

ISSN 2744-1229

Dcembar, 2023 Vol. 2



ZBORNIK RADOVA

iz

"Laboratorijske dijagnostike"

Komora medicinsko-laboratorijskih dijagnostičara FBiH

**Glavni urednik**

Prof. 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 Mujić (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

E-mail: 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

1. DIJAGNOSTIČKA KORISNOST KORIŠTENJA CA 15-3 I CEA U KOMBINACIJI U SKRININGU KARCINOMA DOJKE.....1

Amar Kustura, Berina Hasanefendić, Lajla Halilović, Velda Smailbegović

2. ZNAČAJ I OPASNOST UPOTREBE NITRITA I HLORIDA U MESU I MESNIM PRERAĐEVINAMA15

Dženana Hasanbašić, Čamka Kovač, Alma Agić, Amila Šut, Amir Ibrahimagić

3. BIOLOŠKE OPASNOSTI U HRANI27

Emina Idrizović, Belma Hodžić, Manja Kunarac, Naida Ramić

4. MOLEKULARNE METODE U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI38

Kamelija Madacki Todorović

5. UPUTSTVO ZA AUTORE52



DIJAGNOSTIČKA KORISNOST KORIŠTENJA CA 15-3 I CEA U KOMBINACIJI U SKRININGU KARCINOMA DOJKE

Amar Kustura, Berina Hasanefendić¹, Lajla Halilović¹, Velda Smailbegović²

1OJ Klinička biohemija sa imunologijom, ²Odjeljenje radijacijske onkologije, Klinički centar Univerziteta u Sarajevu

SAŽETAK

UVOD: Osim genetske komponente ili prisustva porodične historije karcinoma dojke i nošenja mutacija BRCA 1 i BRCA 2 gena postoje i drugi rizikofaktori koji povećavaju rizik za razvoj karcinoma dojke. Ova opaka bolest može biti detektovana u ranoj fazi ukoliko imamo dobru kombinaciju tumorskih markera sa visokom osjetljivošću i specifičnošću. Tako da istraživači i kliničari širom svijeta traže najbolju kombinaciju koja može spasiti mnogo života.

METODE: Istraživanje je provedeno sa alatom za prikupljanje podataka o rizikofaktorima i tumorskim markerima iz kartona na Odjeljenju porodične medicine.

REZULTATI: One Sample T-testom je dokazano da postoji statistička značajnost prilikom korištenja kombinacije tumorskih markera CA 15-3 i CEA i da je ona korisna u skriningu karcinoma dojke i njegovih metastaza, ali također u otkrivanju recidiva.

ZAKLJUČCI: Tumorski markeri koji su korišteni uključujući CA 15-3 i CEA su bili korisni u dijagnozi, skriningu i otkrivanju metastaza kod žena.

AUTOR ZA KORESPONDENCIJU

Amar Kustura, Mr. dipl. ing. MLD

Zahira panjete do 426,

Tel. 062/532-661

E-mail: amar.kustura@hotmail.com





1. UVOD

Karcinom dojke je tip karcinoma koji se formira u ćelijama dojke. Nakon karcinoma kože odnosno melanoma, karcinom dojke je najčešće dijagnostikovani karcinom među ženama u Sjedinjenim Američkim Državama. Karcinom dojke se može pojaviti i kod muškaraca i žena, ali je mnogo češći kod žena. Veoma važna podrška za svjesnost o karcinomu dojke kao i finansiranje istraživanja su pomogli da se desi napredak u dijagnozi i liječenju karcinoma dojke. Stepenn preživljavanja od karcinoma dojke se povećao, tako da broj smrti povezanih sa ovom bolesti se postepeno smanjuje, najviše zbog faktora kao što su rana detekcija, novi personalizirani pristup liječenju i bolje razumjevanje bolesti. (1)

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2020. godine bilo je 2.3 miliona žena kojima je dijagnostikovani karcinom dojke i 685 000 smrti globalno. Do kraja 2020. godine bilo je 7.8 miliona žena koje su bile žive sa dijagnostikovanim karcinomom dojke u prethodnih 5 godina, što je učinilo da ova opaka bolest bude najprevalentniji karcinom na svijetu. Karcinom dojke se javlja u svakoj državi u svijetu kod žena bilo koje dobi nakon

puberteta, ali sa povećanim rizikom poslije u životu. Mortalitet karcinoma dojke se mijenjao malo od 1930-ih pa kroz to do 1970-ih kada je sama hirurgija bila primarna opcija liječenja zvana radikalna mastektomija. Unapređenja u preživljavanju su počela u 1990-im kada države uspostavljaju programe rane detekcije karcinoma dojke koji su bili povezani sa sveobuhvatnim programima liječenja uključujući efektivne medicinske terapije. (2)

Prema podacima Federalnog Zavoda za javno zdravstvo iz 2022. godine, karcinom dojke je bio najčešći uzrok mortaliteta od malignih neoplazmi kod žena u Federaciji Bosne i Hercegovine, ispred malignih neoplazmi bronha i pluća koji su na drugom mjestu od mortaliteta među ženama i na prvom mjestu po mortalitetu od malignih neoplazmi kod muškaraca. (3)

Efektivne procedure i intervencije su rezultovale u smanjenju učestalosti dijagnosticiranja u stadiju metastatskog karcinoma dojke kod žena u visokorazvijenim zemljama, dok nejednakost postoji, što treba biti riješeno kroz povećanje svjesnosti o simptomima karcinoma dojke i ranoj detekciji. Povećanje globalnog pokrića i kvalitete registara karcinoma baziranih na



populaciji, uključujući skup standardiziranih podataka o stadiju su ključ u praćenju napretka. (4)

Osim radiološkim metoda koje su najvažniji način detekcije karcinoma dojke, tumorski markeri su se pokazali kao veoma dobri u mnogim sferama analiziranja karcinoma dojke bez obzira da li je u pitanju dijagnoza, prognoza, detekcija metastaza ili recidiva. Proces analize tumorskih markera počinje sa vađenjem krvi i nastavlja sa centrifugiranjem i dobivanjem seruma ili plazme i završava sa samom analizom na aparatu. Tumorski markeri u laboratoriji mogu biti mjereni sa mnogim analitičkim tehnikama uključujući: mjerenje aktivnosti enzima, imunoanalitičke testove na receptore i instrumentalne tehnike kao što su: hromatografija, elektroforeza, masena spektrometrija/tečna (gasna) hromatografija i „microarray“ sistemi. Oni su najčešće analizirani sa imunohemijskim metodama u medicinsko-bihemijskoj laboratoriji. Sve imunohemijske metode su bazirane na reakciji antigena i antitijela. (5)

CEA je kiseli glikoprotein molekularne mase 150-300 kDa, sa specifičnom determinantom humanog embrionskog antigena. On je tumorski

marker širokog spektra koji može biti ekspresiran u različitim tumorima. Povećan je i u serumu pacijenata sa karcinomom dojke, karcinomom pluća i drugim malignim tumorima. Antigenska supstanca je stvorena iz tumorskih ćelija kod odraslih ljudi, a nekada su pušteni u krv gdje se mjere različitim testovima. Mjerenje CEA može poslužiti kao dopuna u određivanju prognoze pojave recidiva i odgovora na terapiju. (6)

CA 15-3 je glikoprotein čije su koncentracije povećane u oko 69% bolesnika sa metastatskim karcinomom dojke, a tek kod 23% bolesnika s primarnim karcinomom dojke. Povećane koncentracije opažene su nekad i kod dobroćudnih bolesti kao što su benigne bolesti jetre i dojke. Ovaj tumorski marker se određuje pri praćenju progresije bolesti i uspješnosti terapije u bolesnika sa uznapredovalom bolesti. Njega prepoznaju dva monoklonska antitijela, i to: DF3 koje je razvijeno prema ekstraktu karcinoma dojke kod pacijentice sa metastazama u jetri i 115 D8 koje je razvijeno prema membrani globule mliječne masti čovjeka. Vrijednosti za CA 15-3 se dobijaju određivanjem MAM-6 antigena, glikoproteina molekulske mase od >400 000. On pripada grupi glikoproteina, a naziva se polimorfni epitelni mucin (eng. PEM - Polymorphic epithelial mucin), koji se



normalno nalazi u luminalnom sekretu žlijezdanih stanica, a ne nalazi se u cirkulaciji. Nakon maligne transformacije bazalne membrane ćelija postaju permeabilne, PEM izlazi u cirkulaciju i detektira se u serumu testom za CA 15-3. Vrijednosti CA 15-3 određenih u istom uzroku reagensima različitih proizvođača se mogu razlikovati uslijed razlika u metodi i specifičnosti reagensa. CA 15-3 u kombinaciji sa CEA predstavlja koristan marker kod pacijenata sa potvrđenom dijagnozom karcinoma dojke i pluća. (7, 8)

2. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je studija kontrole i slučaja provedena u periodu od jula do septembra 2021. godine u JU Dom zdravlja KS odnosno OJ Dom zdravlja Novi Grad, u službi za primarnu zdravstvenu zaštitu u centralnom objektu. Uzorak su činile 200 žena odnosno 100 žena sa karcinomom dojke i 100 žena bez karcinoma dojke koje su uzete kao kontrolna skupina, koje su sakupljene iz kartona porodične medicine. Metodom slučajnog odabira je izvršen pregled 200 kartona porodične medicine sa kompletnom medicinskom dokumentacijom. Ovim se smanjila mogućnost pristrasnosti odnosno

biasa i povećala se reprezentativnost uzorka, tj. uzorak dobro predstavlja populaciju u cjelini odnosno medicinsku dokumentaciju žene sa karcinomom dojke u čitavom Kantonu Sarajevo.

Kriteriji za uključivanje u istraživanje su bili: žene oboljele od karcinoma dojke i kontrole koje predstavljaju žene bez karcinoma dojke, pacijentice koje žive u Kantonu Sarajevo i pacijentice sa potpunom medicinskom dokumentacijom. Dok kriteriji za isključivanje su bili: muškarci oboljeli od karcinoma dojke, pacijentice koje žive van Kantona Sarajevo i pacijentice za koje nemamo dostatnu medicinsku dokumentaciju. Podaci o vrijednostima tumorskih markera su preuzeti iz kartona porodične medicine, a dobijeni su na aparatima ARCHITECT i2000SR, Vitros 5600 i Vitros ECIQ. Prikupljani su podaci: godine starosti, nivo obrazovanja, bračni status, da li osoba ima ili je imala dijagnostikovan karcinom dojke, da li je imala historiju benigne bolesti dojke i da li u njenoj porodici postoji neki član koji je imao ili ima dijagnostikovan karcinom dojke. Dalje su prikupljani podaci o: BMI-u, dobi prve menstruacije, trudnoćama koje su ispitanice imale, dojenju, menopauzalnom statusu i potencijalnom korištenju hormonske



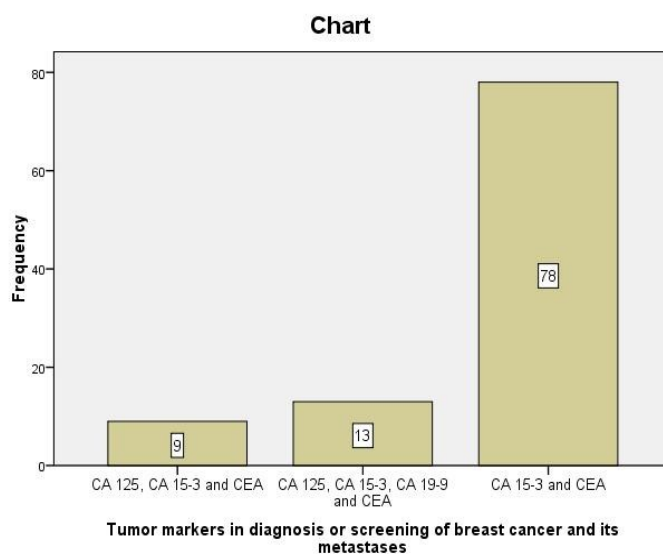
nadomjesne terapije ili oralnih kontraceptiva i da li se ispitanica podvrgnula ovariektomiji. Dodatno su prikupljeni podaci o rizikofaktorima kao što su: pušenje i alkohol.

Analiza je provedena korištenjem statističkog paketa za sociološka istraživanja IBM Statistics SPSS v 17.0 i programa MedCalc uz pripremu i prezentaciju rezultata u programima Microsoft Word i Excel 2016. Prije samih analiza urađen je test provjere normalnosti distribucije podataka. Korišteni su Kolmogorov Smirnov i Shapiro-Wilk test i podaci o rizikofaktorima nisu imali normalnu raspodjelu za čiju analizu su primijenjeni neparametrijski testovi kao što su χ^2 (Chi Square test) i Fisherov egzaktni test, a tumorski markeri su imali normalnu raspodjelu i korišteni su parametrijski testovi kao što je One Sample T-test. U oba slučaja vrijednost $p < 0.05$ je smatrana statistički značajnom odnosno sa nivoom pouzdanosti od 95%.

3. REZULTATI

U našem uzorku ispitanica oboljelih od karcinoma dojke ($N = 100$) najčešće korištena kombinacija tumorskih markera u praćenju i otkrivanju metastaza jeste CA 15-

3 i CEA sa 78%, zatim slijede CA 125, CA 15-3, CA 19-9 i CEA sa 13% i na kraju CA 125, CA 15-3 i CEA sa 9%.



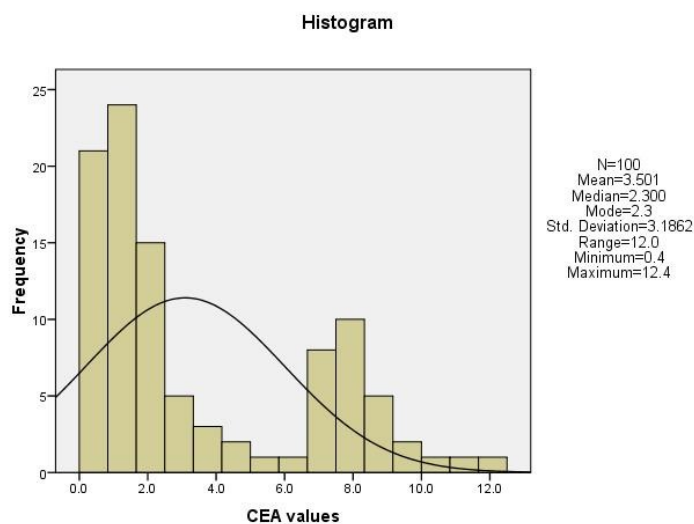
Slika 1. Korištenje tumorskih markera u dijagnozi ili skriningu karcinoma dojke i njegovih metastaza

Prvo su upoređeni rezultati tumorskih markera sa podacima iz literature i dobijena je vrijednost od $p < 0.0001$ za sve tumorske markere koji su praćeni u ovom radu. Nakon toga su ispitivanjem One Sample T-testom dobijene vrijednosti: 10.988 za CEA i 30.925 za CA 15-3, sa p vrijednosti od 0.000 čime je dokazano da postoji statistička značajnost za ove varijable čime je potvrđeno da su ovi



tumorski markeri koristan pokazatelj u dijagnozi, praćenju i otkrivanju metastaza i recidiva.

