



ZBORNİK SAŽETAKA

3. HRVATSKI SIMPOZIJ BIOLOGA U ZDRAVSTVU

ZAGREB, 25. STUDENOG 2023.

ORGANIZATOR

Hrvatsko društvo biologa u zdravstvu
Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

MJESTO ODRŽAVANJA

*Prirodoslovno - matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu
Kemijski odsjek, Dvorana A1, prizemlje
Horvatovac 102a
Zagreb, Hrvatska*

ORGANIZATOR

Hrvatsko društvo biologa u zdravstvu

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

POD POKROVITELJSTVOM

Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske

SPONZORI



ORGANIZACIJSKI ODBOR

Predsjednica:

dr.sc. Ana Vičić, mag.biol.mol.

Članovi:

dr.sc. Ana Livun, mag.biol.mol.

dr.sc. Leona Radmanić, mag.biol.mol.

ZNANSTVENI ODBOR

Predsjednica:

izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej, mag.biol.mol.

Članovi:

prof.dr.sc. Feodora Stipoljev, mag.biol.mol.

izv.prof.dr.sc. Petra Korać, mag.biol.mol.

izv.prof.dr.sc. Ivan Šamija, mag.biol.mol.

doc.dr.sc. Katarina Štingl Janković, mag.biol.mol.

dr.sc. Marija Zekušić, mag.biol.mol.

dr.sc. Ana Klobučar, prof.

TAJNICA KONGRESA

dr.sc. Leona Radmanić, mag.biol.mol.

PROGRAM SIMPOZIJA

08.30-09.30 Registracija

09.30-10.15 **SVEČANO OTVORENJE I UVODNO PREDAVANJE**

Moderatori: Židovec-Lepej S, Vičić A

09.30-09.35 **Snježana Židovec-Lepej:** Pozdravna riječ

09.35-09.45 **Feodora Stipoljev:** Status biologa u zdravstvu

09.45-10.15 **Gordan Lauc:** Translating science into business for 15 years

10.15-10.45 Stanka za kavu i doručak

10.45-12.15 **POZVANA PREDAVANJA**

Moderatori: Štingl-Janković K, Vičić A

10.45-11.05 **Petra Korać:** Translacija znanja u molekularnoj dijagnostici

11.05-11.25 **Katarina Štingl-Janković:** Imunogenetika danas

11.25-11.45 **Snježana Židovec-Lepej:** Primarna rezistencija HIV-a tipa 1 na antiretrovirusne lijekove

11.45-12.05 **Marija Zekušić:** Tkivno inženjerstvo i tkivno bankarstvo u kliničkoj praksi

12.05-12.15 **Rasprava**

12.15-13.00 Stanka za kavu

Moderatori: Livun A, Crkvenac-Gornik K

13.00-13.20 **Leona Morožin Pohovski:** Klasična citogenetika u eri molekularne kariotipizacije (array-CGH)

13.20-13.40 **Marina Korolija:** Klinički značaj sekvenciranja mitohondrijskog genoma

13.40-14.00 **Marcela Curman Posavec:** Komarci kao vektori virusa – prvi dokazi flavivirusa u komarcima na području Hrvatske

14.00-14.05 **Rasprava**

- 14.05-14.50 KRATKA POSTERSKA PRIOPĆENJA**
Moderatori: Stipoljev F, Livun A
- 14.05-14.10 **Lerga M, Kureljak D, Šimić Ševerdija L, Malkoč E, Juranić Lisnić V, Pavletić M:** Inovacije u Dijagnostici Respiratornih Infekcija i Uloga Point-of-Care Testiranja u Hitnoj Medicini
- 14.10-14.15 **Merčep A, Bralić S, Šantak M, Šestak Panižić I, Marchiotti I:** Citokemijska diferencijacija kronične mijeloične leukemije od leukemoidne reakcije i ostalih mijeloproliferativnih neoplazmi
- 14.15-14.20 **Cvek M, Puškadija D, Jakac M, Landeka N, Pustijanac E, Ožanić M, Tomić Linšak D:** Uloga krpelja kao vektora zoonoza s osvrtom na bolesti koje oni prenose na području Istarske županije
- 14.20-14.25 **Peček L, Grgić I, Gorenc L, Židovec Lepej S:** Imunofenotipizacijski profil ispitanika zaraženih parvovirusom B19
- 14.25-14.30 **Vuk T, Vičić A, Oroz M, Stipoljev F:** Sangerovo sekvenciranje *FGFR3* regija s visokom učestalošću patogenih varijanti
- 14.30-14.35 **Gorski I, Babić I, Bingulac-Popović J, Jukić I:** Prevalencija virusa hepatitisa E u zdravoj populaciji u Hrvatskoj
- 14.35-14.40 **Buljubašić Šoda M, Petrović M, Lozić B:** Uloga standardne i molekularne citogenetičke analize u dijagnostici (kariotipizacija i FISH)
- 14.40-14.45 **Jukić L, Maskalan M, Grubić Z:** Tipizacija gena HLA metodom sekvenciranja nove generacije
- 14.45-14.50 **Damjanović I, Eberhard M, Bezik D, Sučić H, Kolarić D, Kralj M, Petrovicky Šveiger B, Ruškan I, Benković S, Bekina H, Turić N:** Cijanobakterije i cvjetanje algi na kupalištima kao javno-zdravstveni problem i izazov

14.50 ZATVARANJE SIMPOZIJA

POZVANA PREDAVANJA

OD ISTRAŽIVANJA DO DIJAGNOSTIKE – ISKUSTVO S PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA

P. Korać, I. Urlić

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska
(petra.korac@biol.pmf.hr, inga.urlic@biol.pmf.hr)

Translacijska istraživanja se uglavnom definiraju kao prijenos znanja iz temeljnih, fundamentalnih znanosti, npr. istraživanja o specifičnoj bolesti, kroz studije na ljudima i kliničku praksu do procesa donošenja odluka. Kao jedna od vodećih regionalnih sveučilišnih institucija za znanstveni i stručni rad u području biologije, čiji je cilj „doprinos razvoju gospodarstva i društva u cjelini primijenjenim i razvojnim znanstvenim istraživanjima unutar nacionalnog trokuta znanja ostvarenog suradnjom s poslovnim sektorom, posebice industrijom i financijskim institucijama, te promicanje društvene odgovornosti i društvenih promjena, Prirodoslovno-matematički fakultet je pokrenuo uslugu molekularnih i staničnih analiza. U ovom predavanju bit će prezentirana naša iskustva vezana za administrativne procese, komunikaciju s poslovnim sektorom i zakonodavstvom. Cilj nam je ukazati na glavne prepreke i razmotriti moguća rješenja za laboratorije poput ovoga, koji povezuju akademiju i gospodarstvo.

Ključne riječi: Prirodoslovno-matematički fakultet, prijenos znanja, akademija, gospodarstvo, molekularne i stanične analize

TKIVNO INŽENJERSTVO I TKIVNO BANKARSTVO U KLINIČKOJ PRAKSI

Dr.sc. Marija Zekušić, mag.biol.mol.

*Odjel za kontrolu kvalitete u transfuziji, staničnoj i tkivnoj terapiji
Zavoda za transfuzijsku i regenerativnu medicinu
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice*

Banka tkiva predstavlja samostalnu organizacijsku jedinicu unutar kliničkog bolničkog centra za prikupljanje, uzimanje, obradu, oduvanje, pohranu i raspodjelu različitih vrsta tkiva ili stanica. Terapijski postupci koji su u kliničkoj praksi su autologni keratinociti (matične stanice epidermisa), autologne limbalne matične stanica (matične stanice rožnice), autologne kosti, alogeno koštano tkivo (glava bedrene kosti, spongioza) i alogene amnijske membrane.

