

# Uloga cijelogenomskog sekvenciranja u karakterizaciji multirezistentnih Gram-negativnih bakterija

---

Pešorda, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:350254>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-01**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU MEDICINSKI FAKULTET**

**Lucija Pešorda**

**Uloga cjelogenomskog sekvenciranja u  
karakterizaciji multirezistentnih Gram-  
negativnih bakterija**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb – Rebro, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Bedenić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## **POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU:**

AMR – antimikrobna rezistencija (antimicrobial Resistance)

ARG-ANNOT – Anotacija gena antibiotske rezistencije (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation)

BLAST – Osnovni alat za pretraživanje lokalnog poravnavanja (Basic Local Alignment Search Tool)

CARD – Sveobuhvatna baza antibiotske rezistencije (Comprehensive Antibiotic Resistance Database)

DHFR – dihidrofolat reduktaza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina ( deoxyribonucleic acid)

ESBL –  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (extended-spectrum beta-lactamase)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MDRGN – multirezistentne gram-negativne (multiresistant gram-negative)

NGS – sekvencioniranje nove generacije (next generation sequencing)

OprD – Porin D vanjske membrane (Outer membrane porin D)

PCR - lančana reakcija polimerazom (polymerase chain reaction)

SRST2 – tipizacija kratko čitanih sekvenci za bakterijske patogene (short read sequence typing for bacterial pathogens)

WGS – cjelogenomsko sekvencioniranje (Whole genome sequencing)

# SADRŽAJ

SAŽETAK.....	
SUMMARY .....	
<b>1.UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1MULTIREZISTENTNE GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 METODE ODREĐIVANJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.2. MOLEKULARNE METODE.....</b>	<b>7</b>
<b>2. RAZRADA.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. GENETSKA PODLOGA ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. CJELOGENOMSKO SEKVENCIONIRANJE.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. DEFINICIJA CJELOGENOMSKOG SEKVENCIONIRANJA .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2. SEKVENCIJSKE PLATFORME U WGS-U .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3. METODE SPAJANJA SEKVENCI U GENOM.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.4. BIOINFORMATIČKI PRISTUPI ZA DETEKCIJU GENA REZISTENCIJE U WGS-U.</b>	<b>10</b>
<b>2.2.5. BIOINFORMATIČKI PROGRAMI DOSTUPNI ZA DETEKCIJU GENA         REZISTENCIJE U WGS-U .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3. UPOTREBA WGS-A U KARAKTERIZACIJI MDRGN BAKTERIJA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1. KORIŠTENJE WGS-A U DETEKCIJI REZISTENCIJE MDRGN BAKTERIJA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2. KORIŠTENJE WGS-A U ISTRAŽIVANJU EVOLUCIJE ANTIBIOTSKE         REZISTENCIJE MDRGN BAKTERIJA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.3. WGS KAO ALAT U NADZIRANJU EPIDEMIJA UZROKOVANIH MDRGN         BAKTERIJAMA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.4. KORIŠTENJE WGS-A RADI USPOSTAVA MJERA KONTROLE ŠIRENJA         INFEKCIJA U KLINCI .....</b>	<b>15</b>
<b>3. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>16</b>
<b>4. ZAHVALA.....</b>	<b>17</b>

## SAŽETAK

U ovom radu se opisuje uloga cjelogenomskog sekvencioniranja u opisivanju multirezistentnih gram-negativnih (MDRGN) bakterija. Unutar ove teme obrađeni su i mehanizmi rezistencije te njihova genetska podloga. Također je opisan princip rada cjelogenomskog sekvencioniranja.

Multirezistentne gram-negativne bakterije su bakterije koje imaju rezistenciju na 2 ili više antibiotika. Mehanizmi rezistencije imaju genetsku podlogu te se stoga osim klasičnim fenotipskim metodama mogu određivati i novijim molekularnim metodama. Jedna takva metoda je cjelogenomsko sekvencioniranje. Cjelogenomskim sekvencioniranjem možemo dobiti gotovo čitavu DNA sekvencu nekog organizma. Cjelogenomskim sekvencioniranjem MDRGN bakterija možemo odrediti gene rezistencije, a uz upotrebu strojnog učenja moguće je otkriti nove gene rezistencije. U detekciji gena rezistencije ovom metodom koriste se različiti bioinformatički programi. Takvi programi sadrže mehanizam detekcije gena rezistencije i bazu podataka s poznatim genima rezistencije. Cjelogenomsko sekvencioniranje je moguće koristiti za detekciju rezistencije MDRGN bakterija, istraživanje evolucije antibiotske rezistencije MDRGN bakterija, nadziranje epidemija uzrokovanih MDRGN bakterijama te radi uspostava mjera kontrole širenja infekcija u klinici.

