



# ZBORNIK RADOVA iz "Laboratorijske dijagnostike"



## **Glavni urednik**

Doc. dr. sc. Amir Ibrahimagić

## **Redakcioni odbor**

Alisa Prešić-Abduzaimović (BiH)

Sedina Omeragić (BiH)

Jasmina Kišija-Bajrić (BiH)

Jasminka Talapko (Hrvatska)

Sanela Hajro (BiH)

Berina Haračić (BiH)

Zijada Smailagić (BiH)

Mirjana Stupnišek (Hrvatska)

Esad Burgić (BiH)

Dženana Gušić (BiH)

Enver Ivanković (BiH)

Harisa Šido (BiH)

Ljiljana Benković (BiH)

Aida Mujičić (BiH)

Dženisa Čajić (BiH)

Magdalena Perić (Hrvatska)

Lejla Hasanbegović (BiH)

Lejla Tatlić (BiH)

Emina Muftić (BiH)

Amel Salkić (BiH)

Savka Petrić (BiH)

Emina Smajić (BiH)

Farah Kamberović (Španija)

Elma Salihović (BiH)

Vedina Kučuković (BiH)

Nemanja Jovičić (BiH)

Aleksandra Pašić (BiH)

## **Sekretar**

Sanela Hajro

Zbornik radova Komore medicinsko-

laboratorijskih dijagnostičara FBiH

Adresa Komore:

Čekaluša 90

71000 Sarajevo, BiH

Adresa predsjednika:

Fra Ivana Jukića 2

72000 Zenica, BiH

0038761/614-147

[www.kmldfbih.ba](http://www.kmldfbih.ba)

e-mail: [kmldfbih2020@gmail.com](mailto:kmldfbih2020@gmail.com)

Poštovane i uvažene kolegice i kolege,

Komora medicinsko - laboratorijskih dijagnostičara FBiH formirana je kao prva matična Komora diplomiranih inženjera medicinsko-laboratorijske dijagnostike još davne 2010. godine i danas okuplja preko 200 članova svih nivoa obrazovanja (od I ciklusa dipl. ing. MLD do III ciklusa Doktora nauka laboratorijske djelatnosti).

Studenti, članovi Komore, pa i članovi drugih komora i udruženja imaju priliku pisati, pokazati i predložiti svoja stručna i naučno – stručna djela. Zbornik obuhvata teme iz različitih laboratorijskih djelatnosti i to: biohemijsko-hematoloških, mikrobioloških, imunoloških, citoloških, patohistoloških, transfuzioloških, bromatoloških, veterinarskih i drugih djelatnosti.

Danas smo svjedoci jačanja i promovisanja digitalizacije radi situacije u kojoj se planeta Zemlja našla, te će nam prvi Zbornik iz laboratorijske dijagnostike biti poveznica informisanja svih inovativnih stručnih i naučno-stručnih zbivanja u zajednici.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>ZNAČAJ BIOTINA U MEDICINSKO-LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI</b><br>Nihada Šehagić, Nihad Bliznović .....  | 4  |
| <b>ZNAČAJ PRAĆENJA REZISTENTNIH SOJEVA ESCHERICHIA COLI<br/>- SADAŠNJOST I BUDUĆNOST</b><br>Rusmira Hasandić Mehmedagić .....                                   | 13 |
| <b>ZNAČAJ ODREĐIVANJA INR-A (INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO)</b><br>Emina Muftić .....  | 22 |
| <b>MJESTO, ULOGA I ZNAČAJ MEDICINSKO-LABORATORIJSKOG<br/>DIJAGNOSTIČARA U ZDRAVSTVENOM SISTEMU BOSNE I HERCEGOVINE</b><br>Nedeljka Šljivo, Fatima Bilajac ..... | 32 |
| <b>DOBRA LABORATORIJSKA PRAKSA KOD MOGUĆIH INTERFERENCIJA<br/>REZULTATA NA SPECIFIČNE IGE ZA POJEDINE ALERGENE</b><br>Nermin Kotorić .....                      | 40 |
| <b>PROMJENE U DIFERENCIJALNOJ KRVNOJ SLICI KOD PROFESIONALNO<br/>IZLOŽENIH OSOBA DJELOVANJU BENZENA</b><br>Esad Burgić .....                                    | 59 |



## ZNAČAJ BIOTINA U MEDICINSKO-LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

Nihada Šehagić, Nihad Bliznović

### SAŽETAK

U posljednjih pet godina, institucije koje se bave ispitivanjem hrane i lijekova su izdale upozorenje javnosti, laboratorijama, zdravstvenim djelatnicima i osobama koje dizajniraju dijagnostičke testove, o potencijalnim interferencijama uzrokovanim biotinom. U ovom radu ćemo ukratko pojasniti strukturu biotina, njegovu biološku funkciju, prednosti i posljedice njegove upotrebe, odnosno, nedostatka u organizmu čovjeka, primjenu u različitim praksama sa akcentom na uticaj u imunohemiji u smislu rezultata ispitivanja i posljedično pogrešnih dijagnoza.

*Ključne riječi: biotin, koncentracija biotina, biotinska interferencija*

**Autor za korespondenciju**  
**Nihada Šehagić MA dipl. ing. MLD**  
**Kantonalna bolnica Zenica**  
**e:mail: n.gazic.l@gmail.com**

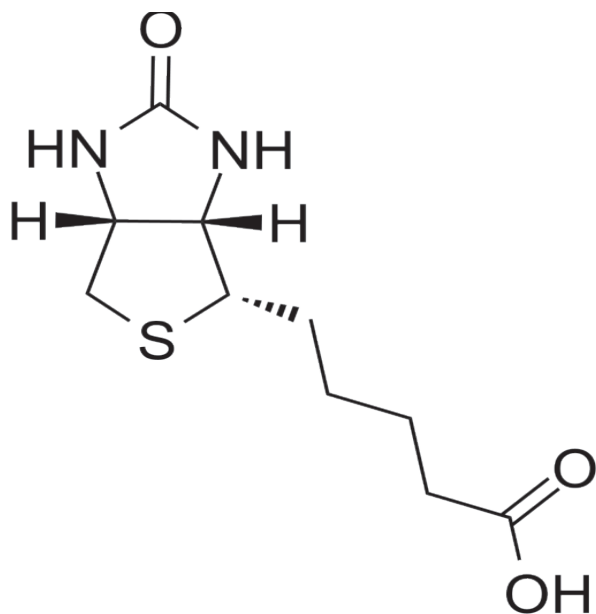


### UVOD

Biotin, poznat kao i vitamin B7 ili vitamin H, je vitamin topljiv u vodi koji pomaže organizmu u metabolizmu masti, karbohidrata i proteina (1). Ljudski organizam mora zadovoljavati potrebe za dnevnim unosom biotina, odnosno vitamina B7. Biotin ima široku praktičnu primjenu, od farmaceutske industrije, preko terapijskih sredstava u nekim patološkim stanjima do upotrebe u multivitaminским dodacima u kozmetici.

### STRUKTURA I FUNKCIJA BIOTINA

Biotin sadržava tri asimetrična ugljikova atoma. Samo se D (+) pojavljuje u prirodi i biološki je aktivan, odnosno ima vitaminsku aktivnost. Kao i svi u vodi topljivi vitamini i biotin nije skladišten u tijelu te je potreban dnevni unos u organizam. Ne mogu ga sintetizovati ljudske ćelije ali ga proizvode bakterije u organizmu te se nalazi u raznoj hrani.



Slika 1: molekularna struktura biotina (<https://www.medchemexpress.com/biotin.html>)

Biološka je funkcija biotina da djeluje kao koenzim niza karboksilaza u metabolizmu masnih kiselina, aminokiselina i ugljikohidrata. U ljudskim tkivima biotin je koenzim za enzimsku karboksilaciju četiri supstrata: piruvata, CoA, propionil-CoA i p-metilkrotonil-CoA. Vezanje CO<sub>2</sub> obavlja se dvostepenom reakcijom: prva uključuje vezanje CO<sub>2</sub> na biotinsko središte holoenzima, a druga prijenos CO<sub>2</sub> vezanog za biotin do odgovarajućeg akceptora.(2)

### Prisutnost biotina

U namirnicama biljnoga i životinjskog porijekla samo je mali dio biotina u slobodnom obliku. Većina biotina kovalentno je vezana na enzime ovisne o biotinu preko amidne veze karboksilne skupine pokrajnjeg lanca biotina i aminoskupine lizinskog ostatka. Biotin se apsorbira u enterocite aktivnim prijenosom ovisnim o natriju. Oralno uziman biotin gotovo se u potpunosti apsorbira, dok biološka dostupnost biotina dobivenog hranom varira.

Tabela 1: Sadržaj biotina u određenim namirnicama

| Namirnica                   | ng biotina/g hrane |
|-----------------------------|--------------------|
| goveđa jetra                | 416                |
| pileća jetra                | 1872               |
| cijelo jaje, kuhano         | 214                |
| žumanjak jajeta             | 272                |
| brokula                     | 9,43               |
| kuhani slatki krompir       | 14,5               |
| konzervirane gljive         | 21,6               |
| avokado                     | 9,61               |
| bademi, pečeni, posoljeni   | 44,07              |
| kikiriki, pečeni, posoljeni | 175                |

Reapsorbira se u bubrezima aktivnim prijenosom ovisnim o natriju, a kod viših koncentracija izlučuje se urinom. Sve stanice sadržavaju biotin, a veće se koncentracije mogu pronaći u jetri, bubrezima, mišićima i mozgu.

### Posljedice nedostatka biotina u organizmu

Nedostatak biotina vrlo je rijedak, no može se javiti kod dugotrajne neadekvatne prehrane, hroničnog alkoholizma, hemodijalize i dugotrajne konzumacije sirovih jaja (biotin stvara neaktivni kompleks s proteinom avidinom sadržanim u bjelanjku jaja, čime je onemogućena njegova apsorpcija; kuhanjem jaja avidin se denaturira, što omogućava otpuštanje, odnosno uspješnu apsorpciju biotina).



Simptomi pomanjkanja biotina jesu gubitak kose, gubitak apetita, konjunktivitis, letargija, osjećaj trnjenja i pečenja u rukama i nogama, hipotonija i bolovi u mišićima.

Tabela 2: dnevne potrebe za unosom biotina

| Životna dob čovjeka    | Dnevne potrebe za unos biotina |
|------------------------|--------------------------------|
| Prvih 6 mjeseci života | 5 µg                           |
| 7 – 12 mjeseci         | 6 µg                           |
| 1 – 3 godine           | 8 µg                           |
| 4 – 8 godine           | 12 µg                          |
| 9 – 13 godine          | 20 µg                          |
| 14 – 18 godine         | 25 µg                          |
| 19 + godine            | 30 µg                          |

Biotin nije toksičan uziman oralno ili intraveniski u miligramskim (mg) količinama kroz dulje razdoblje. Dnevna potreba za biotinom iznosi 30 µg. Kod odraslih zdravih osoba koncentracija biotina u seumu je od 133 – 329 pmol/L i od 18 do 127 nmol u dnevnom urinu.(3) Pored činjenice da je nedostatak biotina u organizmu jako rijedak on je i dalje stalna komponenta vitaminskih suplemenata.

### Praktična primjena biotina

Farmaceutska primjena biotina nalazi se kod sekundarne progresivne multiple skleroze, metaboličkih bolesti (defekti karboksilaze i biotini-daze) i propionske acidemije.

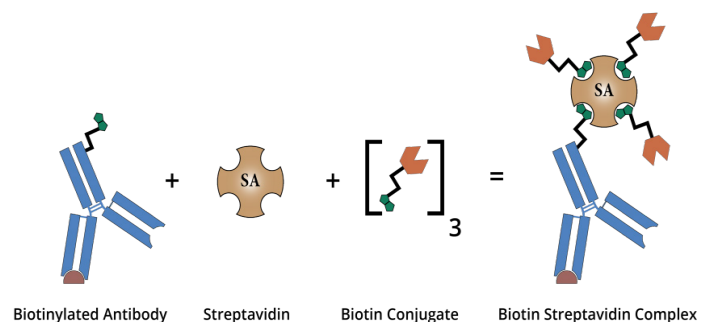
Biotin se u velikim dozama (5-10 mg/dan) koristi kao terapijsko sredstvo kod nekih patoloških stanja kao što su urođene greške u metabolizmu. Još veće doze biotina (300 mg/dan) koriste se u tretmanu sekundane progresivne multiplskleroze.(5)

Biotin se koristi u multivitaminским dodacima i u preparatima za kosu, kožu i nokte. Zadnjih nekoliko godina porasla je popularnost biotina kao dodatka prehrani i kozmetičkog proizvoda koji pridonosi ljepoti. Pošto su ti preparati uglavnom registrirani kao kozmetički proizvodi ne podliježu provjeri kontrole i kvaliteta tako da se dolazi u situaciju da se na tržištu nalaze proizvodi koji sadrže i megadoze biotina i do 10 000 puta veće od preporučene dnevne doze. Ti se biotinski preparati uglavnom reklamiraju kao proizvodi za zdravlje, ljepotu kose, kože i noktiju.

### Primjena biotina u imunohemiji

Otkrivanje i kvantifikacija antitijela i antigena pomoću imunohemijskih tehnika zahtijeva upotrebu enzim – protein konjugata. Većina takvih konjugata nastaje spajanjem enzimatskog markera i antitijela kovalentnom ili nekovalentnom vezom. U zadnje vrijeme se najčešće koristi izuzetno jaka nekovalentna veza streptavidin – biotin.

Streptavidin je 66 kDa protein koji se dobija iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Streptavidin – biotin stvaraju jedan od najčešćih kompleksa u prirodi i ima široku primjenu u osjetljivim biohemijskim ispitivanjima. (6)



Slika 2: ilustracija biotin – streptavidin interakcije

Glavna prednost korištenja biotin – streptavidin kompleksa je mogućnost za unaprijeđen-

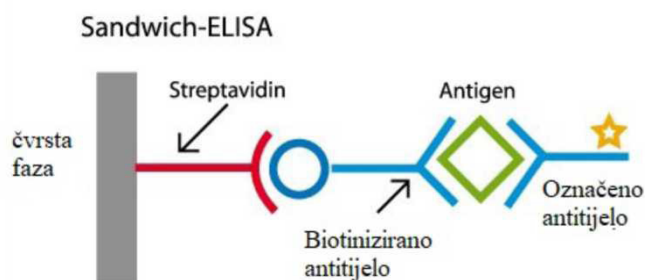


je osjetljivosti detekcije. To je u velikoj mjeri zbog tetramerne strukture streptavidina. Jedan streptavidin protein ima mogućnost vezivanja četiri molekule biotina sa velikim afinitetom i selektivnošću. Mogućnost većeg vezivanja omogućava pojačanje slabog signala i unapređuje osjetljivost detekcije (7). Ostale karakteristike interakcije između biotina i streptavidina su:

- *Kompleks je otporan na promijene pH, ispiranja, promiejnju temperature*
- *Vezivanje streptavidina za biotin je dovoljno specifično da bi osiguralo ciljano vezanje*
- *Biotin je mala molekula kojom se konjugiraju biološki aktivne makromolekule ili se biotiniziraju male molekule koje djeluju kao enzimski supstrati ili mogu vezati specifična antitijela (8)*

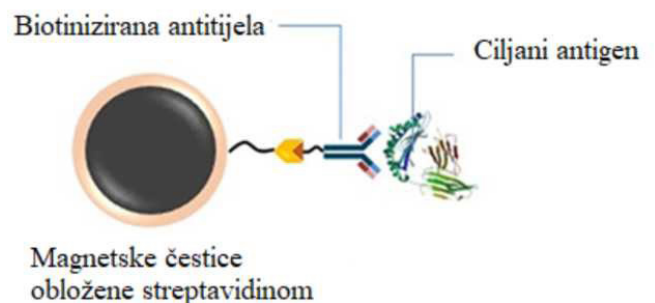
Streptavidin se može u imunohemijskim analizama koristiti na nekoliko načina. Pojedini analizatori koriste čvrstu fazu na koju je imobiliziran streptavidin (Ortho Diagnostics). Na taj način protein prisutan u stanici reagira sa biotiniziranim antitijelom koje se veže za streptavidin na čvrstoj podlozi i na taj način nastaje kompleks koji se može detektirati, a protein odvojiti.

Riječ je o sistemu koji omogućava otkrivanje analita u niskim koncentracijama jer interakcija streptavidin-biotin umnožava signal i povećava osjetljivost (slika br.3).



Slika 3: Prikaz sendvič metode, vezanje biotiniziranog antitijela za streptavidin na čvrstom

Umjesto čvrste podloge, mogu se koristiti i magnetske kuglice visokog kapaciteta s imobiliziranim streptavidinom (Roche Diagnostics) koje omogućavaju brzo i učinkovito pročišćivanje biomolekula iz složenih uzoraka. Čvrste faze obložene streptavidinom učinkovito se koriste kao sredstva za odvajanje u heterogenim imunoanalizama i u testovima DNA-hybridizacije (slika br.4)



Slika 4: Prikaz magnetske kuglice imobilizirane streptavidinom

Mnoge imunohemijske platforme danas koriste biotin u svom radu. Između ostalih tu spadaju: Roche Diagnostics (Cobas), Siemens Healthineers Laboratory Diagnostics (Advia Centaur, Dimension Vista, Immulite), Ortho Clinical Diagnostics (Vitros), Beckman Coulter (Access, DXI i DXC Platforms) i drugi (9).

### Biotinska interferencija

Iako se smatra da i velike doze biotina nisu toksične te nemaju neželjene efekte postoji velika mogućnost da će velike količine biotina u ispitivanom uzorku dovesti do interakcije u velikom broju dijagnostičkih testova. To se posebno odnosi na one testove koji koriste streptavidin-biotin vezivanje (5).

U kliničkim laboratorijama, mnogi biomarkeri, uključujući hormone, tumor markere, vitamine i lijekove određuju se pomoću imunohemijskih platformi koje koriste biotin-streptavidin tehnologiju (11).



Savremene laboratorije su jako dobro upućene u prepoznavanje potencijalnih interferencija kako u hemijskim tako i u imunohemijskim reakcijama. Biotinska interferencija je relativno novo otkriće ali mnoge metode koje se koriste za otkrivanje ove interferencije preklapaju se sa metodama koje su već ranije usvojene (4).

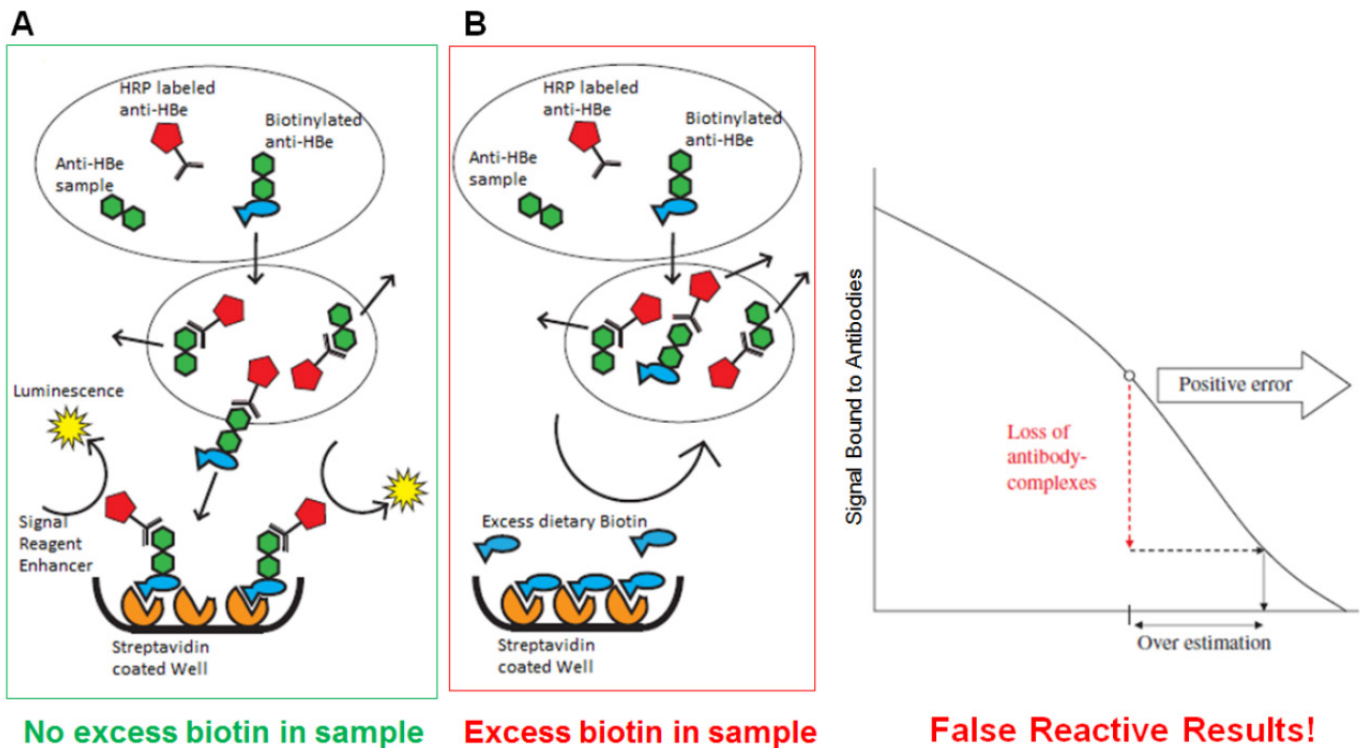
Normalan nivo biotina, koji se u organizam unese ishranom te dobije metabolizmom, prenizak je da bi doveo do interferencije u analizama koje koriste biotin. Također nisu prijavljeni slučajevi interferencije niti prilikom uzimanja multivitaminskih suplemenata koji sadrže do 1 mg biotina. Međutim, unošenje većih doza biotinskih suplemenata ( $\geq 5$  mg) dovodi značajnih povećanja koncentracije biotina u krvi koje mogu interferirati u reakcijama koje koriste biotin (10).

### Mehanizam biotinske interferencije

Biomolekule, kako male tako i velike, klinički bitne u onkologiji, kardiologiji, metabolizmu kostiju, anemiji, infektivnim bolestima, sepsi, dijabetesu, reproduktivnoj endokrinologiji itd. određuju se pomoću imunohemijskih analiza.

Dvije su metode imunohemijskih analiza: kompetitivne i nekompetitivne ili sendvič analize. Kompetitivna metoda se koristi uglavnom kod određivanja manjih molekula kao što su: T3, T4, kortizol, vitaminom D i dr. Kompetitivne su metode kod kojih se koristi jedno antitijelo. Reakcija se odvija uvijek uz višak antigena (ispitivana tvar).

Mehanizam biotinske interferencije kod kompetitivne imunohemijske metode prikazan je na slici br.5. Uzorak seruma se inkubira s an-



Slika 5: Mehanizam biotinske interferencije kod kompetitivnih metoda na primjeru određivanja Hepatitis e antitigena na VITROS platformi. Slučaj A kada nema viška biotina u uzorku, slučaj B kada se stvara višak biotina i pojava lažno reaktivnih rezultata (ref. 3)



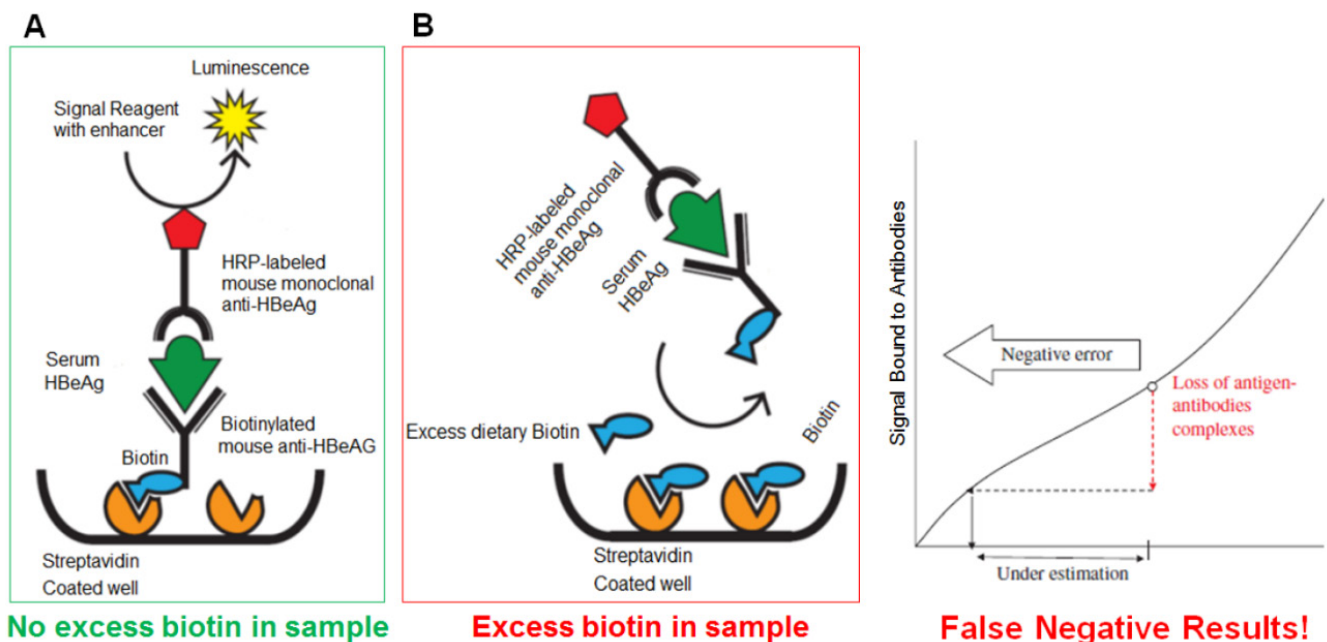


ti-HBe-specifičnim antitijelom, vezanim za HRP. Nakon toga, smjesi se dodaje biotinizirano anti-HBe-specifično antitijelo. Biotinizirani kompleks anti-HBe-protutijela zatim se veže za streptavidinom obloženu jažicu na čvrstoj fazi. Nakon uklanjanja tekuće faze, emitirana kemiluminiscencija obrnuto je proporcionalna anti-HBe u uzorku seruma (Slika 5A). Opisan je način na koji vrlo visoka doza biotina u serumu zasićuje mjesta vezanja streptavidina, što rezultira malim ili nikakvim vezanjem obilježenog kompleksa anti-HBe-antitijela na čvrstu fazu, a time i lažno pozitivnim anti-HBe (Slika 5B). U ovom primjeru, imunotestovi VITROS HBeAg i anti-HBe osjetljivi su na interferenciju biotina, što dovodi do klinički značajne promjene u kvalitativnim interpretacijama rezultata izvorno graničnog HbeAg (reaktivnog do negativnog rezultata) te izvorno anti-Hbe (negativnog do reaktivnog rezultata).