U uzorku ispitanica sa karcinomom dojke, dobijene su vrijednosti od 0.4 kao najniže do 12.4 kao najviše, sa srednjom vrijednošću $\bar{X} = 3.50$ i standardnom devijacijom $SD = \pm 3.1862$, raspon je iznosio 12.0, a to je razlika između maksimalne i minimalne vrijednosti podataka. Median za uzorak ($N = 100$) je iznosio 2.30. Referentne vrijednosti za CEA u našem uzorku su iznosile < 4.6 ng/mL za nepušače i < 10 ng/mL za pušače.



Slika 2. Histogram CEA vrijednosti sa deskriptivnom statistikom

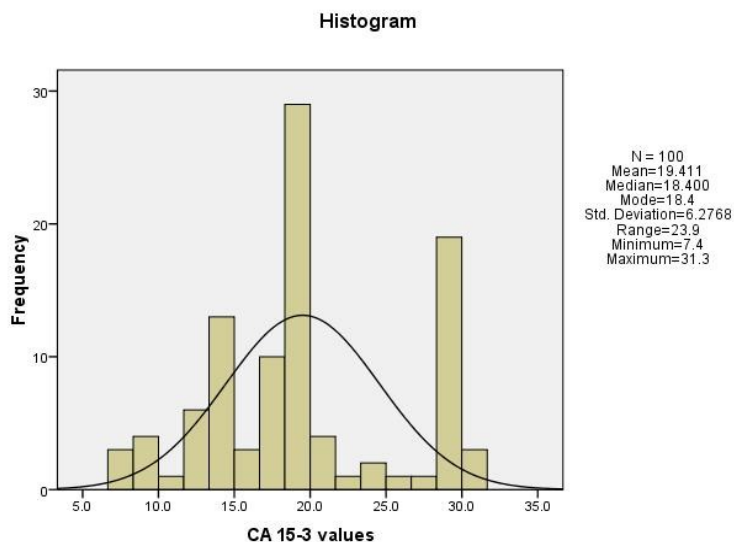
Od ukupnog uzorka pacijentica sa karcinomom dojke ($N = 100$) 97 ispitanica (97%) su imale vrijednosti unutar referentnog opsega prilikom praćenja, 2 ispitanice (2%) su imale povišene vrijednosti CEA, a 1 ispitanica (1%) je imala povišene vrijednosti CEA i CA 15-3. CEA nije korišten ni u jednom slučaju prilikom otkrivanja recidiva. Upoređujući naše rezultate sa podacima iz literature t-testom dobijena je statistička značajnost $p < 0.0001$.

U uzorku ispitanica sa karcinomom dojke, dobijene su vrijednosti od 7.4 kao najniže do 31.3 kao najviše, sa srednjom vrijednošću $\bar{X} = 19.41$ i standardnom devijacijom $SD = \pm 6.2768$, raspon je iznosio 23.9, a to je razlika između maksimalne i minimalne vrijednosti podataka. Median za uzorak ($N = 100$) je iznosio 18.40. Referentne vrijednosti za CA 15-3 su za naš uzorak iznosile < 25 kIU/L.



sa podacima iz literature t-testom dobijena je statistička značajnost $p < 0.0001$.

CA 15-3 je korišten za otkrivanje recidiva kod 59 ispitanica u našem uzorku.



Slika 2. Histogram CA 15-3 vrijednosti sa deskriptivnom statistikom

Od ukupnog uzorka pacijentica sa karcinomom dojke prilikom praćenja 76 ispitanica (76%) su imale vrijednosti unutar referentnog opsega, 23 ispitanice (23%) su imale povišene vrijednosti CA 15-3, dok 1 ispitanica (1%) je imala povišene vrijednosti CEA i CA 15-3. Upoređujući naše rezultate

Aritmetička sredina za vrijednosti CA 15-3 prije recidiva je iznosila 17.57, a poslije recidiva 26.35 sa standardnom devijacijom od ± 5.3219 prije recidiva i ± 5.6610 poslije recidiva.

Median je prije recidiva iznosio 18.30, a poslije recidiva 28.40. Najmanja vrijednost je iznosila 6.9 prije recidiva i 9.1 poslije recidiva, dok je najveća vrijednost iznosila 31.3 prije recidiva i 38.8 poslije recidiva. Raspon za vrijednost CA 15-3 je iznosio 24.4 prije recidiva i 29.7 poslije recidiva karcinoma dojke.



Tabela 1 Deskriptivna statistika CA 15-3 vrijednosti prije i poslije recidiva karcinoma dojke

	VRIJEDNOSTI CA 15-3 PRIJE RECIDIVA KARCINOMA DOJKE	VRIJEDNOSTI CA 15-3 POSILIJE RECIDIVA KARCINOMA DOJKE
ARITMETIČKA SREDINA	17.571	26.347
MEDIAN	18.300	28.400
MOD	18.4	28.4
STANDARDNA DEVIJACIJA	5.3219	5.6610
RASPON	24.4	29.7
MINIMUM	6.9	9.1
MAKSIMUM	31.3	38.8



Osjetljivost koja je kao optimalna dobijena za otkrivanje recidiva praćenjem vrijednosti CA 15-3 i odabrana pomoću cutoff vrijednosti od 19.55 kIU/L je iznosila 81.8% sa specifičnošću koja je iznosila 100%. Sva deskriptivna statistika za tumorske markere i referentne opsege je prikazana na dnu ovog istraživanja.

Tabela 2 Referentni opseg za praćene tumorske markere

TUMORSKI MARKERI	REFERENTNI OPSEG
CEA	< 4.6 ng/mL (nepušači), < 10 ng/mL (pušači)
CA 15-3	< 25 kIU/L
CA 125	< 35 IU/mL
CA 19-9	< 27 kIU/L

4. DISKUSIJA

Prema istraživanju Coa et al. iz 2019. godine praćene su vrijednosti tumorskih markera za 250 pacijentica i dokazana je statistička značajnost između povišenog nivoa CA 15-3 sa cutoff vrijednosti od 23

U/ml i CEA sa cutoff vrijednosti od 5 ng/ml i razvoja metahronog karcinoma dojke. Dokazano je da povišene vrijednosti CEA i CA 15-3 su povezane sa metahronim karcinomom dojke i sa nepovoljnim dugoročnim ishodom preživljavanja. (9)

Prema istraživanju Hinga et al. iz 2020. godine pratili su se tumorski markeri CEA i CA 15-3 u dijagnozi, praćenju i otkrivanju recidiva i metastaza karcinoma dojke. Kod 23 pacijentice (34%) sa recidivom, povišeni tumorski markeri su bili prvi indikator recidiva bolesti prije nego što su se klinički simptomi pojavili ili otkrivanjem bilo kojom drugom dijagnostičkom metodom. Dokazana je povišena vrijednost CEA kod pacijentica sa recidivom i to 10 ng/ml, dok su pacijentice u kontrolnoj grupi imale 6 ng/ml. Također je prikazano kako je senzitivnost samog povišenog CA 15-3 iznosila 71.6% sa specifičnošću 97%, zatim osjetljivost samog CEA je 75% sa specifičnošću 92.5%, a povišeni nivoi CEA i CA 15-3 korištenog u kombinaciji za praćenje recidiva i dijagnostičke preciznosti su imali osjetljivost od 93.9% sa specifičnošću od 89.6%. (10)



U istraživanju koje su proveli Molina et al. 2005. godine, istaknuto je da su najkorisniji tumorski markeri za karcinom dojke CA 15-3 i CEA, ali zbog njihove niske osjetljivosti, ne mogu biti preporučeni za skrining ili ranu dijagnozu, ali periodično mjerenje može biti korisno u ranom otkrivanju udaljenih metastaza. Ovi markeri su se mjerili prije svake hemoterapije i barem svaka tri mjeseca kod pacijentica koje su primale hormonsku terapiju. Korištenjem kombinacije više tumorskih markera (npr. CA 15-3, CEA i citokeratina) moguće je povećati senzitivnost na bar 90% kod pacijenata sa udaljenim metastazama. (11)

U istraživanju koje su proveli Aydiner i saradnici dokazana je statistička značajnost za korištenje CA 15-3 za karcinom dojke i kod pacijentica bez metastaza i sa metastazama u kostima. Specifičnost koja se očekuje pri određivanju vrijednosti CA 15-3 kod karcinoma dojke je 73% sa osjetljivosti

dojke. Koristeći kombinaciju CA 15-3, CEA i citokeratina moguće je povećati senzitivnost do 90% kod pacijenata sa udaljenim metastazama. Dijagnostička osjetljivost samog CA 15-3 je oko 10-15% za stadij I, 20-25% za stadij II i 30-45% za stadij

od 73%. CA 15-3 je smatran specifičnim markerom karcinoma dojke posebno važan za detekciju metastaza u kostima. Prethodno je dokazano da senzitivnost CA 15-3 je veća od CEA kod pacijenata sa lokalnim i metastazama u kostima. (12)

U istraživanju koje su proveli Marić et al. 2011. godine je istaknuto da neki od najčešće korištenih tumorskih markera su članovi porodice MUC-1 kao što su CA 15-3, CA 27.29, CA 549, zatim CEA, određeni onkoproteini kao što je HER-2 i citokeratini (TPA). CA 15-3 i CEA su bili najčešće korišteni tumorski markeri za karcinom dojke u kliničkoj praksi. Osjetljivost i specifičnost tumorskih markera je značajno veća kod pacijenata sa uznapredovalom bolesti i povezana je sa mjestom recidiva. Zbog niske osjetljivosti dostupnih tumorskih markera u ranom stadiju bolesti, samo mamografski skrining može opravdati sumnju na karcinom

III bolesti. Međutim, niski nivoi tumorskih markera kod pacijenata sa sumnjom na karcinom dojke ne isključuju prisustvo maligniteta. (13)

U istraživanju koje su proveli Zaleski et al. praćeni su tumorski markeri CEA, CA



15-3, CA 19-9 i CA 125 pomoću automatiziranih imunoeseja. Najbolje se pokazala kombinacija tumorskih markera CA 15-3 i CEA sa 90% osjetljivosti i 95% specifičnosti. (14)

Kustura A. ZKMLDFBIH 2023; 2: 1-14

5. ZAKLJUČAK

Prema našim rezultatima možemo zaključiti da među ženama u Kantonu Sarajevo najčešći tumorski marker korišteni u kombinaciji ili individualno u dijagnozi ili skriningu karcinoma dojke i njegovih metastaza su: CEA i CA 15-3.

Nakon statističkih analiza dokazano je da kombinacija CA 15-3 i CEA je koristan indikator u dijagnozi, skriningu, detekciji metastaza i recidiva.

Povišeni nivoi CA 15-3 korišteni u praćenju recidiva su imali senzitivnost koja je iznosila 81.8% sa specifičnošću od 100%.

KONFLIKT INTERESA

Autori potvrđuju da ne postoji konflikt interesa.



6. LITERATURA

1. Mayo Clinic Staff. Breast cancer - Symptoms and causes - Mayo Clinic. Mayoclinic.org. 2022. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/breast-cancer/symptoms-causes/syc-20352470> (Available on 11/25/2023).
2. World Health Organization. Breast cancer. WHO.int. 2023. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (Available on 11/25/2023).
3. Zavod za javno zdravstvo FBiH – Institute for Public Health FB&H. Zdravstveno statistički godišnjak Federacije Bosne i Hercegovine 2022. - Health statistics annual Federation of Bosnia and Herzegovina 2022. Sarajevo: Zavod za javno zdravstvo FBiH. 2023. Vol XXI. 33 str. URL: https://www.zzjzfbih.ba/wp-content/uploads/2023/10/Godisnjak-2022_web.pdf (Available on 11/25/2023).
4. Benitez Fuentes JD, Morgan E, de Luna Aguilar A, et al. Global Stage Distribution of Breast Cancer at Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. JAMA Oncol. Published online November 09, 2023. doi:10.1001/jamaoncol.2023.483
5. Ćorić J, Jadrić R, Kučukalić E. Metode određivanja tumorskih markera. U: Biohemijska laboratorijska dijagnostika malignih tumora. Sarajevo: Fakultet zdravstvenih studija u Sarajevu. 2018. 65-79 str.
6. Ćorić J, Jadrić R, Kučukalić E. Onkofetalni antigeni. U: Biohemijska laboratorijska dijagnostika malignih tumora. Sarajevo: Fakultet zdravstvenih studija u Sarajevu. 2018. 62-63 str.
7. Ćorić J, Jadrić R, Kučukalić E. Mucini. U: Biohemijska laboratorijska dijagnostika malignih tumora. Sarajevo: Fakultet zdravstvenih studija u Sarajevu. 2018. 57 str.
8. Serdarević, N., & Mehanović, S. The possible role of tumor antigen CA 15-3, CEA and ferritin in malignant and benign disease. Journal of Health Sciences, 2012. 2(2), 138–143. <https://doi.org/10.17532/jhsci.2012.52>



9. Co, M., Man, V., & Kwong, A.. Serum tumor markers and positron emission tomographycomputed tomography scan as post-breast cancer treatment surveillance. *Annals Of Breast Surgery*, 3. 2019. Retrieved from <https://abs.amegroups.com/article/view/5473>.
10. Hing JX, Mok CW, Tan PT, Sudhakar SS, Seah CM, Lee WP, Tan SM. Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance. *Breast*. 2020 Aug;52:95-101. doi: 10.1016/j.breast.2020.05.005. Epub 2020 May 20. PMID: 32485607; PMCID: PMC7375621
11. Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, Goike H, Lamerz R, Nap M, Sölétormos G, Stieber P. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol*. 2005 Nov-Dec;26(6):281-93. doi: 10.1159/000089260. PMID: 16254457.
12. Adnan Aydiner, Erkan Topuz, Rian Discli, Vildan Yasasever, Maktav Dincer, Koray Dincol & Nijad Bilge. Serum Tumor Markers for Detection of Bone Metastasis in Breast Cancer Patients, *Acta Oncologica*, 1994. 33:2, 181-186, DOI: 10.3109/02841869409098402.
13. Marić P, Ozretić P, Levanat S, Oresković S, Antunac K, Beketić-Oresković L. Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness. *Coll Antropol*. 2011 Mar;35(1):241-7. PMID: 21661378.
14. Zaleski M, Kobilay M, Schroeder L, et al. Improved sensitivity for detection of breast cancer by combination of miR-34a and tumor markers CA 15-3 or CEA. *Oncotarget*. 2018;9(32):22523-22536. Published 2018 Apr 27. doi:10.18632/oncotarget.25077.



