINING KONCENTRATA TROMBOCITA PRIKUPLJENIH AFEREZOM U PERIODU OD STUDENOG 2019. DO RUJNA 2021. – REZULTATI

SLADE M.<sup>1</sup>, Batarilo I.<sup>1</sup>, Gulan Harcet J.<sup>2</sup>, Ljubičić J.<sup>3</sup>, Jukić I.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za mikrobiologiju

<sup>2</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel kontrole kvalitete u transfuzijskoj medicini

<sup>3</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Odjel za osiguranje kvalitete u transfuzijskoj medicini

<sup>4</sup>Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Ravnateljstvo

**Uvod:** Unatoč nizu uvedenih mjera (probir darivatelja, dezinfekcija mjesta venepunkcije, oduzimanje malog početnog volumena krvi, aseptički rad, mikrobiološka kontrola okoline), bakterijska kontaminacija krvnih pripravaka (KP) i dalje predstavlja jedan od vodećih problema u transfuzijskom liječenju. Transfuzija kontaminiranog KP može uzrokovati niz komplikacija, uključujući sepsu i smrt. Koncentrati trombocita (KT) osobito su podložni kontaminaciji zbog skladištenja na sobnoj temperaturi (22°C) koja pogoduje rastu bakterija. Transfuzija kontaminiranih KT predstavlja najznačajniji mikrobiološki rizik transfuzije.

**Cilj:** Cilj rada je prikazati rezultate skrininga KT prikupljenih na staničnom separatoru (KT/AF) u periodu od studenog 2019. do rujna 2021.

**Metode:** U vrećice za uzorkovanje (*blood bag sample*) odvoji se 20 mL KT. Aseptičkim načinom rada, u zaštitnom kabinetu, nasije se u aerobnu i anaerobnu bočicu po 10 mL uzorka. Nasijane bočice inkubiraju se u Bact/ALERT 3D sustavu 7 dana. Svi neutrošeni pripravci KT dodatno se testiraju peti dan starosti (sekundarna kultivacija). Po 100 µL se nasije na 2 ploče krvnog agara (Columbia agar), jedna ploča se inkubira 24/48 sata/37°C u aerobnim uvjetima, a druga 48 sati/37°C u anaerobnim uvjetima. Porasli mikroorganizmi se identificiraju mikroskopskim preparatom i biokemijskim testovima.

**Rezultati:** U periodu od studenog 2019. do rujna 2021. testirano je 5420 KT/AF. Automatskom kultivacijom u BacT/ALERT 3D sustavu detektirano je 0,35% (19/5420) inicijalno pozitivnih KT/AF. Kontaminacija je potvrđena u 0,22% (12/5420) KT. Najčešći izolat bio je *Cutibacterium acnes* (10/12), a izolirani su i *Staphylococcus saccharolyticus* (1/12) i CoNS (1/12). U preostalim inicijalno pozitivnim pripravcima nije dokazana kontaminacija i 7/19 (36,84%) KT proglašeno je lažno pozitivnim. Sekundarna kultivacija provedena je na 53,61% (2906/5420) KT/AF. Nije dokazana kontaminacija niti jednog ispitivanog pripravka.

**Zaključak:** Učestalost kontaminacije KT dobivenih aferezom u HZTM iznosila je 0,22%. Najčešće je izoliran *C. acnes*, koji obitava u dubokim slojevima kože i teže ga je odstraniti dezinfekcijom. *C. acnes* se rijetko povezuje s teškim infekcijama, jednako kao i *S. saccharolyticus* i CoNS. Bakterijski skrining KT dodatno smanjuje mogućnost prijenosa bakterija transfuzijom, a time i niza posljedičnih komplikacija, uključujući sepsu i smrt.

## ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE, LAKTATA I TROMBOCITA TE PH U UZORCIMA KONCENTRATA TROMBOCITA SA SMANJENIM BROJEM LEUKOCITA POOL VIŠE DOZA

GULAN HARCET J.<sup>1</sup>, Vinković M.<sup>1</sup>, Radovčić M. K.<sup>1</sup>, Vuk T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Uvod:** U Odjelu za kontrolu kvalitete u transfuzijskoj medicini (KKM) rutinski se provodi statistička procesna kontrola koncentrata trombocita (KT) koja uključuje određivanje vrijednosti pH na isteku roka valjanosti pripravka. U uzorcima KT dobivenim iz pune krvi (KT/SBL/POOL) *pooliranjem* slojeva leukocita i trombocita (BC, engl. *buffy coat*), pH se određuje 5. dan skladištenja. Nabavom biokemijskog analizatora Vitros Ortho u KKM omogućeno je testiranje nekih biokemijskih parametara važnih u metabolizmu trombocita u KT resuspendiranim u hranjivoj otopini (HO) odnosno plazmi. U lipnju ove godine u suradnji s Odjelom za proizvodnju krvnih pripravaka provedeno je ispitivanje koncentracije glukoze, laktata i trombocita te pH u uzorcima KT/SBL/POOL.

**Cilj:** Cilj je bio ispitati dinamiku metabolizma trombocita u KT/SBL/POOL te usporediti vrijednosti trombocita, glukoze, laktata i pH u trima različitim vrstama pripravaka (KT/SBL/POOL u HO *pool* 4 BC, KT/SBL/POOL u HO *pool* 5 BC i KT/SBL/POOL u plazmi *pool* 4 BC).

**Metode:** Mjerene su vrijednosti koncentracije glukoze, laktata i trombocita te pH prvog, petog i sedmog dana skladištenja, u uzorcima sve tri vrste KT/SBL/POOL (ukupno 24 doze). Koncentracija trombocita mjerena je hematološkim analizatorom Cell Dyn Ruby Abbott, volumen pripravka izračunat je iz mase pripravka izmjerene na preciznoj vagi Mettler Toledo, određivanje glukoze i laktata na biokemijskom analizatoru Vitros Ortho, a pH upotrebom pH-metra Seven Multi Mettler Toledo. Korišteni su komercijalni reagensi i kalibratori. Za izradu pripravaka od 4 BC korišteno je 250 mL HO SSP+, a za izradu pripravaka 5 BC 300 mL HO SSP+. Za statističku analizu podataka korišten je program MedCalc® Statistical Software 20.010; Ostend, Belgium. Za ispitivanje razlike između nezavisnih uzoraka korišten je Mann-Whitney, a za parne uzorke Wilcoxon signed rank test.

**Rezultati:** Ispitano je 8 pripravaka iz svake skupine. Rezultati prosječnih, najnižih i najviših vrijednosti prikazane su u Tablici 1.

Wilcoxonovim signed rank testom za svaku skupinu uspoređeni su podaci za 1. i 5. te 1. i 7. dan. Standardni pripravak KT/POOL u HO *pool* 4 doze imao je značajno niže vrijednosti glukoze i broja trombocita te više vrijednosti laktata 5. i 7. dana u odnosu na 1. dan, osim koncentracije trombocita koja se 5. dana nije značajno razlikovala od 1. dana. Slični rezultati dobiveni su za *pool* 5 doza u HO i za *pool* u plazmi.

TABLICA 1. PRIKAZ PODATAKA ZA SVE TRI VRSTE PRIPRAVAKA – PRIKAZANE SU PROSJEČNE VRIJEDNOSTI (MINIMUM – MAKSIMUM)

	KT/HO 4 DOZE, N=8			KT/HO 5 DOZA, N=8			KT PLAZMA 4 DOZE, N=8		
	1. dan	5. dan	7. dan	1. dan	5. dan	7. dan	1. dan	5. dan	7. dan
broj trombocita	7,44	6,97	6,54	7,82	7,49	6,99	8,44	8,04	7,71
( $\times 10^{10}$ / dozi)	(6,39 – 8,82)	(6,11 – 8,51)	(5,79 – 7,84)	(6,92 – 8,57)	(6,71 – 8,37)	(6,36 – 7,82)	(6,76 – 9,8)	(6,71 – 9,24)	(6,25 – 8,8)
koncentracija trombocita	962,63	942,13	917,75	1054,88	1046,38	1006,13	1074	1067,38	1056,75
( $\times 10^9$ / L)	(827 – 1135)	(808 – 1150)	(785 – 1104)	(967 – 1168)	(970 – 1175)	(902 – 1134)	(878 – 1245)	(898 – 1228)	(865 – 1209)
volumen	309	296	285,13	370,88	358	347,38	314,13	301,5	291,75
(mL)	(293 – 317)	(277 – 306)	(266 – 295)	(358 – 388)	(344 – 376)	(334 – 367)	(305 – 324)	(293 – 313)	(283 – 303)
glukoza	6,95	4,75	3,7	6,95	1,25	0,9	16,96	14,6	13,25
mmol / L	(6,7 – 7,3)	(3,9 – 5,6)	(2,6 – 4,6)	(6,7 – 7,2)	(0,6* – 4,2)	(0,6* – 3)	(15,6 – 19,2)	(12,3 – 17,6)	(10,8 – 16,3)
laktati	4,4	9,01	10,71	4,73	17,36	17,9	9,09	13,48	15,61
mmol / L	(4 – 4,8)	(7,3 – 12)	(9,1 – 13,3)	(4,3 – 5)	(11,1 – 19,5)	(12,5 – 19,3)	(7,9 – 10,4)	(11,4 – 16,6)	(12,9 – 19)
pH	7,14	7,24	7,27	7,14	6,82	6,88	7,22	7,42	7,35
	(7 – 7,19)	(7,11 – 7,31)	(7,08 – 7,41)	(7,13 – 7,16)	(6,71 – 7,13)	(6,76 – 7,2)	(7,15 – 7,29)	(7,33 – 7,51)	(7,3 – 7,46)