Nekompetitivne ili sendvič-metode se koriste uglavnom za određivanje većih molekula, iz-

među ostalih tu spadaju: TSH, PTH, C-peptid, feritin, prolaktin i dr (12). Koriste se dva protutijela i mjeri se količina antigena između dvaju slojeva antitijela. Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na antitijela. Primarno je antitijelo vezano za nosač i specifično je za antigen koji se određuje. Dodatkom uzorka, antigen koji se određuje veže se za primarno antitijelo. Postoji višak primarnog antitijela u odnosu na antigen. Zatim se dodaje sekundarno antitijelo koje je obilježeno (npr. sa HRP) i nastaje sendvič primarno antitijelo - antigenom obilježeno sekundarno antitijelo. U indikatorskoj reakciji dodatkom supstrata kojim je sekundarno antitijelo obilježeno razvija se boja, a jačina boje razmjerna je koncentraciji antigena u uzorku.

Mehanizam interferencije biotina u sendvič-formatu prikazan je na slici 6. Slučajem A na slici 6A je predstavljen normalan tok reakcije. Uzorak pacijenta, antitijela za detekciju i biotinizirana



Slika 6: Mehanizam biotinske interferencije kod nekompetitivnih metoda na primjeru određivanja Hepatitis e antitigena na VITROS platformi. Slučaj A kada nema viška biotina u uzorku, slučaj B kada se stvara višak biotina i pojava lažno negativnih rezultata (ref. 3)



antitijela dodaju se u reakcijsku posudu u kojoj se nalazi streptavidin vezan na čvrstu fazu. Biotinilirano antitijelo veže se na streptavidin. Analit od interesa bit će u sendviču između biotiniliranoga i detektirajućeg antitijela. Nevezane se tvari ispiru. Preostali signal bit će proporcionalan koncentraciji analita u uzorku.

Na slici 6B predstavljena je situacija kada imamo višak biotina u uzorku. Biotin će se vezati za mjesta streptavidina blokirajući biotinilirano antitijelo te stoga i analit od interesa. Biotinilirano antitijelo vezat će se za analit od interesa, ali, bez vezanja za čvrstu fazu, bit će isprano.

### **Neki praktični primjeri lažnih rezultata**

Na interferencije treba posumnjati kada rezultat testa nije u skladu sa širom kliničkom slikom (npr. pacijent bez simptoma disfunkcije štitnjače, ali ima abnormalne rezultate testa funkcije štitnjače). Identificiranje smetnji može biti veći izazov kod pacijenata s utvrđenom dijagnozom, kao što je karcinom, gdje se biomarkeri koriste za procjenu napredovanja bolesti ili usmjeravanje liječenja. Na primjer, tireoglobulin i kalcitonin koriste se kao rani pokazatelji recidiva bolesti kod bolesnika s diferenciranim i medularnim karcinomom štitnjače. Slično tome, kod raka prostate i testisa, rana identifikacija recidiva bolesti temelji se na antigenu specifičnom za prostatu i ljudskom korionskom gonadotropinu. Nesigurnost uzrokovana potencijalno lažnim rezultatom testa može biti posebno izazovna za te pacijente, stoga je važno da kliničari budu svjesni mogućih smetnji i da ispravno protumače anomalne rezultate. Prije nastavka s invazivnim postupcima/terapijama potrebno je provesti dodatne komplementarne testove i razmotriti smetnje.

### **Zaključak**

Premda biotin ima široku praktičnu primjenu, zaključak je kako visoke koncentracije biotina u bolesničkim uzorcima mogu rezultirati lažno pozitivnim ili negativnim rezultatima ispitivanja i posljedično pogrešnim dijagnozama. Shodno tome, izdane su brojne preporuke kako bi se potaknula svijest o uzimanju biotina kao dodatka prehrani i mogućoj interferenciji s dijagnostičkim testovima.

Kliničari moraju biti informirani i svjesni mogućih biotinskih interferencija pri interpretaciji rezultata, koje dobiju iz laboratorije.



## Reference

1. Wilson, D.R. (2017, October 18). Why do we need biotin (vitamin B7) preuzeto sa <https://www.medicalnewstoday.com/articles/could-vitamin-d-deficiency-increase-the-risk-of-heart-disease> (pristupljeno 21.08.2022)
2. Štraus B, Karmela B. Protein, u: Čepelak D. i Čvorišćec I. (ur.): Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb, 2009
3. Jose C. Jara Aguirre, “B” is for Biotin as a Potential Immunoassay Interference, *Pediatric and Maternal-Fetal Division News*; Volume 32, Issue 2, July 2018
4. Biotin: fact sheet for health professionals. National Institute of Health. Dostupno na: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Biotin-HealthProfessional/#h2> (pristupljeno 01.09.2022)
5. Colon, P.J, Greene, D, Biotin Interference in Clinical Immunoassays, May 2018, 02:06, 941-945
6. Chun, K.Y, Biotin Interference in Diagnostic Tests (2017), *Clinical Chemistry*, 63:2, 619
7. Liu, F., Zhang, J. & Mei, Y. The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system: A computational investigation through molecular dynamics simulations. *Sci Rep* 6, 27190 (2016).
8. Biotin and Streptavidin, preuzeto sa <https://www.aatbio.com/catalog/biotin-and-streptavidin> (pristupljeno 10.08.2022)
9. Bowen R, Benavides R, Colón-Franco J.M, Katzman B, Muthukumar A, Sadrzadeh H, Straseski J, Klause U, Tran N, Best practices in mitigating the risk of biotin interference with laboratory testing, *Clinical Biochemistry*, Volume 74, 2019, pages 1-11,
10. Clerico A, Plebani M, Biotin Interference on immunoassays methods: sporadic cases or hidden epidemic?, *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(6): 777-779
11. Li D, Ferguson A, Cervinski MA, Lynch KL, Kyle PB. *AACC guidance document on biotin interference in laboratory tests*. [Epub] *J Appl Lab Med* January 13, 2020,
12. Basok I, Biotin interference in immunoassays, *Int J Med Biochem* 2020;3(1):40-3 /
13. Luong J, Vashist S, Chemistry of Biotin–Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays, *ACS Omega* 2020 5 (1), 10-18,



## THE SIGNIFICANCE OF BIOTIN IN MEDICAL-LABORATORY DIAGNOSTICS

Šehagić N., Bliznović N.

### ABSTRACT

In the past five years, the institutions for food and drug testing have issued warnings to the public, laboratories, health care professionals, and people who design diagnostic tests about potential interferences caused by biotin. In this paper, we will briefly explain the structure of biotin, its biological function, the advantages and consequences of his use, his deficiency in the human body, application in various practices with an emphasis on the impact in immunochemistry in terms of test results and, consequently, wrong diagnoses.

**Key words:** *biotin, biotin concentration, biotin interference*

**Corresponding author:**  
**Nihada Šehagić**  
**Cantonal Hospital Zenica**  
**e:mail: n.gazic.l@gmail.com**



## ZNAČAJ PRAĆENJA REZISTENTNIH SOJEVA *ESCHERICHIA COLI* - SADAŠNJOST I BUDUĆNOST

Rusmira Hasandić Mehmedagić

### SAŽETAK

*Escherichia coli*, članica bakterijske porodice Enterobacteriaceae, najrašireniji je komenzalni stanovnik gastrointestinalnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja, ali ujedno i jedan od najvažnijih patogena koji uzrokuje mnoge bolesti. *Escherichia coli* čest je uzročnik po život opasnih infekcija krvotoka i drugih uobičajenih infekcija, poput infekcija mokraćnog sistema. Otpornost *E. coli* na antibiotike u stalnom je porastu od ranih 2000-ih uprkos pokušajima da se konroliše, pokazuju nove studije i predstavlja globalni, javnozdravstveni problem. Vjeruje se da je otpornost na antibiotike isključivi rezultat ljudske aktivnosti i terapije antibioticima. Tokom proteklih desetljeća razvijene su i primijenjene nove molekularne dijagnostičke tehnike za klasifikaciju patogena i otkrivanje otpornosti. Ove metode značajno su unaprijedile kliničku dijagnostiku. S obzirom da rutinske metode nisu uvijek prikladni i pridonose daljnjem povećanju antimikrobne rezistencije, danas se koriste neke nove tehnike poput Ramanove spektroskopije. Strategije za prevenciju i kontrolu širenja *E. coli* trebale bi uključivati pristup sigurnoj vodi, dobru praksu rukovanja kako bi se smanjio rizik od kontaminacije hrane, sanitarne mjere, javno obrazovanje i vakcinaciju.

**Autor za korespondenciju:**  
**Rusmira Hasandić -Mehmedagić**  
**dipl. ing. MLD;**  
**Hematološko – biohemijski laboratorij**  
**„HBL“, Istočno Sarajevo**  
**e-mail: rusmira.hasandic@hotmail.com;**  
**tel: 0038761/ 368-214**

### UVOD

*Escherichia coli*, članica bakterijske porodice Enterobacteriaceae, najrašireniji je komenzalni stanovnik gastrointestinalnog trakta ljudi i toplokrvnih životinja, kao i jedan od najvažnijih patogena. Kao komensal živi u obostrano korisnoj zajednici s domaćinima i rijetko uzrokuje bolesti. Međutim, takođe je jedan od najčešćih ljudskih i životinjskih patogena jer je odgovoran za širok spektar bolesti. Posebne karakteristike *E. coli*, poput jednostavnosti rukovanja, dostupnosti kompletne sekvence genoma i njene sposobnosti rasta u aerobnim i anaerobnim uslovima, čine je važnim organizmom domaćinom u biotehnologiji. *E. coli* se koristi u raznim primjenama u industrijskom i medicinskom području





i to je mikroorganizam koji se najviše koristi u području tehnologije rekombinantne DNA (1).

Patogena bakterija *Escherichia coli*, koja uzrokuje dijareju, najopasniji je patogeni mikroorganizam u hrani zbog svoje rasprostranjenosti u prirodnom okruženju i sposobnosti prisvajanja virulentnosti horizontalnim transferom gena iz drugih mikroba. Mehanizmi patogenosti su intrigantni, počevši od enterotoksigenog soja *E. coli* (ETEC) pa sve do virulentnijeg enterohemoragijskog soja (EHEC). Napredak u molekularnoj dijagnostici doveo je do razvoja novih metoda brzog određivanja prisutnosti i broja te bakterije i sličnih patogenih bakterija u kliničkim uzorcima, hrani i okolini (2).

*Escherichia coli* čest je uzročnik po život opasnih infekcija krvotoka i drugih uobičajenih infekcija, poput infekcija mokraćnog sistema. Stope rezistencije *E. coli* na antibiotike brzo rastu, posebno u odnosu na fluorokinolone i cefalosporine treće i četvrte generacije. Iznenadujuće, većina ovih sojeva rezistentnih na više lijekova stečena je u zajednici, a ne u zdravstvenim ustanovama. *E. coli* otporna na lijekove lako se dobija putem prehrane (hrana i voda), a svaki dan postoji veliki promet *E. coli* otporne na lijekove (3). Ono što ostaje nejasno je odakle dolazi *E. coli* otporna na lijekove u našoj hrani. Jesu li uglavnom ljudski sojevi koji zagađuju našu hranu (i vodu) ili su ti sojevi uglavnom poticali od životinja koje se hrane hranom (3).

### **Pojava i širenje otpornosti *E. Coli* na antibiotike**

Pojava antibakterijske rezistencije kod *E. coli* i drugih bakterija je multifaktorska, ali je uporedna s uključivanjem ovih sredstava u

terapiju u humanoj i veterinarskoj medicini. Podaci pokazuju da *E. coli* pokazuje najveću stopu rezistencije na one antibiotike koji su najduže u upotrebi, što dokazuje visoka stopa rezistencije u cijelom svijetu na sulfonamide, čija je primjena kod ljudi započela 1930-ih godina, a njegovi prvi klonovi otporni na *E. coli* identifikovani su još 1950 (4).

Vjeruje se da je otpornost na antibiotike isključivi rezultat ljudske aktivnosti i terapije antibioticima; međutim, genomske studije ljudskih bakterijskih komezala i bakterija iz okoline otkrile su prisustvo značajnog broja determinanti otpornosti unutar njihovih genoma koje nisu stečene horizontalnim prenosom i prethodile su kliničkom uvođenju antibiotika. Ova vrsta otpornosti poznata je kao intrinzična rezistencija i pruža selektivnu korist sojevima koji proizvode inhibicijom ili eliminacijom drugih bakterija koje se takmiče za resurse (4).

Unutrašnja rezistencija razlikuje se od novorazvijene vanjske rezistencije na antibiotike po tome što u prvoj nema doprinosa ljudskih aktivnosti, a druga je uglavnom vođena pritiskom odabira antibiotika. U trenutnom razdoblju povećanja rezistentnosti i nedostatka novih antibakterijskih sredstava, proučavanje intrinzičke rezistencije postaje vrlo privlačno kao novi mehanizam za suzbijanje bakterijske rezistencije, jer inhibicija elemenata koji čine intrinzični rezistom čini bakterije hiperosjetljivima na antibiotike. U slučaju Gram-negativnih bakterija, kao što je *E. coli*, dva glavna faktora koji doprinose intrinzičnoj rezistenciji bakterije su njena vanjska membrana, koja je nepropusna za mnoge molekule, i njeno izražavanje brojnih efluksnih pumpi, koje učinkovito smanjuju unutarćelijsku koncentraciju određenih antibiotika (4).



Tokom 1945., samo nekoliko godina nakon uvođenja penicilina u kliničku praksu, Alexander Fleming upozorio je svijet na prekomjernu upotrebu antibiotika, a upozorenje je postalo stvarnost nekoliko godina kasnije kada je objavljeno da je prvi soj *S. aureus* otporan na penicilin. Prijavljene aktivnosti koje su dovele do prekomjerne upotrebe antibiotika su višestruke i uključuju različite industrije kao što su zdravstvena, stočarska i farmaceutska industrija. Primjeri ovih aktivnosti uključuju neodgovarajuće propisivanje antibiotika od strane pružatelja zdravstvenih usluga, opsežnu upotrebu antibiotika u uzgoju stoke i ribe, pacijente koji ne slijede režime liječenja antibioticima, lošu higijenu, bakterijske mutacije i nedostatak razvijenih novih antibiotika (4).

### Osvrt na sadašnja istraživanja o pojavi rezistentnosti *E. coli*

Otpornost *E. coli* na antibiotike u stalnom je porastu od ranih 2000-ih uprkos pokušajima da se kontrolira, pokazuju nove studije. U najvećem genomskom istraživanju *E. coli* do sada, koje je trajalo više od 16 godina u Norveškoj, istraživači su uspješno pratili širenje gena otpornih na antibiotike i pokazali da se ti geni prenose između sojeva *E. Coli* (5).

Istraživači s instituta Wellcome Sanger i Sveučilišta u Oslu pratili su otpornost na više lijekova u Norveškoj i uporedili to s prethodnom studijom iz Ujedinjenog Kraljevstva. Otkrili su da su se otporni sojevi razvili otprilike u isto vrijeme, ali su se brže povećali u populaciji Ujedinjenog Kraljevstva (5).

Rezultati, objavljeni danas prošle godine u časopisu *Lancet Microbe* pokazuju da je praćenje ovih rezistentnih sojeva važno u na-

dzoru i kontroli *E. coli* otporne na lijekove, koja predstavlja značajan problem u bolnicama gdje može uzrokovati ozbiljne infekcije i smrtnost. Osim toga, razumijevanje načina na koji se ti geni prenose između sojeva i što je uzrokovalo sticanje otpornosti na lijekove može pomoći u sprječavanju rasta sojeva otpornih na antibiotike (5).

### Savremeni pristupi u istraživanju antimikrobne rezistencije

Porast otpornosti na antimikrobne lijekove globalni je javnozdravstveni izazov. Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD) predviđa da će 2,4 milijuna ljudi u Europi, Sjevernoj Americi i Australiji umrijeti od infekcija uzrokovanih rezistentnim mikroorganizmima prije 2050. godine. U nedavnoj studiji pokazalo se da je ~28% svih smrti uzrokovanih rezistencijom uzrokovano sojevima *Escherichia coli* koji su otporni na  $\beta$ -laktame proširenog spektra (ESBL) ili karbapeneme (CRE). Kako se ove bakterije šire i razvijaju po cijelom svijetu, poduzimaju se globalne mjere kako bi se smanjila nepotrebna upotreba antibiotika zadnje nužde. Međutim, zbog ograničenja mikrobioloških dijagnostičkih metoda to često nije izvodivo (6). Rutinske mikrobiološke tehnike koje se koriste u kliničkim laboratorijima zahtijevaju najmanje 48 sati i do 4 dana da daju rezultate o otpornosti patogena. To navodi liječnike da koriste empirijsko liječenje temeljeno na istoriji pacijenta i stopama otpornosti zdravstvenih ustanova. Ovi tretmani nisu uvijek prikladni i pridonose daljnjem povećanju antimikrobne rezistencije (6).

Stoga postoji potreba za brzim i pouzdanim dijagnostičkim postupcima kako bi se omogućilo brzo i učinkovito liječenje.



Tokom proteklih desetljeća razvijene su i primijenjene nove molekularne dijagnostičke tehnike za klasifikaciju patogena i otkrivanje otpornosti. Ove metode značajno su unaprijedile kliničku dijagnostiku, ali imaju nekoliko nedostataka: prvenstveno visoku cijenu potrošnog materijala te potrebu za opsežnom infrastrukturom i posebno obučanim osobljem. Nadalje, u slučaju PCR testova, metoda se ne primjenjuje kada se nove mutacije prirodno pojavljuju jer je potrebno prethodno znanje za dizajn testa. Stoga ostaje potreba za osjetljivom, specifičnom, brzom i pouzdanom metodom za otkrivanje rezistencije na antibiotike (6). Ramanova spektroskopija je nova tehnika s velikim potencijalom za kliničku primjenu. Može se primijeniti na bakterijske ćelije uz minimalnu pripremu uzorka. Ramanova spektroskopija ispituje hemijski otisak bakterijskih ćelija i kultura, bez potrebe za vanjskim reagensima i skupim potrošnim materijalom. Budući da se različiti sojevi bakterija razlikuju po svom hemijskom sastavu, te su razlike zabilježene u njihovom Ramanovom spektru i mogu se procijeniti pomoću hemometrijskih metoda (6).

### **Mehanizam rezistencije na antibiotike**

Antibiotici koji pripadaju klasi  $\beta$ -laktama dijele zajedničku karakteristiku: prsten s tri ugljenika i jednim kiseonikom (beta-laktamski prsten), koji je molekularni sastojak odgovoran za bakteriolitički mehanizam djelovanja ovih sredstava protiv bakterija.  $\beta$ -laktami djeluju tako da inhibiraju bakterijsku sintezu peptidoglikana, vitalnog sastojka ćelijskog zida mikroorganizma. Ciljevi za djelovanje beta-laktamskih antibiotika poznati su kao proteini koji vežu penicilin (PBP) (4).

Bakterije su razvile različite mehanizme otpornosti na  $\beta$ -laktame: (a) Inaktivacija ovih agenasa proizvodnjom beta-laktamaza; (b) smanjeno prodiranje antibiotika do ciljanog mjesta; (c) promjena PBP-a ciljnog mjesta; i (d) efluks iz periplazmatskog prostora kroz specifični mehanizam pumpanja. Međutim, u slučaju *E. coli*, otpornost na ove antibiotike je posredovana proizvodnjom skupine enzima koji se nazivaju " $\beta$ -laktamaze". Ovi enzimi su drevni spojevi, koji trenutno premašuju 2800 jedinstvenih proteina, koji su proizašli iz izvora iz okoline (4).

Do danas se  $\beta$ -laktamaze obično klasifikuju na temelju funkcionalnih ili strukturnih kriterija. Trenutno je najčešće korištena klasifikacija za ove enzime Amblerova strukturalna klasifikacija, koja se temelji na sličnosti sekvenci i razdvaja ove proteine u četiri klase: klase A, C i D serin- $\beta$ -laktamaza i klasa B metalo- $\beta$ -laktamaze (4).

Gram-negativne bakterije razvile su proizvodnju različitih  $\beta$ -laktamaza; u slučaju *E. coli*, s medicinskog stajališta najvažnije su  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL),  $\beta$ -laktamaze AmpC (AmpC) i karbapenemaze. Svaka od ovih skupina enzima ima različit spektar hidrolitičke aktivnosti, pokazujući otpornost na različite vrste  $\beta$ -laktama (Tabela1) (4).

### **Klasifikacija rezistentnih sojeva *E. Coli***

Otpornost na karbapenem uzrokovana je proizvodnjom enzima poznatih kao karbapenemaze, koji razgrađuju karbapeneme. To je glavni izvor zabrinutosti, s obzirom na sposobnost širenja sojeva *E. coli* u bolnicama, zdravstvenim ustanovama i potencijalno među opšom populacijom. Tokom jedne studije naučnici su radili u suradnji





**Tabela 1. Spektar aktivnosti glavnih tipova  $\beta$ -laktamaza koje proizvodi *Escherichia coli* (4)**

| $\beta$ -laktamaze                                  | Spektar djelovanja  | Inhibicija inhibitorima $\beta$ -laktamaze | Djelovanje protiv cefalosporina širokog spektra |
|---|---|--|---|
| ESBL  | Penicilini<br>Cefalosporini prve do treće generacije<br>Monobaktami | Da   | Ne  |
| AmpC  | Penicilini<br>Cefalosporini prve do treće generacije<br>Monobaktami | Ne   | Da  |
| Karbapenemaze<br>Klasa B metalo- $\beta$ -laktamaze | Svi $\beta$ -laktami osim aztreonama                                | Ne   | Da  |
| Karbapenem-hidrolizirajuća oksacilinaza-48          | Svi $\beta$ -laktami osim cefalosporina širokog spektra             | Ne   | Slabo   |

s platformom Instituta Pasteur Biomix na sekvencioniranju genoma više od 700 sojeva *E. coli* koji proizvode karbapenemazu prikupljenih u laboratoriji u Nacionalnom referentnom centru za rezistenciju na antibiotike, sa sjedištem u bolnici Bicêtre. Detaljna bioinformatička analiza ovih genoma zatim je korištena za klasificiranje rezistentnih sojeva *E. coli* u tri kategorije i za razvoj hipoteza o njihovom uticaju na javno zdravlje:

➤ Sojevi otporni na više lijekova s nekoliko drugih gena otpornosti, kao i genom karbapenemaze i mutacijama koje takođe pridonose njihovoj otpornosti na različite antibiotike. Ti se sojevi mogu širiti i treba

ih smatrati rizičnim klonovima koje treba nadzirati kao prioritet.

- Dominantna loza rezistentnih sojeva koji su se takođe proširili, u kojima je gen karbapenemaze integrisan u hromosom na stabilan način, za razliku od drugih sojeva koji ga nose u plazmidu, dodatnom dijelu DNK koji nije neophodan za preživljavanje bakterija. To pridonosi širenju ovih bakterija i smanjuje troškove prikladnosti koje plazmid predstavlja za *E. coli*. Takođe se smatra da ti sojevi imaju visok patogeni potencijal.
- Sojevi koji su osjetljivi na više lijekova i čini se da su nedavno dobili plazmid koji nosi gen karbapenemaze od druge



bakterije. Ovi sojevi ne predstavljaju rizik u terapijskom smislu jer su osjetljivi na nekoliko antibiotika, ali bi mogli pridonijeti širenju gena karbapenemaze (7).

Među analiziranim sojevima, sojevi *E. coli* iz rizičnih linija s visokim patogenim potencijalom koji su često odgovorni za infekcije na kraju su se pokazali rijetkima – opažanje koje je bilo ohrabrujuće (7).

### Prevenција i širenje *E. Coli*

Uopšteno, strategije za prevenciju i kontrolu širenja *E. coli* trebale bi uključivati pristup sigurnoj vodi, dobru praksu rukovanja kako bi se smanjio rizik od kontaminacije hrane, sanitarne mjere, javno obrazovanje i vakcinaciju. Pristup sigurnoj vodi primarni je cilj za prevenciju infekcija *E. coli*. Mjere za sprječavanje infekcija od prehrambenih proizvoda uključuju odgovarajuće temperature skladištenja i kuvanja (1).

Bolničke mjere koje ograničavaju rizik od širenja multirezistentnih patogena uključuju prevenciju unakrsne kontaminacije primjenom strogih higijenskih standardnih protokola kao i kontrolu nad upotrebom antimikrobnih lijekova. Glavni prijenosnici širenja patogena su ruke bolničkih radnika i medicinski uređaji. Pravilna higijena ruku ključna je za sprječavanje unakrsne kontaminacije (1).

Antibiotici su neophodni za kontrolu i liječenje infekcija *E. coli* kod ljudi i životinja. Međutim, uopšteno je prihvaćeno da je antimikrobna rezistencija povezana s količinom konzumiranja antibiotika. Neodgovarajuća upotreba i zloupotreba antimikrobnih sredstava povećala je otpornost patogena kao i normalne ljudske bakterijske flore u oba slučaja. Nadalje, široka rasprostranjenost antimikrobne terapije takođe rezultuje os-

lobađanjem antibiotika i gena otpornosti na antibiotike u okolinu s posljedičnom selekcijom rezistentnih bakterija (1).

Zbog toga bi racionalna i odgovorna primjena antibiotika trebala biti preduslov za prevenciju nastanka i prenosa rezistentnih bakterija. Nadalje, odgovarajuće strategije za praćenje i nadzor upotrebe antibiotika bitne su za kontrolu rezistencije, za kontrolu promjena u bakterijskim populacijama i za razvoj prikladnih terapijskih strategija. Konačno, veću pažnju treba posvetiti rizicima povezanim s otpuštanjem antimikrobnih sredstava u okolinu (1).

Probiotici bi mogli biti pristup profilaksi nekoliko infekcija *E. coli*. Probiotici su održivi i sigurni mikroorganizmi, uglavnom iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji su sposobni kolonizovati crijevni trakt i na taj način se takmičiti s patogenim bakterijama (1).

Vakcinacija može biti važna primarna strategija prevencije za ljude protiv najštetnijih sojeva, kao što su ETEC, UPEC i NMEC. Do danas još nije dostupno učinkovita vakcina za prevenciju ovih infekcija (1).

### Smjernice za budućnost

Fenomen rezistencije bakterija na antibiotike je multifaktorijalan i zavisi od međudjelovanja brojnih faktora, ali zajednički faktor je očito pretjerana upotreba antibiotika, kako kod ljudi tako i kod životinja. Stoga cijelom svijetu ozbiljno trebaju antibiotski ili antimikrobni programi upravljanja koji bi trebali spriječiti prekomjernu upotrebu antibiotika i time smanjiti otpornost na antibiotike (8).

S druge strane, sve to nije dovoljno ako neka socioekonomska pitanja ostanu neriješena, poput loše higijene, nedostatka pitke vode ili



loših životnih uslova. Ovi faktori samo povećavaju ozbiljnost problema otpornosti na antibiotike i nadilaze jednostavno ograničavanje potrošnje antibiotika. Očito, znajući sve gore navedene činjenice, rješenje problema rezistencije na antibiotike ili više lijekova nije jednostavno, već zahtijeva integrirane napore svih strana (8).