Autologni keratinociti se uzgajaju u laboratorijskim uvjetima od pojedinačnih epitelnih stanica, trajno obnavljaju epidermis te na taj način zatvaraju ranu i pridonose preživljavanju teško opečenih pacijenata. Uzgoj autolognih keratinocita kao epidermalnih presadaka je ključan (često i životno važan postupak) u liječenju teško opečenih pacijenata.

Limbalne matične stanice se nalaze u korneoskleralnom limbusu (zona između rožnice i bjeloočnice) i imaju mogućnost stalnog popravljavanja te mogu nadomjestiti epitelnu površinu rožnice. Nedostatak ovih stanica može nastati kao posljedica kemijskih ozljeda oka, opekline ili mogu biti nasljedne. Kao posljedica na oku mogu nastati kronični upalni procesi, vaskularizacija te ožiljci na rožnici i konjunktivi. Limbalne matične stanice sposobne su proći proliferaciju i diferencijaciju i obnoviti epitel rožnice. Tijekom procesa prikupljanja, uzimanja, obrade, pohrane i prije kliničke primjene stanica provode se testovi kontrole kvalitete kako bi se osigurala sigurnost, kvaliteta i učinkovitost lijekova za napredne terapije. Primjenjuju se validirani i standardizirani postupci kako bi osigurala ponovljivost i sigurnost u svim fazama obrade stanica i tkiva.

Amnijska membrana se koristi dugi niz godina u različitim medicinskim područjima kao što su dermatologija, oftalmologija, transplantacijska, regenerativna medicina i sl. Široku kliničku primjenu pronašla je u oftalmologiji kod teških bolesti prednjeg očnog segmenta.

Ljudske kosti i ostala koštano-mišićna tkiva najčešće su transplantirana tkiva, a svježa autologna kost je zlatni standard u transplantaciji kostiju. Kost je dinamično tkivo koje se stalno obnavlja i sastoji se od 3 tipa stanica: osteoblasti, osteociti i osteoklasti. Potreba za ugradnjom autolognog koštanog tkiva postoji kod pacijenata nakon teške traume te pacijenata tijekom neurokirurške operacije lubanje. Za osteohondralne presatke održavanje vijabilnosti stanica je ključno, stoga se koristi neagresivna površinska dekontaminacija.

KLASIČNA CITOGENETIKA U ERI MOLEKULARNE KARIOTIPIZACIJE (array-CGH)

Dr.sc. Leona Morožin Pohovski, mag.mol.biol.

Klinika za dječje bolesti Zagreb

Komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (engl. array comparative genomic hybridization; aCGH) je metoda molekularne kariotipizacije koja omogućava pregled cijelog genoma sa znatno većom moći razlučivanja u odnosu na rutinsku kariotipizaciju. U kliničku praksu je uvedena 2004. godine, a danas je zamijenila klasičnu citogenetiku u postupniku laboratorijske obrade bolesnika. Metoda se zasniva na ko-hibridizaciji jednakih količina različito fluorescentno obilježenih DNA odsječaka ispitivanog i kontrolnog uzorka odgovarajućeg spola s oligonukleotidnim DNA probama koje su vezane na staklenu podlogu. Moguće je ispitivanje cijelog genoma na razini razlučivanja koja je ~50-1000 puta veća nego rutinska kromosomska analiza. Moć razlučivanja ovisi o broju i međusobnom razmaku proba na matrici. Probe mogu biti razmještene ciljano, na mjestima gdje se nalaze poznati mikrolelecijski/duplikacijski sindromi (tzv. targeted array) ili su probe u većim ili manjim razmacima raspršene za cijekupni genom (tzv. whole genomic array). Također je moguće zasebno dizajniranje proba na matrici (engl. Custom designed array) za određene gene i kromosomske regije. Prednosti ove metode su velike. Otkriva submikroskopske promjene te nebalansirane aberacije u cijelom genomu kao i mozaicizam, a jednostavnija je i brža u odnosu na klasičnu citogenetiku. U usporedbi s rutinskom kariotipizacijom kod aCGH analize isključena je subjektivnost u interpretaciji rezultata. Također, za aCGH analizu nije potrebno prethodno kultiviranje stanica, što omogućava brže dobivanje rezultata. Ipak, bitno ograničenje aCGH metode je nemogućnost otkrivanja balansiranih kromosomskih promjena kao što su translokacije, prstenasti kromosomi i paracentrične ili pericentrične inverzije te stanične linije u mozaicimu. Budući da je klasičnom kariotipizacijom moguće kvalitativno odrediti strukturu promjene, točno odrediti numeričke i mikroskopski vidljive balansirane i nebalansirane kromosomske aberacije cijeloga genoma, citogenetika ostaje kao „zlatni standard” u laboratorijskoj dijagnostici kromosomskih aberacija.

POSTERSKA PRIOPĆENJA

INOVACIJE U DIJAGNOSTICI RESPIRATORNIH INFEKCIJA I ULOGA POINT-OF-CARE TESTIRANJA U HITNOJ MEDICINI

^{1,2}Mate Lerga, ¹Dunja Kureljak, ¹Lidija Šimić Ševerdija, ¹Elvis Malkoč, ³Vanda Juranić Lisnić ^{1,2}Martina Pavletić

¹*Objedinjeni hitni bolnički prijam, KBC Rijeka*

²*Katedra za anesteziologiju, reanimatologiju, hitnu i intenzivnu medicinu, Medicinski fakultet u Rijeci*

³*Centar za proteomiku, Medicinski fakultet u Rijeci*

Zarazne bolesti predstavljaju značajan izazov globalnom javnom zdravstvu utječući na medicinsku praksu, istraživanja i društveno-ekonomske sustave. Identifikacija točnog uzročnika bolesti ključna je za primjenu odgovarajuće terapije te je, u slučajevima visoko zaraznih bolesti, važna za javno zdravstvo radi izolacije primarnog pacijenta i zaštite čitave zajednice. Pandemija COVID-19 osobito je utjecala na hitne medicinske odjele koji se suočavaju s različitim grupama pacijenata, uključujući kritično oboljele.

Kvantitativni PCR (qPCR) pokazao se zlatnim standardom u dijagnostici SARS-CoV-2, ali je njegova nedostupnost onemogućila široku primjenu u rutinskoj dijagnostici. Uvođenjem Point-of-Care (POC) qPCR-a, vrijeme čekanja na rezultate se smanjilo, ali se zbog ograničene dostupnosti reagenasa i opreme situacija nije znatno poboljšala. Implementacijom metode direktnog qPCR-a postignuta je dostupnost testiranja sa smanjenim vremenom čekanja na rezultate, s prosječnih 15 na 3 sata (Slika 1). Tako je tijekom pandemije poboljšan protok pacijenata, smanjeni su troškovi nabave reagenasa i lažno negativni rezultati brzog antigenskog testiranja (BAT) (Slika 2), čime je poboljšana sigurnost pacijenata i smanjen prijenos virusa unutar bolnice. Nakon pandemije, dijagnostički spektar proširen je na uobičajene respiratorne infekcije poput virusa influence A i B te RSV, kao i na širi spektar respiratornih virusa i bakterija (Slika 3), omogućujući brzu i preciznu identifikaciju uzročnika respiratornih bolesti. Ova proaktivna strategija ubrzava protok pacijenata kroz odjel hitne medicine, olakšava njihov smještaj te ubrzava primjenu terapijskih postupaka.