Cjelogenomsko sekvencioniranje se pokazalo kao vrlo vrijedno sredstvo u karakterizaciji MDRGN bakterija i u borbi protiv antibiotske rezistencije. Donedavno se vrlo rijetko koristilo zbog skupoće i manjka točnih i pouzdanih pristupa. Danas se to mijenja zbog velikog povećanja efikasnosti DNA sekvencioniranja, pada cijena sekvencioniranja i pojave robusnih računalnih alata.

Ključne riječi: cjelogenomsko sekvencioniranje, multirezistentne gram-negativne bakterije

# **SUMMARY**

## **THE ROLE OF WHOLE GENOME SEQUENCING IN CHARACTERISATION OF MULTI-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA**

The topic of this paper is the role of whole-genome sequencing (WGS) in describing multidrug-resistant gram-negative (MDRGN) bacteria. Within this topic, the mechanisms of resistance and their genetic background are also discussed. The working principle of WGS is also described.

Multidrug-resistant gram-negative bacteria are bacteria that are resistant to 2 or more antibiotics. The mechanisms of resistance have a genetic basis and therefore, in addition to classical phenotypic methods, they can also be determined by newer molecular methods. One such method is WGS. By WGS, we can obtain almost the entire DNA sequence of an organism. By WGS of MDRGN bacteria, we can determine resistance genes, and with the use of machine learning, it is possible to detect new resistance genes. Various bioinformatics programs are used in the detection of resistance genes by this method. Such programs contain a gene detection platform and a database with known resistance genes. WGS can be used to detect MDRGN bacterial resistance, investigate the evolution of antibiotic resistance in MDRGN bacteria, monitor epidemics caused by MDRGN bacteria, and to establish measures to control the spread of infections in the clinic.

WGS has proven to be a very valuable tool in the characterization of MDRGN bacteria and invaluable in the fight against antibiotic resistance. Until recently, it was very rarely used due to its high cost and lack of accurate and reliable approaches. Today, this is changing due to the large increase in DNA sequencing efficiency, lower sequencing costs, and the emergence of robust computer tools.

Keywords: whole-genome sequencing, multidrug-resistant gram-negative bacteria

# 1.UVOD

## 1.1MULTIREZISTENTNE GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE

Gram-negativne bakterije su jedan od najvećih svjetskih zdravstvenih problema zbog njihove visoke rezistencije na različite antibiotike. One imaju veliku kliničku važnost jer izazivaju bakterijske infekcije koje mogu postati ozbiljna prijetnja hospitaliziranim pacijentima, a posebno onima u jedinicama intenzivne njege. Infekcije izazvane multirezistentnim gram-negativnim bakterijama (MDRGN) koreliraju s povećanim morbiditetom, mortalitetom i produženom hospitalizacijom. (1)

*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* samo su neke od zabrinjavajućih MDRGN bakterija koje se pojavljuju u bolnicama diljem svijeta. Pretjerano ili krivo korištenje antibiotika širokoga spektra djelovanja dovelo je do ubrzanog razvoja adaptivnih mehanizama rezistencije u gram-negativnih bakterija. (2)



## 1.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE

Rezistencija na antibiotike u 21. stoljeću postaje jedan od najvećih problema moderne medicine. Tipično antibiotska rezistencija se stječe ili *de novo* mutacijama ili pomoću prenosivih DNA jedinica bakterija tzv. transpozona. Transpozoni mogu skakati na nova mjesta unutar DNA iste bakterije ili se pomoću plazmida prenositi u druge bakterije. Shodno tome transpozoni nose DNA za transpoziciju ali i neke gene rezistencije. Ovakva mogućnost horizontalnog prijenosa gena rezistencije može stvoriti bakterije koje imaju nekoliko različitih gena rezistencije na antibiotike. (3)

Postoji više mehanizama kojima gram-negativne bakterije razvijaju rezistenciju na antibiotike. a vrlo su česte kombinacije različitih mehanizama što rezultira u multirezistentnom fenotipu. Neki od bitnijih mehanizama rezistencije su :

1. Produkcija enzima koji razgrađuju antibiotike. Primjeri ovakvih enzima su  $\beta$ -laktamaze i aminoglikozidaze (fosforilaze, adenilaze, acetilaze) te kloramfenikol acetiltransferaza.
2. Mutacije na veznom mjestu za antibiotik. To su najčešći mehanizmi rezistencije Gram-negativnih bakterija na fluorokinolone i stafilokoka na meticilin (MRSA sojevi). MRSA sojevi imaju promijenjeni PBP (PBP-2a) koji ne može vezati niti jedan beta-laktamski antibiotik osim ceftarolina.
3. Promjena proteina vanjske membrane ili porina koja rezultira smanjenom propustljivošću za antibiotike. Primjer ovakve rezistencije je gubitak OprD proteina vanjske membrane koji rezultira rezistencijom na imipenem kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. , *CarO* porina u *A. baumannii* i *OmpK35* i *OmpK36* u *K. pneumoniae*.