DIAGNOSTIC USEFULNESS OF CA 15-3 AND CEA COMBINATION IN BREAST CANCER SCREENING

Kustura A, Hasaneferendić B¹, Halilović L¹, Smailbegović V²

¹OJ Clinical Biochemistry with Immunology, ²Department of Radiation Oncology, Clinical
Center of the University of Sarajevo

ABSTRACT

INTRODUCTION: Except genetic component or presence of history of breast cancer in family and carrying BRCA 1 and BRCA 2 genes mutations there are other risk factors that increase the risk of developing breast cancer. But it can be detected in early stage if we have a good combination of tumor markers with high sensitivity and specificity. So researchers and practitioners all around the world are seeking for the best combination that will save many lives.

METHODS: Research is conducted with tool for collecting data about risk factors and tumor markers from primary healthcare unit record.

RESULTS: With One Sample T-test it is proven that there is statistical significance that using tumor markers CA 15-3 and CEA in combination is useful in screening breast cancer and his metastases but also detecting regression.

CONCLUSIONS: Tumor markers which are used including CA 15-3 and CEA were useful in diagnosis, screening and discovering metastases in females.

CORRESPONDING AUTHOR

Amar Kustura, MA. bacc. lab. dg

Zahira panjete do 426,

Tel. 062/532-661

E-mail: amar.kustura@hotmail.com





ZNAČAJ I OPASNOST UPOTREBE NITRITA I HLORIDA U MESU I MESNIM PRERAĐEVINAMA

Dženana Hasanbašić^{1*}, Čamka Kovač¹, Alma Agić¹, Amila Šut¹, Amir Ibrahimagić¹

¹Služba za hemijsku dijagnostiku, Institut za zdravlje i sigurnost hrane,

Zenica, Bosnia and Herzegovina

SAŽETAK

Uvod: Meso predstavlja značajan izvor energije za naš organizam, obiluje proteinima, vitaminima, te mineralima. Radi očuvanja mesa u primjeni su brojni načini konzerviranja među kojima je upotreba hemijskih konzervanasa jako raširena u mesnoj industriji. Nitriti kao konzervansi imaju široku primjenu u mesnoj industriji jer poboljšavaju kvalitet, trajnost i sigurnost proizvoda, posebno zbog inhibicije rasta i razmnožavanja bakterija. Zbog štetnog djelovanja nitrita na zdravlje ljudi te dokazanog kancerogenog djelovanja nitrozamina, upotreba nitrita u mesnoj industriji nastoji se smanjiti. Nitriti su najčešće dodani u kombinaciji s kuhinjskom soli (NaCl).

Materijal i metode: U ovom istraživanju su ispitivane koncentracije nitrita i hlorida u mesu i proizvodima od mesa, koji su prikupljeni na tržištu Zeničko-Dobojskog kantona u 2022. godini. Ukupno je analizirano 85 uzoraka. Analiza nitrita i hlorida rađena je u skladu sa standardima BAS ISO 2918:2007 i BAS ISO 1841-1:2007.

Rezultati: Izmjerena prosječna koncentracija nitrita u uzorcima je 8,330 mg/kg, a rezultati su se kretali u rasponu od 0,550 mg/kg do 45,705 mg/kg. Prosječna koncentracija hlorida je 2,377% m/m, sa rasponom od 0 do 9.955 % m/m.

Zaključak: Rezultati istraživanja pokazuju potrebu za kontinuiranim praćenjem količina nitrita i hlorida u gotovim proizvodima na tržištu, te primjenu tehnoloških procesa koji bi smanjili upotrebu ovih aditiva u mesnoj industriji.

Ključne riječi: nitriti, hloridi, meso

Autor za korespondenciju

Dženana Hasanbašić, dipl. ing. hem.

Služba za hemijsku dijagnostiku

Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

Tel. 061-354-659

E-mail: dzenana.hasanbasic@inz.ba





1. UVOD

Meso i proizvodi od mesa se smatraju esencijalnim za ishranu stanovništva. Glavni sastojci mesa su, pored vode, proteini, masti, vitamini i minerali, što mesu daje visok stepen biološke usvojivosti. Meso je posebno vrijedan izvor omega-3 masnih kiselina, vitamina B12, proteina i željeza. Navedene karakteristike čine meso i mesne proizvode idealnim za rast mikroorganizama i bakterija te je bez adekvatne pripreme i skladištenja podložno gubitku nutritivnih svojstava i brzom kvarenju. Kako bi se to izbjeglo, široku upotrebu u prehrambenoj industriji pronašli su aditivi. To su tvari poznate hemijske strukture, koje se samostalno ne konzumiraju, niti su tipičan sastojak hrane i u pravilu su bez prehrambene vrijednosti. Prihvatljivom funkcijom aditiva smatra se poboljšanje nekog od atributa kvaliteta, produženja roka trajanja, poboljšanje teksture i organoleptičkih osobina, povećanje nutritivne vrijednosti, stvaranje i poboljšanje funkcionalnih svojstava, olakšavanje prerade i povećanje prihvatljivosti potrošača (1). Upotreba aditiva u svrhu sakrivanja oštećenja ili kvarenja namirnice kao i

zavaravanja potrošača strogo je zabranjena propisima kojima se regulira njihova upotreba.

Prema funkcionalnim svojstvima, aditivi mogu biti: konzervansi, antioksidansi, pojačivači arome, emulgatori, zgušnjivači, sredstava za vezivanje i sredstava za želiranje, bojila, sladila, regulatori kiseline, enzimski preparati i ostali aditivi. Jedni od najčešće korištenih funkcionalnih aditiva u mesnoj industriji su nitriti, a uz njih i so, odnosno hloridi.

Nitriti imaju važnu ulogu ne samo kao konzervansi već i u formiranju karakteristične crvene boje i specifičnog okusa proizvoda od mesa. Osim toga nitriti se dodaju prilikom prerade i proizvodnje mesa i mesnih proizvoda i u kombinaciji s drugim faktorima kako bi smanjili ili spriječili rast i razvoj patogenih bakterija kao npr. *Clostridium botulinum* (2). Spore *Clostridium botulinum* se nalaze svugdje u tlu i na taj način predstavljaju potencijalnu opasnost za životinje i prehrambeni lanac. Simptomi botulinske infekcije uključuju mučninu, povraćanje, umor, nesvjesticu, paralizu mišića i poteškoće disanja, a razvijaju se unutar 12-72 sati od



konzumacije kontaminirane hrane. Oporavak traje nekoliko mjeseci, a stepen smrtnosti je 10 %. Konzumacija mesnih proizvoda glavni uzrok je pojave botulizma jer je upravo meso idealan medij za rast i razvoj, te proizvodnju toksina *Clostridium botulinum* (3).

Funkcija nitrita dodanih mesu zavisi od nekoliko faktora: pH, vrsti mesnih proizvoda, temperaturi skladištenja, eventualnom tretiranju zagrijavanjem, te prisutnosti drugih tvari (npr. limunske kis.).

Antimikrobno djelovanje nitrita je posljedica stvaranja nedisocirane nitratne kiseline koja prolazi kroz jonsku barijeru ćelijskog zida bakterija i u ćeliji djeluje toksično (4). Literaturni podaci pokazuju da je većini suhomesnatih proizvoda dodatak nitrita potreban da se spriječi rast i proizvodnja toksina *C. Botulinum*. Količina nitrita od 5 do 20 mg/kg dovoljna je za održavanje crvene boje mesa, 50 mg/kg za proizvodnju karakterističnog okusa, a 100 mg/kg za antimikrobno djelovanje. U većim količinama nitriti su štetni za zdravlje jer uzrokuju razgradnju eritrocita i vitamina A te imaju toksični učinak na reprodukciju. Ujedno, nitriti zajedno s amidima stvaraju

nitrozoamide, dok s derivatima amonijaka, aminima, stvaraju karcinogene spojeve nitrozamine (5). Pri tom je ključni faktor za nastanak nitrozamina količina nitrita dodana u mesni proizvod, a nadalje i uvjeti prerade, količina krtoga mesa korištena u proizvodnji te prisutnost katalizatora i inhibitora. Nastanku nitrozamina pogoduje duže vrijeme zrenja i skladištenja trajnih kobasica te niži pH, a kod termički tretiranih mesnih proizvoda i povišena temperatura (4). Odbor za prehrambene additive i nutrijente dodane hrani EFSA (2010) je zaključio da se stoga uporaba nitrata i nitrita treba smanjiti na najnižu moguću razinu, pritom omogućavajući nužne efekte konzerviranja i mikrobiološke sigurnosti te trajnost mesnih proizvoda (6).

Prvi dodatak hrani koji su koristile sve civilizacije je kuhinjska so. Koristi se u proizvodnji svih mesnih proizvoda, nekada samo za soljenje, a vrlo često u kombinaciji sa natrijum nitritom kao so za salamurenje. Funkcionalno djelovanje soli u mesnim proizvodima ogleda se u smanjenju aktiviteta vode što ima bakteriostatski efekat, ali u i povoljnom djelovanju na senzorne karakteristike (7). Kada se pri proizvodnji koristi kuhinjska so koja je



higijenski i zdravstveno ispravna njeno korištenje bi trebalo da bude bezbijeđno. Međutim kuhinjska so može negativno da utiče na pigment mesa, odnosno da mijenja crvenkastu boju u smeđu. Također je dokazano da je prekomjerno unošenje soli mogući uzrok hipertenzije, kardiovaskularnih oboljenja, infekcija izazvanih *Helicobacter pylori*, smanjenja gustine kostiju (8).

Cilj našeg rada bio je da se utvrdi količina nitrita i hlorida u različitim proizvodima od mesa na tržištu Zeničko-dobojskog kantona.

2. MATERIJAL I METODE

U svrhu ispitivanja količine nitrita i hlorida prikupljeno je 85 uzoraka mesa i mesnih proizvoda. Svi uzorci su homogenizirani te adekvatno pripremljeni za analize. Svi korišteni reagensi su analitičke čistoće.

Određivanje nitrita rađeno je akreditiranom metodom prema standardu BAS ISO 2918:1975 (9). Izvagano je 10 g uzorka u erlenmajericu, dodano 5 ml zasićenog boraks rastvora i 100 ml vode temperature iznad 70°C, te zagrijavano 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Sadržaj tikvice je ohlađen na sobnu temperaturu, te su

dodana 2 ml rastvora Carez I i 2 ml rastvora Carez II. Nakon toga je sadržaj prebačen u odmjerni sud od 200 ml, te je dopunjen destilovanom vodom do oznake i stavljen da stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi. Poslije filtriranja ide proces razvijanja boje, uz dodavanje reagenasa za razvijanje boje, te se nakon 3-10 minuta mjeri apsorbanca rastvora na talasnoj dužini od 538 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-2600).

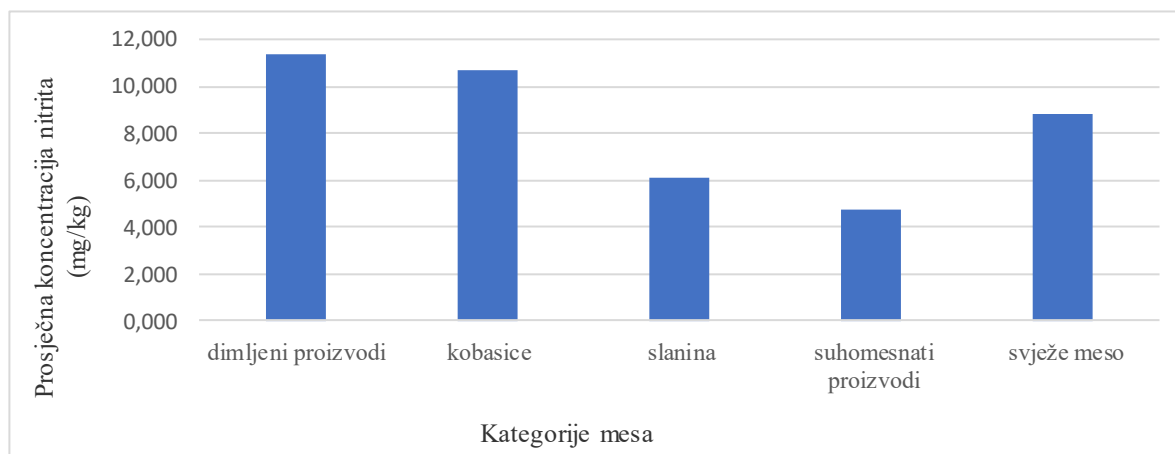
Određivanje hlorida je također rađeno akreditiranom metodom prema standardu BAS ISO 1841-1:1996. Izvagano je 10 g uzorka u erlenmajericu, dodano 100 ml vruće destilovane vode, te zagrijavano 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Sadržaj tikvice je ohlađen na sobnu temperaturu, te su dodana 2 ml rastvora Carez I i 2 ml rastvora Carez II, te ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sadržaj je prebačen u odmjerni sud od 200 ml, te dopunjen destilovanom vodom do oznake. Zatim je sadržaj filtriran uz odbacivanje prvog filtrata. Uzeto je 20 ml filtrata u erlenmajericu, dodato 5 ml nitratne kiseline, te 1 ml indikatora. Zatim je dodato 20 ml srebro nitrata i 3 ml nitrobenzena, te se uradila titracija pomoću kalij-tiocijanata do pojave stabilne ružičate boje (10).