Od vitalne je važnosti pažljivo i kontinuirano pratiti higijenske uslove u bolnicama, kao i metode odlaganja otpada. Što se tiče liječenja bolesnika s bakterijskim infekcijama, takve je bolesnike potrebno pažljivo pregledati kako bi se donijela ispravna odluka o izboru antibiotika koji će se dati. Moramo nastaviti procjenjivati osjetljivost na antibiotike kod ljudi i životinja dok takođe radimo na razvoju i provedbi pouzdanih antibiotskih strategija (8).

Ako se ozbiljno i odgovorno uhvatimo u koštac s ovom problematikom i poduzmemo sve potrebne korektivne radnje, možda ćemo ponovno uspostaviti kontrolu nad infekcijama *E. coli*, kako u Evropi, tako i u cijelom svijetu (8).

### Zaključak

*Escherichia coli* je jedna od najviše proučavanih bakterija u svijetu i nedvojbeno je najbolje poznata od svih modelnih mikroorganizama. U kontekstu ljudske i životinjske ekologije, ovaj mikroorganizam učestvuje i kao komensal crijeva, kao jedna od prvih bakterijskih vrsta koja ga je kolonizirala odmah nakon rođenja, i kao jedan od najvažnijih ljudskih i životinjskih patogena, koji može uzrokovati crijevne i vancrijevne infekcije. Kod ljudi, *E. coli* je najčešći uzročnik infekcija mokraćnog sistema i identifikovana je kao uzročnik bolesti u gotovo svakom anatomskom dijelu ljudskog tije-

la, uzrokujući upalu slijepog crijeva, upalu pluća, krvotok, gastrointestinalne infekcije, kožne apscese, intra- amnionsku i puerperalnu infekciju kod trudnica, meningitis i endokarditis. Nadalje, *E. coli* može uzrokovati i infekcije stečene u zajednici i infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi, i može izazvati bolest u svim dobnim skupinama (9).

Drastično povećanje prevalencije bakterijske rezistencije na antibiotike postalo je veliki zdravstveni problem u cijelom svijetu. Česta izloženost ljudi antimikrobnim agensima znatno pridonosi širenju otpornosti na antimikrobne lijekove i razvoju bakterija otpornih na antimikrobne lijekove. Na primjer, izolati bakterije *Escherichia coli* otporni na antimikrobne lijekove koji se javljaju kod životinja liječenih antibioticima mogu zaraziti ljude. Povećana konzumacija biljne prehrane povezana je s povećanim brojem infekcija i epidemija kod ljudi jer bi voće i povrće moglo djelovati kao rezervoar za patogene ili oportunističke patogene. Nadalje, bakterije otporne na antimikrobne lijekove takođe se mogu prenijeti na ljude preko prehrambenog lanca i vode, što dodatno utiče na ljudsko zdravlje (10).

Pokazalo se da kombinacija antibiotika i nanočestica metalnog oksida smanjuje toksičnost i povećava antibakterijsku, antiviralnu i antikancerogenu učinkovitost sredstava. Osim toga, rješavaju se problemi otpornosti na više lijekova i omogućiće razvoj sveobuhvatnog, pouzdanog i racionalnog plana liječenja. Očekuje se da će buduća istraživanja dovesti do novih istraživačkih mogućnosti, koje bi trebale biti od pomoći za buduće primjene u biomedicinskoj nauci (11).



## LITERATURA

1. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.
2. Pavankumar, A. R., & Sankaran, K. (2008). Primjena novih metoda kontrole patogenih oblika bakterije *Escherichia coli*. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 125-145.
3. Collignon, P. (2009). Editorial commentary: resistant *Escherichia coli*—we are what we eat. *Clinical infectious diseases*, 49(2), 202-204.
4. Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 6-4.
5. Kern, W. V., & Rieg, S. (2020). Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clinical microbiology and infection*, 26(2), 151-157.
6. Nakar, A., Pistiki, A., Ryabchykov, O., Bocklitz, T., Rösch, P., & Popp, J. (2022). Detection of multi-resistant clinical strains of *E. coli* with Raman spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 414(4), 1481-1492.
7. Patiño-Navarrete, R., Rosinski-Chupin, I., Cabanel, N., Zongo, P. D., Héry, M., Oueslati, S., & Glaser, P. (2022). Specificities and Commonalities of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated in France from 2012 to 2015. *Msystems*, 7(1), e01169-21.
8. Puvača, N., & de Llanos Frutos, R. (2021). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and Pet animals. *Antibiotics*, 10(1), 69.
9. Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *E. Coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*, 1-20.
10. Aabed, K., Moubayed, N., & Alzaharani, S. (2021). Antimicrobial resistance patterns among different *Escherichia coli* isolates in the Kingdom of Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 28(7), 3776-3782.
11. Muzammil, S., Hayat, S., Fakhar-Alam, M., Aslam, B., Siddique, M. H., Nisar, M. A., ... & Wang, Z. (2018). Nanoantibiotics: Future nanotechnologies to combat antibiotic resistance. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 10(2), 352-374.



## THE SIGNIFICANCE OF MONITORING RESISTANT STRAINS OF ESCHERICHIA COLI - PRESENT AND FUTURE

Hasandić Mehmedagić R.

### ABSTRACT

*Escherichia coli*, a member of the bacterial family Enterobacteriaceae, is the most widespread commensal inhabitant of the gastrointestinal tract of humans and warm-blooded animals, but also one of the most important pathogens that causes many diseases. *Escherichia coli* is a common cause of life-threatening bloodstream infections and other common infections, such as urinary tract infections. Antibiotic resistance in *E. coli* has been on the rise since the early 2000s despite efforts to control it, new studies show, and is a global public health problem. Antibiotic resistance is believed to be the sole result of human activity and antibiotic therapy. Over the past decades, new molecular diagnostic techniques have been developed and applied to classify pathogens and detect resistance. These methods significantly improved clinical diagnostics. Considering that routine methods are not always suitable and contribute to the further increase of antimicrobial resistance, some new techniques such as Raman spectroscopy are used today. Strategies to prevent and control the spread of *E. coli* should include access to drinking water, good handling practices to reduce the risk of food contamination, sanitation, public education, and vaccination.

**Corresponding author:**  
**Rusmira Hasandić-Mehmedagić**  
**rusmira.hasandic@hotmail.com**  
**tel: 0038761/ 368-214**



## ZNAČAJ ODREĐIVANJA INR-a (INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO)

Emina Muftić

### SAŽETAK

Zgrušavanje ili koagulacija krvi jeste zaštitni mehanizam organizma protiv krvarenja. Kada dođe do oštećenja krvnog suda, događa se niz reakcija koje uključuju supstance koje se prirodno nalaze u krvi i koje su poznate pod nazivom faktori zgrušavanja ili faktori koagulacije. Obično zgrušavanje započinje spontano onda kada dođe do manjeg ili većeg krvarenja iz oštećenog krvnog suda. Međutim, postoji nekoliko stanja koja mogu uzrokovati stvaranje krvnih ugrušaka u odsustvu aktivnog krvarenja. Kada se to dogodi, osoba može biti izložena povećanom riziku od tromboembolijske bolesti. Kod tromboembolijske bolesti, fragmenti krvnih ugrušaka se odvajaju i cirkulišu u krvi, što potencijalno ometa krvne sudove u plućima i izaziva plućnu emboliju, ili sudove u srcu kada izaziva srčani udar, ili u mozgu kada izaziva moždani udar. Svaka od ovih komplikacija je potencijalno fatalna. Stoga, kada je osoba izložena velikom riziku prethodno pomenutih stanja (npr. raniji moždani udar ili srčani udar), koriste se antikoagulansi (lijekovi koji razrjeđuju krv i smanjuju stvaranje ugrušaka) kako bi se rizik od formiranja krvnih ugrušaka smanjio. Ljudi kojima je iz nekog razloga potrebna dugotrajna antikoagulantna terapija, obično se propisuje antikoagulantni lijek (npr. varfarin) koji se može uzimati u obliku tableta umjesto injekcije. Ovaj način antikoagulacije se često naziva oralna antikoagulantna terapija.

INR- je laboratorijski određeno vrijeme koje je potrebno krvi da se formira ugrušak. Ovim testom se prati antikoagulantna terapija kao i otkrivanje poremećaja zgrušavanja krvi. Cilj ovog rada je djelovanje antikoagulantne terapije kod pacijenata sa fibrilacijom atrijske ili koji imaju vještačke zalistice. Kod ovakvih pacijenata INR treba da bude između 2-3. Vrijednost iznad 3 ukazuje na to da je krv previše razrijeđena, te to sa sobom nosi rizik od krvarenja, dok vrijednost od 4,5 mogu izazvati masivna krvarenja. S druge strane INR ispod 2 pokazuje da je krv gušća nego što bi trebala biti, pa takvo stanje povećava rizik od embolije pluća, srčanog ili moždanog udara. U ovom istraživanju pacijentima smo radili INR na mjesečnom nivou i postigli željeni rezultat u 67% slučajeva. Pacijenti vremenom nauče šta utiče na antikoagulantnu terapiju kao što je ishrana bogata zelenim povrćem, suplementi, antibiotici, statini...

**Autor za korespondenciju:**

**Emina Muftić dipl. ing. MDL**

**Služba za laboratorijsku dijagnostiku**

**J. U. Dom zdravlja Vareš**

**Zvijezda 18 71330 Vareš**

**e-mail adresa: [eminamuftic10@gmail.com](mailto:eminamuftic10@gmail.com)**

**Broj telefona: 38761584866**



## KOAGULACIJA ILI ZGRUŠAVANJE KRVI?

Zgrušavanje ili koagulacija krvi jeste zaštitni mehanizam organizma protiv krvarenja. Kada dođe do oštećenja krvnog suda, događa se niz reakcija koje uključuju supstance koje se prirodno nalaze u krvi i koje su poznate pod nazivom faktori zgrušavanja ili faktori koagulacije. Obično zgrušavanje započinje spontano onda kada dođe do manjeg ili većeg krvarenja iz oštećenog krvnog suda. Međutim, postoji nekoliko stanja koja mogu uzrokovati stvaranje krvnih ugrušaka u odsustvu aktivnog krvarenja. Kada se to dogodi, osoba može biti izložena povećanom riziku od tromboembolijske bolesti. Kod tromboembolijske bolesti, fragmenti krvnih ugrušaka se odvajaju i cirkulišu u krvi, što potencijalno ometa krvne sudove u plućima i izaziva plućnu emboliju, ili sudove u srcu kada izaziva srčani udar, ili u mozgu kada izaziva moždani udar. Svaka od ovih komplikacija je potencijalno fatalna. Stoga, kada je osoba izložena velikom riziku prethodno pomenutih stanja (npr. raniji moždani udar ili srčani udar), koriste se antikoagulansi (lijekovi koji razrjeđuju krv i smanjuju stvaranje ugrušaka) kako bi se rizik od formiranja krvnih ugrušaka smanjio. Ljudi kojima je iz nekog razloga potrebna dugotrajna antikoagulantna terapija, obično se propisuje antikoagulantni lijek (npr. varfarin) koji se može uzimati u obliku tableta umjesto injekcije. Ovaj način antikoagulacije se često naziva oralna antikoagulantna terapija.

## ŠTA JE PROTROMBINSKO VRIJEME (PV)?

Protrombinsko vrijeme je test za otkrivanje poremećaja zgrušavanja kao i za praćenje antikoagulantne terapije. Negdje se još koristi i naziv Quickov test. Vrijednosti testa izražene su u postotku (1.0 = 100%). Normalna vrijednost PV-a je jednako ili više od 0.70. Snižene vrijednosti uka-

zuju na povećanu sklonost krvarenju. PV-INR je univerzalna mjera izražavanja PVa u pacijenata na stabiliziranoj oralnoj antikoagulantnoj terapiji

## ŠTA JE INR (INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO) TEST ?

International normalized ratio (INR) je laboratorijski određeno vrijeme koje je potrebno krvi da se formira ugrušak. Koristi se za određivanje uticaja oralnih antikoagulantnih lijekova na sistem zgrušavanja. INR se koristi od 1983. godine i predstavlja standardizovanu metodu izvještavanja o uticaju oralnog antikoagulantnog lijeka poput pomenutog varfarina na zgrušavanje krvi. Pre toga, efekti varfarina na zgrušavanje krvi određivani su laboratorijskom metodom poznatom kao protrombinsko vrijeme. Merenje protrombinskog vremena ima svoje prednosti, uključujući to što je jeftino i jednostavno izvodljivo. Međutim, nedostatak ove metode je u tome što se javljaju velike razlike u dobijenim vrijednostima, zavisno od laboratorije koja je radila merenje - različiti komercijalni mjerni sistemi mogu dati različite rezultate. Stoga je bilo nemoguće uporediti rezultate koji dolaze iz različitih laboratorija. U pokušaju da se prevaziđe varijabilnost između laboratorija, protrombinska vremena su u početku izražena kao odnos protrombinskog vremena kontrolne vrijednosti. Kontrolna vrijednost bila je prosjek protrombinskog vremena od 20 ili više zdravih ispitanika. Iako je izražavanje protrombinskog vremena u odnosu na kontrolnu vrijednost bilo posmatrano kao poboljšanje, ono i dalje nije bilo adekvatno. Potom je u konačnu kalkulaciju primenjen međunarodni indeks osjetljivosti (ISI) kako bi se dobio INR. INR uzima u obzir varijabilnost rezultata dobijenih korišćenjem različitih komercijalnih testova pri izračunavanju rezultata. Na



ovaj način se lakše razumiju rezultati različitih laboratorija i zemalja i dobija se vrijednost koja se može univerzalno tumačiti i interpretirati.

## ŠTA SE TESTIRA?

Protrombin je protein kojeg stvara jetra. To je jedan od nekoliko proteina, poznatih kao faktori zgrušavanja (faktori koagulacije), koji održavaju viskoznost krvi. INR test mjeri ovaj faktor zgrušavanja mjereći koliko dugo je potrebno da vam se krv zgruša.

## ZAŠTO JE POTREBAN INR TEST?

Antikoagulantni lijekovi koriste se za sprječavanje stvaranja ugrušaka u krvi. Obično se propisuju osobama koje imaju atrijsku fibrilaciju ili koji imaju vještačke zalistke. Mjera koliko dobro djeluje antikoagulantni lijek oslikava se time što se produžava vrijeme zgrušavanja krvi. Djelovanje ovih lijekova kod ovakvih bolesnika, prati se upravo INR testom. INR test pomaže u balansiranju rizika od unutrašnjeg krvarenja u odnosu na rizik od prevelikog zgrušavanja krvi. Redovno praćenje INR kod ljudi koji koriste antikoagulantnu terapiju potrebno je kako bi se uravnotežio rizik od prekomjernog krvarenja i sa druge strane zgrušavanja ili tromboze. U ovakvim slučajevima referentne vrijednosti INR jesu 2-3. Vrijednosti INR-a iznad 3, ukazuju na to da je krv previše razrijeđena, te to sa sobom nosi rizik od krvarenja, dok vrijednosti preko 4,5 mogu dovesti masivnog krvarenja. Sa druge strane INR ispod 2, pokazuje da je krv gušća nego bi trebalo biti, pa takvo stanje povećava rizik za stvaranje tromba, a to dalje može dovesti do embolije pluća ili pak srčanog ili moždanog udara.

Dokazi ukazuju da će učestalije testiranje rezultirati optimalnijom distribucijom INR vrijedno-

sti u očekivanim okvirima. Na primjer, studije sugerišu da se željeni rezultati postižu u 50% urađenih INR mjerenja ako se radi na mjesečnom nivou. Ako se INR određivanje sporovodi na sedmičnom nivou, optimalni rezultati se očekuju u oko 85% slučajeva.

## KOLIKO ČESTO JE POTREBNO ODREĐIVATI INR?

Nakon započinjanja terapije antikoagulantnim lijekovima, praćenje protrombinskog vremena / INR odvija se svakodnevno dok se ciljani INR ne postigne i održi najmanje dva uzastopna dana. Nadgledanje se zatim vrši svaka 2-3 dana tokom narednih nekoliko sedmica, a zatim sa opadajućom učestalošću u zavisnosti od stabilnosti rezultata. Ako INR ostane stabilan, testiranje se može sprovoditi na sedmičnom nivou. Međutim, kao što je već pomenuto, češće testiranje omogućava češće prilagođavanje doze, a to znači da je vjerovatnoća da INR osobe ostane unutar terapijskog opsega samim tim veća.

## ŠTA MOŽE UTICATI NA INR VRIJEDNOST?

Poznato je da mnogi lijekovi, hrana, pa čak i neke udružene bolesti, utiču na antikoagulantnu terapiju i zato ometaju INR vrijednost. Ono što može uticati na pomenute vrijednosti ovog testa je ishrana bogata zelenim povrćem, suplementi, antibiotici, kardiološki lijekovi poput amiodarona ili propranolola, statini i slično.

## POSTUPAK ODREĐIVANJA INR TESTA

Kao i većina laboratorijskih testova INR se određuje iz krvi bolesnika, gdje se dodaju određeni reagensi, te se prati protrombinsko vrijeme.





COAG S INR sistem reagensa sastoji se od rekombinantnih molekula tkivnog faktora i izolovanih lipida iz prirodnih izvora (tromboplastin potreban za iniciranje koagulacije), osim jona kalcijuma u puferiranom obliku. Vrijednosti INR određene COAG S INR TEST reagensima su osjetljive na prisustvo antagonista vitamina K. Stoga su vrijednosti INR izmjerene na COAG S INR TEST SISTEMU optimalne za praćenje oralne antikoagulantne terapije. U COAG S INR test sistemu rekombinantni tromboplastinski reagens (R1) rastvoren u puferu R2 indukuje stvaranje fibrinskog ugruška nakon dodavanja uzorka krvi ili plazme pacijenta. Stvaranje fibrinskog ugruška se može detektovati odgovarajućim optičkim mjernim instrumentima. Coag S uređaj koristi optičku turbidimetriju kao sistem za detekciju.

Dia-PT tromboplastin je ekstrakt mozga kunića, koji sadrži tkivni faktor, lipide i jone kalcija. Rastvarač je pufer koji sadrži jone kalcijuma i konzervans. Ovaj reagens se koristi za određivanje protrombinskog vremena (PT). Dia-PT prema Quicku je osjetljivi skrining test za ekstrinzični put koagulacije. Dia-PT kao reagens

za PT je visoko osjetljiv na antagoniste vitamina K, smanjen nivo faktora u vanjskom putu (faktor II, V, VII i X), nasljedne ili stečene poremećaje koagulacije i zatajenje jetre. Stoga se PT sa Dia-PT koristi za prehirurški skrining i praćenje djelovanja oralne antikoagulantsne terapije.

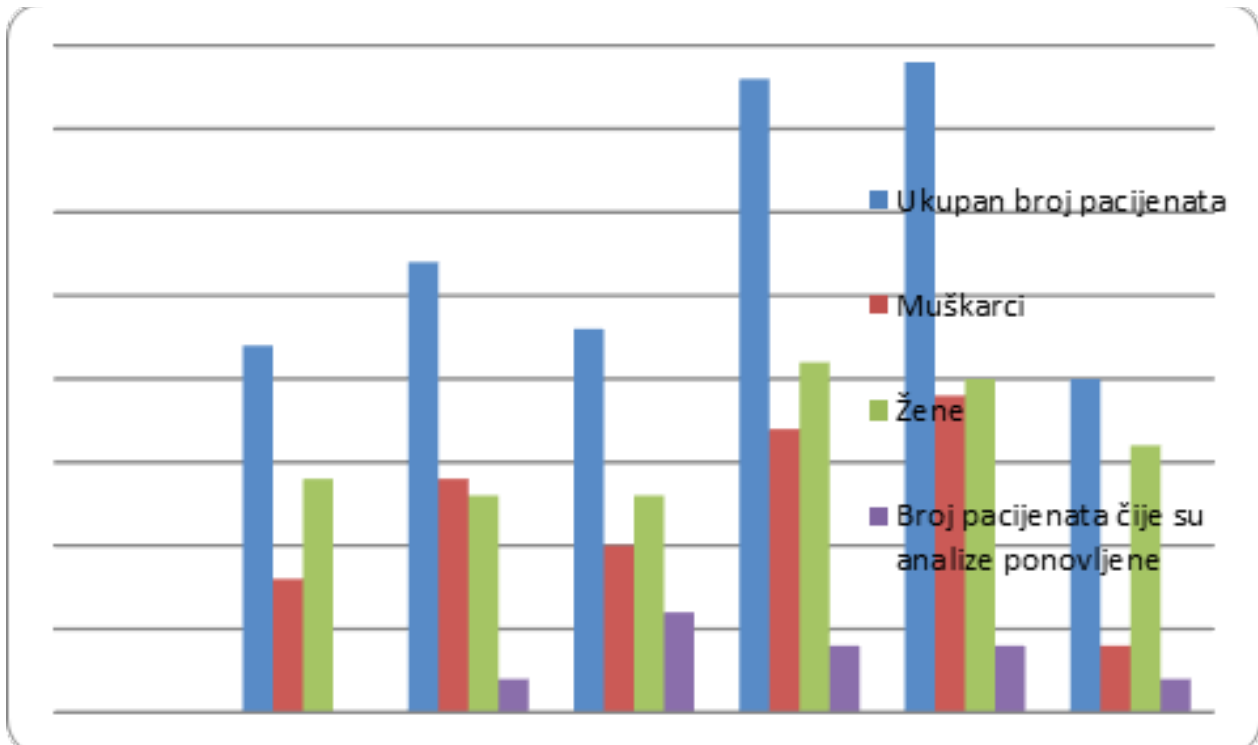
Mjere predostrožnosti: Osoba koja instalira Dia-PT reagens mora biti obučeni profesionalac u laboratoriji. Računanjem sa neodgovarajućim podacima ili nepravilnim korišćenjem dostavljenih podataka može doći do pogrešnih rezultata Dia-PT. Zbog njegovih sastojaka treba pažljivo rukovati uz pridržavanje mera predostrožnosti preporučenih za biološki opasan materijal.

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U prvoj polovini 2022. u laboratoriji J. U. Dom zdravlja Vareš urađeno je 169 analiza INR-a. Iz tabele 1 vidljivo je da su 72 pacijenta bili muškarci i 97 žene. U procentima osoba muškog pola bilo je 42% a osoba ženskog pola 58%. To nam kazuje da žene češće koriste antikoagulantnu terapiju. Broj pacijenata čije su analize ponovljene

Tabela br. 1. Zastupljenost korištenja antikoagulantne terapije po spolu

| Mjesec<br>2022. | Ukupan broj<br>pacijenata | Muškarci  | Žene      | Broj pacijenata čije su<br>analize ponovljene |
|-----------------|---------------------------|-----------|-----------|---|
| Januar          | 22                        | 8         | 14        | 0   |
| Februar         | 27                        | 14        | 13        | 2   |
| Mart            | 23                        | 10        | 13        | 6   |
| April           | 38                        | 17        | 21        | 4   |
| Maj             | 39                        | 19        | 20        | 4   |
| Juni            | 20                        | 4         | 16        | 2   |
| <b>UKUPNO</b>   | <b>169</b>                | <b>72</b> | <b>97</b> | <b>18</b>                                     |



Grafik br. 1. zastupljenost korištenja antikoagulantne terapije

je 18, znači oko 10% pacijenata koji su trebali korigovati terapiju.

Od 169 pacijenata rezultat između 0,9-1,9 imalo je 32 pacijenta, to je 18,8%, rezultat između 2,0-

3,0 imalo je 114 pacijenata, to je 67%, i veći od 3,0 imalo je 24 pacijenta, to je 14,2%. Ovakvi rezultati nam govore da su pacijenti sa antikoagulantnom terapijom u 67% slučajeva u optimal-

Tabela br. 2. Djelotvornost antikoagulantne terapije u populaciji

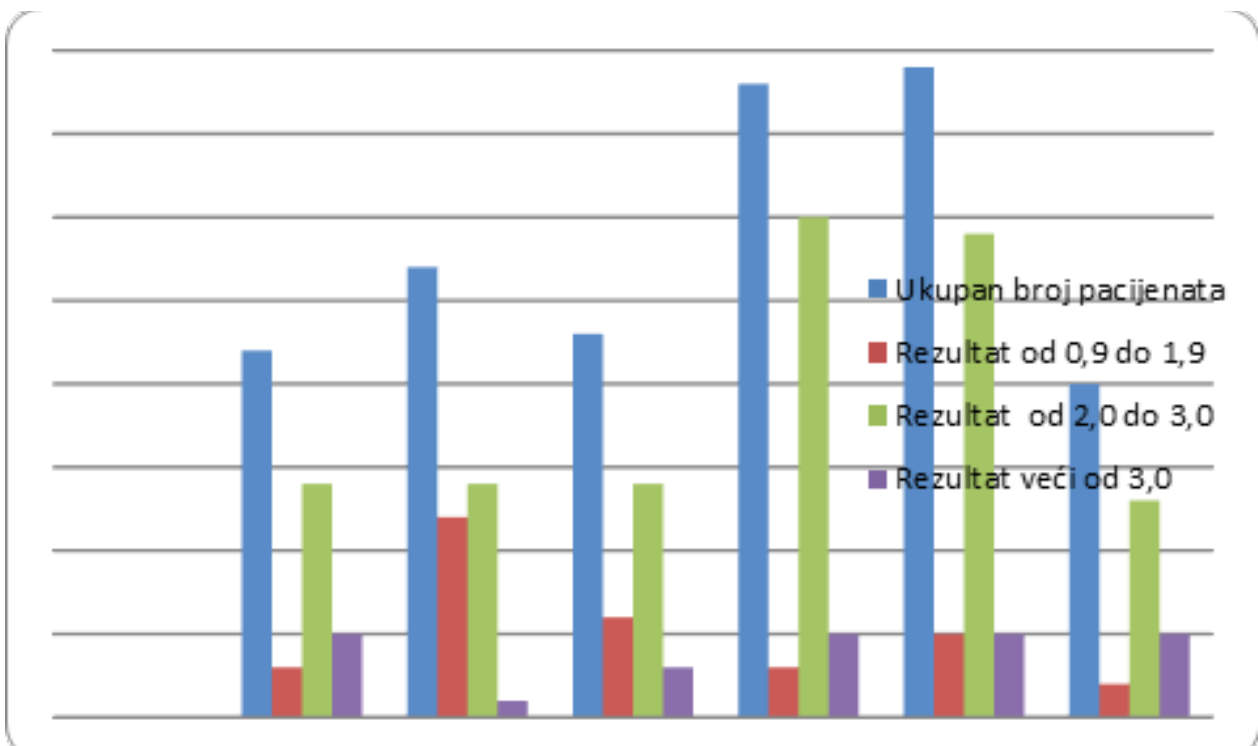
| Mjesec<br>2022. | Ukupan broj<br>pacijenata | Rezultat<br>od 0,9 do 1,9 | Rezultat<br>od 2,0 do 3,0 | Rezultat<br>veći od 3,0 |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Januar          | 22                        | 3                         | 14                        | 5                       |
| Februar         | 27                        | 12                        | 14                        | 1                       |
| Mart            | 23                        | 6                         | 14                        | 3                       |
| April           | 38                        | 3                         | 30                        | 5                       |
| Maj             | 39                        | 5                         | 29                        | 5                       |
| Juni            | 20                        | 2                         | 13                        | 5                       |
| <b>UKUPNO</b>   | <b>169</b>                | <b>32</b>                 | <b>114</b>                | <b>24</b>               |



nom nivou, 18% pacijenata imalo je manji INR od 2 što nam govori da imaju povećan rizik od stvaranja ugruška, a samim tim i veći rizik od moždanog i srčanog udara. 14,2% pacijenata su imali rezultat iznad 3 i to nam ukazuje da je krv previše razrijeđena, te to sa sobom nosi rizik od krvarenja.