4. Postojanje pumpi za izbacivanje antibiotika iz stanice. Ovakvi mehanizmi su najbolje opisani u *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. (4) Efluks pumpe su multiantibiotske i izbacuju više antibiotika iz različitih skupina te dezinficijense i boje. Izbacivanje antibiotika se odvija uz utrošak energije bakterijske stanice protiv gradijenta koncentracije. (4)

Od ovih mehanizama produkcija  $\beta$ -laktamaza je najvažniji. B-laktamaze proširenog spektra (ESBL-extended-spectrum  $\beta$ -lactamases) su najčešće nađene u *K. pneumoniae* (40%) i *Escherichia coli* (4%), ali i u drugim gram-negativnim bacilima poput *Enterobacter sp.*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* i *Serratia marcescans*. (4). ESBL su prvi puta opisane u Njemačkoj 1982. godine u izolatu *K. oxytoca*. ESBL su inhibirane klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom. Postoje tri glavne porodice: TEM, SHV i CTX-M. TEM i SHV ESBL su nastale mutacijama od  $\beta$ -laktamaza širokog spektra TEM-1, TEM-2 i SHV-1. Te mutacije mijenjaju strukturu aktivnog središta tako da velike molekule kao što su oksimino cefalosporini mogu ući u aktivno središte i može doći do hidrolize. CTX-M su native ESBL i nisu nastale mutacijama. One su po supstratnom profilu cefotaksimaze za razliku od TEM i SHV koje su u većini slučajeva ceftazidimaze i bolje razgrađuju ceftazidim u odnosu na cefotaksim. Plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskih ampC gena s kromosoma na plazmid. Za razliku od ESBL hidroliziraju cefamicine a ne djeluju na cefalosporine četvrte generacije. Nisu inhibirane klavulanskom kiselinom. U novije vrijeme veliki terapijski problem predstavljaju i karbapenemaze koje se dijele u klasu A (KPC, IMI, SME, NMC, GES), B (IMP, VIM, NDM, SIM, AIM, DIM) i D (OXA-48). Karbapenemaze su enzimi koji razgrađuju karbapeneme (imipenem, meropenem, ertapenem). U klasi A posebno su značajne KPC karbapenemaze

(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) koje uzrokuju visoki stupanj rezistencije na sve  $\beta$ -laktamske antibiotike a najčešće se javljaju u enterobakterija. KPC-1 je prvi puta opisana 1996. u Sjevernoj Karolini i zatim se proširila po istočnoj obali SAD-a a kasnije i po čitavoj svijetu. U klasi B se nalaze metalo  $\beta$ -laktamaze koje imaju u aktivnom središtu cink a razgrađuju sve  $\beta$ -laktame osim aztreonama. Gen koji ih kodira se nalazi u klasi 1 integrona koji može biti inkorporiran u kromosom ili plazmid. IMP varijante su proširene na Dalekom istoku dok VIM prevladava u Mediteranskim zemljama. U klasi D najvažnija varijanta je OXA-48 koja je sada dominantan tip oksacilinaze u enterobakterija u Europi. Karbapenem-hidrolizirajuće oksacilinaze su dominantan mehanizam rezistencije na karbapeneme u vrsti *A. baumannii*. Postoji pet grupa: OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like i OXA-235-like.

Rezistencija na aminoglikozide nastaje zbog produkcije modificirajućih enzima (adenilaza, acetilaza i fosforilaza), efluksa ili promijenjenog veznog mjesta na ribosomima. U novije vrijeme sve češće se javlja rezistencija zbog 16s metilaza koje se nalaze pod kontrolom *arm* i *rmt* gena a uzrokuju panaminoglikozidnu rezistenciju. Rezistencija na aminoglikozide u anaeroba posljedica je nedostatka transportnog sustava koji je ovisan o citokromu.

Rezistencija na kloramfenikol nastaje zbog produkcije kloramfenikol acetil-transferaze. U florokinolonla rezistencija je obično posljedica promijenjene DNA giraze ili topoizomeraze zbog mutacije *gyrA* i *parC* gena ili zbog akvizicije plazmidno kodiranih *qnr* gena koji kodiraju *qnr* protein koji štiti topoizomerazu. (28.)