3. REZULTATI I DISKUSIJA

Prosječan sadržaj nitrita bio je 8,330 mg/kg (min. 0,550 – max. 45,705 mg/kg). (Slika 1.) prikazuje prosječnu koncentraciju nitrita u različitim kategorijama mesa, ovisno o njihovoj termičkoj obradi. Uzorci dimljenog mesa imaju najveću koncentraciju nitrita, međutim, iznenađujuće visoka koncentracija nitrita pronađena je u svježem mesu.

Veća koncentracija nitrita u svježem mesu može se objasniti njihovim utjecajem na karakterističnu boju mesa, inhibicijom rasta bakterija i očuvanjem specifičnog mirisa. Prosječne koncentracije nitrita bile su 11,396 mg/kg u dimljenim proizvodima, 10,721 mg/kg u kobasicama, 6,145 mg/kg u slanini, 4,712 mg/kg u suhomesnatim proizvodima i 8,861 mg/kg u svježem mesu.



Slika 1. Prosječna koncentracija nitrita u različitim kategorijama mesa



U Tabeli 1. su dati podaci o prosječnoj koncentraciji nitrita u mesu i proizvodima od mesa koji su pronađeni u literaturi. Ukoliko uporedimo dobijene rezultate sa podacima iz Tabele 1. možemo zaključiti da se naši rezultati nalaze u sredini ukupnog raspona ili su u nekim kategorijama bliski nižim vrijednostima. Međutim ukoliko

uzmemo u obzir opasnost upotrebe nitrita, zabrinjavajući podatak je da je samo svježe meso u Australiji bilo bez nitrita od svih provedenih ispitivanja.

Rezultati su pokazali da je sadržaj hlorida bio u rasponu od 0 do 9,955 %m/m (prosječna koncentracija 2,377 %m/m).

Tabela 1. Prosječan sadržaj nitrita u mesu i proizvodima iz mesa na različitim područjima.

Kategorija proizvoda	Područje-period	Srednja vrijednost nitrita (mg/kg)	Referenca
Dimljeni proizvodi	Turska (2016)	4,26-46,28	(11)
	Kina (2020)	4,0-8,7	(12)
	Filipini (2021)	0,15-39,07	(13)
	SAD (2009)	0,64-7,31	(14)
Kobasice	Sudan (2016)	51,8	(15)
	Poljska (2018)	5,79-14,78	(16)
	Iran (2016)	139	(17)
	Južna Koreja (2015)	4,6	(18)
	Finska (2016)	8-97,6	(19)
	Turska (2016)	6,41-90,02	(11)
Slanina	Finska (2016)	11,8	(19)
	Italija (2018)	7,7	(20)
	Južna Koreja (2015)	15,8	(18)
	Australija (2009)	15,7	(21)
Suhomesnati proizvodi	Koreja (2016)	< 37,0	(22)
	Italija (2018)	0,76-25,67	(20)
Svježe meso	Sudan (2016)	42	(15)
	Iran (2016)	38,7	(17)
	Finska (2016)	22,4	(19)
	Australija (2009)	0	(21)

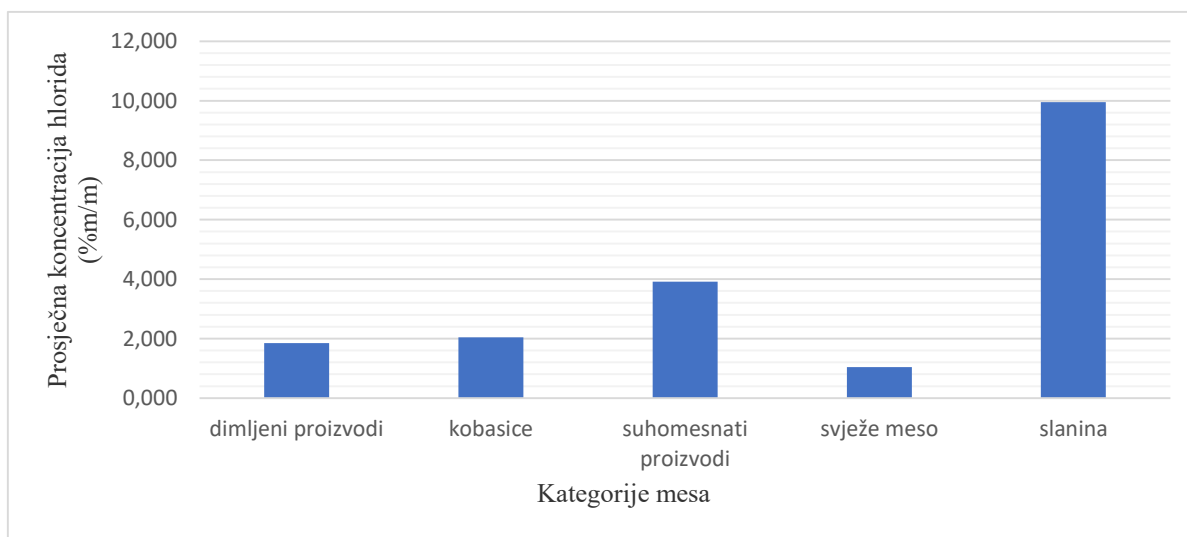


Prosječne koncentracije hlorida bile su 1,85 % u dimljenim proizvodima, 2,04 % u kobasicama, 9,96 % u slanini, 3,92 % u sušenom mesu i 1,04 % u svježem mesu. Slanina ima najveću koncentraciju hlorida. (Slika 2.)

Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mesa nije definisao količinu soli.

Može se reći da je količina soli u proizvodima od mesa definisana preko organoleptičkih osobina – ukusa.

Na osnovu eksperimentalnih podataka i pregleda podataka iz literature, vidi se da su količina i način dodavanja kuhinjske soli specifični za svaku grupu proizvoda od mesa.



Slika 2. Prosječna koncentracija hlorida u različitim kategorijama mesa



Raspon sadržaja soli u proizvodima od mesa na različitim područjima prikazan je u Tabeli 2, gdje vidimo da čak i slični ili ekvivalentni proizvodi mogu biti razrađeni s

različitim koncentracijama ovisno o karakteristikama proizvodnog procesa. To sugerira da je izvedivo općenito smanjiti udio soli u hrani.

Tabela 2. Prosječna koncentracija soli u proizvodima od mesa na različitim područjima

Kategorija proizvoda	Područje	Prosječna koncentracija soli (%)	Referenca
Dimljeni i suhomesnati proizvodi	SAD	8,68	(23)
Slanina	SAD	3,99	(23)
Kobasice	SAD	3,23	(23)
Dimljeni proizvodi	Srbija	3,44	(24)
Kobasice	Srbija	2,95	(24)
Kobasice	Španija	3,18	(25)
Kobasice	Češka republika	2,45	(26)
Kobasice	Njemačka	2,03-2,34	(26)



4. ZAKLJUČAK

Rezultati koje smo dobili našim istraživanjem su nam pokazali da je kvalitet proizvoda od mesa po pitanju sadržaja hlorida i nitrita na području Zeničko-dobojskog kantona relativno zadovoljavajući. Značajne koncentracije nitrita u svježem mesu ipak ukazuju na potrebu češćeg monitoringa, kada uzmemo u obzir sve zdravstvene rizike koje njihovo prisustva izaziva. Također je potrebna dalja neprekidna i sistemska kontrola kako bi se dobili što realniji podaci o sadržaju natrijum hlorida u proizvodima od mesa i na osnovu toga donijele preporuke o maksimalno dozvoljenim količinama u pojedinim kategorijama proizvoda od mesa. Poređenjem sa rezultatima iz literature također možemo zaključiti da je moguće smanjiti upotrebu nitrita i hlorida, uz adekvatno prilagođavanje tehnološkog procesa.

5. LITERATURA

1. Jašić, M. Aditivi u hrani. Tuzla: Tehnološki fakultet; 2009.
2. Yildiz G, Oztekin N, Orbay A, Senkal F. Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode. Food Chem; 2014. Vol 152, pp. 245–250.
3. Cassens G, Ito T, Lee M, Buege D. The use of nitrite in meat. Bioscience; 1978. Vol 28, pp. 633-637.
4. Kovačević, D. Tehnologija kulena i ostalih fermentiranih kobasica. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet; 2014.
5. Janssen, M.M.T. Food Safety and Toxicity. Florida: CRC Press LLC; 1997.
6. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion. Statement on nitrites in meat products, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food; 2010.



7. Stamenković, T. Upotreba kuhinjske soli u proizvodima od mesa- Tehnologija mesa. Beograd; 2004.
8. Cappuccio P, Kalaitzidis R, Duneclift S, Eastwood J.B. Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *J Nephrol*; 2000. Vol 13(3), pp. 169-177.
9. ISO 2918-1975 Meat and meat products Determination of nitrite content (Reference method).
10. ISO 1841-1:1996 Meat and meat products Determination of chloride content Part 1: Volhard method.
11. Büyükünäl, S.K., et al. Presence of salmonella spp., listeria monocytogenes, escherichia coli 0157 and nitrate-nitrite residue levels in Turkish traditional fermented meat products (sucuk and pastirma). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*; 2016.
12. Ji L.L., et al. Processing and product characteristics and shallow fermentation characteristics of sauce flavor preserved meat in Chengdu. *Food Science and Technology*; 2020. Vol 45 (5), pp. 106-112.
13. Joy E, Patalinghug M. Nitrite Concentration Analysis Using Spectrophotometry on Locally Processed Meat Products in a Province in the Philippines. *Ioer international multidisciplinary research journal*; 2021. Vol 3(1), pp. 42-49.
14. Keeton, J.T., et al. A national survey of the nitrite/nitrate concentrations in cured meat products and nonmeat foods available at retail. *J. Agric. Food Chem*; 2009. Vol (60), pp. 3981-3990.
15. Adam A.H.B. et al. Nitrite in processed meat products in Khartoum, Sudan and dietary intake. *Food Additives & Contaminants: Part B*; 2017. Vol 10(2), pp. 79-84.
16. Halagarda M, kędzior, W.; Pyrzyńska E. Nutritional value and potential chemical food safety hazards of selected Polish sausages as influenced by their traditionality. *Meat science*; 2018. Vol 139, pp. 25-34.
17. Bahadoran, Z. et al. Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products,



- meats and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis*; 2016. Vol 51, pp. 93-105.
18. Choi, S.H., Suh, H.J. Determination and estimation of daily nitrite intake from processed meats in Korea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*; 2017. Vol 12(1), pp. 15-22.
19. Suomi, J., et al. Quantitative risk assessment on the dietary exposure of Finnish children and adults to nitrite. *Food Additives & Contaminants: Part A*; 2016. Vol 33(1), pp. 41-53.
20. Roila, R., et al. Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables. *Italian journal of food safety*; 2018. Vol 7(3).
21. Hsu J, Jayashree A, Alice Lee N. Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry*; 2009. Vol 115(1), pp. 334-339.
22. Chen, Xi, et al. Two efficient nitrite-reducing *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented pork (Nanx Wudl) as competitive starter cultures for Chinese fermented dry sausage. *Meat science*; 2016. Vol 121, pp. 302-309.
23. Sodium Content of Your Food. The University of Maine; 2022.
24. Prica N, Živkov Baloš M, Mihaljev Ž, Jakšić S, Stojanov I. Sodium chloride content in meat products. *AVM*; 2013. Sep. Vol 6(1), pp. 71-79.
25. Perez-Palacios, T., et al. Sodium chloride determination in meat products: Comparison of the official titration-based method with atomic absorption spectrometry. *J. Food Compos. Anal.*; 2022. Vol 108.
26. Kameník, J., et al. Salt, sodium chloride or sodium? Content and relationship with chemical, instrumental and sensory attributes in cooked meat products. *Meat Sci*; 2017. Vol 131, pp. 196–202.



THE IMPORTANCE AND DANGER OF USING NITRITE AND CHLORIDE IN MEAT AND MEAT PRODUCTS

Hasanbašić Dž¹, Kovač Č¹, Agić A¹, Šut A¹, Ibrahimagić A¹

¹Department for Chemical Diagnostics, Institute for Health and Food Safety Zenica,
Bosnia and Herzegovina

ABSTRACT

Introduction: Meat represents a significant source of energy for our organism, rich in proteins, vitamins, and minerals. To preserve meat, various methods of preservation are employed, among which the use of chemical preservatives is widespread in the meat industry. Nitrites, as preservatives, find broad application in the meat industry as they enhance product quality, shelf life, and safety, particularly due to the inhibition of bacterial growth and reproduction. However, due to the harmful effects of nitrites on human health and the proven carcinogenic effects of nitrosamines, efforts are made to reduce their use in the meat industry. Nitrites are most commonly added in combination with table salt (NaCl).

Materials and Methods: The concentrations of nitrites and chlorides in meat and meat products collected from the market in the Zenica-Doboj Canton in 2022. were examined in this study. A total of 85 samples were analyzed. Nitrite and chloride analysis were performed in accordance with BAS ISO 2918:2007 and BAS ISO 1841-1:2007 standards.

Results: The measured average concentration of nitrites in the samples was 8.330 mg/kg, with results ranging from 0.550 mg/kg to 45.705 mg/kg. The average chloride concentration was 2.377% , with a range from 0 to 9.955%.

Conclusion: The research results indicate the need for continuous monitoring of nitrite and chloride levels in finished products on the market, as well as the implementation of technological processes to reduce the use of these additives in the meat industry.

Keywords: nitrites, chlorides, meat

CORRESPONDING AUTHOR

Dženana Hasanbašić, grad. chem. eng.
Department for Chemical Diagnostics
Institute for Health and Food Safety Zenica
Tel. 061-354-659
E-mail: dzenana.hasanbasic@inz.ba





BIOLOŠKE OPASNOSTI U HRANI

Emina Idrizović, Belma Hodžić, Manja Kunarac, Naida Ramić

Institut za zdravlje i sigurnost hrane, Zenica, Bosna i Hercegovina

SAŽETAK

Uvod: Biološke opasnosti u hrani su organizmi ili tvari, koje oni proizvode, a koje predstavljaju prijetnju po ljudsko zdravlje. Ove opasnosti uzrokuju trećinu globalnih bolesti u svijetu, a njihov uticaj ogleda se kroz zdravstvene i ekonomske posljedice. Biološki kontaminanti hrane mogu biti: bakterije, virusi, kvasci, paraziti i plijesni, mada se o plijesnima uglavnom raspravlja u kontekstu mikotoksina.