Iz treće tabele je vidljivo da po starosnim

skupinama u razdoblju od 40 do 50 godina je manje žena 32%, a muškaraca 68%, od 50 do 60 godina žena je 70%, a muškaraca 30%, od 60 do 70 godina žena je 52%, a muškaraca 48%, od 70 do 80 godina žena je 65%, a muškaraca 35%, više od 80 godina žena je 70%, a muškaraca 30%. Ovi rezultati nam pokazuju veću zastupljenost u svim dobnim skupinama osim u prvoj.

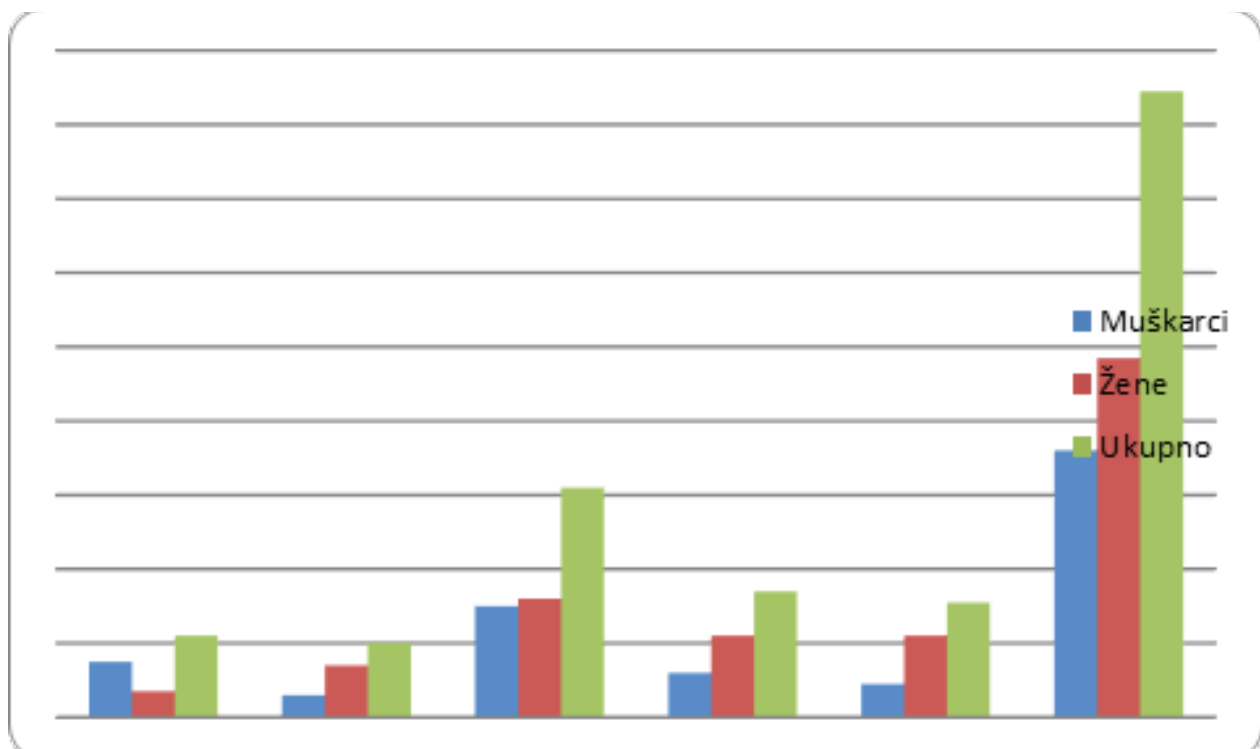


Grafik br. 2. Djelotvornost antiokagulantne terapije u populaciji



Tabela br. 3. Zastupljenost antikogulantne terapije po starosnim skupinama

| Broj pacijenata po starosti | Muškarci  | Žene      | Ukupno     |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|
| Od 40 – 50 godina           | 15        | 7         | 22         |
| Od 50 – 60 godina           | 6         | 14        | 20         |
| Od 60 – 70 godina           | 30        | 32        | 62         |
| Od 70 – 80 godina           | 12        | 22        | 34         |
| Više od 80 godina           | 9         | 22        | 31         |
| <b>UKUPNO</b>               | <b>72</b> | <b>97</b> | <b>169</b> |



Grafik br. 3. Zastupljenost antikoagulantne terapije po starosnim skupinama



Slika br.1- epruveta sa uzorkom krvi za INR

## DISKUSIJA

Mi smo mala laboratorija koja treba da radi analize iz primarnog nivoa zdravstvene zaštite, ali zbog udaljenosti od Kantonalne bolnice Zenica 75km, prinuđeni smo da radimo razne vrste analiza pa tako I INR, a sve u interesu naših osiguranika- pacijenata. Ali I pacijenata koji dolaze iz dijaspore, odnosno iz cijelog svijeta. Optimalan INR postiže se sa odgovarajućom terapijom I sa disciplinom pacijenta.

Za određivanje INR-a potrebno je: citratna plazma uzeta u epruvetu do oznake, pipetori koji moraju biti baždareni, te reagensi. DIA PT re-

agens INR test sistem je rekombinantni tromboplastinski reagens R1 rastvoren u puferu R2 indukuje stvaranje formiranog ugruška nakon dodavanja uzorka plazme pacijenta. COAG 4D koristi optičku turbidimetriju za detekciju stvaranja fibrinskog ugruška.

Pacijenti su u 67% slučajeva u optimalnom nivou, 18% pacijenata imaveći rizik od formiranja ugruška, a 14% rizik od krvarenja. Po dobnim skupinama više su zastupljene žene u odnosu na muškarce, osim u prvoj skupini od 40-50 godina. (Ovaj podatak možemo pripisati hormonalnom statusu kod žena, menopauzi). Podaci su dobijeni na osnovu retrospektivnog istraživanja.



## ZAKLJUČAK

Željeni (ciljani) INR zavisi od toga zašto je propisana antikoagulantna terapija. Tri najčešća razloga upotrebe ovih lijekova, zajedno sa njihovim ciljanim INR-om, uključuju:

Atrijska fibrilacija: ciljani INR raspon 2,0–3,0;

Venska tromboembolija: ciljani INR raspon 2,0–3,0; i

Protetski srčani zalisci: Ciljni raspon INR varira između 2,0 i 3,5, zavisno od vrste vještačkog zasluka i prisustva drugih faktora rizika.

INR analizu je potrebno raditi u zavisnosti od raspona rezultata, a samim tim i korigovati terapiju.

## LITERATURA

1. <https://drvelicki.com/saveti-i-preporuke/razredivanje-krvi-i-znacaj-inr-vrednosti>
2. <https://www.obs.ba/images/stories/AF-ISE/18%20Antikoagulantna%20terapija%201%20dio.pdf>
3. <http://www.diagon.com/en/pocreagent/coag-s-inr-test-kit>
4. <http://www.diagon.com/en/screen/dia-pt-5>



## THE IMPORTANCE OF DETERMINING INR (INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO)

Muftić E

### ABSTRACT

Blood clotting or coagulation is the body's protective mechanism against bleeding. When a blood vessel is damaged, a series of reactions takes place involving substances that occur naturally in the blood and are called clotting factors. Normally, clotting starts spontaneously when there is minor or major bleeding from the damaged blood vessel. However, there are a number of conditions that can lead to the formation of blood clots without active bleeding. In this case, there is an increased risk of thromboembolic disease. In thromboembolic disease, fragments of blood clots break off and circulate in the blood, which can block blood vessels in the lungs, leading to pulmonary embolism, or vessels in the heart, if a heart attack occurs, or in the brain, if a stroke occurs. Each of these complications is potentially fatal. Therefore, if a person is at high risk for the above conditions (e.g., previous stroke or heart attack), anticoagulants (medications that thin the blood and reduce the formation of blood clots) are used to reduce the risk of blood clots. People who need long-term anticoagulant therapy for any reason are usually prescribed an anticoagulant medication (such as warfarin) that can be taken in tablet form rather than as an injection. This method of anticoagulation is often called oral anticoagulation therapy.

INR- is a laboratory-determined time it takes for the blood to form a clot. This test is used to monitor anticoagulant therapy and detect blood clotting disorders. The aim of this work is to study the effect of anticoagulant therapy in patients with atrial fibrillation or with artificial heart valves. In these patients, the INR value should be between 2-3. A value above 3 means that the blood is too thin, which carries the risk of bleeding, while a value of 4.5 can lead to massive bleeding. An INR value below 2, on the other hand, means that the blood is thicker than it should be, so this condition increases the risk of pulmonary embolism, heart attack, or stroke. In this study, we determined the INR level in patients monthly and achieved the desired result in 67% of cases. Over time, patients learn what influences anticoagulant therapy, such as a diet high in green vegetables, supplements, antibiotics, statins....

**Corresponding author:**

**Emina Muftić**

**e-mail adresa:** [eminamuftic10@gmail.com](mailto:eminamuftic10@gmail.com)

**mob:** 38761584866



## MJESTO, ULOGA I ZNAČAJ MEDICINSKO-LABORATORIJSKOG DIJAGNOSTIČARA U ZDRAVSTVENOM SISTEMU BOSNE I HERCEGOVINE

Nedeljka Šljivo, Fatima Bilajac<sup>1</sup>

<sup>1</sup>OJ Klinička biohemija i imunologija, KCUS, Sarajevo, F BiH, BiH

### SAŽETAK

Stručnjak ovog profila je osposobljen za rad na složenim analitičkim postupcima što mu omogućava samostalno izvođenje pretraga iz slijedećih područja: Kliničke hemije/kemije, Laboratorijske hematologije, Bakteriologije, Parazitologije, Virologije, Mikologije, Imunologije i Imunogenetike, Citologije, Histopatologije, Transfuziologije, Tipizacije tkiva, Nuklearne, Eksperimentalne medicine i ostala područja u sklopu laboratorijske medicine. Organizator medicinsko-laboratorijske službe, Zaštite na radu, Menadžer i rukovodioc medicinsko-dijagnostičkih laboratorija u društvenom i privatnom sektoru. Procjenjuje se da se 60 do 70 posto svih odluka koje se tiču pacijentove dijagnoze, liječenja, prijema u bolnicu i otpusta temelje na laboratorijskim rezultatima koje provode medicinsko laboratorijski dijagnostičari.

Prema Klasifikaciji zanimanja u F BiH (2016.) pod šifrom 2269.003 je Inženjer medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Kadar se obrazuje na Fakultetima u F BiH i u Republici Srpskoj. U BiH postoje regulirane profesije, ali ne postoji regulirano (uređeno) obrazovanje.

Tokom obrazovanja na Fakultetu zdravstvenih studija student medicinsko-laboratorijske dijagnostike, prvog ciklusa odsluša i položi BIOHEMIJE → P: 150 sati + VJ: 45 sati + KL. Vj: 60 + Kl.prakse 75 sati + stručne prakse 200 sati i Mikrobiologije P: 90 sati + Vj: 90 sati + KP: 125 sati.

Zakon o zdravstvenoj zaštiti F BiH i Zakon o zdravstvenoj zaštiti RS ne tretiraju jednako medicinsko-laboratorijske dijagnostičare. Onemogućeno mu je dalje napredovanje u vidu specijalizacije i neophodno je da se nepravilnosti otklone i omogući pozicija i značaj koji pripadaju medicinsko-laboratorijskim dijagnostičarima.

Ključne riječi: inženjer medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Fakultet zdravstvenih studija, Zakon o zdravstvenoj zaštiti

**Autor za korespondenciju:**  
**Mr. sc. Nedeljka Šljivo, dipl. ing. MLD**  
**E-mail: nedašljivo@gmail.com**  
**Tel. 0038763/401-429**

### UVOD

Medicinsko-laboratorijska dijagnostika pokriva 4 matične oblasti: Hemijsko-biohemijske laboratorijske tehnologije, Morfološke laboratorijske tehnologije u hematologiji, histo/cito dijagnostici, Mikrobiološke i molekularne laboratorijske tehnologije i Eksperimentalne laboratorijske tehnologije.

### Medicinski laboratorij – definicija

Laboratorij za biološka, mikrobiološka, imunološka, hemijska, imunoematološka, hema-





tološka, biofizikalna, citološka, histopatološka ili druga ispitivanja materijala uzetih sa ljudskog tijela za potrebe pribavljanja informacija za dijagnozu, prevenciju i liječenje bolesti ili za ocjenjivanje zdravlja ljudi, a koja može obezbjediti konsultantsku savjetodavnu uslugu u koju su uključeni svi aspekti laboratorijskog istraživanja, uključujući interpretaciju rezultata i savjet o daljnim odgovarajućim istraživanjima.

### Zdravstveni radnici u medicinsko-laboratorijskoj dijagnostici

- ❖ dipl.ing medicinsko-laboratorijske dijagnostike/BA Laboratorijskih tehnologija; MSc zdravstvenih nauka/MA laboratorijskih tehnologija; Dr Sc zdravstvenih nauka
- ❖ Specijalista medicinske biohemije sa završenim medicinskim ili farmaceutskim fakultetom, MSc medicinskih/farmaceutskih nauka; DrSc medicinskih/farmaceutskih nauka sa završenom specijalizacijom iz medicinske biohemije
- ❖ Viši laboratorijski tehničar (VLT)
- ❖ Laboratorijski tehničar (SSS)

### Mjesto, uloga i značaj

Medicinsko laboratorijski dijagnostičar (MLD), poznat i kao medicinski tehnolog ili klinički laboratorijski znanstvenik, radi na analizi raznih bioloških uzoraka. Oni su odgovorni za provođenje znanstvenih ispitivanja uzoraka i izvještavanje o laboratorijskim nalazima liječnicima

Stručnjak ovog profila je osposobljen za rad na složenim analitičkim postupcima što mu omogućava samostalno izvođenje pretraga iz slijedećih područja: Kliničke hemije/kemije, Laboratorijske hematologije, Bakteriologije, Parazitologije, Virologije, Mikologije, Imunologije i Imunogenetike, Citologije, Histopatologije, Transfuziologije, Tipizacije tkiva,

Nuklearne, Eksperimentalne medicine i ostala područja u sklopu laboratorijske medicine.

Osposobljen i poznaje najsavremenije laboratorijske mjerne i druge tehnologije koje rade na principu metoda: Spektrofotometrije, Nefelometrije, Fluorimetrije, Denzitometrije, Atomske apsorpcije, Hromatografije, Imunoodređivanja, Genetičkog inženjeringa, Mikroskopsku i fototehniku, Automatsku obradu podataka, LIS, Kontrolu kvalitete u radu u laboratorijskoj medicini, Organizaciju medicinsko-laboratorijske službe, Zaštitu na radu, Rukovodne funkcije medicinsko-dijagnostičkih laboratorija u društvenom i privatnom sektoru.

MLD vrlo blisko surađuju s liječnicima i medicinskim laboratorijskim tehničarima u dijagnostici i praćenju procesa bolesti, kao i praćenju učinkovitosti terapije.

Medicinski laboratorijski dijagnostičari mogu napredovati u menadžerske ili nadzorne uloge u laboratoriju.

Medicinsko laboratorijski dijagnostičari izvode složene testove na uzorcima pacijenata koristeći sofisticiranu opremu. Procjenjuje se da se 60 do 70 posto svih odluka koje se tiču pacijentove dijagnoze, liječenja, prijema u bolnicu i otpusta temelje na laboratorijskim rezultatima koje provode medicinsko laboratorijski dijagnostičari.

MLD imaju širok raspon odgovornosti i dužnosti, uključujući: Pregled i analiza krvi, tjelesnih tekućina, tkiva i stanica, prezentiranje laboratorijskih rezultata liječnicima. Mikroskopiranje, rad na automatskim brojačima i visokopreciznoj laboratorijskoj opremi. Optička analiza DKS u potrazi za abnormalnim stanicama za pomoć u dijagnozi anemije i leukemije. Praćenje ishoda bolesti. Uspostavljanje programa osiguranja kvalitete za praćenje i osiguranje tačnosti laboratorijskih rezultata. Nadzor nad radom medicinskog laboratorijskog tehničara.



## OBRAZOVANJE U F BiH

U Federaciji BiH postoji nekoliko fakulteta zdravstvenog usmjerenja koja obrazuju kadar medicinsko-laboratorijskog dijagnostičara (tehnolog). Za primjer ćemo uzeti najstariji Fakultet zdravstvenih studija Univerziteta u Sarajevu, Studij medicinsko-laboratorijska dijagnostika koji je obrazovao kadar diplomirani inženjer medicinsko-laboratorijske dijagnostike u toku 4 godine studiranja (do 2009/10), nakon toga 2 godine poslijediplomskog magistarskog studija - magistar zdravstvenih nauka/znanosti (Mr Sc.) i doktorat - doktor zdravstvenih nauka/znanosti (Dr Sc.) (doktorirati do 2016 god.) Prije bolonjskog sistema obrazovanja s klasifikacijom stupnjeva obrazovanja. (VII/1; VII/2 i VII/3).

Bolonjski sistem obrazovanja, Fakultet zdravstvenih studija Univerziteta u Sarajevu (od 2009/10), Studij laboratorijske tehnologije: I ciklus: 4 godine (240 ECTS) - Bachelor (BA) laboratorijskih tehnologija + 1 godina (60 ECTS) - Master (MA) + 3 godine doktoralnog studija (180 ECTS) - doktor zdravstvenih nauka/znanosti (Dr Sc.). Čl. 9. (skraćeno) Službene novine KS br. 34 od 15,10,2008. god.

## OBRAZOVANJE U RS

Aperion Univerzitet, Studijski program "LABORATORIJSKO-MEDICINSKI INŽENJERING" TROGODIŠNJI PROGRAM (6-to semestralni):

ZVANJE: "Diplomirani medicinsko-laboratorijski inženjer – 180 ECTS" (Bachelor of Medical Laboratory Engineering-180 ECTS - BSc Med.Lab. Eng.)

ČETVEROGODIŠNJI PROGRAM (8-mo semestralni):

ZVANJE: "Diplomirani medicinsko-laboratorijski inženjer – 240 ECTS" (Bachelor of Medical Laboratory Engineering – 240 ECTS - BSc Med.Lab. Eng.)

## Klasifikacija zanimanja u F BiH (14.06.2016.) Federalni zavod za statistiku

- 226 OSTALI ZDRAVSTVENI STRUČNJACI
- 2269.003 Inženjer medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Poslovi: Nadzor nad provođenjem pravilnih mjera i poštivanje propisa u zdravstvenim ustanovama;

Planiranje, priprema i savjetovanje pri izvođenju različitih organizacijskih i strukturnih mjera i postupaka zaštite u laboratoriji; Pružanje usluga iz oblasti laboratorijske dijagnostike; Rukovanje tehničkom opremom koja se upotrebljava u dijagnostičke svrhe; Savjetovanje pri zdravstvenom osiguranju; Priprema naučnih rasprava i izvještaja; Nadzor ostalih suradnika

## Republika Srpska: Klasifikacija zanimanja

86.9 Ostale djelatnosti zdravstvene zaštite. Ovaj razred uključuje: djelatnosti medicinskih laboratorija kao što su: - radiološke laboratorije i ostali dijagnostički centri, - laboratorije za analizu krvi, djelatnosti banaka krvi, sperme, transplatacijskih organa itd.

## Zakon o zdravstvenoj zaštiti F BiH

Pod odjeljkom XIV Zdravstveni radnici i Zdravstveni suradnici, prema čl. 137. zdravstveni radnici su osobe koje imaju obrazovanje zdravstvenog usmjerenja i neposredno u vidu zanimanja pružaju zdravstvenu zaštitu stanovništvu, uz obavezno poštivanje moralnih i etičkih načela zdravstvene struke

Zdravstveni radnici obrazuju se na medicinskom, stomatološkom, farmaceutkom ili farmaceutsko-biohemijskom fakultetu, fakultetu zdravstvenih studija i u srednjim školama zdravstvenog usmjerenja



Zdravstveni radnik obavlja poslove svoje profesije samo u okviru svog stručnog naziva određenog licencom. (čl. 147.)

Zdravstveni suradnici su osobe koje nisu završile obrazovanje zdravstvenog usmjerenja, a rade u zdravstvenim ustanovama i učestvuju u dijelu zdravstvene zaštite. (čl. 141.)

**Obrazovanje zdravstvenih suradnika u F BiH**  
Zdravstveni suradnici u medicinsko-laboratorijskoj dijagnostici: BA biologije ili MA biologije – biohemija i fiziologija/mikrobiologija/genetika (završen PRIMAT).

Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu

Odsjek za biologiju: obrazovanje na dodiplomskom studiju realizirano u smjerovima biohemija i fiziologija; nastavnički smjer; ekologija; genetika; mikrobiologija.

I ciklus studija u trajanju od 3 godine (180 ECTS) i dobiva se zvanje BA biohemije i fiziologije; ekologije; genetike; mikrobiologije

II ciklus studija 2 godine (120 ECTS) sa slijedećim smjerovima: Nastavnički smjer; Smjer biohemija i fiziologija – MA biohemije i fiziologije; Smjer ekologija – MA ekologije; Smjer genetika – MA genetike i Smjer mikrobiologija – MA mikrobiologije

Prema Standardnoj klasifikacija zanimanja u F BiH (2016) šifra zanimanja 2131.003 Biohemičar i prema dopuni klasifikacije (2020) šifra 2145.047 Inženjer genetike i bioinženjeringa i 2133.008 Biolog ekolog.

**Zakon o zdravstvenoj zaštiti RS, GLAVA X; ZDRAVSTVENI RADNIK I ZDRAVSTVENI SARADNIK; Zdravstveni radnik i zdravstveni saradnik u zdravstvenoj ustanovi**

Zdravstveni radnik koji završi prvi ciklus akademskog ili strukovnog studija i stekne odgovarajuće akademsko ili strukovno zvanje, te koji završi integrisani akademski studij prvog i drugog ciklusa iz oblasti medicine, stomatologije, farmacije i **medicinske biohemije**, i stekne odgovarajuće akademsko zvanje, obavlja zdravstvenu djelatnost, ako ima položen stručni ispit za rad u zdravstvenim ustanovama u Republici (u daljem tekstu: stručni ispit) i licencu nadležne zdravstvene komore u Republici.

Zdravstveni saradnik koji obavlja poslove u funkciji zdravstvene djelatnosti mora imati završen najmanje prvi ciklus akademskog ili strukovnog visokog obrazovanja i položen stručni ispit.

Na pitanja radnopravnog statusa zdravstvenog radnika i zdravstvenog saradnika koja nisu uređena ovim zakonom primjenjuju se propisi kojima je uređena oblast rada. (čl. 131.)

### Obrazovanje zdravstvenih saradnika u RS

PRIMAT I ciklus Biologija i II ciklus Biohemija  
**Obrazovanje zdravstvenih suradnika u okruženju BiH**

Farmaceutsko-biokemijski fakultetu u Zagrebu, studij *Medicinska biokemija*, po završetku studija dobiva se naziv *Magistar medicinske biokemije i laboratorijske medicine*. To je integralni studij u trajanju 5 godina (ukupno 300 ECTS)

Farmaceutski fakultet Univerzitet u Beogradu, Studijski program Farmacija – Medicinska biohemija traje 5 godina (300 ECTS). Dodatno obrazovanje Zdravstvene specijalizacije za zdravstvene radnike i zdravstvene suradnike

Farmaceutski fakultet u Novom Sadu trajanje studija 5 godina (300 ECTS) obrazuje kadar koji po završetku dobiva naziv *Magistar farmacije – medicinske biohemije*.



Prema **PRAVILNIK-u O BLIŽIM USLOVIMA PROSTORA, OPREME I KADRA ZA OSNIVANJE I OBAVLJANJE ZDRAVSTVENE DJELATNOSTI U ZDRAVSTVENIM USTANOVAMA u F BiH, Pododjeljak A.3. Laboratorijska djelatnost/dijagnostika**

čl. 120. a, b i c i d

- *Specijalista medicinske biokemije i laboratorijske dijagnostike*
- *Inženjer medicinske biokemije sa završenim drugim ciklusom visokog obrazovanja*

## **SPECIJALIZACIJE**

### **Zakon o zdravstvenoj zaštiti F BiH (Član 153 i 154.)**

Zdravstveni radnici i zdravstveni saradnici sa visokom stručnom spremom mogu se specijalizirati u određenoj grani zdravstvene djelatnosti, te određenim granama subspecijalizacije.

Grane specijalizacije, trajanje i program specijalizacija i subspecijalizacija pravilnikom utvrđuje federalni ministar. Odobrenje za specijalizaciju, odnosno subspecijalizaciju daje federalni ministar na osnovu godišnjeg plana potrebnih specijalizacija i subspecijalizacija koji donosi na prijedlog kantonalnih ministarstava zdravstva.

### **Pravilnik o specijalizacijama u F BiH (Član 2.)**

Doktori medicine, doktori stomatologije i magistri farmacije mogu se stručno usavršavati u obliku specijalizacije i subspecijalizacije. Specijalizacija i subspecijalizacije je organizovan oblik sticanja teoretskih i praktičnih stručnih znanja i naučnih saznanja prema propisanom programu. Plan i program specijalizacija i subspecijalizacija za doktore medicine, doktore stomatologije i magistre farmacije, te njihovo trajanje sastavni je dio ovog Pravilnika.

PLAN I PROGRAM SPECIJALIZACIJE ZA DOKTORE MEDICINE;

PLAN I PROGRAM SPECIJALIZACIJE ZA INŽINJERE MEDICINSKE BIOHEMIJE

MEDICINSKA BIOHEMIJA I LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA, Broj 75 - Strana 430. SLUŽBENE NOVINE FEDERACIJE BiH, Ponedjeljak, 19. 10. 2020.)

Specijalizacija u trajanju od 4 godine.

**Uslov za specijalizaciju i subspecijalizaciju**  
**Zakon o zdravstvenoj zaštiti RS (čl. 139. (1) i (2))**

Zdravstveni radnik koji ima visoko obrazovanje može pohađati specijalizaciju i subspecijalizaciju iz oblasti medicinskih i zdravstvenih nauka. Zdravstveni saradnik koji ima visoko obrazovanje može specijalizirati i subspecijalizirati iz naučne oblasti koja je u vezi sa medicinskim i zdravstvenim naukama.