### 1.3 METODE ODREĐIVANJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE

Testiranje osjetljivosti na antibiotike je rutinski postupak u dijagnostičkim mikrobiološkim laboratorijima. Prvo je potrebno identificirati bakteriju, a zatim odabrati antibiotike na koji će se ispitivati osjetljivost u ovisnosti o vrsti bakterije, dobi bolesnika, sjelu infekcije i ostalim čimbenicima. (5) U rutinskim laboratorijima se radi disk-difuzijska metode ili antibiogram zbog jednostavnosti izvođenja. Dilucijske metode koje određuju MIK se uglavnom rade u istraživačke svrhe. Kod nekih antibiotika kao što su kolistin, vankomicin i teikoplanin disk-difuzijska metode ne daju pouzdane rezultate pa se rezultat testiranja potvrđuje dilucijom u bujonu. Kod fosfomicina referentna metoda testiranja je agar dilucija. PCR za detekciju gena rezistencije se najčešće izvodi u karbapenem-rezistentnih sojeva. Detektiraju se geni koji kodiraju KPC, VIM, IMP i OXA-48 karbapenemaze. (6)

Disk difuzijski test (antibiogram) je kvalitativna metoda na temelju koje se sojevi svrstavaju u osjetljive, umjereno osjetljive i rezistentne. Diskovi koji sadržavaju definiranu količinu antibiotika se stavljaju na Mueller-Hintog agar koji je prethodno zasijan s testiranim sojem. Antibiotik iz diska difundira po površini ploče i formira se gradijent koncentracije. Na određenoj udaljenosti od ruba diska kolonije prestaju rasti i formira se inhibicijska zona. Na temelju promjera inhibicijske zone soj se svrstava u osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan. Dilucijske metode određuju najnižu koncentraciju antibiotika (MIK) koja inhibira rast testiranog soja. Antibiotik se serijski razrjeđuje u nizu epruveta tako da se dobiju dvostruka stupnjevita razrjeđenja. U ta razrjeđenja antibiotika se dodaje testirani soj. Najniža koncentracija pri kojoj

nema porasta testiranog soja odgovara za MIK. Dilucijska metoda se može izvoditi u epruvetama kao makrodilucija ili u mikrotitar pločicama kao mikrodilucija. (29)

### **1.3.1. FENOTIPSKE METODE**

Sumnja na produkciju ESBL se postavlja na temelju smanjenja inhibicijskih zona oko diskova cefalosporina a potvrda se vrši metodom dvostrukog diska ili metodom kombiniranih diskova. Kod metode dvostrukog diska se na sredinu MH ploče koja je prethodno zasijana testiranim sojem stavlja disk koji sadržava klavulansku kiselinu i oko njega se postavljaju diskovi cefalosporina na udaljenosti od 2 cm. Ako soj proizvodi ESBL doći će do deformacije inhibicijskih zona oko diskova cefalosporina u smjeru centralnog diska koji sadržava klavulansku kiselinu. Kod metode kombiniranih diskova se na površinu ploče prethodno zasijane testiranim sojem postavljaju diskove cefalosporina treće generacije (ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson) i monobaktama (aztreonam). Na jedan disk se nakapa klavulanska kiselina a drugi je kontrolni disk. Ako je razlika u zoni veća od 5 mm onda je to dokaz produkcije ESBL. P-AmpC beta-laktamaze se dokazuju na isti način samo što se kao inhibitor koristi fenilboronična kiselina. (29)

Za detekciju karbapenemaza u rutinskom laboratoriju obično koristimo modificirani Hodge test (MHT), CARBA-NP test ili CIM test (carbapenem inactivation method). Kod MHT zasijavamo *E. coli* ATCC 25922 na MacConcey agar i u sredinu ploče stavljamo disk karbapenema (imipenem, meropenem, ertapenem). Testirani soj se povlači okomito na disk karbapenema u obliku crte. Ploče se inkubiraju preko noći i uvrtnje inhibicijske zone oko diska karbapenema na mjestu gdje je povučena crta testiranog soja upućuje na produkciju karbapenemaze. CIM test

se izvodi tako da se pripremi gusta suspenzija testiranog soja. U tu suspenziju se stavlja disk karbapenema i suspenzija se inkubira 2h na 37 C. Nakon toga se vadi disk karbapenema i stavlja na MH ploču koja je prethodno zasijana *E. coli* ATCC 25922. Ako je zona manja od 14 mm ili se pojavljuju kolonije unutar inhibicijske zone to upućuje na produkciju karbapenemaze. Sojevi pozitivni u fenotipskim testovima se podvrgavaju molekularnoj detekciji karbapenemaza PCR metodom. (29)