Cilj: Ukazati na važnost procjene bioloških rizika iz hrane, podizanje svijesti građana i razvoja metoda i sistema koji bi omogućili otkrivanje bolesti koje se prenose hranom.

Diskusija: Procjenjuje se da virusi uzrokuju više od 50% bolesti koje se prenose hranom, a najznačajniji su hepatitis A, norovirusi, rotavirusi. Bakterije koje se prenose hranom odavno su poznate i stoljećima odnose živote ljudi, a najznačajnije su kampilobakterioza, salmoneloza, jersinioza, a slijede je *Escherichia coli* (STEC) koja proizvodi Shiga toksin i *Listeria monocytogenes* infekcije. Broj oboljelih od kampilobakterioze činio je više od 62% svih prijavljenih potvrđenih slučajeva u Evropi u 2021 g., međutim u BiH nije bilo prijavljenih slučajeva kampilobakterioze, vjerovatno zbog neotkrivanja i netestiranja. Salmoneloza je i dalje druga najčešće prijavljena zoonoza, a serotip *Salmonella* Enteritidis je i dalje najčešći prijavljeni uzročnik izbijanja trovanja hranom u Evropi. Danas ne smijemo zanemariti ni postojanje sve većeg broj patogena u nastajanju, kao ni mogućnost promjene virulentnosti poznatih patogena i razvoj rezistencije na antibiotike u kontekstu lanca prehrane. Važan alat za smanjenje i kontrolu bioloških opasnosti koje se prenose hranom je procjena rizika koja se ogleda u njegovoj sposobnosti da identifikuje opasnosti i procjeni njihov uticaj na populaciju.

Zaključak: Sigurnost hrane u budućnosti potrebno je sagledavati kroz procjenu rizika potencijalno novih i već poznatih opasnosti, a BiH mora uložiti dodatne napore kako bi razvila efikasne mehanizme testiranja i prepoznavanja bolesti povezanih sa hranom.

Ključne riječi: Biološke opasnosti, rizici, sigurnost hrane.

Autor za korespondenciju:

Emina Idrizović, MA biolog,

spec. mikrobiologije

Služba za mikrobiologiju hrane, INZ

Tel. 061/555-908

E-mail: emina.idrizovic@inz.ba





1. UVOD

Svake godine javljaju se milioni slučajeva bolesti koje se prenose hranom širom svijeta, a njihov globalni uticaj ogleda se kroz zdravstvene i ekonomske posljedice, iako, vrlo često, bolesti koje se prenose hranom ostaju neprepoznate i neistražene (1). Danas, u kontekstu lanca prehrane, ne smijemo podcijeniti niti zanemariti postojanje sve većeg broja patogena u nastajanju, potencijalnih promjena virulentnosti poznatih patogena i pojavu rezistencije na antibiotike (10). Biološki kontaminanti hrane mogu biti: bakterije, virusi, kvasci, paraziti i plijesni, mada se o plijesnima uglavnom raspravlja u kontekstu mikotoksina koji se sve češće svrstavaju u hemijske kontaminante. Svi oni predstavljaju rizike koji mogu uzrokovati infekciju, trovanje pa čak i smrt, a direktno su povezani sa statusom domaćina (dob, imunološki status i dr.), patogenosti mikroorganizma i infektivnom dozom (2). Putevi prenosa bioloških opasnosti obuhvataju: fekalnu kontaminaciju, koja može imati porijeklo sa zemljišta ili vode i loših higijensko sanitarnih uslova u klaonicama, ljude kao izvor kontaminacije,

zbog loše lične higijene, te unakrsnu kontaminaciju prehrambenih proizvoda širenjem sa okoline, u toku proizvodnje ili obrade hrane, zbog loših i neodgovarajućih sanitarnih uslova (5). Kontrola bioloških opasnosti u hrani najviše se oslanja na prevenciju kontaminacije u svim fazama uzgoja, pripreme i distribucije, kroz uspostavljanje procedura zasnovanih na dobroj proizvođačkoj praksi (GMP) i analizi opasnosti kontrolnih kritičnih tačaka (HACCP) (3). Drugi alat za kontrolu bioloških opasnosti u hrani jeste procjena i upravljanje rizicima (1).

1.1. Najznačajniji bakterijski uzročnici trovanja hranom

Bakterije koje uzrokuju trovanja hranom odavno su poznate i stoljećima odnose živote ljudi. Jedna od dobro poznatih bakterijskih opasnosti je kolera, koja se i dalje pojavljuje u nerazvijenim zemljama, iako je u dvadesetom stoljeću u razvijenim zemljama prestala biti bolest od javnog značaja. Druge bakterijske infekcije probavnog sistema poput salmoneloze i kampilobakterioze i dalje predstavljaju velik javno-zdravstveni problem i u razvijenim



zemljama (2). Prema EFSA-inom izvještaju, iz 2021.g., u Evropi prva najčešća zoonoza kod ljudi bila je kampilobakterioza, a slijede je salmoneloza, jersinioza i infekcije uzrokovane *Escherichia coli* koja produkuje šiga toksin (STEC). Broj oboljelih od kampilobakterioze činio je više od 62% svih prijavljenih i potvrđenih slučajeva oboljelih ljudi. (6). Prema izvještaju Federalnog zavoda za javno zdravstvo u Federaciji BiH nije prijavljen niti jedan slučaj kampilobakterioze ljudi u 2019., 2020. i 2021. godini (7). Salmoneloza je druga najčešće prijavljena zoonoza u 2021. g. u Evropi, dok je serotip *S. Enteritidis* najčešći prijavljeni uzročnik epidemija uzrokovanih hranom (6). Broj potvrđenih slučajeva salmoneloze, u BiH, iznosio je 40 slučajeva u 2021. g (8), dok je broj potvrđenih salmoneloza u FBiH u 2021. g bio 21 slučaj (7). Jersinioza je bila treća najčešće prijavljena zoonoza, a slijede je *Escherichia coli* (STEC) koja proizvodi Shiga toksin i *Listeria monocytogenes* infekcije. *L. monocytogenes* je najteža zoonotska bolest, s najvećim brojem hospitalizacija i najvišim stopama smrtnosti (6). U BiH u 2021.g. od ukupnog broja analiziranih uzoraka njih

0,5% bili su pozitivni na *L. monocytogenes* (7). Nije bilo dostupnih podataka za jersiniozu i STEC *E. coli* infekcije za područje BiH ili FBiH. *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) je oportunistički patogen povezan s infekcijama koje se prenose hranom, a smatra se opasnim po život dojenčadi (12). Toksikogene bakterije često su povezana sa izbijanjem epidemija, a *Bacillus cereus* postaje sve važniji uzročnik toksikogenih trovanja hranom u Evropi. Toksini *Clostridium perfringens* su uzrokovali najveći broj slučajeva smrti, a *Staphylococcus aureus* toksini najveći broj hospitalizacija u 2021. g (6). Na području BiH prijavljen je 191 slučaj toksikoinfekcija/intoksikacija u 2021. godini (8).

1.2. Najznačajniji virusni uzročnici trovanja hranom

Virusne bolesti koje se prenose hranom su glavni uzročnik svih bolesti koje se prenose hranom. Putevi prenosa obuhvataju konzumiranje proizvoda životinjskog porijekla koji su kontaminirani zoonotičnim virusima, konzumiranje hrane koju su kontaminirale zaražene osobe u procesu



rukovanja hranom i putem kontaminirane vode (13). Oni se ne razmnožavaju u hrani i time ne predstavljaju opasnost u smislu kvarenja hrane, ali su u stanju da uzrokuju invazivnu infekciju nakon unosa niskih doza virusa. Hepatitis A, norovirus i rotavirusi su prepoznati kao najznačajniji virusi koji se prenose hranom (9), ali ne smijemo zanemariti ni sapovirus i hepatitis E virus (13). Norovirus je glavni uzročnik nastanka akutnih nebakterijskih gastroenteritisa, a u Evropi je bio treći najčešće prijavljeni uzročnik trovanja hranom u 2021. g (6). Rota virusi mogu uzrokovati teške bolesti kod djece, starijih i imunokompromitovanih osoba, dok kod odraslih zdravih osoba obično ne uzrokuju teške oblike bolesti. Često su uključeni u izbijanje sporadičnih epidemija među djecom u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju (13). Šest država članica EU (Evropska unija) je prijavilo izbijanje epidemija uzrokovanih Hepatitis A virusom koje su povezane sa hranom. Trovanja hranom uzrokovana hepatitis E virusom zabilježena su u EU, a od ostalih virusa prijavljen je jedan slučaj trovanja hranom uzrokovan adenovirusom (6). U BiH u 2021. godini nije bilo

prijavljenih pojedinačnih slučajeva virusnih trovanja hranom (8), a FZZJZ (Federalni zavod za javno zdravstvo) je izvijestio da nije bilo oboljelih od hepatitisa A u Federaciji BiH u 2021 godini. Za hepatitis E nije bilo dostupnih podataka (7).

1.3. Najznačajniji parazitski uzročnici trovanja hranom

Parazite, kao biološke opasnosti povezane sa hranom, ne treba zanemariti, a globalna trgovina hranom omogućava njihov transport širom svijeta. Neki od najznačajnijih parazita koji se prenose hranom su: vrste iz roda *Trichinella*, *Echinococcus granulosus*, *Cryptosporidium hominis* i *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* (*lambia*) (2). Ukupan broj epidemija i slučajeva trihineloze u EU je u opadanju posljednjih deset godina (6). U BiH nema prijavljenih slučajeva parazitarnih oboljenja kojima je put prenosa bila hrana (8).



2. DISKUSIJA

Stanovnici razvijenih zemalja imaju jače razvijenu svijest o bolestima koje se prenose hranom, njihovim putevima prenosa i rizicima PO zdravlje, vjerovatno, zbog boljeg sistema kontrole i obavlještavanja (4). Evropska agencija za sigurnost hrane (EFSA) vrši procjenu rizika u Evropi i daje naučna mišljenja i savjete za upravljanje rizicima koji su povezani sa hranom. Procjena rizika koji potiču iz svake pojedinačne biološke opasnosti mora obuhvatiti: identifikaciju opasnosti, karakterizaciju opasnosti, procjenu izloženosti i karakterizaciju rizika (1, 11). Kada govorimo o trovanjima hranom i njihovom uticaju na zdravlje ljudi EFSA u svom izvještaju koristi sljedeće podatke: ukupan broj slučajeva (oboljelih), broj i udio slučajeva (%) koji su doveli do hospitalizacije i/ili smrti, srednju veličinu izbijanja (srednji broj slučajeva po izbijanju), raspon izbijanja slučajeva (minimum i maksimum), te stopu izbijanja i prijavljivanja slučajeva na 100.000 stanovnika. Stopa izbijanja i prijavljivanja slučajeva na 100 000 stanovnika koristi se kao relativna mjera pojavljivanja u

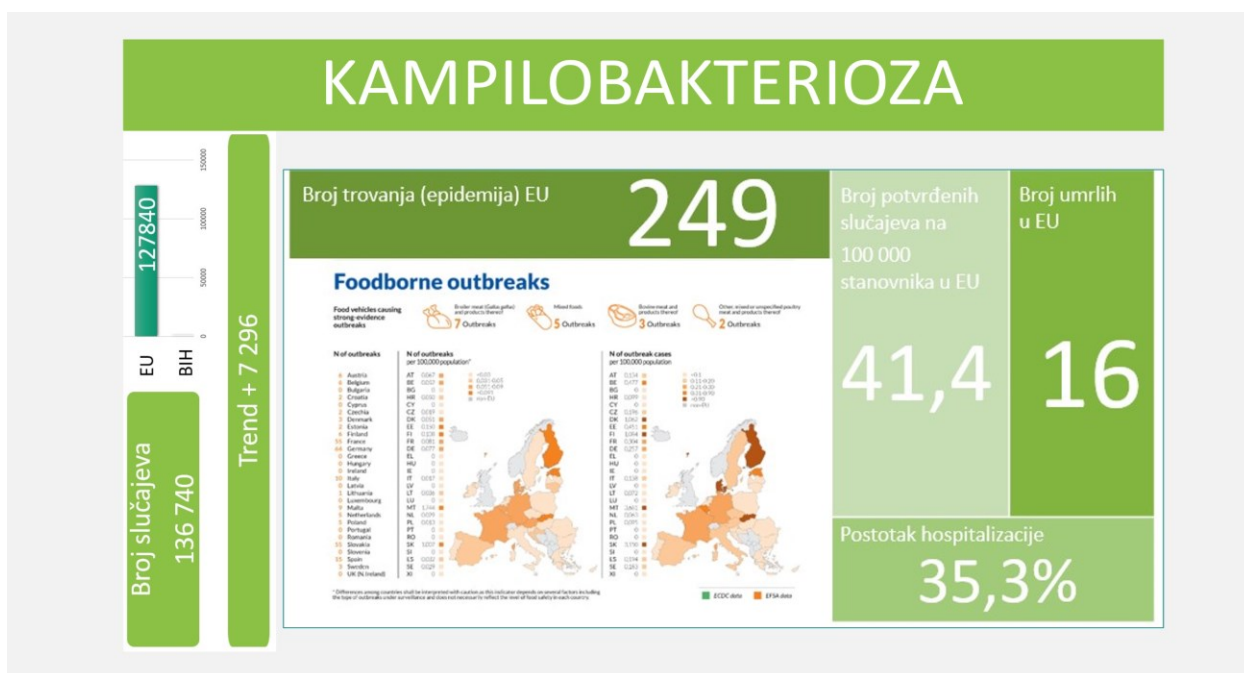
populaciji koja omogućava direktno poređenje među državama, nezavisno od veličine populacije (6). Izvještaj sadrži podatke koje su prijavile države članice EU (27 članica) i Ujedinjeno Kraljevstvo, te 7 država koje nisu članice EU, a to su: BiH, Island, Crna Gora, Norveška, Republika Sjeverna Makedonija, Srbija i Švicarska. Ukupno je prijavljeno 4088 epidemija trovanja u kojima je oboljelo 33 813 osoba, od čega je 2560 hospitalizovanih slučajeva i 33 smrtna slučaja. Bosna i Hercegovina prijavila je EFSA-i dvije epidemije trovanja hranom, koje nisu imale jake dokaze povezivanja sa hranom koja ih je uzrokovala. Ove dvije epidemije trovanja hranom obuhvatile su 66 oboljelih osoba i jedan hospitalizovani slučaj, što nas dovodi do stope izbijanja po stanovniku od 2,0 (6). Izvještaj koji je izdala Agencija za sigurnost hrane kaže da od 01.01.2021.g. do 31.12.2021. g. Agenciji nisu dostavljeni podatci o registrovanim epidemijama kojima je put prenosa hrana (8). Ovo neslaganje u Izvještajima jasno ukazuje na manjak kapaciteta BiH da uspostavljenе mehanizme prikupljanja i obrade podataka dosljedno provodi. Takođe manjak dokaza za



povezivanje uzročnika trovanja hranom i put prenosa ukazuje na postojanje potrebe za uspostavljanje dodatnih mehanizama koji bi osigurali sve potrebne kapacitete za dobivanje ovakvih podataka.