"Point-of-care" testiranje igra ključnu ulogu u donošenju brzih i informiranih odluka u hitnoj medicini koje često mogu biti presudne za pacijente u kritičnim situacijama. Ovakav pristup omogućava brzo dijagnosticiranje, praćenje različitih parametara, smanjuje vrijeme čekanja na rezultate, optimizira obradu i protok pacijenata te poboljšava ukupnu kvalitetu hitne medicinske skrbi. Cilj nam je unaprijediti zdravstveni sustav i doprinijeti efikasnijem liječenju pacijenata u Odjelu bolničke hitne medicine.

CITOKEMIJSKA DIFERENCIJACIJA KRONIČNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE OD LEUKEMOIDNE REAKCIJE I OSTALIH MIJELOPROLIFERATIVNIH NEOPLAZMI

Antonia Merčep, Sara Bralić, Maja Šantak, Ivana Šestak Panižić, Ivan Marchiotti

BioGnost d.o.o. Međugorska 59, 10040 Zagreb, Hrvatska

Kronična mijeloična leukemija je neoplastična proliferacija stanica granulocitne loze u koštanoj srži koja rezultira povećanjem broja leukocita. Za citokemijsku diferencijaciju kronične mijeloične leukemije od leukemoidne reakcije i ostalih mijeloproliferativnih neoplazmi koristi se determinacija indeksa aktivnosti alkalne fosfataze (ALP). U razdoblju od lipnja do listopada 2023. godine testirano je 87 uzoraka. Za testiranje su korišteni razmazi periferne krvi od kojih je 54 bilo poznate dijagnoze mijeloproliferativne neoplazme (MPN), mijelodisplastičnog sindroma (MDS) i mijeloproliferativne neoplazme/mijelodisplastičnog sindroma (MPN/MDS), a 33 uzorka bila su pod sumnjom na mijeloproliferativni poremećaj zbog iskazane leukocitoze. Uzorci su testirani kompletom LeukoGnost ALP (BioGnost®, Zagreb, Hrvatska) prema uputama iz kompleta. Za svaki uzorak određivana je ocjena („score“) aktivnosti alkalne fosfataze tako što se 100 uzastopnih neutrofilnih granulocita, ovisno o intenzitetu citokemijske reakcije, svrstavalo u 6 kategorija, od 0 do 5. Dobiveni broj granulocita u svakoj kategoriji množio se s brojem pripadajuće kategorije, a zbroj dobivenih umnožaka predstavlja Kaplowljev zbroj odnosno indeks aktivnosti alkalne fosfataze (ALP indeks). Od uzoraka pacijenata s poznatom dijagnozom u svrhu praćenja bolesti, njih 27,8% pokazuje nizak ALP indeks (<13) što prikazuje pacijente s dijagnosticiranom kroničnom mijeloičnom leukemijom, njih 48,1% pokazuje ALP indeks 13-130 što prikazuje pacijente u remisiji bolesti, a njih 24,1% pokazuje ALP indeks (>130) što prikazuje pacijente s dijagnosticiranom nekom drugom mijeloproliferativnom neoplazmom (MPN), mijelodisplastičnim sindromom (MDS) i mijeloproliferativnom neoplazmom/mijelodisplastičnim sindromom (MPN/MDS). Od uzoraka pacijenata sa sumnjom na neku od mijeloproliferativnih neoplazmi zbog leukocitoze njih 21,2% pokazuje nizak ALP indeks (<13), njih 72,7% pokazuje ALP indeks zdrave osobe (13-130), a njih 6,1% pokazuje visok ALP indeks (>130). Indeks aktivnosti leukocitne alkalne fosfataze (ALP indeks) predstavlja dobar parametar za prognozu kronične mijeloične leukemije jer pokazuje različite stupnjeve te hematološke bolesti. Dijagnostički kompleti poput korištenog LeukoGnost ALP (BioGnost® Zagreb, Hrvatska) su brza, pristupačna i učinkovita metoda za praćenje indeksa aktivnosti leukocitne alkalne fosfataze citokemijskom metodom.

ULOGA KRPELJA KAO VEKTORA ZOONOZA S OSVRTOM NA BOLESTI KOJE ONI PRENOSE NA PODRUČJU ISTARSKJE ŽUPANIJE

Cvek M.¹, Puškadija D.¹, Jakac M.¹, Landeka N., Pustijanac, E.²

¹ Nastavni zavod za javno zdravstvo Istarske županije, Nazorova 23, 52100 Pula, Republika Hrvatska

² Fakultet prirodnih znanosti, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Zagrebačka 30, 52100 Pula, Hrvatska

Životinje predstavljaju rezervoar patogena koje krpelji prenose na čovjeka, poput lajmske bolesti, Q groznice i rikecioze. U radu je prikazana prostorna analiza prikupljenih krpelja u periodu od 2020. i dio 2023. u korelaciji s povijesnim podacima o zoonozama u ljudi i životinja prenosivih krpeljima. Prikupljeno je 2349 krpelja raspoređenih u 12 vrsta. Podaci o humanim zoonozama prenosivim krpeljima u periodu od 2016. i dio 2023. dobiveni su iz Prijava zaraznih bolesti. Ukupno je prijavljeno 129 zaraznih bolesti čiji je mogući vektor krpelj: 2019. jedan slučaj mišje groznice u Kršanu; jedan slučaj rikecioze 2016. u Ližnjanu; po jedan slučaj Q groznice 2016. u Poreču i 2018. u Vižinadi; 123 slučajeva borelioze od kojih je 115 analizirano. Kao vektora borelioze *Borrelia burgdorferi* sensu lato potvrđenog na području Istre, prikupljene su vrste krpelja *Ixodes ricinus* (70,72 %), *Ixodes hexagonus* (0,13 %) te *Ixodes frontalis* (1,40 %). Iz godišnjih izvješća o pojavi bolesti u životinja u Republici Hrvatskoj zabilježene su borelioza, Q groznica i rikecioza kao bolesti koje mogu prenijeti krpelji sa životinje na čovjeka. U životinja obrađeni su podaci samo za Q groznicu koje su zabilježne 2017. u Cerovlju i Tar – Vabrizi; 2019. u Kršanu; 2020. u Lupoglavu; a 2022. u Žminju i Svetvinčentu. U istraživanom periodu zabilježena je jedna najezda glodavaca - riđe voluharice i žutogrih šumskih miševa na obroncima Učke 2021., koji su prikupljeni u naseljima Šušnjevice i Brgudac. Najveći broj humanih slučajeva lajmske bolesti evidentiran je u urbanim sredinama. Najviše krpelja prikupljeno je u urbanim sredinama s pasa koji predstavljaju sentinel životinje za humanu boreliozu, dok su humane rikecioze te humane i životinjske Q groznice zabilježene u ruralnim sredinama, no slučajevi nisu povezani, patogen nije prenesen sa životinje na čovjeka. Daljnjim analizama dokazati će se prisustvo istraživanih patogena u krpelja te eventualno preklapanje područja zoonoza zabilježenih u ljudi i životinja.