### **1.3.2. MOLEKULARNE METODE**

Molekularne metode se obično koriste kao nadopuna fenotipskih metoda, ali se čini da bi ih uskoro mogle potpuno zamijeniti zbog veće brzine i točnosti određivanja antimikrobne rezistencije (AMR). Nedostatak molekularnih tehnika je u tome što zahtijevaju skupu opremu i educirano osoblje. Također potrebno je stalno obnavljati bazu podataka. Osim toga prisustvo gena za određenu determinantu rezistencije ne mora nužno značiti da je soj rezistentan s obzirom na to da ne mora postojati ekspresija gena. Molekularnim metodama se određuju geni odgovorni za bakterijsku rezistenciju. Najčešće korištene metode su: PCR, microarray i WGS. (9). U ovom radu će detaljnije biti razrađena metoda cjelogenomskog sekvencioniranja.

## 2. RAZRADA

### 2.1. GENETSKA PODLOGA ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE

Stečena rezistencija na antibiotike je posljedica velikog broja molekularnih mehanizama. Ovi mehanizmi podrazumijevaju različite genetske događaje kao što su: konstitutivna ili inducirana ekspresija gena rezistencije, povećana ekspresija gena rezistencije radi mutacije u promotorskoj ili regulatornoj regiji i insercija jako aktivnih promotora ispred gena rezistencije, mutacije u genima koji mijenjaju ciljno mjesto antibiotika, mutacije koje dovode do promjene strukture ili gubitka porina. (9) Neke bakterije mogu biti intrinzično rezistentne na određene antibiotike koje onda ne stavljamo u panel za testiranje za tu vrstu. Uzroci intrinzične rezistencije su manjak ciljnih mjesta djelovanja antibiotika, nemogućnost lijeka da dođe do ciljnog mjesta, ekspresija gena prisutnih na kromosomu koji kodiraju enzime koji razgrađuju antibiotik te hiperekspresija efluks pumpi za izbacivanje lijekova. (10) S obzirom na veliku raznolikost mehanizama rezistencije, detekcija gena koji kodiraju determinante rezistencije je vrlo kompleksno. (9) S druge strane neke mehanizme rezistencije nije moguće otkriti fenotipskim metodama. To je vidljivo kod Gram-negativnih bakterija koje nose *bla<sub>OXA</sub>* gen, koji ne utječe na fenotip rezistencije ako ne postoji hiperekspresija zbog insercijske sekvence ispred gena koja djeluje kao promotor i pojačava ekspresiju gena. (11)

## **2.2. CJELOGENOMSKO SEKVENCIONIRANJE**

### **2.2.1. DEFINICIJA CJELOGENOMSKOG SEKVENCIONIRANJA**

U zadnjih nekoliko godina pojavljuje se nova puno brža i točnija metoda detekcije antibiotske rezistencije cjelogenomsko sekvencioniranje (WGS) . (3) Cjelogenomsko sekvencioniranje je proces određivanja cijele ili gotovo cijele DNA sekvence genoma nekoga organizma odjednom. (12) Do nedavno korištenje WGS u klinici je bilo izazovno zbog skupoće i manjka točnih i pouzdanih pristupa. Ovo se mijenja u zadnje vrijeme zbog drastičnog povećanja efikasnosti DNA sekvencioniranja te istovremenog pada cijena sekvencioniranja i pojave robusnih kompjuterskih alata. (3)

### **2.2.2. SEKVENCIJSKE PLATFORME U WGS-U**

Kako bi dobili sekvencu cijeloga genoma prvo je potrebno sekvencionirati DNA. U WGS-u se koriste visoko sofisticirane platforme koje produciraju velike količine sekvencioniranih podataka. Danas najčešće korištene platforme za sekvencioniranje bakterijskih genoma su Illumina and Ion Torrent strojevi koji provode sekvenciranje nove generacije (NGS). Ovim strojevima je zajedničko da stvaraju kratke sekvence od 100 do 400 bp. (9) Takve su sekvence često i manje od AMR gena te ih je potrebno spojiti u duže sekvence i zatim u njima identificirati genetske varijacije koje dovode do određenog fenotipa rezistencije. (13, 14)



### **2.2.3. METODE SPAJANJA SEKVENCI U GENOM**

Radi detekcije gena rezistencije često je potrebno napraviti nacrt genoma. Postoje dva pristupa u spajanju dobivenih kratkih sekvenci DNA u genom. Prva metoda je *de novo* sastavljanje. U ovoj metodi se sekvence međusobno uspoređuju i zatim spajaju kako bi se dobila kontinuirana duža sekvenca. Druga metoda koristi referentni genom prema kojem se mapiraju i slažu dobivene kratke DNA sekvence u novi genom. (13)