Broj oboljelih od kampilobakterioze činio je više od 62% svih prijavljenih potvrđenih slučajeva u Evropi u 2021 g., a najčešći put prenosa povezuje se sa konzumiranjem mliječnih i peradarskih proizvoda (6). Bosna i Hercegovina je 2018 g. preuzela Uredbu Evropske komisije 2017/1495 od 23. kolovoza 2017. o izmjeni Uredbe br. 2073/2005 u pogledu kontrole *Campylobacter spp.* u trupovima brojlera" čime je prvi put zakonski regulisana kontrola kampilobakter vrsta u prehrambenom lancu. Prema izvještaju Agencije za sigurnost hrane i Federalnog zavoda za javno zdravstvo nije bilo prijavljenih slučajeva kampilobakterioze kod ljudi u 2021. g. (7, 8), iako je u Europi kampilobakterioza jedna od najčešćih

prijavljenih bolesti koje se prenose hranom (Slika 1.) (6). Salmoneloza je u Evropi bila druga najčešće prijavljena zoonoza u 2021. g., a najčešće je povezana sa konzumiranjem jaja, proizvoda od jaja i mješane hrane (6). Od ukupnog broja analiziranih uzoraka u BiH koji su prijavljeni Agenciji za sigurnost hrane ukupno je 0,2% uzoraka bilo pozitivno na salmonela vrste, od čega je najveći broj kontaminiranih uzoraka bio iz grupe meso i proizvodi od mesa (8). U svome izvještaju Agencija za sigurnost hrane za 2021. g. je izvijestila 40 pojedinačnih slučajeva salmoneloze čiji je put prenosa hrana (8). U BiH u 2021.g. od ukupnog broja analiziranih uzoraka njih 0,5% bili su pozitivni na *L. monocytogenes* (7), ali nema prijavljenih slučajeva listerioze kod ljudi u FBiH u 2021 g. (8). Jersinioza je bila značajan bakterijski uzročnik trovanja hranom u Evropi zauzimajući treće mjesto kao najčešće prijavljena zoonoza, a slijede je trovanja uzrokovana *Escherichia coli* (STEC) koja proizvodi Shiga toksin.



Slika 1. Prikazuje statističke podatke kampilobakterioze u EU, BiH i Evropi (obuhvata 27 članica EU, Ujedinjeno kraljevstvo i 7 država koje nisu članice EU, a to su: BiH, Island, Crna Gora, Norveška, Republika Sjeverna Makedonija, Srbija i Švicarska) (6, 8).

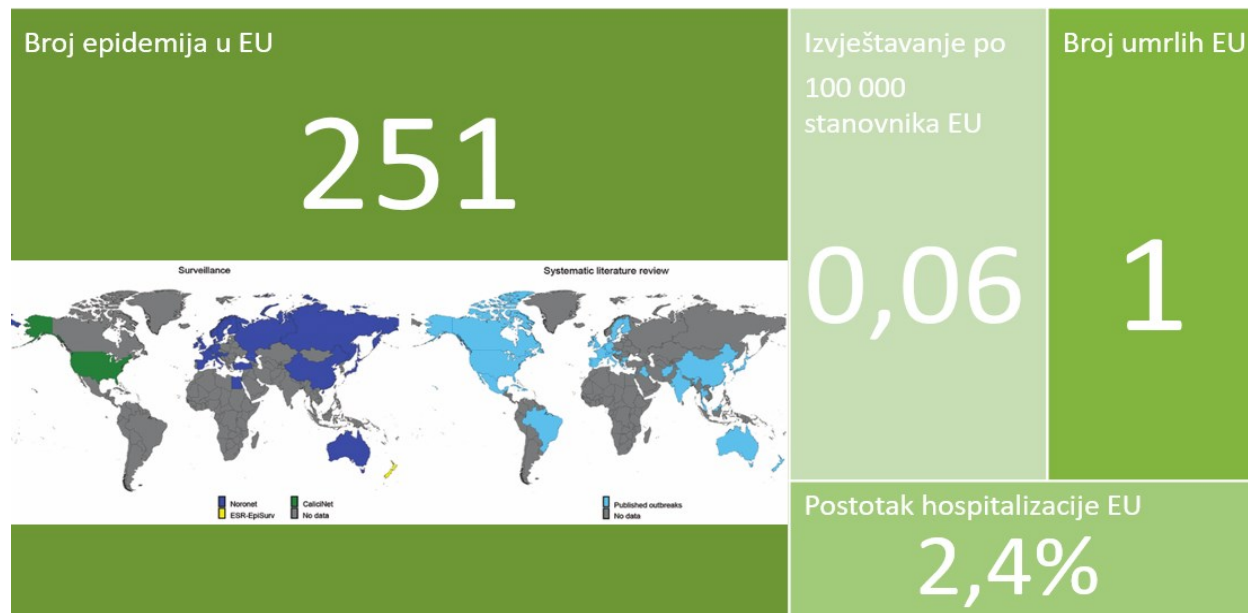
Virusne bolesti koje se prenose hranom poprimaju sve veći javnozdravstveni značaj, i pokazuju tendenciju rasta u zadnjem desetljeću. Zbog velikog broja epidemija koje uzrokuju i velikog broja oboljelih najznačajniji uzročnici virusnih bolesti koje se prenose hranom u Evropi su Norovirus (Slika 2) i hepatitis A virus (13). Norovirus je bio treći najznačajniji uzročnik trovanja hranom u EU, dok je u šest država članica bio prvi najznačajniji uzročnik trovanja hranom. Namirnice koje su najčešće povezane sa prenosom virusnih bolesti su

školjke, svježi proizvodi poput voća i povrća i gotova hrana. Epidemije Hepatitis A virusom je prijavilo šest država članica EU, a putevi prenosa su bili bobičasto voće, sokovi i mješovita hrana (6). U 2021. godini u BiH nije bilo prijavljenih slučajeva zaraženih virusom hepatitisa A kojima je put prenosa hrana (8). Smatra se da virusi, koji se prenose hranom, uzrokuju više od 50% svih bolesti koje se prenose hranom u svijetu (9). Bosna i Hercegovina nema zakonsku regulativu niti nacionalni program monitoringa hrane u smislu kontrole



kontaminacije hrane virusima. Uspostavljanju kapaciteta u BiH za mogućnost dijagnosticiranja i praćenja virusa koji se prenose hranom, a s obzirom

na sve veću javnozdravstvenu značajnost virusa koji se prenose hranom, trebalo bi posvetiti veću pažnju u narednim godinama.



Slika 2. Prikazuje statističke podatke za Norovirus u EU. (8).

Broj zemalja koje su prijavile bolesti uzrokovane trihinelom, kao i ukupan broj epidemija i slučajeva trihineloze u cijeloj EU je u padu u posljednjih 10 godina. BiH nije imala prijavljenih slučajeva oboljelih od trihineloze (8), a FZZJZ je izvijestio da nije

bilo oboljelih od trihineloze u FBiH u 2021 g. U EU prijavljena su dva slučaja kriptosporidioza povezanih sa hranom, i slučajevi giardiaz. U FBiH prijavljen je jedan slučaj giardiaz i jedan slučaj amebijaze (7).



3. ZAKLJUČCI

Sigurnost hrane u budućnosti potrebno je sagledavati kroz procjenu rizika potencijalno novih i već poznatih bioloških opasnosti koje je potrebno stalno pratiti i analizirati.

BiH mora uložiti dodatne napore kako bi razvila efikasne mehanizme kontrole, testiranja, prepoznavanja i povezivanja puteva prenosa bolesti povezanih sa hranom.



4. LITERATURA

1. Maria SCH., Rossana T., Giovanna S. (2017). Biological hazards in food. *Frontiers in Microbiology* Volume 7 - 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02154>.
2. Albert M., Boris H., Ljubo B., Relja B (2009). *Biološke opasnosti u hrani*. HAH, Osijek 2009.
3. Katepogu K., Venkobarao P. K. (2018). Food Products and Food Contamination; in *Microbial Contamination and Food Degradation* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00001-9>.
4. Gaby-Fleur B. (2015). International food safety: perceived versus real risks. 1. hrvatska konferencija o procjeni rizika porijeklom iz hrane uz obilježavanje Svjetskog dana hrane 6. – 7. listopada 2015., Osijek.
5. Jean Maguire van Seventer, Davidson H. Hamer (2017). *Foodborne Diseases. International Encyclopedia of Public Health* (Second Edition) DOI:10.1016/B978-0-12-803678-5.00516-6.
6. One Health EFSA report 2021. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2022.7666>.
7. Zdravstveno statistički godišnjak FBiH (2021): <https://www.zzjzfbih.ba/wp-content/uploads/2022/10/2021-Publikacija-FINAL.pdf>.
8. Izvještaj o rezultatima sprovedenih laboratorijskih analiza hrane, pojavi i kretanjima oboljenja čiji je uzrok/put prenosa hrana i prijavljenim slučajevima zoonoza za 2021. g. <https://fsa.gov.ba/wp-content/uploads/2022/08/Izvjestaj-o-rezultatima-provedenih-laboratorijskih-analiza-hrane-2021.pdf>.
9. Monika T., Kevin H. and David RL. (2022). Risk assessment of enteric viruses along the food chain and in the population <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/e200918>.
10. Mrinal S., Karl R. M., Tejpal D. and Anil K. P. (2022). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods* 11(19): 2966, DOI:10.3390/foods11192966.
11. Davide A. (2015). Risk assessment workflow in EFSA: how it works in practise.. 1. hrvatska konferencija o procjeni rizika porijeklom iz hrane uz obilježavanje Svjetskog dana hrane 2015. 6. – 7. listopada 2015., Osijek.
12. K. Abdesselam, F. Pagotto (2014): *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii and Other Cronobacter spp.; Encyclopedia of Food Safety; Volume 1, 2014, Pages 424-432*.
13. Sahar Abd Al-Daim (2022): Overview of Foodborne viruses: Important viruses, outbreaks, health concerns, food Handling and fresh produce. *Journal of Science and Nutrition Therapy*, DOI:10.17352/jfsnt.000038.



BIOLOGICAL FOOD HAZARDS

Idrizović E, Hodžić B, Kunarac M, Ramić N.

ABSTRACT

Introduction: Biological hazards in food are organisms or compounds they create, which represent a risk to human health. These hazards cause third of the global diseases and their impact is significant to general health and economy. Biological food contaminants can be bacteria, viruses, yeasts, parasite, and mold. Although the mold has been discussed in context of mycotoxin.

Aim: To present the importance of biological food hazard assessment and raising awareness as well as development of methods and systems that would allow detection of food born illness.

Discussion: It is estimated that viruses cause more than 50% of food borne diseases and most significant are hepatitis A, norovirus, rotavirus. Bacteria that are transmitted by food are well know and have been cause of death for centuries. Most significant of these are: campylobacteriosis, salmonellosis, yersinosis and are followed by *Escherichia coli* (STEC) which produces Shiga toxin and *Listeria monocytogenes* infections. Number of patients caused by campylobacteria was more than 62% of all reported and confirmed cases u 2021. However, in Bosnia and Hercegovina, mainly because of lack of identification and lack of testing, we haven't had single reported case of campylobacteriosis. Salmonellosis is still second most reported zoonosis and serotype *Salmonella Enteritidis* is the most commonly reported cause of food poisoning outbreak in Europe. We can't neglect the fact of even larger number of pathogens that are being formed, nor possibility of change in virulence of known pathogens and antibiotics resistance development in context of food chain. Important tool for control and reduction of food born biological hazards is risk assessment that has ability to identify critical points and assess these risk factors for population.

Conclusion: The development of food safety must include risk assessment of potentially new and know hazards. Bosnia and Herzegovina need to put additional effort to develop efficient testing mechanisms and recognition of food born illness.

Key words: Biological hazard, risk, food safety.

CORRESPONDING AUTHOR

Emina Idrizović, MA biology,

spec. microbiology

Department for food microbiology, INZ

Tel. 061/555-908

E-mail: emina.idrizovic@inz.ba





MOLEKULARNE METODE U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

Kamelija Madacki Todorović

Sarajevo School of Science and Technology, Medical school

Hrasnička cesta 3a, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Kamelija Madacki Todorović, SSST Medicinski fakultet; kamelija.madacki@ssst.edu.ba

ABSTRACT

Savremene molekularne metode revolucionirale su laboratorijsku dijagnostiku posljednjih desetljeća, pružajući nevjerovatne uvide u genetsku i molekularnu osnovu bolesti. Ovaj rad daje pregled ključnih molekularnih tehnika koje se koriste u laboratorijskoj dijagnostici i njihov uticaj na kliničku praksu. Rad obuhvata pregled tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina kao što su lančana reakcija polimerazom (PCR), PCR u stvarnom vremenu, ističući njihove primjene u otkrivanju i kvantificiranju genetskog materijala. Dodatno, ulogu sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) u otkrivanju genomske informacije, omogućavajući sveobuhvatnu analizu genetskih varijacija povezanih s raznim bolestima. Primjena molekularne dijagnostike je ključna u tačnom i pravovremenom otkrivanju bolesti u infektivnim bolestima, onkologiji i genetskim poremećajima. Kako se molekularne metode nastavljaju razvijati, primjena istih otvara mogućnosti za povećanje preciznosti, brzine i obima laboratorijske dijagnostike, što u konačnici pridonosi učinkovitom liječenju pacijenata, te personaliziranim pristupima liječenja pacijenta. Napredak u molekularnim metodama revolucionirao je laboratorijsku dijagnostiku, nudeći neuporedivu preciznost i učinkovitost u otkrivanju i karakterizaciji bolesti. Naglasak je na primjeni molekularnih tehnika u savremenom dijagnostičkom pristupu, njihova uloga u identifikiranju genetskih markera, uzročnika infekcija i različitih procesa na nivou ćelije.