IMUNOFENOTIPIZACIJSKI PROFIL ISPITANIKA ZARAŽENIH PARVOVIRUSOM B19

Laura Peček ¹, Ivana Grgić ², Lana Gorenec ², Snježana Židovec Lepej ^{1,2}

¹ *Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

² *Odjel za imunološku i molekularnu dijagnostiku, Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Hrvatska*

Ljudski parvovirus B19 pripada rodu *Erythroparvovirus* unutar porodice *Parvoviridae* čiji genom čini jednolančana DNA duljine oko 5600 nukleotida. Primarno zaražava i replicira se u diobeno aktivnim stanicama prekursora eritrocita u koštanoj srži. Prenosi se kapljičnim putem, krvlju te s majke na dijete. U imunokompetentnih osoba infekcija izaziva blage simptome dok može biti opasna za imunokompromitirane osobe i trudnice. Cjepivo, kao ni bilo koji oblik direktne terapije zasad nisu razvijeni. Zaraza parvovirusom B19 najčešća je krajem zime i početkom proljeća, što ponekad rezultira epidemijom. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti rezultate analize limfocitnih subpopulacija ispitanika koji su tijekom epidemije zaraze parvovirusom B19, od veljače do kolovoza 2023. godine zaprimljeni u Kliniku za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U istraživanje je uključeno 14 odraslih te 5 pedijatrijskih ispitanika kojima je u perifernoj krvi detektirana DNA parvovirusa B19 te rađena protočna citometrija periferne krvi. Limfocitne subpopulacije u perifernoj krvi ispitanika analizirali smo na protočnom citometru FACSCanto II koristeći BD Multitest™ 6-colour TBNK i BD Multitest™ CD8/CD38/HLA-DR reagense, a viremiju u uzorku odredili koristeći AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 na aparatu The LightCycler® 480 Instrument II. Limfocitne subpopulacije u skupini ispitanika do 16 godina su unutar referentnih vrijednosti te infekcija parvovirusom ne pokazuje nikakav karakterističan imunofenotipizacijski profil. Razlike u skupini odraslih najizraženije su u apsolutnom broju CD4+ limfocita koji je snižen u odnosu na referentne vrijednosti u 9 od 14 ispitanika, te CD8+CD38+ limfocitima gdje 9 od 14 ispitanika ima vrijednosti više od gornje granice. Vrijednosti NK stanica povišene su u 5 ispitanika, a aktiviranih limfocita T u 4 ispitanika. Ostale limfocitne subpopulacije ne pokazuju uočljive tendencije porasta ili snižavanja tijekom infekcije. Kako bismo mogli dobiti jasniji uvid u promjene koje u limfocitnim subpopulacijama izaziva parvovirus B19 istraživanje je potrebno provesti na većem broju ispitanika.

PREVALENCIJA VIRUSA HEPATITISA E U ZDRAVOJ POPULACIJI U HRVATSKOJ

Ivana Gorski¹, Ivana Babić², Jasna Bingulac-Popović², Irena Jukić²

¹Jasika d.o.o., Dolenica 55, 10250 Zagreb, ²Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, 10000 Zagreb

Infekcija virusom hepatitisa E (HEV) u zdravih osoba uglavnom je asimptomatska. Transfuzija HEV zaražene krvi u imunokompromitiranih bolesnika može izazvati ozbiljnu bolest. U svrhu procjene potrebe uvođenja rutinskog probira dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) na prisutnost HEV RNA potrebno je utvrditi prevalenciju infekcije virusom HEV u populaciji DDK u Hrvatskoj. Uzorci plazme DDK testirani su ID-NAT metodom korištenjem Procleix UltrioPlex E probirnog testa za istovremeno određivanje HBV DNA, HCV RNA, HIV-1,2 RNA i HEV RNA (Grifols, Španjolska). HEV infekcija potvrđena je standardiziranim testom, RealStar HEV RT-PCR Kit 2 (Altona Diagnostics, Njemačka), a prisutnost anti-HEV IgM i anti-HEV IgG antitijela određena je ELISA metodom (DIA.PRO Diagnostic Bioprobes, Italija). Primjenom nested-PCR-a i sekvenciranjem evolucijski očuvane regije unutar otvorenog okvira čitanja 1 (ORF1) po Sangeru, određen je genotip i filogenetska pripadnost virusa HEV. U periodu od prosinca 2021. do ožujka 2022., testiran je 8.631 uzorak i utvrđena su četiri HEV RNA-pozitivna uzorka, odnosno jedna pozitivna donacija na 2.158 donacija (0,046%, 95% interval pouzdanosti, 0,018%-0,119%). Tri donacije bile su u serološkom periodu prozora (window period), te su potvrđnim kvantitativnim testiranjem tih uzorka dobivene vrijednosti od $3,2E+1$ do $4,73E+3$ IU/ml HEV RNA. Filogenetskom analizom kod dva je uzorka utvrđen genotip HEV-3c. DDK nisu imali simptome bolesti, a u prehrani su konzumirali svinjetinu. Naknadnim testiranjem uzoraka nakon 60 dana, utvrđena je serokonverzija, a HEV RNA nije detektirana. Incidencija HEV RNA infekcije u zdravoj populaciji u Hrvatskoj i prisutnost HEV-3 genotipa, odgovara podacima u ostalim zemljama EU. Odluka o implementaciji HEV RNA NAT probira DDK u Hrvatskoj, zahtjeva stručnu evaluaciju, uz procjenu rizika prijenosa HEV infekcije transfuzijom krvi.

ULOGA STANDARDNE I MOLEKULARNE CITOGENETIČKE ANALIZE U DIJAGNOSTICI (KARIOTIPIZACIJA I FISH)

Maja Buljubašić Šoda^{1,2}, Marija Petrović¹, Bernarda Lozić^{1,2}

1Laboratorij za humanu genetiku, Klinika za dječje bolesti, KBC Split,

2Katedra za pedijatriju, Medicinski fakultet u Splitu

Laboratorij za humanu genetiku, KBC Split

Iako je kariotipizacija tehnika stara preko 70 godina, i danas, u eri molekularnih metoda i dalje ostaje zlatni standard i glavna metoda citogenetike. Ona omogućuje uvid u sve numeričke i veće strukturne kromosomske aberacije pri određivanju konstitucijskih promjena (npr. Down sindrom, Cri du chat sindrom), ali također i pri određivanju stečenih kromosomskih aberacija kod hematoloških pacijenata. Budući da je ograničavajući čimbenik ove metode razlučivost od 5-10 Mb, ovisno o uputnoj dijagnozi pacijenata često ju je potrebno nadopuniti sa molekularnom citogenetičkom analizom- *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH). Za razliku od kariotipizacije, FISH je ciljane molekularna metoda pomoću koje također možemo odrediti numeričke, ali i manje strukturne kromosomske promjene poput delecija i translokacija veličine 100-200 kb. Posebnom vrstom FISH sonde, tzv. *Whole Chromosome Painting* (WCP) sonda koja se specifično veže za cijeli kromosom, možemo potvrditi balansirane translokacije prethodno otkrivene kariotipizacijom. Posljednjih nekoliko godina, u Laboratoriju smo uveli i specifične FISH panele za određene hematološke bolesti, kako bismo mogli uočiti i one promjene koje se ne mogu primjetiti standardnom kariotipizacijom. Citogenetička analiza izrazito je važna u dijagnostici, jer omogućuje postavljanje ispravne dijagnoze, te primjenu ciljane terapije, naročito u hematologiji.