### **Pravilnik o specijalizaciji RS (čl.2; 3; 5; 6)**

Specijalizacije, odnosno subspecijalizacije odobravaju se zdravstvenom radniku, odnosno zdravstvenom saradniku radi osposobljavanja za obavljanje specijalističkih, odnosno subspecijalističkih poslova u određenoj oblasti zdravstvene zaštite. Doktor medicine može specijalizirati u sljedećim granama medicine: klinička biohemija u trajanju od 4 godine; medicinska mikrobiologija u trajanju od 5 godina. Magistar farmacije može specijalizirati u sljedećim granama farmacije: medicinska biohemija u trajanju četiri godine. Magistar farmacije – medicinski biohemičar može specijalizirati u sljedećim granama farmacije: medicinska biohemija u trajanju 4 godine.



## ZAKLJUČAK

Ako saberemo sate iz predmeta vezanih za biohemiju i kliničku hemiju student studija medicinsko-laboratorijske dijagnostike/ laboratorijskih tehnologija na Fakultetu zdravstvenih studija Univerziteta u Sarajevu u toku I ciklusa (4 godine studija) odsluša i položi **UKUPNO KLINIČKE HEMIJE I BIOHEMIJE: P: 150 sati + VJ: 45 sati + KL. Vj: 60 + Kl.prakse 75 sati + stručne prakse 200 sati.**

Po kojem osnovu nisu osposobljeni te im nije omogućena odgovarajuća pozicija kao i specijalizacija dok za kadar inženjera biohemije ista se omogućava.

Postoje mnoge kontradiktornosti i „izbacivanje“ medicinsko-laboratorijskog dijagnostičara, a njegovo mjesto se ustupa ne zdravstvenom radniku. Prema Zakonu o zdravstvenoj zaštiti RS nije ni spomenut kadar dok je u Zakon o zdravstvenoj zaštiti F BiH uvršten, ali se prema Pravilniku o bližim uvjetima otvaranja zdravstvenih ustanova u F BiH spominje iza zdravstvenih suradnika sa zanimanjima koja nisu obuhvaćena ni nacionalnom klasifikacijom zanimanja.

U F BiH je otvoreno dosta privatnih laboratorija koje uspješno vode medicinsko-laboratorijski dijagnostičari koji svoj posao obavljaju na visoko profesionalnom stupnju i čiji nalazi su priznati i činjenica je da sve više pacijenata potražuju usluge privatnih laboratorija.

Zakonske akte u BiH treba uskladiti sa podacima i omogućiti ovom kadru nesmetan rad, poziciju i napredovanje u svrhu zaštite pacijenata i boljeg sistema zdravstvene zaštite u Bosni i Hercegovini.



## LITERATURA

1. Bosna i Hercegovina, Federacija BiH, Federalni zavod za statistiku, opisi grupa zanimanja, Klasifikacija zanimanja
2. Kurikulum Prvog ciklusa studija Programa 2: Laboratorijske tehnologije Fakulteta zdravstvenih studija Univerziteta u Sarajevu za zvanje: Bakalaureat/Bachelor laboratorijskih tehnologija
3. Majkic-Sinegh N. Journal of medical Biochemistry, 2011, vol. 30. br. 4. strl. 279-286
4. Nastavni plan Fakulteta zdravstvenih nauka 2021/22 I i II ciklus Studijski program "LABORATORIJSKO-MEDICINSKI INŽENJERING
5. Nastavni plan Studijskog programa 2: LABORATORIJSKE TEHNOLOGIJE Fakulteta zdravstvenih nauka Univerziteta u Sarajevu
6. Pravilnik o bližim uvjetima prostora, opreme i kadra za osnivanje i obavljanje zdravstvene djelatnosti u zdravstvenim ustanovama, Službene novine FBiH Broj 26 - Stranica 37. Petak, 23. 3. 2012.
7. Pravilnik o bližim uvjetima prostora, opreme i kadra za osnivanje i obavljanje zdravstvene djelatnosti u zdravstvenim ustanovama, Službene novine Federacije BiH, br. 5. str. 44. Srijeda, 22.01.2020. god.
8. Pravilnik o specijalizacijama i subspecijalizacijama zdravstvenih radnika i zdravstvenih suradnika, "Službene novine Federacije BiH, broj 75/20.
9. Pravilnik o specijalizacijama i užim specijalizacijama zdravstvenih radnika i zdravstvenih saradnika, „Sl. glasnik RS“, br.10/2013, 91/2013, 113/2013, 109/2014, 53/2018, 17/2021 i 77/2022.
10. Republika Srpska, Republički zavod za statistiku, Klasifikacija zanimanja (KZBiH-08)
11. Skraćenice (čl.9) Univerzitet u Sarajevu, Sl.novine KS, br. 34. od 15.10.2008.
12. Zakon o zdravstvenoj zaštiti , "Službene novine Federacije BiH", br. 46/2010 i 75/2013.
13. Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Srpske, „Sl. glasnik RS“, br. 57/2022.



## **THE PLACE, ROLE, AND IMPORTANCE OF THE MEDICAL LABORATORY DIAGNOSTICIAN IN THE HEALTH SYSTEM OF BOSNIA AND HERZEGOVINA**

Šljivo N., Bilajac F.

### **ABSTRACT**

An expert of this profile is trained to work on complex analytical procedures, which enables them to perform tests in the following areas independently: Clinical chemistry, Laboratory hematology, Bacteriology, Parasitology, Virology, Mycology, Immunology and Immunogenetics, Cytology, Histopathology, Transfusiology, Tissue typing, Nuclear, Experimental medicine and other areas within laboratory medicine. They are also an organizer of medical-laboratory services, Occupational Safety, Manager, and head of medical-diagnostic laboratories in the public and private sectors. It is estimated that 60 to 70 percent of all decisions regarding a patient's diagnosis, treatment, hospital admission, and discharge are based on laboratory results performed by medical laboratory diagnosticians.

Engineer of medical and laboratory diagnostics is under the code 2269.003 according to the Classification of Occupations in the Federation of Bosnia and Herzegovina (2016). The staff is educated at the Faculties in the Federation of Bosnia and Herzegovina and the Republic of Srpska. There are regulated professions in Bosnia and Herzegovina, but no regulated education exists.

During education at the Faculty of Health Studies, a student of medical-laboratory diagnostics, in the first cycle, takes and passes BIOCHEMISTRY → T: 150 hours + P: 45 hours + CP: 60 + Class practice 75 hours + Professional practice 200 hours and Microbiology T: 90 hours + P: 90 hours + CP: 125 hours.

The Law on Health Care of the FBiH and the Law on Health Care of the RS do not treat medical-laboratory diagnosticians equally. They are prevented from further advancement in the form of specialization, and it is necessary to remove the irregularities and enable the position and importance belonging to medical-laboratory diagnosticians.

Keywords: engineer of medical-laboratory diagnostics, Faculty of Health Studies, Law on Health Care

**Corresponding author:**

**Nedeljka Šljivo**

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

**Tel. 0038763/401-429**



## DOBRA LABORATORIJSKA PRAKSA KOD MOGUĆIH INTERFERENCIJA REZULTATA NA SPECIFIČNE IGE ZA POJEDINE ALERGENE

Nermin Kotorić

### SAŽETAK

Dijagnoza alergije određivanjem alergen-specifičnog IgE komplicirana je klinički irelevantnim IgE antitijelima, od kojih je najistaknutiji primjer IgE protiv unakrsno reaktivnih ugljikohidratnih determinanti (CCD), koje se javljaju na alergenima iz biljaka i insekata. Iako nemaju nikakav klinički značaj, u dijagnostici alergija in vitro, pojava ovih antitijela otežava interpretaciju pozitivnih rezultata. Inhibicija CCD-ova predložena je kao lijek. U ovom smo radu prikazali naša iskustva u rješavanju problema koje u in vitro dijagnostici alergija donose CCD, kao i namjeru da sumnjive rezultate potvrdimo ili isključimo kao lažno pozitivne. Od 2012. godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje alergija. Kroz rad smo se neizbježno susretali sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata i poduzimajući mjere za njihovo rješenje. Od 2021. godine CCD blokatore uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U istoj godini smo kod 388 uzorka ispitali preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane a kod 43 pacijenta smo izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni uzorci su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Ovaj rad je rezultat našeg iskustva sa „šarenim“ rezultatima za specifične IgE i njihovo tretiranje sa CCD blokatorima. Utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima alergena hrane po klasama prije i nakon dodavanja blokatora. Međutim kod inhalatornih alergena i alergena gljivica i epitela životinja nije pronađena statistički značajna razlika u vrijednostima klasa prije i nakon dodavanja blokatora. Eliminacija CCD-specifičnih IgE antitijela pomoću sintetičkog CCD blokatora drastično je smanjila broj lažno pozitivnih rezultati in vitro testova bez ugrožavanja osjetljivosti na relevantne IgE interakcije. Stoga, CCD-blokator predstavlja vrijedan alat za povećanje specifičnosti testa rutinske in vitro dijagnoze alergije.

### UVOD

Očigledna svrha svake dijagnostičke mjere je dobiti tačan dojam o pacijentovom stanju. U slučaju dijagnoze alergije, to podrazumijeva identifikaciju pravog krivca, alergena, uz izbjegavanje optuživanja bezopasnih alergena. Među različitim „imitatorima alergije“, ugljikohidrati povezani s proteinima istaknuti su i dobro definirani uzrok lažno pozitivnih reakcija. Unakrsno reaktivne determinante ugljikohidrata (CCD) su strukture šećera koje su vezane za proteine tokom posttranslacijske glikozilacije. CCD strukture glikoziliranih proteina iz biljaka i insekata razlikuju se od ljudskih glikoproteina i stoga su imunogene. Pri prvom kontaktu s glikoziliranim alergenom stvaraju se specifična IgE antitijela na protein kao i na CCD strukture. Obično nemaju nikakav klinički značaj. U dijagnostici alergija in vitro, pojava ovih antitijela otežava interpretaciju pozitivnih rezultata, jer nije

**Autor za korespondenciju:**  
**Nermin Kotorić dipl. ing. MLD,**  
**Opća bolnica Tešanj,**  
**Služba za laboratorijsku dijagnostiku**  
**Email: [kotoric.nermin@hotmail.com](mailto:kotoric.nermin@hotmail.com)**  
**Tel. 00387 061 692 852**





moguće razlikovati reakcije uzrokovane antitijelima protiv peptidnih epitopa i anti-CCD IgE antitijela.

## ALERGIJA DANAS

Posljednjih pola stoljeća, u cijelom svijetu prati se porast alergijskih bolesti. Razloge takvog epidemiološkog trenda medicinska znanost ne može objasniti, iako se spominju mnogi faktori koji mogu imati utjecaja. Jednim dijelom su za nastalo stanje odgovorne promjene u okolišu kao i promjene higijenskih navika, koje su rezultirale smanjenom izloženošću imunostimulacijskim bakterijama. Smanjen kontakt s domaćim životinjama i obitelji su manje, što se u istraživanjima pokazalo rizičnim faktorima za razvoj alergija. Smatra se da je to dio odgovora zašto u najranijoj dobi djeteta dolazi do usporenog razvoja ravnoteže između  $T_H1$  i  $T_H2$  odgovora limfocita, te se u atopijske djece pojačano luči citokinski profil  $T_H2$  limfocita koji favorizira alergijski odgovor organizma. Takođe smanjena je i izloženost parazitima, zagađenost okoliša, sa zrakom zasićenim tvarima izgaranja dizelskih goriva, uz promjenu vanjskog mijenja se i unutrašnji okoliš u kojima ljude provode sve više vremena. Povećava se izloženost prašinskim grinjama, žoharima, plijesni, dimu cigareta, vlazi, a smanjeno ili ukinuto prirodno prozračivanje prostorija, umjesto kojeg se koristi umjetna ventilacija. Drugi dio uzroka porasta promjena leži u novim, promijenjenim navikama prehrane novorođenčeta, sa sve manjim brojem dojene djece a kao zamjena preporučuju se hidrolizirane formule hrane za djecu. I odrasli ljudi pojačano su izloženi posve novim alergenima u hrani na koje nisu tradicionalno navikli, a što je donijela globalizacija. Ove promjene u prehrani, uz smanjeno unošenje svježih namirnica, sve manje sirove hrane bogate antioksidansima, mogu dovesti i do promjena crijevne mikroflore, što možda pridonosi alergijskoj preosjetljivosti. U kontekstu povećanja broja osoba s alergijama značajan doprinos daje brzo i stresno življenje. Stres je složeni imunobiološki proces u kojem se oslobađaju brojne supstancije u mozgu, a koje mogu imati utjecaj na promjenu imunološku reakciju organizma.[1]

## IMUNOLOŠKA PREOSJETLJIVOST

Osnovna zadaća imunološkog sistema je da brani domaćina od infekcija, međutim imunski odgovor sam

po sebi može da izazove oštećenja tkiva kao i bolest. Takve reakcije nazivamo reakcije preosjetljivosti.

Rana preosjetljivost je reakcija na određene antigene posredovana IgE antitijelima i mastocitima, koja izaziva brz izlazak tečnosti iz krvnih sudova, sekreciju mukoze i često praćena zapaljenjem, što sve zajedno nazivamo alergija ili atopija. Ove reakcije mogu da zahvate različita tkiva i mogu da variraju u intenzitetu kod različitih osoba. Najčešći tipovi ovakvih reakcija su: polenskagroznicu, bronhijalna astma, alergija na hranu, lijekove i anafilaksija. Alergije predstavljaju najčešće imunološke poremećaje u razvijenim zemljama (oko 20 % ljudi oboljeva) sa tendencijom stalnog porasta, najčešće oboljevaju djeca. [2]

### Putevi stvaranja IgE antitijela

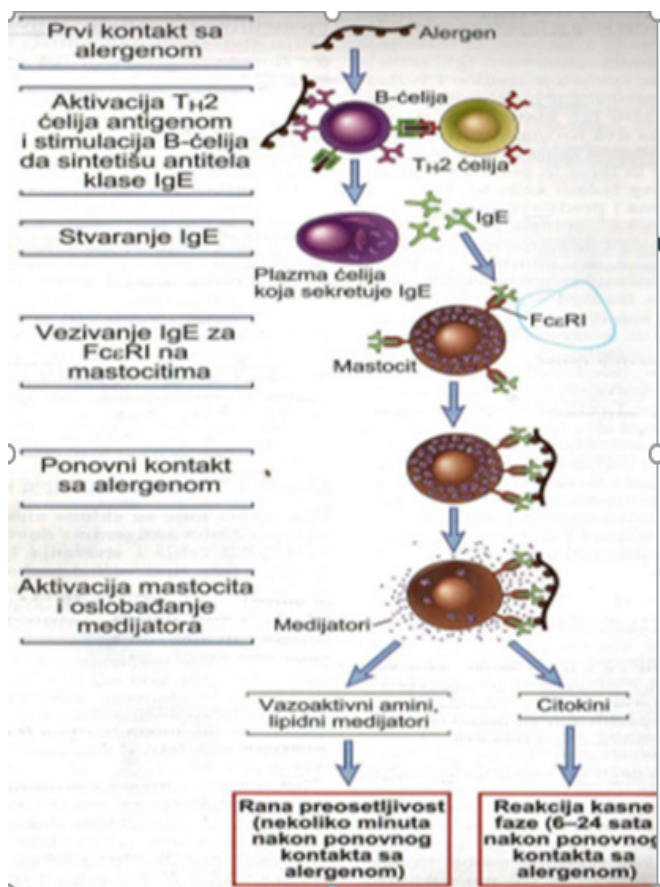
Kod osoba koje su sklone alergiji izlaganje pojedinim antigenima dovodi do aktivacije  $T_H2$  ćelija i stvaranja IgE antitijela. Citokini koje sekretuju  $T_H2$  ćelije, interleukin - 4 i interleukin -13, stimulišu B- limfocite specifične za strane antigene da diferenciraju u plazma ćelije koje proizvode antitijela IgE klase. Kod većine osoba ne razvija se snažan  $T_H2$  odgovor na strane antigene. Iz nepoznatih razloga u kontaktu sa antigenima kao što su proteini polena, određena hrana, otrov insekata, ili životinjska perut, ili poslije uzimanja lijekova, kod nekih osoba dolazi do snažnog  $T_H2$  odgovora. Rana preosjetljivost nastaje kao posljedica aktivacije  $T_H2$  u odgovoru na proteinske antigene ili hemijske supstance koje se vezuju za proteine. Nije jasno zbog čega mali broj uobičajnih antigena spoljašnje sredine kod atopičara izaziva odgovor  $T_H2$  ćelija i stvaranje IgE antitijela i koje karakteristike antigena uslovljavaju da se ponaša kao alergen. [2]

### Aktivacija i sekrecija mastocita

IgE antitijela stvorena na alergen vezuju se za  $Fc\epsilon R1$  receptor visokog afiniteta specifične za eta-teške lance, koji su eksprimirani na mastocitima. Mastociti se nalaze u svim vezivnim tkivima u organizmu, naročito ispod epitela i obično se nalaze u blizini krvnih sudova. Koji će mastociti biti aktivirani un-



akrsnim povezivanjem IgE antitijela specifičnih za alergen često zavisi od puta ulaska alergena u organizam. Kada se ovako senzibilizirani mastociti izlože ponovnom kontaktu istog antigena, ove ćelije se aktiviraju i luče svoje medijatore. Do aktivacije mastocita dolazi usljed vezivanja alergena za dva ili više molekula IgE antitijela na toj ćeliji, kada se to dogodi dolazi do unakrsnog povezivanja FcεRI molekula koji nose IgE i sprovođenja biohemijских signalnih lanaca FcεRI. Ti signali dovode do odgovora u mastocitima i brzog oslobađanja sadržaja granula (degranulacija), sinteze i sekrecije lipidnih medijatora i sinteze i sekrecije citokina. (slika 1.) Najvažniji medijatori mastocita su vazoaaktivni amini i proteaze koji se skaldiste i oslobađaju iz granula, novo stvoreni i sekretovani produkti metabolizma arahidonske kiseline i citokini. Najznacajniji amin je histamin. [2]



**Slika 1.** Redosljed događaja u ranoj preosjetljivosti, stvaranje IgE antirijela, 2. -Osnovna imunologija, Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Sciv Pillal, četvrto izdanje, str.210

## IN VITRO DIJAGNOSTIKA ALERGIJE

Postupak in vitro dijagnostike u alergijskim bolestima kreće otkrićem imunoglobulina E (IgE) (Ishizaka i Johansson, 1968), i omogućava razvoj alergološko laboratorijske dijagnostike. Danas određivanje koncentracije ukupnih i alergen-specifičnih IgE antitijela čini osnovu in vitro laboratorijske alergološke dijagnostike. Imunološki testovi, općenito, otkrivaju reakciju antigen-antitijelo (Ag-At). S obzirom da je reakcija antigen-antitijelo visoko specifična, pogodna je za dijagnostiku, jer će IgE antitijelo reagirati samo s alergenom koji je izazvao njegovu sintezu. Pokazatelji da se u laboratorijskom mediju zbilja reakcija Ag-At mogu biti različiti biljezi koji se vežu za antitijelo. Ako je biljeg enzim, pokreće se reakcija sa supstratom, ako je biljeg izotop, može se detektirati radioaktivnost, dok se kod fluorogenih molekula otkriva fluorescencija. Različiti imunološki testovi dobili su ime prema biljegu za dokaz reakcije.[3]

### Određivanje ukupnog IgE

Prvi korak u identifikaciji atopične osobe kao takve, nakon anamneze, može se provesti određivanjem ukupnog IgE, iako je njegova stvarna vrijednost kontroverzna jer normalne vrijednosti ukupnog IgE ne isključuju postojanje atopijske bolesti, a visoke vrijednosti ukupnog IgE nisu same po sebi uvjet za dijagnozu atopije. Većina atopičnih osoba ima visoke vrijednosti IgE, ali normalan rezultat mora se pažljivo tumačiti: moraju se uzeti u obzir varijacije vezane uz dob i godišnje doba. Općenito, atopijski bolesnici s vrijednostima IgE većim od 1000 UI/ml, uvijek imaju pozitivan specifični IgE protiv nekog alergena.[4]

### Određivanje specifičnog ige

Antigen-specifični IgE je sljedeći korak u in-vitro identifikaciji odgovornog alergena. Danas postoji veliki broj (preko 400) karakteriziranih alergena dostupnih za in - vitro dijagnostičke testove i nekoliko korisnih metodologija za određivanje specifičnog IgE. Rezultati specifičnih IgE dobiveni različitim metodama značajno variraju, s apsolutnim slaganjem u 55-65% slučajeva, razlikama u jednoj klasi IgE u 20-30% slučajeva i razlikama u više od dvije klase



u 5-10%. Specifičnost anti-IgE protutijela korištenog u testu je od kritične važnosti jer svako kontaminirajuće protutijelo može dati nespecifične rezultate. S druge strane postoji kompromis između specifičnosti i osjetljivosti, tako da povećanje osjetljivosti tehnike dovodi do smanjenja njezine specifičnosti. Ne može se reći da postoji jedna metoda koja je bolja od ostalih. Dakle, specifično određivanje IgE varira ovisno o vrsti alergena. Tako da za inhalacijske alergene specifičnost i osjetljivost metoda su znatno veće u odnosu na testove alergena u hrani. Postoji dobra korelacija između kliničke anamneze i specifičnog IgE protiv inhalacijskih alergena, a niža korelacija u slučaju alergena hrane. Uspoređujući dijagnostičku pouzdanost specifičnog IgE u odnosu na druge alergološke dijagnostičke metode, nalazimo značajnu i pozitivnu korelaciju ove tehnike s kožnim testovima (ali nikad više od 90-95%) i testom oslobađanja histamina.[4]

## IMUNO BLOT POLYCHECK TESTOVI

U ovom radu koristili smo imunoblot Polycheck® testove tvrtke Biocheck GmbH Njemačka. To je platformska tehnologija koja omogućava kvantitativno multiparametarsko testiranje različitih parametara (jedan test 20 – 30 alergena) u jednom testnom pristupku. Softver Biocheck Imaging jednostavan za korištenje precizno ocjenjuje testove. Dokumentacija o rezultatima ispisuje i pohranjuje u središnji LIS, uključujući sliku sirovih podataka.

### Polycheck platforma

Danas je odabir alergijskih reakcija središnje pitanje za ljudsku dijagnostiku jer se broj alergija i njezini klinički problemi ubrzano povećavaju tokom posljednjih godina. Biocheck pruža rutinskim laboratorijima brzo i isplativo rješenje za serološku dijagnostiku alergija in vitro. Budući da nije potrebna skupa analitička oprema, test se može postaviti i u malim laboratorijima i izravno u liječničkoj ordinaciji. Po izboru su različiti paneli za alergene: hrana, inhalacija, pedijatrijska, atopijska kao i više kombinacija različitih vrsta alergena – svaki predstavlja 20 zasebnih alergena, jednostavno rukovanje, i samo 200 µl seruma za testiranje na 20 alergena. (slika 2 i 3.), [5]



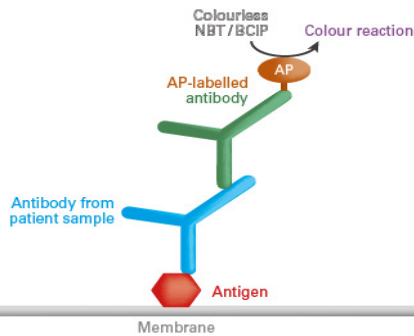
**Slika 2.** prikaz imunoblot testa priprema za rad (preuzeto sa [www.polycheck.de](http://www.polycheck.de))



**Slika 3.** Prikaz imunoblot testa, završeno testiranje (preuzeto sa [www.polycheck.de](http://www.polycheck.de))

### Princip rada imunoblot testa

Polycheck® Screening Assay je enzimski imunotest za kvantitativno mjerenje alergija specifični IgE u serumu. Relevantni alergeni su odvojeno obloženi u linijama kao i kalibratori na nosaču koji je fiksiran u bušotini kasete. Tokom inkubacije pacijentovog seruma, alergen specifični IgE veže se na odgovarajuće alergene. Nevezane komponente seruma se uklanjaju pranjem. Anti-IgE-antitijela obilježena monoklonskim ligandom vežu se na IgE vezan za alergen. Nevezana antitijela uklanjaju se ispiranjem. Obilježeni enzimima anti-ligandi se vežu na imunološke komplekse; višak konjugata enzima uklanja se pranjem te otopina supstrata se dodaje i specifično veže enzimi pretvaraju bezbojni supstrat u tamni talog. (slika 4). Intenzitet boje linija proporcionalan je odgovarajućoj koncentraciji IgE specifičnog za alergen u pacijento-



**Slika 4.** Prikaz vezanja komponenti u imunoblot testu (preuzeto sa <https://www.euroimmunblog.com>)

vom serumu. Uz pomoć Biocheck Imaging Software (BIS) i računala, Polycheck® kasete se interpretiraju. Svaki pojedinačni alergen bit će identificiran i, prema

kalibratorskoj krivulji prisutnoj u svakoj kaseti, koncentracija svakog alergena-specifičnog IgE se kvantificira.[5]

Tumačenje rezultata

Uz korištenje skenera Softver za evaluaciju Biocheck Imaging Software (BIS) analizira i dokumentira rezultate svih pacijenata. Program evaluacije provjerava valjanost kalibracijsku krivulju, dodjeljuje odgovarajući alergen svakoj poziciji skenirane trake i izračunava koncentraciju IgE specifičnu za alergen kalibracijsku krivulju, dodjeljuje odgovarajući alergen svakoj poziciji skenirane trake i izračunava koncentraciju IgE specifičnu za alergen. Rezultati su kvantitativno prijavljeni u International Jedinice (kU IgE/l). (slika 5).[5]

**Slika 5.** Tabela klasifikacije referentnih rezultata po klasama (preuzeto sa <https://www.polycheck.de>)

| Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                    | Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                         |
|-------|----------------------|-----------------------------------|-------|----------------------|--|
| 0     | <0.35                | Nema detekcije specifičnog IgE.   | 4     | 17.5 - <50           | Visok titar specifičnog IgE.           |
| 1     | 0.35 - <0.7          | Veoma slab titar specifičnog IgE. | 5     | 50 - <100            | Veoma visok titar specifičnog IgE.     |
| 2     | 0.7 - <3.5           | Slaba titar specifičnog IgE.      | 6     | >= 100               | Ekstremno visok titar specifičnog IgE. |
| 3     | 3.5 - <17.5          | Jasan titar specifičnog IgE.      |       |                      |  |