Tehnike hibridizacije nukleinskih kiselina, kao što su fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) i microarray su metode koje olakšavaju vizualizaciju i identifikaciju specifičnih sekvenci DNA ili RNA, nudeći dragocjene uvide u hromosomske abnormalnosti i obrasce ekspresije gena. Savremena primjena molekularne dijagnostike i metoda važne su u procesu donošenja kliničkih odluka, terapijske strategije i pristupa personalizirane medicine. Molekularne metode imaju sve istaknutiju ulogu u laboratorijskoj dijagnostici, pružajući kliničarima neprocjenjive uvide u tačnu dijagnostiku i personaliziranu brigu za pacijente.

Primjena molekularne dijagnostike pored zaraznih bolesti i genetike također ima ulogu u farmakogenomici, personaliziranoj medicini i praćenju onkoloških pacijenata.

Ključne riječi: molekularne metode, laboratorijska dijagnostika, personalizirana medicina

Autor za korespondenciju:

Kamelija Madacki Todorović, MA genetike

dipl. ing. MLD

SSST Medicinski fakultet, Sarajevo

Tel. 061/219-088

E-mail: kamelija.madacki@ssst.edu.ba





UVOD

Molekularna dijagnostika, korištenje dijagnostičkog testiranja za razumijevanje molekularnih mehanizama bolesti pojedinog pacijenta, bit će ključna u pružanju sigurne i učinkovite terapije za mnoge bolesti u budućnosti. Dijagnostika utiče na čak 70 % donošenja odluka u zdravstvu, a nova generacija dijagnostičkih testova koji pružaju uvide na molekularnoj razini ispunjava obećanje personalizirane medicine. Uloga molekularne dijagnostike u personaliziranoj medicini obuhvata slijedeće aspekte:

- Rano otkrivanje i odabir odgovarajućeg liječenja za koje se na temelju molekularne dijagnostike utvrdi da su sigurni i učinkoviti
- Integracija molekularne dijagnostike s terapijom
- Praćenje terapije kao i određivanje prognoze

Molekularne metode u laboratorijskoj dijagnostici igraju ključnu ulogu u analizi genetskog materijala kako bi se identificirale genetske promjene, dijagnosticirale bolesti, pratili terapijski odgovor i pružile informacije o individualnim genetskim karakteristikama pacijenata. Ove metode

omogućava detaljniju i precizniju analizu na molekularnoj razini, što doprinosi razvoju personalizirane medicine.

Istorija molekularne dijagnostike obuhvata razvoj tehnologija i metoda koje se koriste za analizu genetskog materijala, identifikaciju genetskih varijacija i dijagnostiku bolesti na molekularnom nivou. U nastavku su prikazani ključni događaji kroz istoriju u razvoju molekularne dijagnostike:

1953. - Otkriće strukture DNA: James Watson i Francis Crick predstavili su model dvostrukog heliksa strukture DNA, otvarajući put za razumijevanje genetskog materijala.

1977. - Sekvenciranje DNA: Frederick Sanger razvio je metodu sekvenciranja DNA, što je omogućilo određivanje redoslijeda nukleotida u genetskom materijalu.

1983. - PCR (Polimerazna lančana reakcija): Kary Mullis razvio je PCR, revolucionarnu tehniku koja omogućava umnožavanje specifičnih sekvenci DNA. PCR je postao ključna tehnika u molekularnoj dijagnostici.

1985. - DNA fingerprinting: Alec Jeffreys je prvi put koristio tehniku DNA otiska prsta (DNA fingerprinting) za forenzičke svrhe,



što je značilo otkriće genetskih markera koji se mogu koristiti za identifikaciju pojedinaca.

1987. - Sekvenciranje ljudskog genoma: Nacionalni instituti za zdravlje (NIH) pokreću Human Genome Project (Projekat ljudskog genoma) s ciljem potpune sekvencije ljudskog genoma.

1990. - Razvoj PCR bazirane dijagnostike: PCR postaje sve prisutna tehnika u laboratorijima za dijagnozu genetskih bolesti, infekcija i drugih stanja.

1996. - Metoda sekvenciranja sljedeće generacije (NGS): Razvoj NGS-a omogućava brže i jeftinije sekvenciranje genoma, što dodatno ubrzava istraživanje genetskih bolesti.

2001. - Dovršetak Human Genome Project-a: Prva potpuna sekvencija ljudskog genoma objavljena je kao rezultat međunarodnog Human Genome Project-a.

2005. - Personalizirana medicina: Molekularna dijagnostika postaje ključna u personaliziranoj medicini, gdje se terapija prilagođava genetskim karakteristikama pojedinca.

2010. - CRISPR-Cas9: Razvoj CRISPR-Cas9 tehnologije omogućava precizno uređivanje gena, što ima veliki potencijal u liječenju genetskih bolesti.

2013. - Nove metode sekvenciranja: Razvoj treće generacije tehnika sekvenciranja, kao što su PacBio i Oxford Nanopore, omogućuje čitanje dužih sekvenci i bolje razumijevanje strukture genoma.

2020. - Molekularna dijagnostika u pandemiji COVID-19: Molekularne metode, uključujući PCR, odigrale su ključnu ulogu u dijagnostici i praćenju COVID-19.

U daljem tekstu možemo vidjeti opće prikaze, karakteristike i primjene molekularnih metoda u laboratorijskoj dijagnostici danas:

PCR (Polimerazna lančana reakcija) je tehnika molekularne biologije koja omogućava amplifikaciju (umnožavanje) određenih dijelova DNA. Za ovu metodu zaslužan je Kary Mullis 1983. godine, te je postala ključna u mnogim laboratorijskim disciplinama, uključujući genetsku dijagnostiku, molekularnu biologiju, forenziku i istraživačke znanosti (1).

Osnovni princip rada PCR-a sastoji se od nekoliko koraka, započinje sa :

Denaturacija (94-98°C): Prvi korak u PCR-u je denaturacija, gdje se uzorak zagrijava na visoku temperaturu (obično između 94 i 98°C). Ovaj proces razgrađuje dvostuke



lanca DNA na pojedinačne niti, otvarajući ih za daljnju analizu.

Anneling (50-65°C): Nakon denaturacije, temperatura se snižava na temperaturu annelinga. Tokom ovog koraka, prajmeri (kratke niti DNA koje određuju mjesto amplifikacije) vežu se uz svoje komplementarne sekvence na ciljanoj DNA.

Elongacija (72°C): Temperatura se zatim podiže za elongaciju, tokom koje enzim poznat kao DNA polimeraza sintetizira novu niti DNA komplementarnu ciljanoj sekvenci. Ovaj korak proizvodi dva nova dvostuka lanca DNA.

Cikliranje: Svi ovi koraci se ponavljaju u ciklusima kako bi se postigla eksponencijalna amplifikacija ciljane DNA sekvence. Broj ciklusa određuje količinu amplificirane DNA.

Postoje različite vrste PCR-a, a ovdje su prikazane samo osnovne vrste:

RT-PCR (Reverse Transcription PCR): Koristi se za amplifikaciju RNA, a ne DNA. Prvo se provodi reverzna transkripcija kako bi se pretvorila RNA u komplementarnu DNA.

Real-time PCR (qPCR): Omogućava praćenje amplifikacije u stvarnom vremenu. Reakcija se može pratiti kontinuirano tokom

ciklusa, što omogućava kvantifikaciju početne količine DNA (Slika1).



Slika 1. Real-time PCR (qPCR)

(Izvor: <https://www.fishersci.ca/shop/products/quantstudio-5-real-time-pcr-system-96-well-0-2ml-laptop/a28569>)

Nested PCR: Koristi se dvije skupine prajmera za dodatnu specifičnost. Prvi set prajmera amplificira cijelu regiju, dok drugi set amplificira manju unutarnju podregiju.

Multiplex PCR: Koristi se za amplifikaciju više ciljanih regija istovremeno, što štedi vrijeme i resurse (2).

PCR je izuzetno važan alat u molekularnoj biologiji i dijagnostici. Omogućava brzu, specifičnu i selektivnu amplifikaciju genetskog materijala, čime olakšava analizu genetskih varijacija, dijagnozu bolesti, identifikaciju mikroorganizama i druge aplikacije u istraživačkom i kliničkom okruženju.

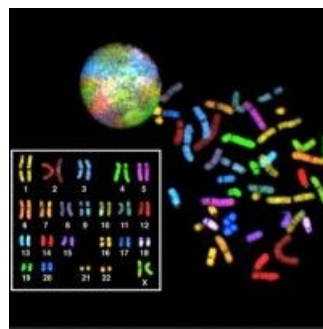


Kariotipizacija i FISH tehnika često se koriste u kombinaciji kako bi se dobile sveobuhvatne informacije o genetskim promjenama. Kariotipizacija pruža pregled cjelokupnog kariotipa, dok FISH omogućava detaljnu analizu specifičnih sekvenci na hromosomima. Ove tehnike igraju ključnu ulogu u dijagnostici genetskih poremećaja, onkologiji i istraživanju genoma (3).

Kariotipizacija

Kariotipizacija je tehnika koja se koristi za vizualizaciju i analizu kompletne garniture hromosoma jednog organizma. Procedura se sastoji od uzimanje uzorka najčešće krvi, amnionska tekućina, koštana srž. Potom slijedi stimulacija diobe stanica: Stanice se potiču na diobu kako bi hromosomi bili u fazi najveće kontrakcije. Potom slijedi zaustavljanje diobe i fiksacija stanica: Dioba se zaustavlja, a stanice se fiksiraju kako bi se spriječila daljnja dioba. Bojenje hromosoma je slijedeći postupak gdje se hromosomi boje određenim bojama, često koristeći tehniku Giemsa (G-banding), kako bi se omogućila njihova vizualizacija pod mikroskopom. Posljednja faza je analiza kariotipa gdje se hromosomi organiziraju po veličini, obliku i centromerima, a rezultat je prikazan u obliku kariotipskog dijagrama (4).

Ova tehnika nalazi svoju primjenu u dijagnostici genetskih poremećaja, praćenje djelotvornosti i izloženosti zračenju te analiza genetskih promjena u onkologiji i prenatalnoj dijagnostici (Slika 2).



Slika 2. Kariotipizacija

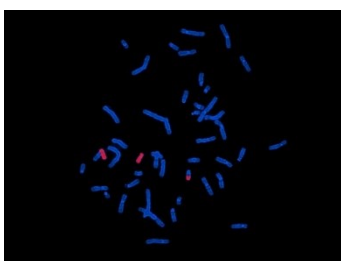
(Izvor: [https:// hr.womanuntamed.com / fetal-karyotyping/](https://hr.womanuntamed.com/fetal-karyotyping/))

FISH je tehnika koja koristi fluorescentno označene sonde kako bi se identificirale i locirale specifične sekvence DNA na hromosomima. Postupak se sastoji od nekoliko koraka, od pripreme uzorka gdje se stanice fiksiraju na staklenom nosaču. Zatim slijedi denaturacija DNA, hibridizacija: fluorescentno označena DNA-sličica (sonda) koja se komplementira sa specifičnom DNA sekvencijom hromosoma dodaje se uzorku i vezuje se za svoju ciljanu sekvencu. Slijedi pranje i uklanjanje nepovezane sonde, te detekcija: Fluorescentni signali se detektiraju



pod fluorescentnim mikroskopom, omogućujući vizualizaciju specifičnih hromosomskih područja (5).

FISH tehnika nalazi svoj primjenu u detekciji i lokalizaciji određenih gena ili sekvenci na hromosomima (Slika 3).



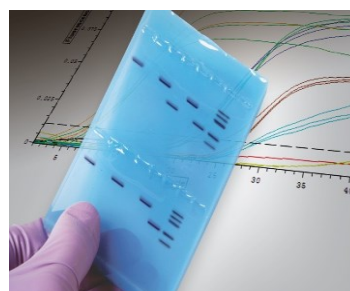
Slika 3. FISH

(Izvor: <https://clgenetics.com/our-services/fluorescence-in-situ-hybridization/>)

Identifikacija hromosomskih abnormalnosti i istraživanje hromosomskih struktura i organizacija. Ove dvije tehnike često se koriste u kombinaciji kako bi se dobile sveobuhvatne informacije o genetskim promjenama. Kariotipizacija pruža pregled cjelokupnog kariotipa, dok FISH omogućava detaljnu analizu specifičnih sekvenci na hromosomima.

Gel elektroforeza je tehnika koja se koristi za razdvajanje i analizu fragmenata DNA, RNA ili proteina na temelju njihove veličine i/ili naelektrisanja. Ova tehnika se često

primjenjuje u molekularnoj biologiji, genetici i biohemiji (Slika 4).



Slika 4. Gel elektroforeza

(Izvor: <https://www.fishersci.com/us/en/browse/90155123/agarose-gel-electrophoresis-systems>
<https://www.bio-rad.com/en-ba/a/edu/dna-pcr-agarose-gel-electrophoresis>)

Princip Gel Elektroforeze sastoji se od nekoliko koraka, od pripreme gela, gdje se najčešće koristi agarozu (za DNA) ili poliakrilamidni gel (za proteine), pripreme uzorka, nalijevanje uzorka u pokretanja sistema električne energije. Elektroforeza se izvodi u prisustvu električnog polja koje vuče nabijene molekule prema suprotnom kraju gela (6). Električna struja prolazi kroz gel, a



molekule se kreću prema suprotnom kraju gela ovisno o njihovoj veličini i/ili naelektrisanju. Manji fragmenti ili manje naelektrizirani fragmenti putuju brže, dok veći fragmenti ili veći naelektrizirani fragmenti putuju sporije. Nakon elektroforeze, gel se obično boji određenim bojama koje omogućuju vizualizaciju i dokumentaciju rezultata. Na taj način, mogu se vidjeti i analizirati veličine i relativne količine fragmenata.