TIPIZACIJA GENA HLA METODOM SEKVENCIRANJA NOVE GENERACIJE

Jukić Lucija, Maskalan Marija, Grubić Zorana

Odjel za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

Geni sustava Humanog Leukocitnog Antigena (HLA, od engl. Human Leukocyte Antigen) imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu zbog čega su ključni u transplantaciji solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica te u upalnim procesima i autoimunim bolestima. Jedna od glavnih karakteristika ovog sustava je izrazito velik polimorfizam gena što značajno utječe na određivanje podudarnosti primatelja i davatelja organa u transplantaciji. Metoda sekvenciranja nove generacije (NGS, od engl. New Generation Sequencing) omogućuje tipizaciju visokog razlučivanja do 4 polja te sekvenciranje dijelova gena HLA koji do sada nisu bili sekvencirani, što za posljedicu ima i otkrivanje velikog broja novih alela. Metoda NGS uvedena je u svrhu tipizacije dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica iz Hrvatskog registra. Ovom metodom je do sada analizirano 2350 uzoraka za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 pomoću testova NGSgo-MX6-1 (GenDx, Utrecht, Nizozemska). Sekvencirani su cijeli geni za lokuse HLA razreda I (HLA-A, -B i -C), a za gene HLA razreda II (HLA-DRB1, -DQB1 i -DPB1) samo egzoni 2 do 4. Sekvence alela HLA uspoređivane su sa sekvencama baze IPD-IMGT/HLA, dok su novi aleli prijavljeni u banku gena BankIt te u bazu alela HLA IPD-IMGT/HLA. Na lokusu HLA-A otkriveno je devet novih alela, na najpolimorfnijem lokusu HLA-B jedanaest novih alela, a na lokusu HLA-C sedam. Kako je pokrivenost sekvence gena HLA razreda II pomoću korištenog testa manja nego pokrivenost sekvence gena HLA razreda I, otežano je otkrivanje novih alela pa tako na lokusima HLA-DRB1 i -DQB1 nismo otkrili niti jedan novi alel, a na lokusu HLA-DPB1 četiri. Najveći broj novih alela (N=13) je imao intronsku promjenu u slijedu nukleotida u odnosu na njima najbliži, dosad opisani alel. Šest alela je imalo sinonimnu mutaciju, a kod dvanaest novih alela pronađena je nesinonimna mutacija. Ovi podaci naglašavaju važnost novih metoda sekvenciranja gena HLA u svrhu određivanja što bolje podudarnosti primatelja i davatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica, ali i dobivanja preciznije slike o raznolikosti gena HLA u hrvatskoj populaciji.

Cijanobakterije i cvjetanje algi na kupalištima kao javno-zdravstveni problem i izazov

IVAN DAMJANOVIĆ¹, MIRTA EBERHARD¹, DANIJELA BEZIK¹, HRVOJE SUČIĆ¹, DARIO KOLARIĆ¹, MARIKA KRALJ¹, BARBARA PETROVICKY ŠVEIGER¹, INES RUŠKAN¹, SNJEŽANA BENKOTIĆ¹, HRVOJE BEKINA¹, NATAŠA TURIĆ¹

¹Nastavni zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Drinska 8, 31000 Osijek

Sažetak

Cijanobakterije predstavljaju jedne od najstarijih fotosintetskih organizama na Zemlji, a naseljavaju različita vodena staništa uključujući i ona koje karakteriziraju ekstremni uvjeti. Prema tome, može se zaključiti da popunjavanju različite ekološke niše te se smatraju „pionirima naseljavanja“. Nadalje, mnoge vrste fiksiraju i atmosferski dušik u aminokiseline i amonijeve ione, a posljednja istraživanja su pokazala da su cijanobakterije glavni fiksatori atmosferskog dušika u oceanima. Zbog svojih karakteristika koje dovode do povećanja koncentracije cijanotoksina važna su karika ekosustava, ali zbog sposobnosti tolerancije na ekstremne okolišne uvjete i naglog rasta pri optimalnim uvjetima mogu prouzročiti pojavu cvjetanja pri čemu se njihova brojnost naglo povećava što posljedično može imati negativne posljedice za zdravlje čovjeka i ekosustav u cjelini. Nastavni zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije provodi praćenje koncentracija cijanobakterija na kupalištima i odabranim jezerima na području Osječko-baranjske županije tijekom sezone kupanja. Uzorkovanje je provedeno fitoplanktonskom mrežicom na ukupno devet kupališta: četiri na području grada Đakova i pet na području grada Osijeka. Uzorci su zatim analizirani pod mikroskopom, a prisutne vrste i rodovi su determinirani uz pomoć odgovarajuće literature. U drugoj polovici kolovoza uz prisutno cvjetanje algi na osječkom kupalištu Bajer Jug II, zabilježena je koncentracija cijanobakterija, koja predstavlja visok rizik za zdravlje ljudi. Mikroskopskom analizom uzoraka utvrđena je dominantnost vrsta iz rodova *Aphanizomenon* i *Pseudanabaena*. Osim navedenih, zabilježene su i vrste iz rodova *Limnithrix* i *Microcystis*. Budući da je postojao visok rizik za pojavu štetnih učinaka na zdravlje ljudi, poduzete su određene mjere smanjenja rizika te su izdane javno-zdravstvene preporuke. Uzorkovanja su nakon toga ponovljena početkom i sredinom rujna te je analizama utvrđeno smanjenje koncentracije cijanobakterija na razinu koja zadovoljava kriterije niskog rizika za pojavu štetnih učinaka na zdravlje čovjeka prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO: Guidelines for safe recreational water environments, Volume 1: Coastal and fresh waters).

Ključne riječi: cijanobakterije, cvjetanje algi, površinske kopnene vode, javno zdravlje

RAZVOJ ENZIMOCITOKEMIJSKIH KOMPLETA LEUKOGNOST ZA PRIMJENU U DIJAGNOSTICI I DIFERENCIJACIJI AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Sara Bralić, Maja Šantak, Ivana Šestak Panižić, Ivan Marchiotti

BioGnost d.o.o. Međugorska 59, 10040 Zagreb, Hrvatska

Uvod

Bojenje krvnih razmaza i preparata koštane srži poznate su metode za dijagnostiku hematoloških bolesti koje se koriste u kombinaciji s modernim metodama poput protočne citometrije i imunohistokemijskih metoda. Enzimskim citokemijskim bojenjem detektira se lokacija i aktivnost staničnih struktura i enzimskih sustava u citoplazmi leukemijskih stanica bitnih za postavljanje različitih dijagnoza. Dijagnostika LeukoGnost setovima predstavlja jedan od prvih koraka u dijagnostici leukemija i time temelj za dobar odabir personalizirane terapije kod ovih zloćudnih bolesti. Leukemije su neoplastične proliferacije nezrelih stanica hematopoetskog sustava koje karakterizira abnormalna diferencijacija. Leukemijske stanice se ubrzano dijele i akumuliraju u koštanoj srži. Zamjena normalnih stanica leukemijskim stanicama rezultira znakovima i simptomima bolesti. Leukemije se mogu podijeliti na akutni i kronični oblik. Akutne leukemije potječu od primitivnih krvotvornih matičnih stanica i mogu se podijeliti na akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) i akutnu limfoblastičnu leukemiju (ALL) dok se kronične leukemije dijele na kroničnu mijeloičnu leukemiju (CML) i kroničnu limfoblastičnu leukemiju (CLL).