## SMETNJE U IMUNOTESTIRANJU - INTERFERENCIJA

Postupci imunotestiranja imaju široku primjenu u kliničkoj medicini i kao takvi se koriste u kliničkim biokemijskim laboratorijima kako za hitna tako i za rutinska ispitivanja. Kliničarima i laboratorijskom osoblju često se prezentiraju rezultati imunotestiranja koji nisu u skladu s kliničkim nalazima. Bez visokog stepena sumnje na smetnje se uglavnom neće detekovati. Često takvi rezultati mogu biti posljedica niza interferencija u imunološkim testovima a između ostalih mogu uključivati i unakrsno reagirajuće tvari. Uglavnom otkrivanje i daljnje postupke kod interferencije rezultata ovisi o praksi laboratorije, njene saradnje sa distributerom reagenasa koje daju praktič-

na rješenja za ispitivanje sumnjivih rezultata kao i dobre saradnje sa kliničarima. Tvari koje mijenjaju mjerljivu koncentraciju analita, odnosno utiču na proces vezanje antigena i antitijela mogu potencijalno dovesti do smetnji u imunološkom testu rezultirajući lažno povišenim ili lažno niskim koncentracijama analita. Prevalencija smetnji općenito je niska u testovima koji sadrže blokatore koji neutraliziraju ili inhibiraju smetnje, ali je često veća u novim, neproverenim imunotestovima.[6]

Interferencija u imunotestiranju može dovesti do pogrešne interpretacije pacijentovih rezultata od strane laboratorija i pogrešnog toka liječenja od strane ljekara. Laboratoriji bi trebali uspostaviti procese za otkrivanje, testiranje i prijavu sumnjivih smetnji. Jednako je važno da ljekari prenesu laboratoriju svaku kliničku sumnju na nesklad između kliničkih i lab-



oratorijskih podataka. Neophodno je da laboratorij obavijesti ljekare o postupku praćenja i izvještaje o prisutnosti bilo kakvih smetnji. Uspostavljanje stalnog kontakta laboratorij-lijječnik ključno je za kontinuiranu svijest o mogućim pogrešnim rezultatima analiza zbog smetnji u procesu testiranja.[6]

## UNAKRSNO REAKTIVNE DETERMINANTE UGLJIKOHIDRATA (CCD)

Unakrsno reaktivne determinante ugljikohidrata ili CCD-ovi su prisutni u glikoziliranim proteinima, a proces glikozilacije događa se u endoplazmatskom retikulumu i u Golgijevom kompleksu dodatkom ugljikohidrata na specifične aminokiselinske ostatke proteina. U proteinima biljaka i insekata dolazi do N-glikozilacije u kojoj se oligosaharidi (glikani) vežu na atom dušika koji je prisutan u aminokiselinskim ostacima asparagina (Asn). U biljkama i insektima, dodani N-glikani su veoma slični; na primjer,  $\alpha$ 1,3-fukoza, rjeđe,  $\alpha$ 1,6-fukoza (glavna struktura poznata kao MMF<sup>3</sup>F<sup>6</sup>), koji su epitopi visoko imunogeni i sposobni inducirati proizvodnju IgE antitijela.[7] Iako se CCD smatra imunogenom molekulom, klinički je irelevantan, jer nema izvještaja o alergijskim reakcijama uzrokovanim kao rezultat imunološkog odgovora potaknutog na ove epitope.[8]. Ovaj nedostatak alergijskih reakcija može se pripisati činjenici da je CCD monovalentna struktura, koja ne dopušta poprečnu vezu između CCD i anti-CCD IgE povezanog sa FcεRI receptorima na mastocitu, čime ne uzrokuje degranulaciju mastocita i oslobađanje upalnih medijatora kao što su vazoaktivni amini i citokini. Međutim, anti-CCD IgE je relevantan kod in vitro dijagnostike alergije, budući da više od 20% pacijenata s alergijom razvija ova antitijela, što bi moglo biti povezano s generiranjem lažno pozitivnih rezultata na RAST testovima.[9] CCD-ovi su molekularne strukture koje se također nalaze u bromelainu (Brl), enzimu dobivenom iz sirovog i vodenog ekstrakta ananasa (*Ananas comosus*), koji ima dva N-glikana,  $\beta$ 1,2-ksilozu i  $\alpha$ 1,3-fukoze, sa strukturom zvanom MUXF<sup>3</sup>. Zbog sličnosti između ove strukture i CCD epitopa prisutnih u alergenima biljaka i insekata, Brl

može biti koristan alat za razlikovanje pacijenata koji imaju samo anti-CCD IgE od onih koji imaju specifično prepoznavanje proteinskih epitopa. [10]

## HISTORIJAT CCD

Iako je prvi put opisano prije nekoliko desetljeća, važnost antitijela specifičnih za ugljikohidrate kao medijatora alergije tipa I nije bila prepoznata sve do nedavno. Prije se smatralo da antitijela specifična za alergen IgE koja se vežu na epitope ugljikohidrata pokazuju klinički irelevantnu unakrsnu reaktivnost. Međutim, to se promijenilo nakon otkrića alergija tipa I posebno posredovanih oligosaharidnim strukturama.[11]

U 1960-ima znanstvenici su sve više pretpostavljali da alergene mora karakterizirati zajednička karakteristika koja definira alergen kao alergen.[12] Nekoliko skupina znanstvenika neovisno je ispitala kliničku reaktivnost alergičnih bolesnika na različite ekstrakte alergena u kožnim testovima i, prema izračunatim koeficijentima korelacije, predložilo da se alergeni mogu grupirati u skupine ili obitelji bliskog alergennog potencijala.[13] Na temelju ovih rezultata, drugi su pretpostavili da su ključna kemijska svojstva alergena N-glikozidno povezani šećeri.[14] Iako se to nije pokazalo kao ključ za razumijevanje alergijskog potencijala određenih antigena općenito, pokazalo se tačnim: mnogi alergeni, posebno oni iz biljnog carstva, posjeduju zajedničke N-glikozidno povezane imunogene determinante ugljikohidrata sa svojstvima vezanja IgE. Godine 1979., japanska je skupina opisala kompletnu strukturu ugljikohidratnog dijela bromelaina iz matice ananasa, što se općenito smatra početnom točkom identifikacije unakrsno reaktivnih determinanti ugljikohidrata i njihove važnosti.[15]

Iste godine Baur i sur. opisao je međusobnu inhibiciju Radio-Allergo-Sorbent-Test-a (RAST) na papain, bromelain, pšenično brašno, raženo brašno, pelud trave i pelud breze. Međutim, relevantne unakrsno reaktivne strukture bilo je teško identificirati s radioimunoelektroforezom, koja je u to vrijeme bila standardna metoda. Početkom 1980-ih, Aalberse i njegovi kolege identificirali su IgE antitijela koja unakrsno reagiraju s biljnom hranom, peludom i otrovom Hymenoptera novim i preferiranim postupkom "imunoblotting".[16]



Posebno su dva nalaza omogućila uspostavljanje koncepta 'unakrsno reaktivnih determinanti ugljikohidrata', ukratko CCD-a: njihovi rezultati koji pokazuju da se križno-reaktivni inhibitorni učinak peludi trave u RAST-u može uništiti predobradom perjodatom, postupkom koji rezultira razgradnjom ugljikohidrata, I opažanja, da lektin koji sadrži gume poput tragakan-tove gume - lektini vrlo specifično vežu određene ugljikohidrate - mogu inhibirati razine RAST-a u heljdi ili krumpiru. Kasnije su ovi nalazi dokazani pokazujući da glikopeptidi napravljeni od bromelaina iz stabljike ananasa mogu inhibirati vezanje anti CCD IgE . Ne-humani monosaharid  $\beta$ -(1,2) ksiloza vezan je za prvu manozu u području jezgre N-glikana. Identificirano je da su ove imunogene fukoze i ksiloze odgovorne za vezanje IgE i križnu reaktivnost IgE. Očekuje se da oko 15-30% atopijskih bolesnika koji povećavaju IgE odgovor ima anti-CCD IgE. [17]

## CCD BLOKERI

Prisutnost anti-CCD IgE može se dokazati uz pomoć screening alergena koji sadrži CCD, kao što je MUXF3, ili pomoću prirodnih glikoproteina kao što su bromelain, peroksidaza iz hrena, ili askorbat oksidaze. Pozitivan test samo potvrđuje prisutnost takvih protutijela u serumu, ali ne dopušta pouzdanu izjavu o tome je li reaktivnost s određenim izvorom alergena isključivo posljedica CCD-ova ili su dodatno uključena protein-specifična IgE antitijela. Smjernice AWMF-a poznate kao In vitro Allergiediagnostik (In vitro dijagnoza alergije) [18] navode da test inhibicije sa specifičnim CCD probirnim alergenom može značajno poboljšati specifičnost testa. U tamo spomenutim referencama , test inhibicije se smatra poželjnim alatom za povećanje specifičnosti, ali posebne preporuke nisu dane. Podaci o tome nedostaju, a tehnička primjena ostaje neriješena. [19]. Dakle, postoji potreba za jednostavnim postupkom odvajanja pljeve anti-CCD IgE antitijela od pšenice klinički relevantnog antigen- specifičnog IgE. Nevažne ili lažno pozitivne rezultate testova treba suzbiti, a na relevantne ne treba utjecati. Tehnički plan Izvođenje postupka treba biti jednostavno, tvar stabilna i neproblematična, troškovi niski, rezultati ponovljivi, a valjanost visoka. Nedavno je razvijen CCD blokator za rješavanje upravo ovog problema. [20]

CCD blokator je sintetski gliko protein napravljen od humanog serumskog albumina (HSA, Sigma-Aldrich) i visoko pročišćenog biljnog glikopeptida. Bromelain se prvo izolira iz ekstrakta stabljike ananasa (Sigma-Aldrich) i probavlja s protease. Ovim se procesom uništavaju svi postojeći proteinski epitopi. Tako dobiveni glikopeptid pročišćava se takozvanom MUXF strukturom (posebno MUXF<sup>3</sup>) i dipeptidom ili tripeptidom kako bi se postigla homogenost. Identitet i čistoća testirani su MALDI-TOF masenom spektroskopijom. MUXF glikopeptid je povezan s HSA preko dinetrodifluorobenzena (Sigma-Aldrich). MALDI-TOF masena spektroskopska analiza otkrila je umjerenu prisutnost najmanje devet MUXF glikopeptida. (slika 6.) Budući da sam CCD blokator ne sadrži antigen-ske determinante, može se, isključiti rizik od nenamjerne supresije relevantnih IgE alergijskih reakcija. Polivalentnost CCD blokatora osigurava njegovu visoku učinkovitost i, posljedično, nisku radnu koncentraciju. CCD blokator se može dodati serumima prije određivanja specifičnih IgE antitijela korištenjem bilo kojeg tipa IgE sistema za testiranje. [20]

## CILJ RADA

U ovom smo se radu usredotočili na „šarene“ rezultate za specifične IgE za inhalatorne alergene a pogotovo za rezultate hrane, s ciljem da potvrdimo ili isključimo kao lažno pozitivne kako bi kliničari imali pouzdane podatke. Sve rezultate dobivene prije kao i poslije obrade sa CCD blokatorom smo statistički obradili i uporedili

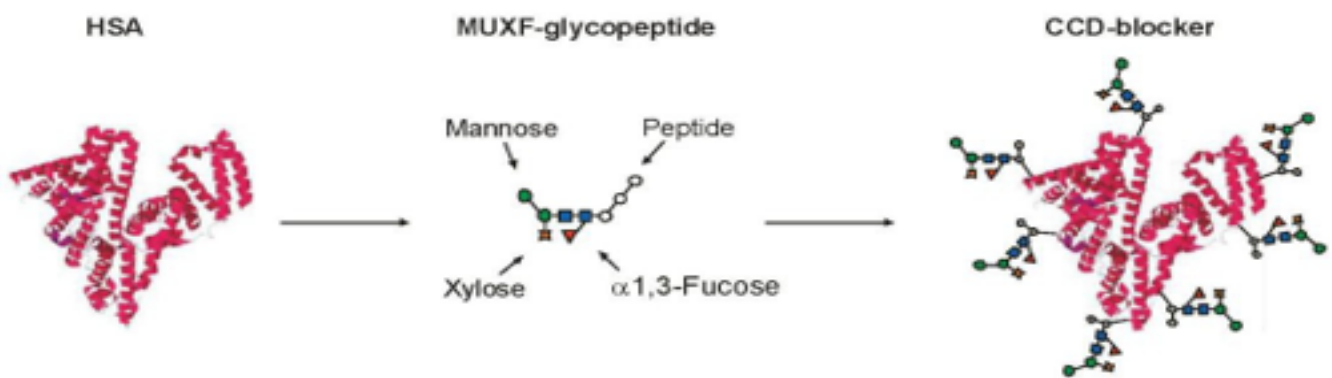
## MATERIJAL I METODE

Od 2013. godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje uzoraka na inhalatorne i alergene hrane. Kroz rad smo se neizbježno susretali sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata, pokušavali ih riješiti na način ponavljanje testova i uzoraka kao i izdavanjem komentara rezultata uz nalaz. Od 2021 godine CCD blokatore uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U istoj godini je kod 388 uzoraka seruma ispitana preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane. Za obradu seruma su korišteni Polycheck multiparametarski testovi (Njemačka)



koji tada još nisu sadržavali indikatore za CCD. Kod 43 uzorka smo izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni serumi su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Oba rezultata su poslana liječniku koji je upućivao

kao i odgovarajući komentar. Ovaj rad je rezultat našeg iskustva sa „šarenim“ rezultatima za specifične IgE i njihovo tretiranje sa CCD blokatorima.



Slika 1. Proizvodnja CCD blokatora iz humanog serumskog albumina (HSA) i MUXF glikopeptida.

Slika 6. Proizvodnja CCD blokera iz humanog albumina (HAS) i MUXF glikoproteina (preuzeto sa <https://www.proglycan.com>)

## REZULTATI

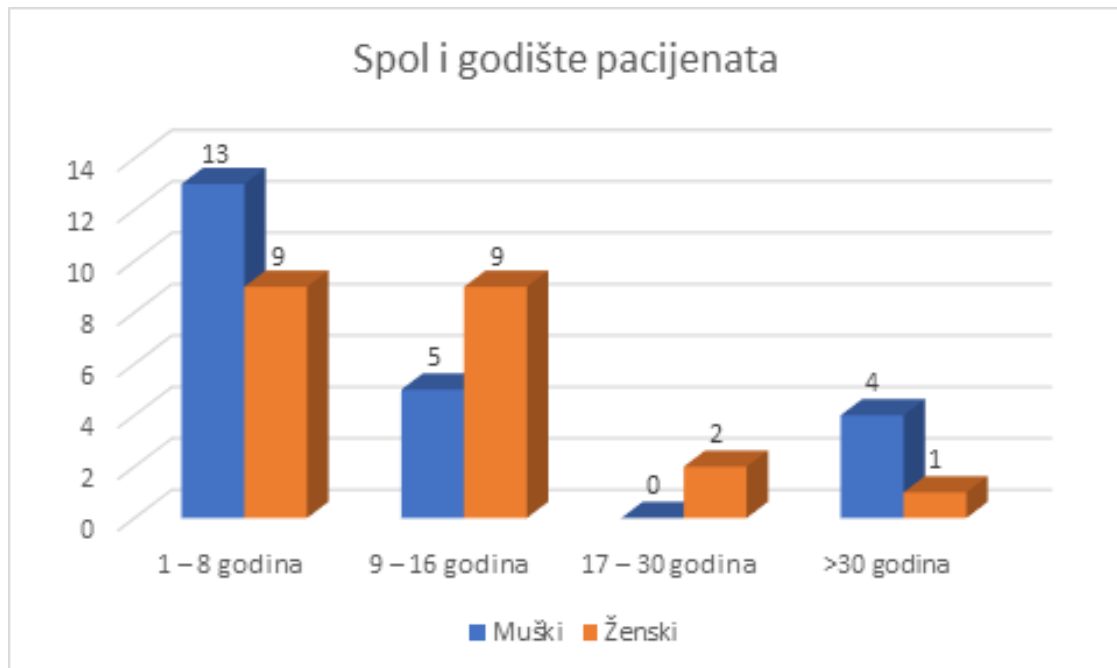
Utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima alergena hrane po klasama prije i nakon davanja blokatora ( $p < 0,05$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima klasa inhalatornih alergeni i alergeni životinja te gljivice prije i nakon testa sa blokatorom ( $p > 0,05$ ).

Ukupan broj ispitanih pacijenata je 43, muški je bilo 22, a ženski 21. u starosnoj dobi od 1 – 8 godina bilo je 22 pacijenta, dok je u starosnoj dobi od 9 – 16 godina bilo 14 pacijenata. U starijim dobnim skupinama je zabilježen manji broj pacijenata. Razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu spola i životnog doba pacijenata ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1. Spol i godište pacijenata

| Spol   | 1 – 8 godina | 9 – 16 godina | 17 – 30 godina | >30 godina | Ukupno |
|--------|--------------|---------------|----------------|------------|--------|
| Muški  | 13           | 5             | 0              | 4          | 22     |
| Ženski | 9            | 9             | 2              | 1          | 21     |
| Ukupno | 22           | 14            | 2              | 5          | 43     |

$$\chi^2=5,65 \text{ (} p=0,1 \text{)}$$

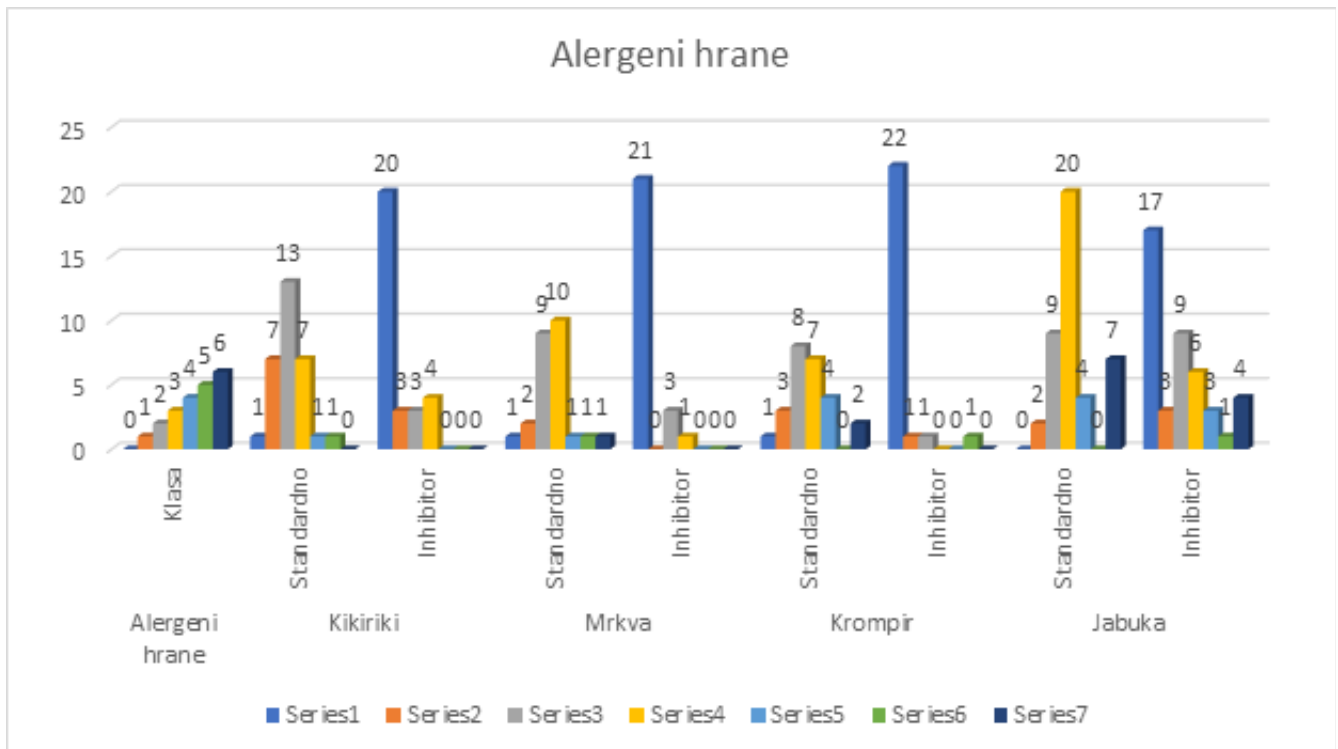


**Grafikon 1. Spol i godište pacijenata**

**Tabela 2. Alergeni hrane** (prikaz najčešće reagovanih alergena hrane, sortirani po rezultatima klasa , dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

| Klasa    |             | 0  | 1 | 2  | 3  | 4 | 5 | 6 |
|----------|-------------|----|---|----|----|---|---|---|
| Kikiriki | Standardno  | 1  | 7 | 13 | 7  | 1 | 1 | 0 |
|          | Inhibitirno | 20 | 3 | 3  | 4  | 0 | 0 | 0 |
| Mrkva    | Standardno  | 1  | 2 | 9  | 10 | 1 | 1 | 1 |
|          | Inhibitirno | 21 | 0 | 3  | 1  | 0 | 0 | 0 |
| Krompir  | Standardno  | 1  | 3 | 8  | 7  | 4 | 0 | 2 |
|          | Inhibitirno | 22 | 1 | 1  | 0  | 0 | 1 | 0 |
| Jabuka   | Standardno  | 0  | 2 | 9  | 20 | 4 | 0 | 7 |
|          | Inhibitirno | 17 | 3 | 9  | 6  | 3 | 1 | 4 |

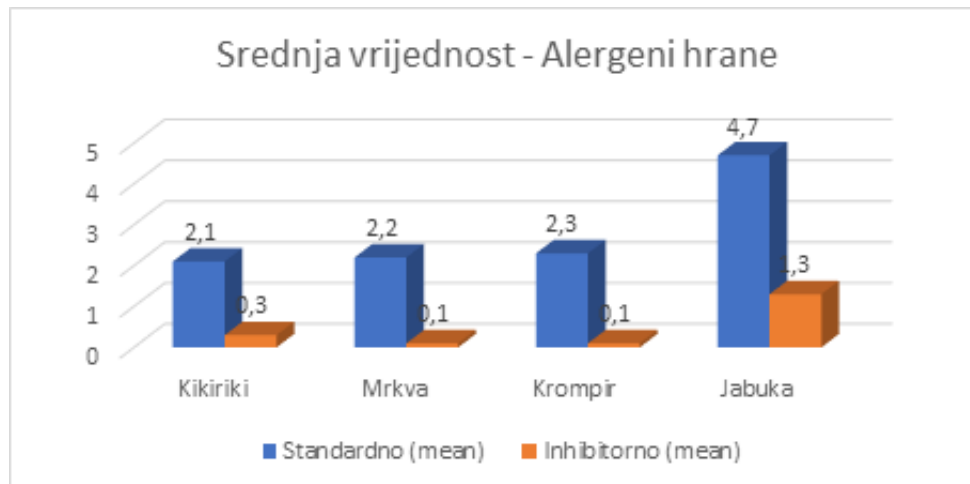




**Grafikon 2. Alergeni hrane**

**Tabela 3. alergeni hrane** - prikaz najčešće reagovanih alergena hrane, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa, dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

| Alergeni hrane | Standardno (mean) | Inhibitorno (mean) |
|----------------|-------------------|--------------------|
| Kikiriki       | 2,1               | 0,3                |
| Mrkva          | 2,2               | 0,1                |
| Krompir        | 2,3               | 0,1                |
| Jabuka         | 4,7               | 1,3                |



**Grafikon 3.** srednja vrijednost - alergen hrane

Na osnovu rezultata T testa možemo zaključiti da se razlika u vrijednostima klasa prije i nakon dodavanja blokera pokazala statistički signifikantnom ( $T=3,34$   $p=0,01$ )

**Tabela 4.** Inhalatorni alergeni ( prikaz najčešće reagovani inhalatorni alergeni, sortirani po rezultatima klasa dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

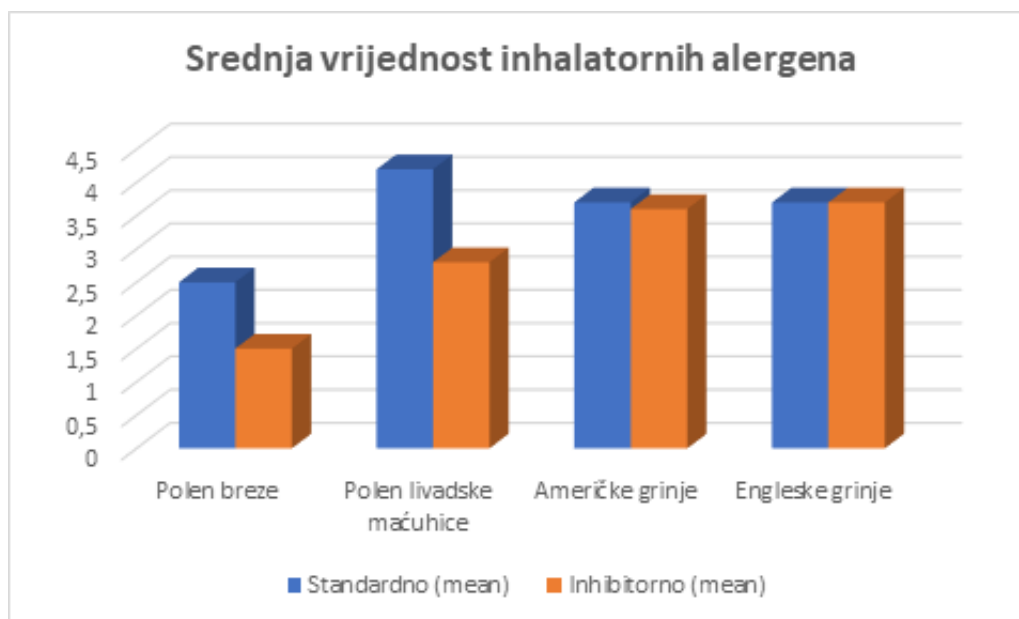
| Inh.Alergeni          | Klasa       | 0  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6  |
|-----------------------|-------------|----|---|---|---|---|---|----|
| Polen breze           | Standardno  | 0  | 5 | 9 | 9 | 2 | 0 | 2  |
|                       | Inhibitorno | 15 | 0 | 3 | 5 | 2 | 0 | 2  |
| Polen livad. maćuhice | Standardno  | 0  | 0 | 3 | 4 | 5 | 0 | 14 |
|                       | Inhibitorno | 8  | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 12 |
| Grinje američke       | Standardno  | 0  | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 16 |
|                       | Inhibitorno | 0  | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 16 |
| Grinje evropske       | Standardno  | 0  | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 16 |
|                       | Inhibitorno | 0  | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 17 |



**Tabela 5.** prikaz najčešće reagovanih inhalatornih alergena, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa , dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera )

| Inhalatorni alergeni    | Standardno<br>(mean) | Inhibitorno<br>(mean) |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| Polen breze             | 2,5                  | 1,5                   |
| Polen livadske maćuhice | 4,2                  | 2,8                   |
| Američke grinje         | 3,7                  | 3,6                   |
| Evropske grinje         | 3,7                  | 3,7                   |