Postoje različiti tipovi gel elektroforeze: agarozni gel elektroforeza (za DNA), Poliakrilamidni gel elektroforeza (za proteine): Ova vrsta gela se često koristi za razdvajanje proteina, posebno u tehnikama kao što su SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Gel elektroforeza je temeljna tehnika u molekularnoj biologiji koja omogućava brzo i učinkovito razdvajanje i analizu genetskog materijala i proteina. Gel elektroforeza se koristi za DNA analizu, RNA analizu, uključujući mRNA u tehnikama poput Northern blot analize, proteinska analiza: razdvajanje i analiza proteina prema njihovoj veličini i/ili naelektrisanju (7). Također se koristi za proučavanje genetskih varijacija: Gel

elektroforeza može se koristiti za detekciju i analizu genetskih varijacija, poput polimorfizama duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP) i nezaobilaznu molekularnu dijagnostiku, identifikaciju genetskih poremećaja ili bolesti putem analize DNA fragmenata.

Sekvenciranje DNA (Deoksiribonukleinska kiselina) je proces određivanja redoslijeda nukleotida (A, T, C, G) u molekuli DNA. To je ključna tehnika u molekularnoj biologiji i genomici koja omogućava detaljno razumijevanje genomske strukture organizama, identifikaciju genetskih varijacija te istraživanje bioloških procesa. NGS (Next-Generation Sequencing) je skup tehnologija koje omogućava brže i masovno sekvenciranje DNA u usporedbi s prethodnim metodama (8). Klasično sekvenciranje je Sangerovo sekvenciranje: Razvijeno 1977. godine, ova metoda koristi modificirane nukleotide i omogućava određivanje nukleotidnog redoslijeda pomoću elektroforeze.

NGS (Next-Generation Sequencing): NGS predstavlja skup modernih tehnologija koje omogućavaju istovremeno sekvenciranje velikog broja DNA fragmenata. Glavne karakteristike NGS-a uključuju visoku



brzinu, visoku paralelizaciju i niže troškove u odnosu na klasične metode sekvenciranja (9). Primjene sekvenciranja i NGS-a je široka i obuhvata genomska istraživanja, Također se koristi u onkologiji, mikrobiološkim istraživanjima, identifikaciji patogena, biotehnologiji u procesu razvoja novih lijekova (Slika 5).



Slika 5. NGS (Next-Generation Sequencing)

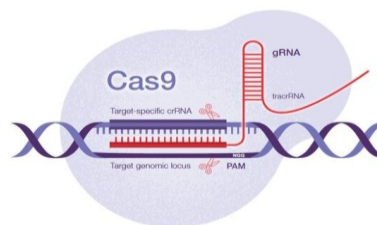
(Izvor: <https://www.chemistryworld.com/news/the-future-of-next-generation-dna-sequencing/4014391.article>)

Sekvenciranje i NGS su ključni alati u modernoj biologiji, pružajući dublje uvide u genetske informacije i omogućavajući inovacije u mnogim područjima znanosti i medicine.

CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 9) predstavlja revolucionarnu tehnologiju za precizno uređivanje gena. Razvijena je iz prirodnog

obrambenog mehanizma bakterija protiv napada virusa te je kasnije prilagođena za genetsko inženjerstvo. Ovaj sistem omogućava istraživačima da precizno mijenjaju, dodaju ili isključuju gene u genomu organizama, uključujući i ljudski genom (10).

Nekoliko koraka su ključni: dizajn gRNA: naučnici dizajniraju gRNA koji je komplementaran specifičnoj sekvenci ciljanog gena, dalje imamo vezanje sa Cas9 gdje se gRNA se poveže s Cas9 proteinom, stvarajući kompleks koji je sposoban prepoznati i vežu se za ciljanu sekvencu u genomu. Na dalje, rezanje DNA: Cas9 djeluje kao "molekularne makaze" i reže DNA na određenom mjestu (Slika 6.)



Slika 6. CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 9)

(Izvor: <https://www.thermofisher.com/ba/en/home/life-science/genome-editing/genome-editing-learning-center/crispr-cas9-technology-information.html>)



Ovaj rezultat potiče prirodni proces popravka DNA u stanici. Zadnji korak predstavlja reparacija DNA: kada DNA bude izrezan, stanica ima nekoliko opcija za popravak. Postoje dvije glavne metode: nehomologna završetna faza (NHEJ) koja može uzrokovati slučajna umetanja ili brisanja, i homologna rekombinacija (HR) koja koristi homolognu sekvencu za tačno popravljnje (11).

Primjena CRISPR-Cas9 tehnike je široka, od genetsko inženjerstvo gdje postoji mogućnost preciznog uređivanja gena omogućava različite primjene, uključujući ispravak genetskih bolesti i stvaranje genetski modificiranih organizama (GMO); istraživanje funkcije gena: omogućava istraživačima da ispituju funkciju određenih gena eliminacijom ili izmjenom tih gena u modelnim organizmima, potom borba protiv infekcija, te je moguće koristiti CRISPR-Cas9 za poticanje očuvanja i održivost ugroženih vrsta. Personalizirana medicina također nalazi primjenu u ovoj tehnologiji. Međutim, primjena CRISPR-Cas9 tehnologije donosi sa sobom niz etičkih pitanja koja se odnose na promjene u genetskom materijalu organizama, posebno u kontekstu ljudi.

Etičkih pitanja vezanih uz CRISPR-Cas9:

Mogućnost uređivanja gena ljudskih embriona postavlja ozbiljna etička pitanja, posebno kada se radi o promjenama koje se mogu prenijeti nasljedno. Postavlja se pitanje gdje povući granicu između terapijskih intervencija (poput ispravljanja genetskih bolesti) i poboljšanja genetskih osobina (12). Mogućnost preciznog uređivanja gena otvara vrata mogućnosti stvaranja "dizajnirane djece" s određenim genetskim karakteristikama, što izaziva etička pitanja vezana uz autonomiju pojedinca i mogućnost stvaranja genetskih elitizama. Genetskog uređivanja s ciljem poboljšanja određenih svojstava (inteligencija, sportske sposobnosti, itd.) postavlja pitanje etičkih granica i potencijalnog stvaranja socijalnih nejednakosti.

Neželjeni genetski učinci i neželjene promjene u genomu mogu se dogoditi tokom postupka uređivanja, a njihovo dugoročno ispitivanje i predviđanje može predstavljati etički izazov. Sigurnost i pouzdanost postupaka CRISPR-Cas9 uređivanja gena su ključne etičke brige (13). Kako će tehnologija biti dostupna i ko će imati pristup njoj? Pitanja pravednosti i jednake distribucije dobiti od genetskog uređivanja postaju



važna u kontekstu globalne zdravstvene jednakosti.

Postavlja se pitanje kako spriječiti zloupotrebu CRISPR-Cas9 tehnologije, uključujući neetičke primjene, terorističke prijetnje, ili potencijalnu upotrebu u vojne svrhe.

Zbog brzog razvoja tehnologije, važno je osigurati učinkovitu suradnju između naučnika, etičara, zakonodavaca i javnosti kako bi se postigla odgovorna primjena CRISPR-Cas9 tehnologije.

Također se neophodno postaviti jasna i stroga pravila, regulacije i etičke standarde kako bi se osigurala odgovorna upotreba CRISPR-Cas9 tehnologije i kako bi se izbjegle neetičke ili rizične primjene (14). Etička pitanja vezana uz CRISPR-Cas9 tehnologiju aktivno se raspravljaju i prate na globalnoj razini, uključujući i rad međunarodnih organizacija, kao što su UNESCO i WHO, kako bi se postavili smjernice za sigurnu, odgovornu i etičku primjenu ove moćne tehnologije.

ZAKLJUČAK

Personalizirana medicina kombinira informacije o genetskim, molekularnim i drugim biološkim faktorima pacijenta kako bi se prilagodila dijagnoza, liječenje i prevencija bolesti. Kada se personalizirana medicina integrira sa savremenom molekularnom dijagnostikom, otvara se mogućnost preciznije dijagnoze i prilagođenijeg tretmana svakom pacijentu (15).

Na temelju molekularnih analiza, ljekari mogu odabrati ciljanu terapiju koja je usmjerena na specifične molekularne promjene povezane s bolešću pacijenta. Ovo može poboljšati učinkovitost terapije i smanjiti nuspojave. Molekularna dijagnostika omogućava praćenje promjena u genetskom i molekularnom profilu tokom vremena, što može biti od posebne važnosti u praćenju hroničnih bolesti ili raka. Razumijevanje genetskih predispozicija ili rizičnih faktora pomoću molekularne dijagnostike omogućava usmjeravanje preventivnih mjera i rano otkrivanje bolesti (16). Personalizirana medicina uz korištenje savremenih molekularnih dijagnostičkih alata donosi revoluciju u pristupu



zdravstvenoj zaštiti, pružajući prilagođene terapije temeljene na jedinstvenim biološkim karakteristikama svakog pacijenta.

S novim dostignućima dolaze i izazovi, uključujući etička pitanja privatnosti podataka, dostupnost tehnologije, nužnost educiranja zdravstvenih stručnjaka i pacijenata. Ipak, u konačnici na prvo mjesto treba biti humani pristup prema svakom pacijentu i čovjeku, te ljudska empatija, profesionalni pristup i razumijevanje svakog ljudskog bića.



LITERATURA:

1. Zhang H, Li H, Zhu H, Pekárek J, Podešva P, Chang H, et al. Revealing the secrets of PCR. *Sens Actuators B Chem.* 2019; 298:126924.
2. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance.* 2012;17(39):20285.
3. Cicatiello R, Pignataro P, Izzo A, Mollo N, Pezone L, Maruotti GM, et al. Chromosomal microarray analysis versus karyotyping in fetuses with increased nuchal translucency. *Medical Sciences.* 2019;7(3):40.
4. Santos M, Kishimoto RK, Safranauskas R, Coimbra AAC, Silva GSE, Silva JL, et al. KARYOTYPE ANALYSIS OF ADVANCED THERAPY SPECIMENS IN A ROUTINE CYTOGENETIC LABORATORY. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2023;45:S515–6.
5. Nath J, Johnson KL. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. *Biotechnic & Histochemistry.* 2000;75(2):54–78.
6. Hajba L, Jeong S, Chung DS, Guttman A. Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2023;117024.
7. Green MR, Sambrook J. Agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(1):pdb-prot100404.
8. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017;550(7676):345–53.
9. Rodriguez R, Krishnan Y. The chemistry of next-generation sequencing. *Nat Biotechnol.* 2023;41(12):1709–15.
10. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-as13a/C2c2. *Science (1979).* 2017;356(6336):438–42.
11. Wight A V, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164():29–44.
12. Xonto'rayev S. ETHICAL CONSIDERATIONS IN GENETIC ENGINEERING. *Engineering problems and innovations.* 2023;
13. Erdmann A, Rehmann-Sutter C, Bozzaro C. Patients' and professionals' views related to ethical issues in precision medicine: a mixed research synthesis. *BMC Med Ethics.* 2021;22(1):116.
14. Pullman D, Etchegary H. Ethical, Legal, and Social Issues (ELSI) in Clinical Genetics Research. *Clinical*



- Epidemiology: Practice and Methods. 2021;65–82.
15. Mathur S, Sutton J. Personalized medicine could transform healthcare. Biomed Rep. 2017;7(1):3–5.
 16. Zhang S, Bamakan SMH, Qu Q, Li S. Learning for personalized medicine: a comprehensive review from a deep learning perspective. IEEE Rev Biomed Eng. 2018;12:194–208.



MOLECULAR METHODS IN LABORATORY DIAGNOSTICS

Madacki Todorović K.

ABSTRACT

Modern molecular methods have revolutionized laboratory diagnostics in recent decades, providing incredible insights into the genetic and molecular basis of disease. This paper provides an overview of key molecular techniques used in laboratory diagnostics and their impact on clinical practice. The paper includes an overview of nucleic acid amplification techniques such as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, highlighting their applications in the detection and quantification of genetic material. Additionally, the role of next-generation sequencing (NGS) in uncovering genomic information, enabling comprehensive analysis of genetic variation associated with various diseases. The use of molecular diagnostics is essential in the accurate and timely detection of diseases in infectious diseases, oncology and genetic disorders.

As molecular methods continue to develop, their application opens up possibilities for increasing the precision, speed and scope of laboratory diagnostics, which ultimately contributes to the effective treatment of patients and personalized patient treatment approaches.

Advances in molecular methods have revolutionized laboratory diagnostics, offering unparalleled precision and efficiency in disease detection and characterization. The emphasis is on the application of molecular techniques in the modern diagnostic approach, their role in identifying genetic markers, infectious agents and various processes at the cellular level.

Molecular techniques have transformed genetic analysis, enabling the identification of mutations, genomic variations, and microbial genomes with high precision.

Nucleic acid hybridization techniques such as fluorescence in situ hybridization (FISH) and microarray are methods that facilitate the visualization and identification of specific DNA or RNA sequences, offering valuable insights into chromosomal abnormalities and gene expression patterns.

Modern application of molecular diagnostics and methods are important in the process of making clinical decisions, therapeutic strategies and approaches to personalized medicine. Molecular methods are playing an increasingly prominent role in laboratory diagnostics, providing clinicians with invaluable insights into accurate diagnosis and personalized patient care. In addition to infectious diseases and genetics, the application of molecular diagnostics also plays a role in pharmacogenomics, personalized medicine and monitoring of oncology patients.

Keywords: molecular methods, laboratory diagnostics, personalized medicine

CORRESPONDING AUTHOR

Kamelija Madacki Todorović, MA genetic

School of Science and Technology,

Medical school Sarajevo

Tel. 061/219-088

E-mail: kamelija.madacki@ssst.edu.ba



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 podrobno 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 β -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.
3. Članak preuzet sa internet sajta: Navesti autora i naslov te [Internet]. Dostupno na: http://ppf.unsa.ba/Dokumenti/uputstvo_za_izradu_ms_rada.pdf [pristupljeno 30. 03. 2016].

26

6. Prilozi

Slike, tabele, grafikoni i sl. mogu se dati u sklopu teksta, a ako su obimniji na posebnoj stranici u prilogu. U podnožju slike piše se redni broj slike i njen naziv. Ako je slika preuzeta od drugog autora, onda se ispod naziva slike navodi izvor iz koga je slika preuzeta.

Tabele sadrže neophodne podatke prikazane na pregledan način. Iznad tabele se stavlja redni broj tabele i naziv u što kraćem obliku, a ako je tabela preuzeta iz nekog izvora onda se u podnožju tabele navode bibliografski podaci tog izvora i stranica sa koje je tabela preuzeta.