Cilj

Cilj ovog projekta bio je razviti enzimske komplete (LeukoGnost SPE, LeukoGnost NSE i LeukoGnost SPENSE) za citokemijsko bojenje krvnih razmaza i razmaza koštane srži koji će se koristiti za dijagnostiku i diferencijaciju podtipova akutne mijeloične leukemije.

Materijali i metode

Za razvoj enzimskih kompleta korišteni su razmazi periferne krvi i razmazi koštane srži pacijenata oboljelih od akutne mijeloične leukemije (AML), akutne limfoblastične leukemije (ALL), mijelodisplastičnog sindroma (MDS), mijeloproliferativne neoplazme (MPN) i mijelodisplastičnog sindroma/mijeloproliferativne neoplazme (MDS/MPN). Razmazi su prije bojenja kompletima sušeni na sobnoj temperaturi i potom fiksirani LeukoGnost fiksativom (BioGnost, Zagreb). Nakon fiksacije, preparati su bojeni kompletima LeukoGnost SPE (komplet za detekciju aktivnosti specifične esteraze u leukocitima), LeukoGnost NSE (komplet za detekciju aktivnosti nespecifične esteraze u leukocitima) i LeukoGnost SPENSE (komplet za istovremenu detekciju aktivnosti specifične i nespecifične esteraze u leukocitima). Kod korištenja kompleta LeukoGnost NSE i LeukoGnost SPENSE, osim bojenja sa supstratom, testirana je i reakcija sa inhibitorom nespecifične esteraze. Nakon enzimskog bojenja, preparati su kontrastno bojeni hematoksilinom LeukoGnost HEM (LeukoGnost SPE i LeukoGnost NSE) ili bojom Methyl Green (LeukoGnost SPENSE). Kako bi se očuvala postojanost i kvaliteta preparata, razmazi su nakon bojenja pokriveni pokrovnim stakalcima uz korištenje sredstva BioMount Aqua (BioGnost, Zagreb).

Rezultati

Pri mikroskopskoj analizi uzoraka obojenih kompletom LeukoGnost SPE pozitivnom citokemijskom reakcijom na specifičnu esterazu smatrana je prisutnost brojnih intenzivno crveno obojenih zrnaca u citoplazmama stanica hematopoeze. Citokemijska reakcija je izrazito pozitivna u stanicama granulopoeze (neutrofilni granulociti). Monociti su negativni ili vrlo slabo pozitivni (vrlo nježno crveno obojena zrnca u citoplazmama). Ostale stanice hematopoeze (limfociti, limfoblasti, plazma stanice, stanice eritropoeze i trombopoeze) su negativne. Pri mikroskopskoj analizi uzoraka obojenih kompletom LeukoGnost NSE pozitivnom citokemijskom reakcijom na nespecifičnu esterazu smatrana je prisutnost crveno-smeđih zrnaca ili difuzne crvenosmeđe obojenosti citop-

lazme stanica hematopoeze. Citokemijska reakcija je izrazito pozitivna (intenzivno tamno-crveno-smeđe obojenje) u stanicama monopoeze (monociti). Nakon bojenja s inhibitorom nespecifične esteraze dolazi do potpune inhibicije reakcije te monociti ostaju nebojeni. U ostalim stanicama hematopoeze mjestimice je vidljivo nježno svijetlo-smeđe obojenje citoplazme. Pri mikroskopskoj analizi uzoraka obojenih kompletom LeukoGnost SPENSE pozitivnom citokemijskom reakcijom na kombinaciju specifične i nespecifične esteraze smatrana je prisutnost plavo obojenih zrnaca u citoplazmama stanica granulopoeze (neutrofilni granulociti) i smeđe-crvenih zrnaca u citoplazmama stanica monopoeze (monociti). Citokemijska reakcija je istovremeno pozitivna i u neutrofilima i u monocitima, osim kod korištenja inhibitora nespecifične esteraze kada ne dolazi do specifičnog obojenja monocita. Kombinacija specifične i nespecifične esteraze omogućuje istovremeno prepoznavanje monocita i stanica neutrofilne linije, naročito u slučaju akutne mijelomonocitne leukemije (AMML) gdje stanice pokazuju istovremeni pozitivitet.

Zaključak

Uzorci obojeni kompletima LeukoGnost SPE, LeukoGnost NSE i LeukoGnost SPENSE u potpunosti su adekvatni za procjenu aktivnosti specifične i nespecifične esteraze u razmazima periferne krvi i koštane srži u bolesnika oboljelih od AML, ALL, MDS, MPN i MDS/MPN

EKOLOŠKI PRIHVATLJIVI FIKSATIVI U HISTOLOGIJI I CITOLOGIJI

Mateja Nemet, Lea Vrbančić, Maja Šantak, Ivana Šestak Panižić, Ivan Marchiotti

BioGnost d.o.o., Međugorska 59, Zagreb

Standard u fiksaciji histoloških uzoraka je otopina formaldehida u vodi, poznata kao formalin, koju je predložio Ferdinand Bloom 1893.-1894. godine. Formalin je toksičan hlapljivi reagens, koji pokazuje alergena, neurotoksična i kancerogena svojstva. Posljedično i samo zbrinjavanje fiksativa na bazi formaldehida predstavlja veliki problem što čini ovaj fiksativ ekološki neprihvatljivim - kako za ljude tako i za cjelokupni okoliš. Nadalje, formalin kao sam fiksativ pokazuje određene nedostatke u smislu nepoželjnih morfoloških promjena u tkivu te spore i ponekad nepotpune fiksacije.

Već se dugi niz godina traga za novim zamjenskim fiksativom za formalin koji bi uz netoksičnost trebao osigurati identično strukturno i molekularno, ako ne i bolje, očuvanje tkiva. Kao jedan od najčešćih alternativa formaldehidu ističe se glioksal. Radi se o jednostavnom dialdehidu koji manje hlapi nego formalin što ga posljedično čini manje štetnim za ljude. Istraživanja su pokazala da glioksal pokazuje sličnu reaktivnost prema komponentama tkiva kao formalin, što ga uz nisku toksičnost, čini dobrom potencijalnom alternativom formalinu. BioGnost je trenutno u završnoj fazi razvoja ekološkog fiksativa na bazi glioksala za primjenu u histologiji koji pokazuje usporedive rezultate s formalinom, a u nekim analizama (npr. analiza DNA) i bolje od formalina.

Osim za histološke uzorke, formaldehid se također koristi kao glavna komponenta većine fiksativa za hematološke i citološke uzorke, i to osobito za uzorke na kojima se rade enzimocitokemijska bojanja. Za razliku od metanola, koji se često koristi kao fiksacijsko sredstvo krvnih razmaza, formaldehid omogućava očuvanje i staničnih enzima čija se aktivnost detektira specijalnim bojanjima. BioGnost u svom katalogu nudi LeukoGnost fiksativ pogodan za fiksaciju razmaza krvi i koštane srži u svrhu provedbe enzimocitokemijskih metoda. S obzirom da je LeukoGnost fiksativ baziran na formalinu i acetonu razvijena su tri nova fiksativa za citološke uzorke prvenstveno u svrhu enzimocitokemijske dijagnostike koji umjesto formaldehida sadrži manje štetni glioksal ili kemikalije koje nisu štetne po ljudsko zdravlje niti za okoliš.

Utjecaj vode niske i visoke temperature na sposobnost inhibicije enzima α -amilaze i lipaze kod mladih biljaka brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.)