Na osnovu rezultata T testa razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu na vrijednosti klasa prije i nakon davanja blokatora (T=1,0 p=0,35)



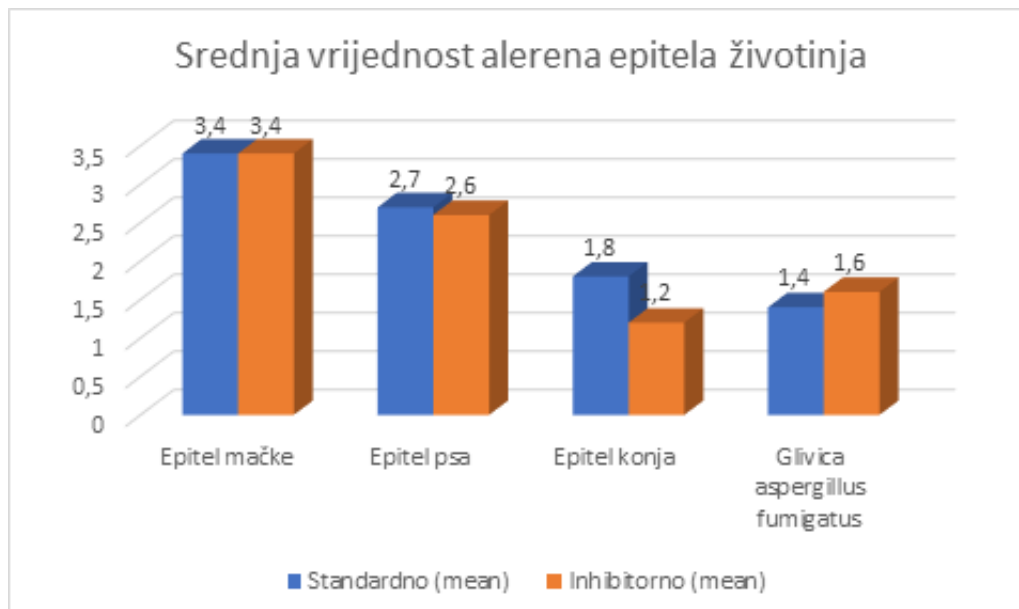
**Grafikon 4.** srednja vrijednost rezultata klasa – inhalatorni alergen



**Tabela 6. Alergeni epitela domaćih životinja i gljivice** - prikaz najčešće reagovani alergeni, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa, dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera )

| Alergeni epitela životinja | Standardno (mean) | Inhibitirno (mean) |
|----------------------------|-------------------|--------------------|
| Epitel mačke               | 3,4               | 3,4                |
| Epitel psa                 | 2,7               | 2,6                |
| Epitel konja               | 1,8               | 1,2                |
| Aspergillus fumigatus      | 1,4               | 1,6                |

Na osnovu T tesat razlika se nije pokazala statistički značajnom u vrijednostima alergena epitela životinja prije i nakon davanja blokatora ( $T=0,18$   $p=0,85$ )



**Grafikon 5.** srednja vrijednost rezultata klasa – alergeni epitela domaćih životinja i aspergillus fumigatus



| Alergeni             | Klasa | IgE [kU/l] |   |   |   |       |     |
|----------------------|-------|------------|---|---|---|-------|-----|
|                      |       | 0          | 1   | 2 | 3 | 4 + 5 | 100 |
| f17 Lješnik          | 3     | 6.0        | [Bar chart showing value 6.0 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f13 Kikiriki         | 3     | 5.3        | [Bar chart showing value 5.3 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f16 Orah             | 2     | 0.92       | [Bar chart showing value 0.92 between 0.35 and 0.7] |   |   |       |     |
| f20 Badem            | 2     | 3.4        | [Bar chart showing value 3.4 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f02 Mlijeko          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                     |   |   |       |     |
| f01 Bjelanjak jajeta | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                     |   |   |       |     |
| f75 Žumanjak jajeta  | 0     | 0.25       | [Bar chart showing value 0.25]                      |   |   |       |     |
| f78 Kazein           | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                     |   |   |       |     |
| f35 Krompir          | 4     | 42         | [Bar chart showing value 42 between 17.5 and 100]   |   |   |       |     |
| f85 Celer            | 2     | 3.4        | [Bar chart showing value 3.4 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f31 Mrkva            | 3     | 7.7        | [Bar chart showing value 7.7 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f25 Paradajz         | 3     | 9.8        | [Bar chart showing value 9.8 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f03 Bakalar          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                     |   |   |       |     |
| f24 Škampi           | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                     |   |   |       |     |
| f95 Breskva          | 3     | 14         | [Bar chart showing value 14 between 0.35 and 0.7]   |   |   |       |     |
| f49 Jabuka           | 3     | 15         | [Bar chart showing value 15 between 0.35 and 0.7]   |   |   |       |     |
| f14 Soja             | 0     | 0.32       | [Bar chart showing value 0.32]                      |   |   |       |     |
| f04 Pšenično brašno  | 3     | 3.8        | [Bar chart showing value 3.8 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f10 Susam            | 3     | 9.3        | [Bar chart showing value 9.3 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |
| f05 Raženo brašno    | 3     | 5.2        | [Bar chart showing value 5.2 between 0.35 and 0.7]  |   |   |       |     |

| Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                    | Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                         |
|-------|----------------------|-----------------------------------|-------|----------------------|--|
| 0     | <0.35                | Nema detekcije specifičnog IgE.   | 4     | 17.5 - <50           | Visok titar specifičnog IgE.           |
| 1     | 0.35 - <0.7          | Veoma slab titar specifičnog IgE. | 5     | 50 - <100            | Veoma visok titar specifičnog IgE.     |
| 2     | 0.7 - <3.5           | Slaba titar specifičnog IgE.      | 6     | >= 100               | Ekstremno visok titar specifičnog IgE. |
| 3     | 3.5 - <17.5          | Jasan titar specifičnog IgE.      |       |                      |  |

Slika 7. prikaz slučaja, nalaz testa na alergene hrane prije dodavanja CCD blokera

| Alergeni             | Klasa | IgE [kU/l] |  |   |   |       |     |
|----------------------|-------|------------|--|---|---|-------|-----|
|                      |       | 0          | 1  | 2 | 3 | 4 + 5 | 100 |
| f17 Lješnik          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f13 Kikiriki         | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f16 Orah             | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f20 Badem            | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f02 Mlijeko          | 3     | 6.5        | [Bar chart showing value 6.5 between 0.35 and 0.7] |   |   |       |     |
| f01 Bjelanjak jajeta | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f75 Žumanjak jajeta  | 0     | 0.15       | [Bar chart showing value 0.15]                     |   |   |       |     |
| f78 Kazein           | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f35 Krompir          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f85 Celer            | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f31 Mrkva            | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f25 Paradajz         | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f03 Bakalar          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f24 Škampi           | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f95 Breskva          | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f49 Jabuka           | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f14 Soja             | 0     | 0.15       | [Bar chart showing value 0.15]                     |   |   |       |     |
| f04 Pšenično brašno  | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f10 Susam            | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |
| f05 Raženo brašno    | 0     | <0.15      | [Bar chart showing value <0.15]                    |   |   |       |     |

| Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                    | Klasa | Koncentr. IgE [kU/l] | Interpretacija                         |
|-------|----------------------|-----------------------------------|-------|----------------------|--|
| 0     | <0.35                | Nema detekcije specifičnog IgE.   | 4     | 17.5 - <50           | Visok titar specifičnog IgE.           |
| 1     | 0.35 - <0.7          | Veoma slab titar specifičnog IgE. | 5     | 50 - <100            | Veoma visok titar specifičnog IgE.     |
| 2     | 0.7 - <3.5           | Slaba titar specifičnog IgE.      | 6     | >= 100               | Ekstremno visok titar specifičnog IgE. |
| 3     | 3.5 - <17.5          | Jasan titar specifičnog IgE.      |       |                      |  |

Slika 8. prikaz slučaja, nalaz testa na alergene hrane prije dodavanja CCD blokera



## DISKUSIJA

Od 2013 godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje alergija koristeći multiparametarske Polycheck imunoblot testove od deset i dvadeset inhalatornih i alergena hrane epitela domaćih životinja i gljivica kao i njihovih kombinacije alergena. Kroz rad se neizbježno susrećemo sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata (CCD) i poduzimajući mjere za njihovo rješenje. Kao lijek za rješenje tog problema nametala se upotreba anti - CCD blokera. Zbog visoke cijene prvih blokera odustaje se od njihove nabavke a kliničarima se kao uputa i objašnjenje na sumnjivi nalaz pišemo komentare i preporuke za dalje korake pacijenta (primjer komentara: zbog prisustva više pozitivnih rezultata klase 1-3 na specifične alergene iz hrane, postoji mogućnost da su oni posljedica interferencije po tipu CCD a ne stvarne prisutnosti specifičnih IgE koji bi upućivali na senzitivaciju. Preporučujemo pacijentu kod osnovane sumnje na alergijsku reakciju tipa I na pojedine alergene hrane uraditi i PRICK testiranje prije konačne dijagnoze). Od 2020 godine CCD blokera su po cijeni daleko pristupačniji te ih uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U narednoj smo godini kod 388 uzorka ispitali preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane a kod 43 pacijenta izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni uzorci su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Vrijednosti rezultata in vitro alergo testiranja su standardizovane vrednuju po klasama od 0 do 6.

Tako klasa 0 ima koncentraciju IgE (kU/l) manje od 0,35 kU/l, a rezultat intepetira kao negativan ili ne postojanje detekcije IgE, vrijednost klase 1 je 0,35 – 0,7 kU/l, i interpretira kao veoma slabo pozitivan, klasa 2 je 0,7 – 3,5 kU/l i označava kao slabo pozitivna, klasa 3 iznosi od 3,5 – 17,5 kU/l i vrednuje kao jasan titar specifičnog IgE, klasa 4 od 17,5 – 50 kU/l a označava kao visok titar, klasa 5 je od 50 – 100 kU/l je veoma visoki titar, dok klasa 6 iznosi više od 100 kU/l a interpretira kao ekstremno visoki titar specifičnog IgE.

U ovoj studiji ukupan broj ispitanih pacijenata je 43, muški je bilo 22, a ženski 21. uglavnom su dominirala djeca i to u starosnoj dobi od 1 – 8 godina 22 pacijenta, a od 9 – 16 godina bilo 14 pacijenata. Uz primjetan podatak da djeca do puberteta dominiraju dječaci a nakon puberteta u većem broju su zastupljene djevojčice. U starijim dobnim skupinama je zabilježen manji broj pacijenata. Razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu spola i životnog doba pacijenata ( $p>0,05$ ).

Kod testiranja alergena hrane uticaj anti – CCD blokera je bio vrlo izražen što je vidljivo kod pojedinih alergena hrane koje su najčešće reagovali i statistički obradili (kikiriki, mrkvu, krompir i jabuku). Uticaj anti CCD na rezultate prije i nakon dodavanja blokera je vidljiva jer kikiriki je prije dodavanja blokera bio pozitivan u klasi 1 sedam uzoraka a u klasama od 2 do 6 pozitivan kod 27 pacijenata, a nakon obrade sa blokerom negativnih je bilo 20, u u klasama od 2 – 3, 7 uzoraka. Slične ili gotovo iste rezultate smo dobili kod obrade alergena mrkve i krompira sa skoro identičnim rezultatima od ukupno 24 pozitivna uzorka koji su se kretali od klase 1 sa 2, a u klasama od 2 - 6 utvrđeno je 22 pozitivna rezultata. Nakon dodavanja blokera negativnih rezultata je bilo 20, a ostatak od 4 uzorka se kretao u nižim klasama, tj. 2 – 3 klase. Rezultati testova kod alergena na jabuku su pokazali nešto višu reaktivnost. Jabuka je od 43 uzorka pozitivno reagovala kod 32 i to u klasi 1, 2 uzorka, a u klasama 2 – 6 kod 30 uzoraka od čega 7 uzoraka sa ekstremno visokim titrom. Nakon obrade sa blokerom kod alergena jabuke dobili smo sljedeće rezultate, negativnih testova je bilo 17, u klasi 1 pronađena su 3 pozitivna uzorka a u klasama od 2 do 6 reagovala su 23 uzorka. Ukupna srednja vrijednost za pojedine alergene hrane (kikiriki, mrkva i krompr) prije dodavanja blokera iznosila je od 2,1 do 2,3 klase, a nakon obrade seruma sa blokerom od 0.1 do 0.3 klase,. Kod jabuke je vidljiva veća reaktivnost i učinak na rezultate i prije i nakon obrade sa blokerom tj. prije blokera prosjek klase je bio 4,7, a nakon uticaja blokera prosjek klase je iznosio 1,3. Rezultati hrane su nam bili veoma bitni zbog mogućnosti da interpretacija re-



zultata pozitivnog alergo testa na hranu sa uticajem CCD može dovesti do zabrane bez potrebe određene vrste ili pak više namirnica, ili uključivanje određene terapije u ovom slučaju nepotrebne.

Kod usporedbe rezultata alergo testova prije i nakon dodavanja blokera kod inhalatornih alergena utvrdili smo sljedeće. Kao najčešće reagujući vanjski inhalatorni alergeni pokazali su polen breze kao i polen lovadske maćuhice. Kod polena breze ukupno je pozitivnih prije dodavanja blokera bilo 27, a najčešće klase su bile 2 i 3, nakon dodavanja blokera 15 testova je bilo negativno i to uglavnom iz klasa 1,2, i 3, dok su više klase ostale ne promjenjene. Kod livadske maćuhice ukupan broj pozitivnih rezultata je 26, i to sa 12 pozitivnih testova u klasama između 2 i 5, dok je ekstremno visok titar bio kod 14 pacijenata. Nakon obrade serumma sa blokerima imali smo 8 negativnih rezultata, u trećoj klasi 4, dok je u klasi 6 stanje bilo skoro ne promjenjeno t. dobili smo 12 pozitivnih testova. Srednja vrijednost klasa za vanjske inhalatorne alergene je kod polena breze prije dobrade sa blokerom je 2,5 dok nakon obrade sa blokerom iznosi 1,5. Prosječna vrijednost klasa kod alergena na livadsku maćuhicu je 4,2 prije blokera, a nakon obrade sa blokerom je vrijednost je iznosila 2,8. Za oba primjera rezultati ne pokazuju statističku značajnost u odnosu na vrijednost klasa prije i nakon davanja blokera.

Kod unutrašnjih inhalatornih alergena najčešći reagujući alergeni su kako evropske tako i američke. Na grinje ukupno je bilo pozitivno 20 uzoraka sa izuzetno visokom reaktivnošću, jer su od 20 pozitivnih 16 reagovala sa ekstremno visokim titrim specifičnog IgE antitijela prije i nepromjenjenim rezultatima poslije obrade sa blokerom sa prosjekom klasa u četvrtoj grupi.

Dakle, na osnovu dobivenih rezultata na inhalatorne vanjske alergene možemo zaključiti da učinak anti CCD blokatora je vidljiv ali ne toliko oliko je kod alergena hrane. Kod inhalatornih unutrašnjih alergena prije svega kod grinja, rezultati prije i poslije obrade sa blokerima su identični pa možemo zaključiti da CCD antitijela ne djeluju unakrsno kod pozitivnih rezultata na grinje.

Alergeni epitela životinja i gljivica također nisu pokazale statističku značajnost jer rezultati alergena epitela mačke, psa i konja kao i na *aspergillus fumigatus* nisu pokazale promjene klasa rezultata prije i nakon obrade seruma sa blokerima, što je pokazala i usporedba prosjeka dobivenih rezultata klasa.

Dobiveni rezultati su potvrdili je da kod rada in - vitro alergo testova na multiparametarskoj imunoblot platformi jasno vidljiv uticaj anti CCD u nastanku više lažnih pozitivnih rezultata a što upućuje na opravdanu sumnju u interferenciji i nagonu na djelovanje ka rješavanju tih sumnji.

Rezultati do kojih smo došli su nam takođe pomogli kod daljnog odabira uzoraka za tretman sa CCD blokerima, koji su se pokazali kao uspješan put u rješavanju problema interferencije rezultata pod uticajem CCD antitijela a posebno kod alergena hrane. Takođe u radu smo dobili i rezultate koji iskaču iz očekivanih vrijednosti odnosno kod kojih testirani CCD blokator nije uspio postići dovoljnu inhibiciju, što navodi na sumnju na uticaj i drugih faktora na sam krajnji rezultat testa (prisutnost dvostruke preosjetljivosti ili inhibiciju uzrokuju faktori koji nisu CCD-ovi) i nameće zadatak laboratorijama, kliničarima i istraživačima da taj problem istraže što detaljnije. Činjenica da CCD-ovi predstavljaju samo jedan potencijalni izvor pogreške u in-vitro dijagnozi alergije, postoje i neki drugi faktori koji mogu imati uticaj kao što je slaba specifičnost IgE, konkurencija IgE ili drugih "imitatora alergije". Međutim problem CCD-a, kvantitativno gledano glavni uzrok neskladnih izvještaja o alergijama.



## ZAKLJUČAK

Eliminacija CCD-specifičnih IgE antitijela pomoću sintetičkog CCD blokatora drastično je smanjila broj lažno pozitivnih rezultati in vitro testova bez ugrožavanja osjetljivosti na relevantne IgE interakcije. Stoga, CCD-blokator predstavlja vrijedan alat za povećanje specifičnosti testa rutinske in vitro dijagnoze alergije.

**Zaključak:** Uklanjanje učinka IgE usmjerenog protiv CCD-a inhibicijom dovodi do značajnog smanjenja lažno pozitivnih in vitro rezultati ispitivanja bez smanjenja osjetljivosti prema relevantnim senzibilizacijama. Primjena CCD blokatora može biti vrijedna gdje god se koriste prirodni ekstrakti alergena ili komponente.

## LITERATURA

1. prim. dr. sc. Sanja Popović-Grle Klinika za plućne bolesti Jordanovac Alergijske bolesti – uzroci i posljedice MEDIX • SRPANJ 2007. • GOD . XIII • BROJ71
2. Dodig s. laboratorijska dijagnostika alergija. Paediatr Croat 2012; 56 (suppl 1): 90-6.
3. Batišta I, Stipičić Marković A, Čvorišćec B. Dijagnostika alergijskih bolesti in vitro. Biochem Med 1996, 6: 213-21.
4. [ML Sanz](#)<sup>1</sup>, [ja Prieto](#), [BITI García](#), [Oehling](#) Dijagnostička pouzdanost određivanja specifičnog IgE Zaved za alergologiju i kliničku imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišna klinika Navarra, Pamplona, Španjolska
5. polichek uputstva za rad [www.polycheck.de](http://www.polycheck.de)
6. Jill Tate, Greg Ward Department of Chemical Pathology, Queensland Health Pathology Service, Princess Alexandra Hospital, Woolloongabba, Queensland 4102, Australija ) Interferencije u imunotestovima , (Clin Biochem Rev 2004; 105-120)
7. Brehler R., Grundmann S., Stöcker B. Unakrsne determinante ugljikohidrata i alergija na otrov Hymenoptera. *Curr. Opin. Klinika za alergije. Immunol.* 2013.; 13 :360–364. doi: 10.1097/ACI.0b013e328362c544.
8. Tretter V., Altmann F., Kubelka V., März L., Becker WM Fukoza  $\alpha$ 1,3 povezana s jezgrom glikoproteinskih n-glikana stvara važan epitop za ige kod osoba s alergijom na pčelinji otrov. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993.; 102 : 259–266. doi: 10.1159/000236534. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#) ]
9. Antonicelli L., Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiologija alergije na himenoptera. *Curr. Opin. Klinika za alergije. Immunol.* 2002; 2 :341–346. doi: 10.1097/00130832-200208000-00008. [[PubMed](#) ] [[CrossRef](#) ] [[Google Scholar](#) ]





10. Maurer HR Bromelain: Biokemija, farmakologija i medicinska uporaba. *stanica. Mol. Život Sci.* 2001; 58 : 1234–1245. doi: 10.1007/PL00000936. [ [PubMed](#) ] [ [CrossRef](#) ] [ [Google Scholar](#) ]
11. Miriam Hils 1†, Florian Wölbing1†, Christiane Hilger Tilo Biedermann1,4 \*Povijest ugljikohidrata u vrsti I Alergija
12. Augustin R, Hayward BJ. Alergeni peludi trava: IV. izolacija nekih od glavnih alergena *phleum pratense* i *dactylis glomerata* i njihovi spektri osjetljivosti u bolesnika. *Imunologija.* (1962) 5:424.
13. Holley JW, Willén K. Metoda faktorske analize za proučavanje intrakutanih kožnih reakcija. *Alergija.* (1969) 24:284–93. doi: 10.1111/j.1398-9995.1969.tb03744.x
14. Berrens L. Kemijska klasifikacija atopijskih alergena: pokušaj integracije. *Int Arch Allergy Immunol.* (1971) 41:186–98. doi: 10.1159/000230517
15. Ishihara H, Takahashi N, Oguri S, Tejima S. Kompletna struktura ugljikohidratnog dijela bromelaina iz stabljike. Primjena glikopeptidaze badema za proučavanje strukture glikopeptida. *J Biol Chem.* (1979) 254:10715–9.
16. Aalberse R, Koshte V, Clemens J. Imunoglobulin E antitijela koja križno reagiraju s biljnom hranom, polenom i otrovom Hymenoptera. *J Allergy Clin Immunol.* (1981) 68:356–64. doi: 10.1016/0091-6749(81)90133-0 23. Weber A, Schröder H,
17. Thalberg K, Marz L. Specifična interakcija IgE antitijela s ugljikohidratnim epitopom fosfolipaze otrova medonosne pčele A2. *Alergija.* (1987) 42:464–70. doi: 10.1111/j.1398-9995.1987.tb00364.x 24. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker
18. Renz H, Biedermann T, Bufe A, Eberlein B, Jappe U, Ollert M, Petersen A, Kleine-Tebbe J, Raulf-Heimsoth M, Saloga J, Werfel T, Worm M. AWMF-Leitlinie In vitro alergijska dijagnostika. *Al lergo J.* 2010.; 19: 110-128.
19. Jappe U, Raulf-Heimsoth M. Značaj križno-reaktivnih determinanti ugljikohidrata (CCD) za dijagnozu alergije. *alergologija.* 2008.; 31: 82- 90. CrossRef
20. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Ponovno ocjenjivanje uloge hijaluronidaze u alergiji na otrov žutog omotača. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.; 125: 184-190.



## GOOD LABORATORY PRACTICE FOR POTENTIAL INTERFERENCES OF RESULTS ON SPECIFIC IgE FOR CERTAIN ALLERGENS

Kotorić N.

### ABSTRACT

Allergy diagnosis by determination of allergen-specific IgE is complicated by clinically irrelevant IgE antibodies, the most prominent example of which is IgE against cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) that occur on allergens from plants and insects. Although they have no clinical significance, in the diagnosis of allergies in vitro, the appearance of these antibodies makes it difficult to interpret positive results. Inhibition of CCDs has been proposed as a remedy. In this paper, we presented our experiences in solving problems caused by CCDs in allergy diagnostics and the intention to confirm or reject suspicious results as false positives. Since 2010, the laboratory diagnostics service at Tešanj General Hospital has been doing in vitro allergy testing. During our work, we inevitably encountered “suspicious” positive results, suspecting the cross-reaction of carbohydrates and taking measures to solve them. Since 2021, we have been introducing CCD blockers into the routine processing of suspicious results. In the same year, we examined hypersensitivity to inhalant and food allergens in 388 samples, and in 43 we expressed suspicion of CCD reactivity. Separated samples were subjected to CCD inhibition test and retested and the results were compared with the previous ones. This paper is the result of our experience with “colorful” results for specific IgE and their treatment with CCD blockers. A statistically significant difference was found in the values of food allergens by a class before and after the administration of the blocker. However, in the case of inhalant allergens and allergens of fungi and animal epithelium, no statistically significant difference was found in the class values before and after administration of the blocker. Elimination of CCD-specific IgE antibodies using a synthetic CCD blocker drastically reduced the number of false-positive in vitro test results without compromising sensitivity to relevant IgE interactions. Therefore, the CCD-blocker represents a valuable tool to increase the specificity of the routine in vitro allergy diagnosis test.

**Corresponding author:**

**Nermin Kotorić**

**Email: [kotoric.nermin@hotmail.com](mailto:kotoric.nermin@hotmail.com)**

**Tel. 00387 061 692 852**



## PROMJENE U DIFERENCIJALNOJ KRVNOJ SLICI KOD PROFESIONALNO IZLOŽENIH OSOBA DJELOVANJU BENZENA

Esad Burgić

### SAŽETAK

Korištenjem diferencijalne krvne slike (DKS) – optička metoda, kao parametra u sistematskom pregledu radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa, možemo procijeniti napredovanje mijelosupresije uzrokovane benzenom i njegovim homolozima tokom određenog vremenskog perioda. Cilj rada je utvrditi prisustvo elemenata diseritocitopoeze, disgranulocitopoeze, distrombocitopoeze u perifernom razmazu krvi kod profesionalno izloženih osoba djelovanju benzena. Kao materijal za istraživanje je uzeta puna krv sa EDTA u laboratoriju JZU DZ Lukavac za vrijeme sistematskog pregleda radnika koji rade sa sirovim benzenom u Global Ispat koksnoj industriji Lukavac, i uzorci krvi nastavnog osoblja Javne ustanove Gimnazija Lukavac, kao kontrolni. Uzorcima krvi uzete sa EDTA po standardiziranom postupku je urađena optička diferencijalna krvna slika (periferni razmaz), bojena po metodi May Grüenvald – Giemsa i preparati analizirani na mikroskopu Leica 1000 pod povećanjem 100/1,25. Kod radnika u proizvodnji benzena su promjene u diferencijalnoj krvnoj slici značajno češće nego kod kontrolne grupe ispitanika, što dokazuje mielosupresivno dejstvo benzena i njegovih homologa. Promjene u DKS ispitivane grupe se registruju od najkraće do najduže ekspozicije, stoga da je u skupini sa akspozicijom >20 godina broj najveći. Promjene u DKS ispitivane grupe u periodu 2008 – 2011, pokazuje veću učestalost u periodu 2011. 2008 je bilo 11 ili 27,5% patološki nalaza, a 2011 je bilo 32 ili 80% patoloških nalaza, što je dokaz postepenog mielosupresivnog dejstva benzena. Preporučuje se uvođenje optičke diferencijalne krvne slike u obavezni program pretraga prilikom sistematskog pregleda radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa.