### **2.2.4. BIOINFORMATIČKI PRISTUPI ZA DETEKCIJU GENA REZISTENCIJE U WGS-U**

Nakon cjelogenomskog sekvencioniranja potrebno je iz dobivenih podataka detektirati gene koji su odgovorni za rezistenciju. Postoje dva bioinformatička pristupa u koja se koriste u detekciji gena rezistencije. To su BLAST analiza i mapiranje individualnih sekvenci prema bazi podataka. (9) BLAST analiza je program koji dobiveni nacrt genoma bakterije uspoređuje prema parovima baza s određenom bazom podataka u kojoj se nalaze geni rezistencije. (14) S druge strane individualnim mapiranjem sekvenci prema bazi podataka s genima rezistencije nije potrebno stvarati nacrt genoma, ali je lakše moguća kontaminacija DNA koja dovodi do lažno pozitivnih rezultata.(9)

### **2.2.5. BIOINFORMATIČKI PROGRAMI DOSTUPNI ZA DETEKCIJU GENA REZISTENCIJE U WGS-U**

Trenutačno dostupni programi za detekciju AMR gena su: ARG-ANNOT, CARD, ResFinder, KmerResistance i SRST2. Svi ovi program se sastoje od alata za detekciju gena (najčešće BLAST analiza) i baza podataka koje sadrže gene rezistencije. Neki od ovih programa su dostupni online na internetu, a neke je potrebno instalirati na računalo te funkcioniraju bez internet pristupa. (9)

## **2.3. UPOTREBA WGS-A U KARAKTERIZACIJI MDRGN BAKTERIJA**

### **2.3.1. KORIŠTENJE WGS-A U DETEKCIJI REZISTENCIJE MDRGN BAKTERIJA**

Studije su već pokazale potencijal primjene WGS tehnika u predviđanju gena rezistencije kod gram pozitivnih bakterija i *Mycobacterium tuberculosis*. Predviđanje antibiotske rezistencije u gram-negativnih bakterija je izazovnije jer su mehanizmi rezistencije često složeniji od onih u gram pozitivnih bakterija. (15) Tako gram-negativne bakterije mogu sadržavati nekoliko  $\beta$ -laktamaza sličnih aminokiselinskih sekvenci, ali s različitim djelovanjem prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima. (18) Također gram-negativne bakterije su sklonije razvoju mutacija koje smanjuju permeabilnost membrane i povećavaju ekspresiju efluks pumpi. (19)

Nedavno istraživanje je pokazalo važnost WGS-a u identifikaciji rezistencije u MDRGN bakterija. Radi se o sekvencijskom istraživanju bakterije *E. coli*. Autori istraživanja su iskoristili WGS kako bi identificirali bakterijske izolate s multiplom rezistencijom na najčešće korištene antibiotike poput meropenema, ampicilina ceftrijaksona, gentamicina i ciprofloksacina. Na ovaj način su pacijenti dobili učinkovito liječenje. (16)

Unatoč svemu WGS će teško postati primarni dijagnostički alat u skorijoj budućnosti za detekciju antibiotske rezistencije. WGS je manje senzitivn od kultura ili PCR-a kada se koristi direktno na kliničkim uzorcima kao što je uzorak stolice. U takvom uzorku je vrlo teško odrediti kojem patogenu pripada rezistencija. (20) Smatra se da je WGS ipak koristan u određenim kliničkim scenarijima. WGS bi mogao biti koristan kada je klinički relevantno objasniti mehanizme rezistencije ili kada su klasične fenotipske metode prespore. (21)

### **2.3.2. KORIŠTENJE WGS-A U ISTRAŽIVANJU EVOLUCIJE ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE MDRGN BAKTERIJA**

WGS se osim za rekonstrukciju evolucije antibiotske rezistencije može koristiti i za istraživanje evolucije rezistencije u realnom vremenu pod određenim uvjetima. (21) Jedno takvo istraživanje su proveli Toprak i suradnici. (24) Istraživanje je proučavalo evoluciju antibiotske rezistencije kod gram-negativne bakterije *Escherichia coli*. Kako bi proučavali ovu evoluciju istražitelji su razvili selekcijski uređaj „morbidostat“ koji kontinuirano nadzire bakterijski rast i regulira koncentraciju antibiotika na načina da je populacija *Escherichiae coli* stalno pod pritiskom. Analizirali su rezistenciju na kloramfenikol, doksiciklin i trimetoprim. Nakon 20 dana razina rezistencije se dramatično povećala. Korištenjem WGS-a u analizi evoluiranih sojeva identificirane su mutacije specifične za rezistenciju na određen antibiotik i rezistenciju na više antibiotika. Kloramfenikolska i doksiciliknska rezistencija je evoluirala nesmetano različitim kombinacijama mutacija u genima uključenim u translaciju, transkripciju i transport. S druge strane trimetoprimska rezistencija je evoluirala na postepen način kroz mutacije ograničene na gen koji kodira enzim dihidrofolat reduktaza (DHFR). (24)