KT = koncentrat trombocita; HO = hranjiva otopina; N = broj; \*vrijednosti niže od donje granice mjerenja aparata (0,6)

Usporedbom 4 BC u HO i u plazmi, značajno su više vrijednosti glukoze, ali i laktata te pH u plazmi nego u HO u svim mjerenjima ( $P < 0,05$ ). Također, koncentracija trombocita značajno je viša u plazmi 5. ( $P = 0,03$ ) i 7. ( $P = 0,01$ ) dana skladištenja.

Usporedbom KT s 4 i 5 BC u HO, broj i koncentracija trombocita nisu se značajno razlikovali. Međutim, pripravci s 5 BC imali su značajno nižu glukozu 5. i 7. dana (nemjerljivu postojećom opremom, ali za potrebe analize uzeta je donja vrijednost mjerenja 0,6 mmol/L) i više laktate. Također, pH je bio značajno niži u pripravcima s 5 BC.

**Zaključak:** Usporedbom tri vrste pripravaka, pokazalo se kako je broj trombocita u pripravku KT/SBL/POOL najveći u pripravcima resuspendiranim u plazmi. Pripravci trombocita u HO iz 5 BC pokazali su značajno lošije rezultate nego pripravci 4 BC, stoga veći broj BC u pripravku ne rezultira kvalitetnijim pripravkom. Pretpostavka je kako je to posljedica većeg broja trombocita u vrećici istog volumena pa je izmjena plinova otežana, a time narušen i metabolizam trombocita. Prednosti proizvodnje KT u HO (rjeđa pojava transfuzijskih reakcija, mogućnost inkompatibilne transfuzije te više plazme za proizvodnju pripravaka i derivata plazme) nadmašuju, iako statistički značajne, ali praktično relativno male razlike u kvaliteti pripravaka.

Određivanje koncentracije glukoze u KT u HO osjetljiviji je pokazatelj metabolizma trombocita i u kontroli kvalitete mogao bi biti prikladan test od određivanja pH.

## PRAĆENJE INDIKATORA KVALITETE U TRANSFUZIJSKOJ SLUŽBI RH (2013–2020)

### VUKT.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

• Služba upravljanja kvalitetom u transfuzijskoj medicini

**Uvod:** Učinkovitost sustava kvalitete u velikoj mjeri ovisi o praćenju i procjeni kvalitete. Prikladni indikatori kvalitete, uz jasno definirane ciljeve, omogućavaju objektivno mjerenje kvalitete, analizu trendova, identifikaciju potencijalnih rizika i provedbu mjera za unapređenje kvalitete. O značaju indikatora kvalitete u transfuzijskoj medicini intenzivnije se raspravlja posljednjih 10-tak godina. Od 2013. godine započinje i projekt praćenja indikatora kvalitete u transfuzijskoj službi RH s ciljem standardizacije rada i unapređenja kvalitete i sigurnosti.