Jana Zekirovski, Emilie Kokić, Dino Davosir, Ivana Šola*

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Hrvatska

*korespondirajući autor

Brokula je, kao i mnoge druge biljke iz porodice kupusnjača, bogata spojevima koji inhibiraju aktivaciju enzima bitnih za razgradnju tvari u ljudskom organizmu. Takvi enzimi su α -amilaza i lipaza. Inhibicija α -amilaze, enzima koji ima važnu ulogu u probavi škroba i glikogena, smatra se strategijom liječenja poremećaja unosa ugljikohidrata, poput dijabetesa i pretilosti, kao i zubnog karijesa i parodontalne bolesti. Dok je lipaza gušterače ključni enzim za apsorpciju lipida. Klimatske promjene globalni su problem koji iz dana u dan utječe na biokemijske parametre biljaka. U sklopu ovog rada istražen je utjecaj vode niske i visoke temperature na metabolizam mladih biljaka brokule s ciljem utvrđivanja promjena u nutritivnim svojstvima biljke. Ekstrakti brokule pripremljeni su u 70%-tnom etanolu. Nakon toga je mjerena sposobnost inhibicije enzima α -amilaze i lipaze. Rezultati pokazuju da se sposobnost inhibicije α -amilaze značajno povećala u skupini tretiranoj vodom niske temperature, dok je inhibicija lipaze značajno smanjena u skupini tretiranoj vodom visoke temperature. Promjene u navedenim parametrima ukazuju da bi porast globalne temperature, kao i sve češći temperaturni šokovi, mogli značajno utjecati na hranjivu vrijednost biljaka.

Ključne riječi: klimatske promjene, fitokemija, nutritivna vrijednost, enzimi

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu HRZZ istraživačkog projekta IP-2020-02-7585 "Neizravni utjecaj globalnog zatopljenja na fiziološke parametre sisavaca ishranom biljkama uzgojenim na visokim temperaturama (TEMPHYS)".

UTJECAJ PANDEMIJE COVID-19 NA RAD ODJELA ZA TIPIZACIJU TKIVA KLINIČKOG BOLNIČKOG CENTRA ZAGREB

Matea Vuković, Marija Burek Kamenarić, Katarina Štingl-Janković, Natalija Martinez, Renata Žunec

Odjel za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Pandemija COVID-19 značajno je utjecala na opterećenost zdravstvenog sustava i dovela do smanjenja dostupnih kapaciteta medicinske skrbi. Cilj ovoga rada bio je utvrditi utjecaj pandemije COVID-19 na broj provedenih pretraga na Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Koristeći podatke o broju pacijenata koji su obavili pojedine pretrage na Zavodu, usporedili smo stanje u pred-COVID razdoblju (2018.-2019. g.), u COVID razdoblju (2020.-2021. g.), te u post-COVID razdoblju (2022.-11/2023. g.).

U 2020. godini, koju je obilježio početak pandemije koronavirusa, zabilježen je pad u broju kadaveričnih davatelja (N=87) u odnosu na pred-COVID razdoblje (N=134 i N=108), a padajući trend nastavio se i u narednim godinama (N=87; 96; 82). Također, u 2020. godini zabilježen je najmanji broj transplantacija bubrega (N=100), jetre (N=92) i srca (N=26) unutar istraživanog razdoblja (2018.-2023.). Broj pacijenata na listi čekanja za transplantaciju nije se promijenio u COVID razdoblju. Za razliku od transplantacija solidnih organa, broj obavljenih transplantacija krvotvornih matičnih stanica povećavao se svake godine i ne vidi se utjecaj pandemije na ukupan broj transplantacija. Jedina vidljiva razlika jest da je veći broj transplantacija u COVID razdoblju obavljen sa srodnih donora (N=39 i N=47), u odnosu na pred-COVID (N=33 i N=33) i post-COVID razdoblje (N=25). Sukladno tome, broj pacijenata koji su dolazili na Zavod zbog posttransplantacijskog praćenja kimerizma povećavao se iz godine u godinu. Učinak pandemije COVID-19 jasno je vidljiv u broju pretraga vezanih uz dijagnostiku bolesti, jer je tijekom 2020. došlo do smanjenja broja pacijenata (N=2385) u odnosu na pred-COVID razdoblje (N=3460 i N=3550), dok u post-COVID razdoblju broj pacijenata ponovno raste (N=3748 i N=3555).

Ovaj rad potvrđuje očekivano smanjenje opsega rada tijekom pandemije COVID-19, ponajviše u području transplantacija. Pandemija je značajno otežala transport organa i ograničila dostupnost davatelja, što je dovelo do manjeg broja transplantacija solidnih organa, ali isto tako i većeg broja transplantacija krvotvornih matičnih stanica sa srodnih donora. Ovi rezultati mogu biti poticaj za donošenje boljih mjera i strategija u izvanrednim situacijama poput pandemije, kako bi se neometano mogla pružati medicinska skrb svim pacijentima, a posebice onim najugroženijima.

PROMJENE U BROJU KOPIJA REGIJE Q11.2 KROMOSOMA 22

Ivana Tonković Đurišević¹, Sanda Huljev Frković², Morana Mikloš¹, Anita Pokupec Bilić¹

¹Odjel za citogenetiku, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC-Zagreb, Zagreb

²Zavod za genetiku i bolesti metabolizma, Klinika za pedijatriju, KBC-Zagreb, Zagreb

Regija q11.2 kromosoma 22 sadrži visoko homologne sekvence malog broja ponavljajnja, LCR (eng. *low-copy repeats*), tj. segmentalnih duplikacija koje su medijatori nealelne homologne rekombinacije (NAHR - eng. *nonallelic homologous recombination*). Ovim mehanizmom LCR-ovi mogu stimulirati nastanak CNV-a, promjene u broju kopija DNA i tako dovesti do rekurentnih delecija i duplikacija.

Metode kojima se u Odjelu za citogenetiku otkrivaju delecije i duplikacije kromosoma 22q11.2 su molekularna kariotipizacija – komparativna genomska hibridizacija s upotrebom biočipova (engl. *array-based comparative genomic hybridization*) (Agilent Technologies), višestruko umnažanje vezanih probi - MLPA (engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (MRC Holland) te Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) na uzorcima periferne krvi pacijenata.

Prikaz slučajeva: klinička slika najčešće mikrolelecije LCR22A-LCR22D od 3 Mb proksimalne regije 22q11.2 slična je rjeđoj i nešto manjoj deleciji od 1,5 Mb A-B, a poznate su pod nazivom 22q11.2 mikrolelecijski sindrom, što ukazuje na gotovo potpunu penetrantnost gena.

Duplikacije proksimalne regije, kao i distalne delecije i duplikacije 22q11.2 pokazuju varijabilni fenotip. Nađene rekurentne distalne delecije LCR22D-LCR22G i LCR22E-LCR22F i duplikacije LCR22E-LCR22H varijabilne su u svojoj veličini, ovisno kojim su sekvencama ograničene. Mogu biti *de novo* nastanka ili su naslijeđene od zdravog ili blago zahvaćenog roditelja, što upućuje na nekompletnu penetrantnost zahvaćenih gena i varijabilnu ekspresivnost fenotipa.