### 2.3.3. WGS KAO ALAT U NADZIRANJU EPIDEMIJA UZROKOVANIH MDRGN BAKTERIJAMA

WGS se pokazao kao vrlo koristan alat u nadziranju epidemija pa tako i onih uzrokovanih MDRGN bakterijama. (21) WGS-om je tako pokazana važnost međunarodnog širenja antibiotske rezistencije. Primjer je Liverpoolski soj *P. aeruginosa* za koji je WGS-om dokazano da se širio između klinika za cističnu fibrozu u Ujedinjenom Kraljevstvu i Sjevernoj Americi. (22)

Sve prisutnija primjena WGS-a je pobliže objasnila povezanost infekcija ljudi i životinja. U 90-ima je bila svjetska epidemija multirezistentne *Salmonella typhimurium* DT104. Suprotno dosadašnjim mišljenjima u Škotskoj se korištenjem WGS-a pokazalo da ljudske infekcije nisu primarno nastale transmisijom s lokalnih životinja. Ljudske i životinjske populacije *S. Typhimurium* DT104 u Škotskoj su bile vrlo različite što nam govori da je postojao drugi izvor infekcije, kao npr. uvezana hrana. (23)

U Danskoj je provedeno WGS bazirano nadziranje nad infekcijama uzrokovanim *E. coli* koja je otporna na treću generaciju cefalosporina. Zaključeno je da kontinuirano nacionalno nadziranje ovog soja *E. coli* (3GC-R Ec) WGS-om u kombinaciji s epidemiološkim informacijama može poboljšati praćenje populacijske dinamike soja te tako omogućiti detekciju izbijanja novih epidemija i efekte različitih režima liječenja na ova bakterijski soj. (25)

#### **2.3.4. KORIŠTENJE WGS-A RADI USPOSTAVA MJERA KONTROLE ŠIRENJA INFEKCIJA U KLINCI**

WGS se pokazao iznimno korisnim alatom za rano otkrivanje širenja infekcija u bolnicama te uspostavu mjera kontrole njihova širenja. (21) Tako je WGS analizom uzoraka karbapenem rezistentnih enterobakterija otkrivena infekcija istim sojem kod 4 pacijenta u 2 bolnice u Wisconsinu. Iako točan mehanizam transmisije nije bio otkriven došlo je do revidiranja mjera sprječavanja infekcija, epidemiološke istrage i edukacije zaposlenika što je spriječilo širenje karbapenem rezistentnog soja enterobakterija u ovim bolnicama. (26)

Jedno istraživanje provedeno na pacijentima inficiranim izolatima *P. aeruginosa* na odjelu intenzivne njege u Ujedinjenom Kraljevstvu koristeći WGS tehnologiju je otkrilo izvor infekcije. Analizom biofilma termostatskog ventila kroz koji prolazi voda su pronađeni isti sojevi *P.aeruginosa* koji su inficirali pacijente te je stoga zaključeno da je ovo izvor infekcije u bolnici. Na ovaj način se omogućilo sprječavanje daljnjeg širenja infekcije u ovoj bolnici. (27)

### 3. ZAKLJUČAK

WGS se pokazao kao vrlo koristan alat u karakterizaciji MDRGN bakterija i neprocjenjivo važno sredstvo u borbi protiv antibiotske rezistencije. (21).

WGS se može koristiti u otkrivanju osjetljivosti MDRGN bakterija na antibiotike (16). Iako je ova vrsta uporabe WGS-a obećavajuća još uvijek nije u stanju zamijeniti druge načine otkrivanja rezistencije ponajprije zbog smanjene senzitivnosti prilikom primjene na direktnim kliničkim uzorcima. (21) S druge strane WGS-om se može pobliže istražiti i opisati evolucija antibiotske rezistencije u MDRGN bakterija. (24)

Ipak WGS se pokazao najkorisnijim u uspostavi mjera kontrola širenja infekcija i praćenju epidemija unutar bolnice ali i izvan nje. (21) WGS omogućuje otkrivanje izvora infekcije unutar bolnice te time prilagodbu mjera sprječavanja širenja infekcije. (27) Na većoj razini WGS-om možemo otkriti međunarodno širenje infekcija istim sojevima MDRGN bakterija. (22).