**Metode:** Prikazani su rezultati praćenja indikatora kvalitete u ovlaštenim zdravstvenim ustanovama transfuzijske službe RH za razdoblje od 8 godina (2013–2020). Analizirani su podaci prikupljeni upitnicima koje ustanove ispunjavaju svake godine i koji se koriste za izradu godišnjih izvješća. Za potrebe ove studije izračunat je nacionalni prosjek svih indikatora u dva promatrana četverogodišnja razdoblja (2013–2016 i 2017–2020), kako bi se procijenili trendovi.



**Rezultati:** Ukupni rezultati prikazani su u **Tablici 1** kao prosjek dva četverogodišnja razdoblja.

TABLICA 1. REZULTATI PRAĆENJA INDIKATORA KVALITETE U RH 2013–2020  
(USPOREDBA RAZDOBLJA 2013–2016 I 2017–2020)

Indikator kvalitete	2013–2016	2017–2020	Indikator kvalitete	2013–2016	2017–2020
Odbijanje DDK ukupno	13,4%	14,0%	Losi varovi u proizvodnji KP	0,026%	0,024%
Odbijanje DDK zbog sniženog HGB	5,32%	4,81%	Nesukladni KP	7,48%	6,04%
Donacije prikupljene od novih DDK	9,15%	6,48%	Istekroka KE	1,46%	1,39%
Neuspješne donacije	1,15%	0,98%	Istekroka KT	8,77%	8,98%
Loši varovi na uzimanju krvi	0,027%	0,010%	Nesukladni rezultati u kontroli kvalitete KP	5,68%	2,56%
Reakcije i komplikacije DDK	1,49%	1,00%	Bakterijska kontaminac. KP	0,090%	0,127%
Reklamacije DDK	0,010%	0,006%	Reklamacije KP	0,028%	0,027%
Ugrušci u eritrocitnim KP	0,065%	0,054%	Izdavanje pogrešnog KP	0,005%	0,001%
Lipemična plazma	4,76%	2,62%	Vraćeni KP	0,038%	0,047%
Hemolitična plazma	0,011%	0,001%	Povlačenje KP	0,046%	0,099%
Proizvodni indeks	2,50	2,66	Ozbiljni štetni događaji	0,005%	0,002%

DDK = dobrovoljni davatelji krvi; HGB = hemoglobin; KP = krvni pripravci; KE = koncentri eritrocita; KT = koncentri trombocita

Za veliku većinu indikatora bilježi se unapređenje kvalitete, koje je za pojedine indikatore i znatnije naglašeno. Izdvojiti treba pad učestalosti neuspješnih donacija, reakcija i komplikacija DDK i reklamacija DDK, smanjenje udjela nesukladnih KP, unaprijeđenje kvalitete KP, povećanje proizvodnog indeksa, smanjenje grešaka u izdavanju KP i ozbiljnih štetnih događaja. Varijacije između centara u pojedinim indikatorima upućuju na moguće neujednačenosti kriterija u procjeni, bilježenju i prijavi pojedinih odstupanja. Dominantni su problemi veliki udio isteka roka KT i uništenih doza plazme u pojedinim ustanovama. Naglašen je i veliki udio odbijanja DDK u pojedinim ustanovama te pad udjela donacija prikupljenih od novih DDK. Potrebno je uložiti dodatne napore za smanjenje rizika bakterijske kontaminacije KP i implementaciju kvantitativnih metoda određivanja hemoglobina kod DDK.

**Zaključak:** Praćenje indikatora kvalitete na nacionalnom nivou omogućilo je: uvid u aktivnosti i razinu kvalitete ovlaštenih zdravstvenih ustanova u transfuzijskoj službi RH, usporedbu rezultata između ustanova (benchmarking), rasprave o uzrocima pojedinih odstupanja, implementaciju mjera za unapređenje kvalitete. Dosadašnji rezultati praćenja kvalitete na nacionalnom nivou pokazuju poboljšanje u velikoj većini indikatora. Prepoznata su međutim i područja u kojima je potrebno provoditi dodatne mjere za unapređenje kvalitete i sigurnosti. Jednako tako, prepoznata je i potreba stalnog unapređenja upitnika i dostupnosti podataka za njihovo standardizirano prikupljanje i obradu. Uz postojeće, uvode se i novi indikatori kvalitete, kako bi se obuhvatio što veći broj aktivnosti u transfuzijskoj službi.

*Zahvala: Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama u ovlaštenim zdravstvenim ustanovama transfuzijske službe RH, bez kojih ovaj prikaz rezultata ne bi bio moguć.*