XYY SINDROM – PRIKAZ SLUČAJA S FENOTIPIKOM NISKOG RASTA

**Anita Pokupec Bilić^{*1}, Morana Mikloš¹, Ivana Tonković Đurisević¹, Ivan Bilić²,
Katja Dumić Kubat³**

¹*Odjel za citogenetiku, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska*

²*Zavod za patofiziologiju, Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

³*Klinika za pedijatriju, Zavod za dječju endokrinologiju i dijabetes, KBC Zagreb, Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Croatia*

UVOD: XYY sindrom je rijetki genetski poremećaj koji se javlja u 1/1000 živorođene muške djece. Okarakteriziran je prisutnošću dodatnog Y kromosoma u stanicama te se fenotipski manifestira kroz visoki rast te blaže odstupanje u motoričkom i govorno-jezičnom razvoju. Mozaične forme XYY sindroma koje uključuju tri stanične linije vrlo su rijetke i klinički varijabilne, ovisno o udjelu stanica sa aneuploidijom spolnih kromosoma u tkivu.

METODE I REZULTATI: Četnaestogodišnji dječak nakon endokrinološke obrade, upućen je na kariotipizaciju zbog niskog rasta. Citogenetskom analizom uzorka periferne krvi određen je kariotip: mos 47,XYY,inv(9)[25]/45,X,inv(9)[1]/46,XY,inv(9)[1]. Udio staničnih linija te struktura kromosoma Y određena je metodom FISH. Stanične linije sa prisutnom SHOX regijom na svim gonosomima, distribuirane su u 92% (XYY), 2% (X) i 5% (XY).

ZAKLJUČAK: Prezentirani slučaj prikazuje neobičan fenotip niskog rasta, posljedicom mozaične forme tri stanične linije, ali s visokim udjelom XYY stanica u perifernoj krvi. Prikazom slučaja naglašava se važnost citogenetske analize kao dijagnostičke obrade kod endokrinoloških procjena poremećaja rasta.

Ključne riječi: XYY sindrom; mozaicizam; niski rast

USPOREDBA KVANTIFIKACIJE DNA VIRUSA EPSTEIN-BARR PRIMJENOM DVAJU TESTOVA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU

Ivana Listeš¹, Leona Radmanić Matotek², Snježana Židovec Lepej³

¹*Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, 10000, Zagreb,* ^{2,3}*Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Mirogojska 8, 10 000 Zagreb*

Virus Epstein-Barr (EBV) onkogeni je virus čija se protutijela mogu dokazati u više od 90% odraslih osoba u svijetu. Infekcije virusom EBV često su bez simptoma, no akutna infekcija može uzrokovati i pojavu infektivne mononukleoze. Infekcije virusom EBV iznimno su značajne u imunodeficijentnih osoba zbog mogućnosti reaktivacije virusne replikacije, ali i virusom-potaknute transformacije i immortalizacije B-limfocita te mogućnosti uzrokovanja brojnih malignih i autoimunih bolesti. Metode molekularne biologije, posebice lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*, PCR), iznimno su značajne za analizu kinetike virusne replikacije određivanjem broja kopija DNA EBV-a u istraživanjima iz područja molekularne virologije, imunopatogeneze infekcije EBV-om kao i u biomedicinskim istraživanjima bolesti povezanih s ovim virusom.. U ovom istraživanju cilj je bio usporediti broj kopija DNA EBV-a u uzorcima periferne krvi određenih primjenom dvaju standardiziranih kvantitativnih PCR testova u stvarnom vremenu te utvrditi da li su rezultati procjene kinetike virusne replikacije usporedivi i primjenjivi u biološkim i biomedicinskim istraživanjima. Uzorci su analizirani koristeći standardizirani test *LightMix for the detection of EBV DNA* na instrumentu *LightCycler 2.0.* (kapilarni real-time PCR instrument) te primjenom novoga testa *LightMix for the detection of EBV DNA* s adaptiranim protokolom na real-time PCR instrumentu nove generacije *LightCycler 480 II.* Rezultati istraživanja pokazali su većinsko poklapanje između dva testa što se tiče zabilježavanja pozitivnih uzoraka, no i jedan diskrepantni uzorak. Nadalje, uzorci testirani na novom instrumentu imali su značajno niže Ct vrijednosti od uzoraka testiranih na starom instrumentu kao i značajno nižu viremiju od uzoraka testiranih na starom testu. Također, korištenjem *LightCycler 480 II.* zabilježene su niže razine viremije u visoko pozitivnim uzorcima, dok pri niskim vrijednostima virusne DNA zabilježava više vrijednosti od *LightCycler 2.0.*, što pokazuje veću osjetljivost, kao i objašnjenje diskrepantnog uzorka koji je na *LightCycler 2.0* uređaju zabilježen kao negativan, a na *LightCycler 480 II.* kao pozitivan.

REZULTATI PILOT STUDIJE KLINIČKOG GENETSKOG TESTIRANJA KARDIOMIOPATIJA U KB DUBRAVA

Mario Udovičić, 0000-0001-9912-2179
Ana Livun 0000-0002-6758-1677
Željko Sutlić 0000-0001-6926-9436
Rajko Kušec 0000-0002-2131-3861
Danijela Grizelj 0000-0002-8298-7974
Katica Cvitkušić Lukenda 0000-0001-6188-0708
Tamara Žarković Žigman 0000-0003-1184-8798
Diana Rudan 0000-0001-9473-2517
Šime Manola 0000-0001-6444-2674

Iznenadni srčani zastoj (SCA) vodeći je uzrok netraumatske smrtnosti u svijetu. Najmanje 25% slučajeva SCA ima genetsku komponentu i može se klasificirati kao nasljedno srčano stanje (ICC). Pokušali smo sagledati učinak i kliničku korist dostupnog dijagnostičkog panela pod nazivom TruSight Cardio Sequencing Panel.

U ovoj pilot studiji proveli smo genetsko testiranje na kardiomiopatije u odabраних pacijenata s jasnim fenotipovima neishemične kardiomiopatije. Genetsko testiranje provedeno je u genetičkom laboratoriju KB Dubrava korištenjem NGS tehnologije koje pokriva 174 gena koja su najčešće povezana s kardiomiopatijama, aritmijama i aortopatijama. Rezultati su očitani i analizirani pomoću BaseSpace platforme.

Od lipnja 2020. do ožujka 2021. 16 pacijenata podvrgnuto je genetskom testiranju (10 muškaraca, 33,6±18,7 godina), u sklopu pilot testiranja. Od ovih pacijenata, 7 je prethodno bilo podvrgnuto transplantaciji srca (HTx), dok je jedan bio na listi čekanja za HTx, 7 je bilo na redovnom praćenju, a jedna je analiza bila post mortem. Klinički je 12 pacijenata klasificirano kao dilatativna kardiomiopatija (DCM), dva su imala hipertrofičnu kardiomiopatiju (HCM) i dva aritmogenu kardiomiopatiju (ACM). Dijagnostički učinak provedenih genetskih testova bio je relativno visok, u samo dva bolesnika od 16 nismo identificirali nikakve mutacije. Ovo testiranje dovelo je do otkrivanja Danonove bolesti u jednoj obitelji i promjene kliničkog tijeka kod drugog bolesnika. O rezultatima se konzultiralo s kliničkim genetičarom; u sedam slučajeva pacijenti su upućeni u genetsko savjetovalište, dok je u pet slučajeva započet daljnji obiteljski probir.

Zaključili smo da ovo genetsko testiranje daje uvid u dijagnozu, liječenje i prognozu bolesnika s neishemičnim kardiomiopatijama te usmjerava probir koji omogućuje identifikaciju rizičnih srodnika i započinjanje odgovarajuće terapije lijekovima i zahvatima.