U zadnje vrijeme se WGS kombinira sa strojnim učenjem što omogućuje pronalazak novih gena rezistencije. WGS bi u kombinaciji sa strojnim učenjem mogao omogućiti bržu identifikaciju gena rezistencije kod MDRGN bakterija te zaustaviti nastajanje potencijalnih epidemija. Također postoje naznake da bi se mogao koristiti kao alat za razvoj novih antibiotika što bi zasigurno pomoglo u borbi protiv MDRGN bakterija. Korištenje WGS-a je donedavno bilo vrlo zahtjevno zbog skupoće i manjka točnih i pouzdanih pristupa. Ovo se unazad nekoliko godina počelo mijenjati zbog velikog povećanja efikasnosti DNA sekvencioniranja, pada cijena sekvencioniranja i pojave robusnih računalnih alata. (3)

## **4. ZAHVALA**

Ovom prilikom želim zahvaliti prof. dr. sc. Branki Bedenić na pomoći u pisanju diplomskog rada.

Veliko hvala i kolegama, prijateljima i obitelji na podršci.



## 5. LITERATURA

1. Oliveira, J., & Reygaert, W. C. (2021). Gram Negative Bacteria. In StatPearls. StatPearls Publishing.
2. Cerceo, E. et al. (2016). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 22(5), 412–431.
3. Gurwitz D. (2019). Whole-genome sequencing for combatting antibiotic resistance. *Drug development research*, 80(1), 3–5.
4. Ho, J., Tambyah, P. A., & Paterson, D. L. (2010). Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Current opinion in infectious diseases*, 23(6), 546–553.
5. Giuliano, C., Patel, C. R., & Kale-Pradhan, P. B. (2019). A Guide to Bacterial Culture Identification And Results Interpretation. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 44(4), 192–200.
6. van Belkum, A. et al. Working Group on Antimicrobial Resistance and Rapid Diagnostic Testing (2019). Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nature reviews. Microbiology*, 17(1), 51–62.
7. antibiogram. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 27. 7. 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=2>
8. Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755.

9. Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiology spectrum*, 5(6), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017.
10. Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 303(6-7), 287–292.
11. Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1597–1606.
12. "Definition of whole-genome sequencing - NCI Dictionary of Cancer Terms". National Cancer Institute. 2012-07-20. pristupljeno 27.7.2021.
13. Ng, P. C., & Kirkness, E. F. (2010). Whole genome sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 628, 215–226.
14. Ellington, M. J. et al. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(1), 2–22.
15. Van Camp, P. J., Haslam, D. B., & Porollo, A. (2020). Prediction of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria From Whole-Genome Sequencing Data. *Frontiers in microbiology*, 11, 1013.
16. Jeong, S. et al. (2018). Extensively Drug-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 1642 Carrying an IncX3 Plasmid

17. Containing the blaKPC-2 Gene Associated with Transposon Tn4401a. *Annals of laboratory medicine*, 38(1), 17–22.
18. Livermore D. M. (1998). Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41 Suppl D, 25–41.
19. Marston, H. D. et al. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*, 316(11), 1193–1204.
20. Loman, N. J. et al. (2013). A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA*, 309(14), 1502–1510.
21. Köser, C. U., Ellington, M. J., & Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in genetics : TIG*, 30(9), 401–407
22. Dettman, J. R. et al. (2013). Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52), 21065–21070.
23. Mather, A. E. et al. (2013). Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT104 in different hosts. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6153), 1514–1517.
24. Toprak, E. et al. (2011). Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature genetics*, 44(1),
25. Roer, L. et al.(2017). WGS-based surveillance of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Denmark. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(7), 1922–1929.

26. Elbadawi, L. I. et al. (2016). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Transmission in Health Care Facilities - Wisconsin, February-May 2015. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 65(34), 906–909.
27. Quick, J. et al. (2014). Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. BMJ open, 4(11), e006278.
28. Bedenić, B., Sardelić, S., i Ladavac, M. (2015). multirezistentne bakterije, Acta medica Croatica, 69(3), str. 211-215.
29. Kalenić, S. et al. (2019) Medicinska mikrobiologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2.izd.

## 6. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI :

Ime i prezime: Lucija Pešorda  
Datum rođenja: 04.10.1996.  
Mjesto rođenja: Zagreb

### OBRAZOVANJE:

2015.-2021. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
2011.-2015. VIII. Gimnazija, Zagreb  
2003.-2011. Osnovna škola Ivana Filipovića, Zagreb

### OSTALO:

Aktivno se služim engleskim jezikom na razini C1 te talijanskim jezikom na razini A2.

Završila sam osnovnu glazbena školu i osnovnu baletnu školu te svira klavir. Za vrijeme studiranja sudjelovala sam na međunarodnom natjecanju iz fiziologije IMSPQ-2019, te na

međunarodnom natjecanju iz medicinske mikrobiologije, parazitologije i imunologije

SIMPICSED.