### UVOD

Zbog dokazanog kancerogenog dejstva benzena, preventivno mielosupresivnog, radnici u proizvodnji koksa podliježu obaveznim sistematskim pregledima, a prema zakonima iz oblasti zaštite na radu u Bosni i Hercegovini, sistematski pregled podrazumjeva rad sljedećih testova: laboratorijski standard (krva slika, sedimentacija, glukoza u krvi, urea u krvi, urin), retikulocite, enzimatiski testovi za jetru, kreatinin, klirens kreatinina, vrijeme krvarenja i protrombinsko vrijeme (1,2,3). Među ovim, zakonom propisanim testovima, nije predviđena diferencijalna krvna slika (DKS). Benzen djeluje mielosupresivno na koštano srž te izaziva hiperplaziju, hipoplaziju i displazije. Studija koja je objavljena 2010 godine, a koju je radio Abdul Khalada i saradnici iz Instituta za medicinu rada i okoliša fakulteta Sveučilišta u Birminghamu u Velikoj Britaniji, a obuhvatala je sistematski pregled

**Autor za korespondenciju:**  
**Mr. sc. Esad Burgić, dipl.ing. MLD**  
**Privatni medicinsko biohemijski laboratorij**  
**EsoLab lukavac**  
**Tel. 38762/750-301**  
**Email: esadburgic@hotmail.com**



svih radova objavljenih na ovu temu od 1950 do Jula 2009 godine, u rezultatima između ostalog navode da u skladu izloženosti benzenu na radnom mjestu su prisutni svi mogući prelazi od teških hipoplazija do pojave ekstrapredularne hematopoeze. Mielosupresivni efekat benzena se manifestuje displastičnim promjenama na sve tri krvne loze, što se može ilustrirati promjenom odnosa broja i morfoloških promjena zrelih krvnih elemenata u perifernoj krvi. Diferencijalna krvna slika je brz i ekonomičan pregled koji daje uvid u promjene nastale u koštanoj srži.

Obzirom da benzen ima kumulativno dejstvo na hematopoezu te promjene koje prouzrokuje u hematopoezi karakteriše dug latentni period, te se simptomi bolesti mogu javiti čak godinama poslije prekida ekspozicije.

Hronična izloženost benzenu je u pogledu toksičnosti, sa aspekta hematopoeze usmjerena prema koštanoj srži i perifernim krvnim ćelijama. Izloženost benzenu je povezana sa aplastičnom anemijom, mijelodisplastičnim sindromom (MDS), leukemijom i non Hodgkinovim limfomom.(4,5,6,7). Profesionalno trovanje benzenom i njegovim homolozima javlja se kod svih radova gdje se u procesu proizvodnje dolazi u dodir sa štetnom materijom te zauzimaju značajno mjesto u profesionalnoj patologiji. (8,9,10)

**Materijal i metode:** Kao materijal za istraživanje je uzeta puna krv sa EDTA po standardiziranom postupku u laboratoriju JZU Dom zdravlja Lukavac u periodu od 01.03. – 31.03. 2008 i 01.03. – 31.03.2011 godine, za vrijeme sistematskog pregleda radnika koji rade sa sirovim benzenom i njegovim homolozima u Global Ispat koksnoj industriji – Lukavac, i uzorci krvi nastavnog osoblja Javne ustanove Gimnazija Lukavac, kao kontrolni. U istraživanje je uzeto 80 uzoraka krvi, koji su obrađeni u laboratoriju Doma zdravlja Lukavac. Uzorci su podijeljeni u dvije grupe prema vrsti posla koji rade: Grupa A, ispitivana grupa - radnici koji rade na poslovima sa sirovim benzenom i njegovim homolozima, 40 uzoraka. Grupa B, kontrolna grupa - nastavno osoblje koje radi u Gimnaziji Lukavac, 40 uzoraka. Prema vremenu analiza, istraživanje je sprovedeno u dva perioda: sa uzorcima podgrupa. *Podgrupa a:* uzorci iz 2008 godine. *Podgrupa b:* uzorci iz 2011 godine.

**Metode istraživanja:** Ispitanici su birani metodom slučajnog izbora, te su dobrovoljno učestvovali u analizi. Uzorci su bili, puna venska krv uzeta u vacuetu sa EDTA 3 ml po standardiziranom postupku, je urađena optička diferencijalna krvna slika (periferni razmaz), bojen po metodi May Grünvald – Giemsa i preparati analizirani na mikroskopu Leica 1000 pod povećanjem 100/1,25 (imerzija).

**Statistička obrada rezultata istraživanja:** Provedena je računalnim programom Statistical Package for Social Sciences for Windows, v.18.0 PASW-SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Numerički podaci su prikazani putem mjera centralne tendence i odgovarajućih mjera disperzije. Za testiranje hipoteze između dvije grupe, koncept nezavisnih uzoraka, upotrebljen je T-test i Mann-Whitney-test, ako je uočena diskrepanca u distribuciji. Za testiranje razlike u ponavljanoj mjerenoj, koncept zavisnog uzorka urađen je parni T-test ili Wilcoxon test ovisno o normalnosti distribucije. Za analizu učestalosti upotrebljen je Hi-kvadrat test. Za ispitivanje uticaja dva faktora na rezultujuću varijablu urađena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati su pregledno prikazani tabelarno i grafikonima. Za statističku značajnost vrijednosti "p" odabran je uobičajeni nivo značajnosti "p < 0,05".

**Tip istraživanja i etički aspekt:** Urađeno je retrospektivno prospektivno istraživanje kliničko epidemiološkog tipa. Za učesće ispitanika u istraživanju postoji suglasnost svih učesnika istraživanja.

### Rezultati istraživanja

U obje grupe je bilo po 40 istih ispitanika, odnosno njihovih uzoraka i to u trogodišnjem intervalu, 2008 i 2011 godine. Obje grupe su bile na redovnim sistematskim pregledima i bez tegoba. Dobna distribucija ispitanika i kontrolne grupe nije imala značajne razlike. Dužina radnog staža između ispitanika i kontrole je bila ujednačena. Ispitanici i kontrola se razlikuju prema spolu. Ispitanici su bili 36 muškaraca i 4 žene, a kontrolu su činili 24 muškarca i 16 žena. Ispitanici i kontrola nisu ujednačene po spolu. Razlog za ovakvu spolnu zastupljenost je u tome što muškarci uglavnom rade na proizvodnji benzena, a žene su zastupljene kao laboratorijski radnici koji svakod-



neveno uzimaju uzorke benzena za analize. Kontrola su uposlenici u javnoj ustanovi Gimnazija Lukavac, prosvjetni radnici, a poznato je da je u prosvjeti zastupljen veći broj žena nego muškaraca. Pošto spol ne utiče na mielosupresiju i promjene u hematološkom nalazu, ovaj podatak nije relevantan za studiju.

Prema podacima iz literature mielosupresija se ogleda u pojavi leukopenije sa vrijednostima nižim od  $4,5 \times 10^9 / L$ , uz relativnu limfocitozu.(11,15,1,17) U granulocitima se mogu naći toksične granule, kako u koštanoj srži tako i u perifernoj krvi.(11,15,16,17) U početku može da se pojavi leukocitoza  $10-20 \times 10^9/L$  a tek kasnije leukopenija.(11,19,20,21) Neutropeniju prati često eozinofilija i limfocitoza. Metamijelociti i mijelociti se rijetko viđaju u perifernoj

krvi. Smanjenje polinukleara ide i do agranulocitoze.(11,20,21,22) Ovi literarni podaci su potpuno u skladu sa našim istraživanjem. U našim rezultatima kod ispitivane grupe, prisutne su vrijednosti broja leukocita koji spadaju u leukopenije, ali i vrijednosti broja leukocita koji spadaju u leukocitoze, koji su u ovom istraživanju više zastupljene.

U diferencijalnoj krvnoj slici odnosno perifernom razmazu koji je rađen po metodi May Grünvald Giemsi prisutne su bile značajne razlike između grupa i podgrupa. U ispitivanoj grupi u periodu uzorkovanja 2008 godina bilo je 29 uzoraka sa normalnim nalazom diferencijalne krvne slike i 11 uzoraka sa patološkim elementima diferencijalne krvne slike.

Tabela 1. Nalazi diferencijalne krvne slike grupe A i podgrupa

| Grupa A             |                                   |       | podgrupa a | podgrupa b | Ukupno |    |
|---------------------|-----------------------------------|-------|------------|------------|--------|----|
| DKS<br>(Per. razm.) | normalan nalaz                    | N     | 29         | 8          | 37     |    |
|                     |                                   | % DKS | 78,4%      | 21,6%      | 100,0% |    |
|                     | atipični limfociti                | N     | 2          | 14         | 16     |    |
|                     |                                   | % DKS | 12,5%      | 87,5%      | 100,0% |    |
|                     | tox.gr.u neut.granul.             | N     | 4          | 4          | 8      |    |
|                     |                                   | % DKS | 50,0%      | 50,0%      | 100,0% |    |
|                     | anizocit., hipohrom.              | N     | 1          | 2          | 3      |    |
|                     |                                   | % DKS | 33,3%      | 66,7%      | 100,0% |    |
|                     | atyp.limf., tox.gr.u neut.granul. | N     | 3          | 8          | 11     |    |
|                     |                                   | % DKS | 27,3%      | 72,7%      | 100,0% |    |
|                     | megatrombociti                    | N     | 1          | 2          | 3      |    |
|                     |                                   | % DKS | 33,3%      | 66,7%      | 100,0% |    |
|                     | tox.gr.u neut.granul.,mijelocit   | N     | 0          | 2          | 2      |    |
|                     |                                   | % DKS | ,0%        | 100,0%     | 100,0% |    |
|                     | Ukupno                            |       | N          | 40         | 40     | 80 |



U kontrolnoj grupi u periodu uzorkovanja 2008 godina nije bilo patoloških nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici. Svih 40 uzoraka je imalo normalan nalaz. Ispitivana grupa u ispitivanom periodu 2011 godine je im-

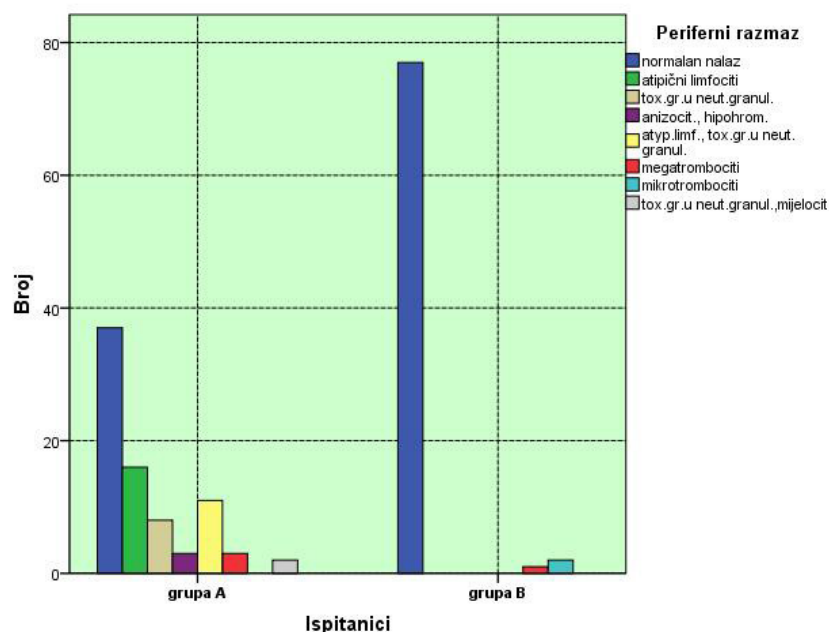
ala u 8 uzoraka normalan nalaz diferencijalne krvne slike, a u 32 uzorka su bile prisutne patološke promjene u diferencijalnoj krvnoj slici.

Tabela 2. Nalazi diferencijalne krvne slike grupe B i podgrupa

| Grupa B                |                 |       | podgrupa a | podgrupa b | Ukupno |
|------------------------|-----------------|-------|------------|------------|--------|
| DKS<br>(Per.<br>razm.) | normalan nalaz  | N     | 40         | 37         | 77     |
|                        |                 | % DKS | 51,9%      | 48,1%      | 100,0% |
|                        | megatrombociti  | N     | 0          | 1          | 1      |
|                        |                 | % DKS | 0%         | 33,3%      | 100,0% |
|                        | mikrotrombociti | N     | 0          | 2          | 2      |
|                        |                 | % DKS | ,0%        | 100,0%     | 100,0% |
| Ukupno                 |                 | N     | 40         | 40         | 80     |

U kontrolnoj grupi je u ispitivanom periodu 2011 godine je bilo 37 uzoraka sa normalnim nalazom difer-

encijalne krvne slike, a 3 uzorka su imali patološke promjene u diferencijalnoj krvnoj slici.



Grafikon 1. Diferencijalna krvna slika (periferni razmaz) grupa A i B



Pearsonov Hi kvadrat test je pokazao za ispitivanu grupu vrijednost 25,85 što je statistički značajno za  $p < 0,0001$  u odnosu na izloženost i vrijeme uzorkovanja te razliku između grupa i podgrupa. Primjetne su značajne razlike u nalazima diferencijalne krvne slike u periodu uzorkovanja.

U ispitivanoj grupi je u periodu uzorkovanja 2008 godine bilo 72,5 % normalnih nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici i 27,5 % patoloških, a u kontrolnoj grupi u istom periodu uzorkovanja je svih 40 uzoraka ili 100 % bilo normalnih nalaza diferencijalne krvne slike.

U drugom periodu uzorkovanja, 2011 godine je u ispitivanoj grupi bilo 20,6 % normalnih nalaza u diferencijalnoj krvnoj slici i 79,4 % patoloških nalaza, dok je u kontrolnoj grupi u istom periodu uzorkovanja bilo 92,5 % normalnih nalaza i 7,5 % patoloških.

U diferencijalnoj krvnoj slici odnosno u perifernom razmazu se na najočigledniji način očituju promjene uzrokovane štetnim dejstvom benzena i njegovih homologa. Literarni podaci govore da se najčešće promjene prikazuju kao karakteristika smanjene hematopoeze. (22,24,25,27,30) Prisutna je anizocitoza, leukopenija sa pojavom toksičnih granulacija u neutrofilnim granulocitima te promjene u trombocitima kao što su mega i mikrotrombociti. Široki spektar genotoksičnih efekata u limfocitima, kod radnika izloženih dejstvu benzena je dobro dokumentirana, kao što je i uloga kromosomskih efekata u karcinogenezi. Tu je i sve više dokaza o bliskom odnosu između limfoidnih tumora i vrsta tumora mieloidnog porijekla poznato da je uzrokovano benzenom. (29,30,31) Nekoliko studija koje su rađene da se utvrdi odnos između izloženosti benzenu i odgovor organizma, a koji se odnosi na hematološke efekte je utvrdilo da je veći pad u perifernoj krvnoj slici stanica bijele loze na nižim razinama izloženosti ( $< 1\text{ppm}$ ), nego na višim razinama. (18,19,32,38,39,40,41). Ovi literarni podaci su potpuno u skladu sa našim istraživanjem, stim da je u ovom istraživanju najkarakterističnija promjena bila u prisutvu atipičnih limfocita u perifernom razmazu. Nije bilo izraženog pada stanica ni jedne loze u perifernoj krvnoj slici i nego na protiv bilo je izraženo povećanje broja leukocita u odnosu na period izloženosti, te pojavu svih patoloških elemenata

u diferencijalnoj krvnoj slici koje i literatura opisuje. Upoređujući rezultate ispitivane i kontrolne grupe, te promjene hematološkog nalaza: diferencijalne krvne slike, registrovane u ispitivanoj grupi, ukazuju da se ove promjene mogu povezati sa mielosupresivnim djelovanjem benzena, pošto iste promjene nisu registrovane kod kontrolne grupe.

Na osnovu učinjene analize može se dati preporuka da se diferencijalna krvna slika i to optička metoda, uvede kao obavezan parametar prilikom sistematskog pregleda radnika koji rade na proizvodnji benzena i njegovih homologa, što dosadadašnje zakonodavstvo nije uvrstilo kao obavezu.



## LITERATURA

1. Uredba o ratifikaciji konvencije o zaštiti od opasnosti od trovanja benzenom (MOR br. 136), Službeni list SFRJ 16/76.
2. Zakon o zaštiti na radu, Službeni list SRBiH, broj 22/90.
3. Pravilnik o uslovima za utvrđivanje radnih mjesta sa posebnim uslovima rada i ljekarskim pregledima radnika na tim radnim mjestima, Službeni list SRBiH, broj 2/91.
4. Heilbronner E, Jacques J, Havrez P., Benzolformel u: *Chemie in unserer Zeit*. 32.1998,5, 256-264.
5. Šišović A., Policiklički aromatski ugljikovodici u nas. *Arh.Hig toksikol* 2000;51:89-101
6. Rožina B, Organska hemija. Zagreb: skripta Fakulteta poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, 2007:34-43.
7. Nježić Z., Ačanski M. Mirjana: Ekološka crna tačka, *Hem.ind.* 2009;63(2), 75-78.
8. [www.datoteka.com/medicinski\\_leksikon/b/Benzol.html](http://www.datoteka.com/medicinski_leksikon/b/Benzol.html)
9. [www.gikil.ba](http://www.gikil.ba)
10. Arandžević M, Jovanović J. *Medicina rada, Niš: Medicinski fakultet*, 2009, str.134-137
11. Pyatt D, Hays S., A review of the potential association between childhood leukemia and benzene., *Chem Biol Interact.* 2010 Mar 19;184(1-2):151-64.
12. Berbić – Fazlagić J., *Hematologija, IP „Svjetlost“*, Sarajevo, 2006 ; str 48.
13. Bras J., *Harvardski priručnik za stil, Savremeni stavovi u dijagnostici i liječenju mijelodisplastičnog sindroma*, Harvard, 2007; volumen 35, br, 4; str 195 – 208.
14. Labar B, Hauptman E, *Hematologija. Zagreb: Školska knjiga*, 1998:75-9
15. Bennett JM, et al. Proposal for the classification of myelodysplastic syndromes (FAB cooperative group). *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.
16. Swerlow SH, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008:89.
17. Khalade A, et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, *Environ Health.* 2010, 9: 31.
18. Ljubić N, Uloga adhezijskih molekula i izvanstanične potke u mijelodisplastičnom sindromu. *Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu*, 2010; 14-17.
19. Bennett JM, et al. *The myelodysplastic syndromes. Pathobiology and Clinical Management.* New York: Marcel Decker, 2002;124.
20. List AF, et al. Myelodysplastic syndromes. *Haematology Am Soc Hematolo Educ Program* 2004;297-314.
21. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999;340:1649-60.
22. Le Beau MM, Olney HJ. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:479-95.
23. Ibrulj S., i sar. *Citogenetičke metode, primjena u medicini*, Ingeb, Sarajevo, 2008;98-108.
24. Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Chromosome aberrations as boindicators of environmental Genotoxicity. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 7 (4), 2007:311-316.
25. Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Complementarity of standard citogenetic assays. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 8 (1), 2008:27-33.
26. Kasim B, i sar. *Uvod u genetičko inženjerstvo*, Ingeb, Sarajevo, 2005:121-136.
27. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastics syndromes: implications for new therapies. *Leukemia* 2008;14:2-8.
28. Nolte F, Hoffman WK. Myelodysplastics syn-





- dromes; molecular pathogenesis and genomic changes. *Am Hematol* 2008;87:777-95.
29. Zhiying Ji, et al. The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutagenesis*. 2009 ; 24(4): 367–372.
- 30 Smith MT., Advances in understanding benzene health effects and susceptibility., *Rev Public Health*. 2010 Apr 21;31:133-48 2.
31. David B, Temporal Variation in the Association between Benzene and Leukemia Mortality, *Health Perspect*. 2008 March; 116(3): 370–374.
32. Cliona M. McHale, et al. Changes in the Peripheral Blood Transcriptome Associated with Occupational Benzene Exposure Identified by Cross-Comparison on Two Microarray Platforms, *Genomics*. 2009 April; 93(4): 343–349.
33. Kawasaki Y, et al. Benzene-Induced Hematopoietic Neoplasms Including Myeloid Leukemia in Trp53-Deficient C57BL/6 and C3H/He Mice, *Toxicol Sci*. 2009 August; 110(2): 293–306.
34. Matthew S, et al. Biomarkers by Microarray Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression in Benzene-Exposed Workers, *Environ Health Perspect*. 2005 June; 113(6): 801–807.
35. Khan HA, Short Review: Benzenes toxicity: a consolidated short review of human and animal studies, *Human and Experimental Toxicology*, September 1, 2007; 26(9):677-685
36. Vassilios M., Evangelos C., Case report: hydroquinone and/or glutaraldehyde induced acute myeloid leukaemia, *Occup Med Toxicol*. 2006; 1: 19.
37. Duraković Z., Krvotvorni organi u: *Medicina rada i okoliša*, Medicinska naklada, Zagreb 2002. str. 498-506.
38. Gun RT, et al., Update of mortality and cancer incidence in the Australian petroleum industry cohort, *Occup Environ Med*. 2006 July; 63(7): 476–481.
39. Zhiying Ji, Luoping Zhang, 2009, The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutagenesis*. 2009 July; 24(4): 367–372.
40. Codispoti K., Depalma L., Myelodysplastic syndrome in elderly patients: correlation of CBC with cytogenetic and FISH analysis, *Int J Lab Hematol*. 2010 August 1;32(4):443-448.
41. Nakić M. Citologija-dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u malignim oboljenjima djece, *Pediatr. Croat*. 2006;50(Supl 1):167-175.



## **CHANGES IN THE DIFFERENTIAL BLOOD PICTURE IN PERSONS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO BENZENE**

Burgić E.

### **ABSTRACT**

By using the differential blood count (DKS) - an optical method, as a parameter in a systematic examination of workers working on the production of benzene and its homologues, we can assess the progression of myelosuppression caused by benzene and its homologues over a certain period of time. Aim fo the study was to determinethepresenceofelements of dyserythrocytopoiesis, dysgranulocytopoiesis, and dysthrombocytopoiesis in the peripheral blood smear of persons professionally exposed to the effects of benzene. As material for research, whole blood with EDTA was taken in the laboratory of JZU DZ Lukavac during a systematic examination of workers who work with raw benzene in the Global Ispat coke industry Lukavac, and blood samples from the teaching staff of the Public Institution Gimnazija Lukavac, as a control. Blood samples taken with EDTA according to a standardized procedure were subjected to an optical differential blood count (peripheral smear), stained according to the May Grünvald - Giemsa method, and the preparations were analyzed on a Leica 1000 microscope under a magnification of 100/1.25. Among workers in the production of benzene, changes in the differential blood count are significantly more frequent than in the control group of subjects, which proves the myelosuppressive effect of benzene and its homologues. Changes in the DKS of the examined group are registered from the shortest to the longest exposure, with the largest number in the group with exposure >20 years. Changes in the DKS of the examined group in the period 2008 - 2011, shows a higher frequency in the period of 2011. In 2008, there were 11 or 27 .5% of pathological findings, and in 2011 there were 32 or 80% of pathological findings, which is evidence of the gradual myelosuppressive effect of benzene. It is recommended to introduce the optical differential blood count in the mandatory examination program during the systematic examination of workers who work on the production of benzene and its homologues.

### **Corresponding author:**

**Esad Burgić**

**Private medical biochemical laboratory**

**EsoLab Lukavac**

**Tel. 38762/750-301**

**Email: esadburgic@hotmail.com**



## Uputstvo za autore

### Strukturu rada čini:

1. naslovna strana,
2. sažetak
3. glavni dio (razrada teme),
4. zaključak,
5. spisak literature i
6. prilozi (po potrebi).

1. **Naslovna** strana je prva strana rada. Ona treba da pruži osnovne informacije o autoru i radu, hronološkim redom (koristiti Times New Roman, font 12):

- Naziv/naslov rada
- Autor/i (ime i prezime)
- naziv Institucije/a,
- naziv Odjeljenja ili Službe (ukoliko je osoba zaposlena),
- podatke o osobi za korespondenciju (ime i prezime, institucija, adresa, broj telefona, E-mail).

2. **Sažetak** na originalan način prezentira suštinu problema koji se razmatra u radu, ukazuje na njegov značaj, razloge (motive) za njegovu obradu i daje kratak pregled sadržaja rada. Obim sažetka je poželjno da bude u 300 riječi. Sažetak pisati na jezicima naroda BiH, te na engleskom jeziku.

3. **Glavni dio** (razrada teme) je osmišljen, temeljan i argumentovan prikaz teorijske utemeljenosti teme (analiza literature i prethodnih srodnih istraživanja) i praktičnih (ilustrativni primjeri, po pravilu originalni) rezultata koji se odnose na zadatu temu, metodološkog pristupa istraživanju i rezultata istraživanja i njihove interpretacije. On je najvažniji i svakako najobimniji dio rada (obično čini 70-80% rada). Njime treba obuhvatiti sve ono što je u sažetku napisano. Ukoliko je autor koristio praktični dio i posjeduje rezultate, onda na početku glavnog dijela navodi sekciju „Materijal i metode“, te na kraju glavnog dijela sekciju „Rezultati“.

4. **Zaključak** je finalni dio rada. U njemu se na sistematičan i koncizan način saopštavaju najvažnija saznanja do kojih se došlo. On proizilazi iz čitavog sadržaja rada, pa se preporučuje autoru da detaljno pročita sve ono što je prethodno napisao. U zaključku treba da se ocijeni, po mogućnosti kritički, tema koja je bila predmet razrade, procjene stanja ili situacije, potvrde ili odbace postavljene hipoteze, iskažu poruke i doprinos rada, kao i da se ukaže na probleme i pitanja koja bi trebalo dalje obraditi i proučiti.

5. **Spisak literature** je sistematski pregled svih izvora koji direktno ili indirektno tretiraju sadržaj teme rada i koji su korišteni tokom izrade. Postoje različiti sistemi navođenja referenci u literaturi.

Molimo pisati radove po vankuverskom sistemu. Vankuverski sistem navođenja izvora poznat je i kao numerički sistem, jer se oslanja na upotrebu brojki pri navođenju referenci u spisku literature i to npr (1) ili ako imate slijed više referenci (1-5). Navedene brojke koriste se i za objašnjavanje autorstva u otvorenom tekstu. Ovaj sistem je dobio ime prema Međunarodnom udruženju urednika medicinskih časopisa (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) koje je ustanovilo obrazac za naučne radove koji se podnose medicinskim časopisima. Udruženje je poznato i kao Vankuverska grupa koja je prvi sastanak održala u Vankuveru 1978. godine. Popis referenci (izvora) u spisku literature reda se redosljedom kojim se pojavljuju u tekstu.

### Primjeri

Knjiga jednog autora: 1. Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija, Zenica: Fojnica, 2009.

Knjiga dva autora: 2. Durmišević S, Ibrahimagić A. Higijena i zdravstvena ekologija – praktikum dopunjeno izdanje. Univerzitet u Zenici, 2018.



Članak iz časopisa:

1. Prinarhis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gozouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
2. Bedenić B, Žagar Ž. Increased Beta-Lactamase Activity in *Branhamella Catarrhalis* after Exposure to Amoxicilin and Clavulanic Acid. *J Chemother* 1994; 6(6):383-7.