

Identifikacija mikroorganizama iz urina genomskom i proteomskom analizom

Čepnja, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:546208>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Čepnja

**IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA
IZ URINA GENOMSKOM I
PROTEOMSKOM ANALIZOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marina Čepnja

**IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA
IZ URINA GENOMSKOM I
PROTEOMSKOM ANALIZOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Jasenka Škrlin-Šubić

prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Marina Čepnja

**IDENTIFICATION OF URINE
MICROORGANISMS BY GENOMIC AND
PROTEOMIC ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Associate Professor Jasenka Škrlin-Šubić, PhD

Professor Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2021

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u sklopu projekata HRZZ O-192-2013 „Klinička proteomika mikroorganizama“ i HRZZ IP-2016-06-3509 „MicroEquilibrium“ voditelja izv. prof. dr.sc. Antonia Starčevića.

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, Laboratoriju za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za proteomiku, Instituta Ruđer Bošković, a u sklopu poslijediplomskoga sveučilišnog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Posebno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Antoniju Starčeviću na nesebičnoj pomoći, podršci i izvrsnoj suradnji na projektima „Klinička proteomika mikroorganizama“ i „MicroEquilibrium“.

Želim izraziti veliku zahvalnost svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Jasenki Škrlin-Šubić i prof. dr. sc. Karmeli Barišić na usmjeravanju u znanstveno-istraživačkom radu, poticanju, podršci i svim korisnim savjetima tijekom izrade doktorskoga rada.

Hvala Andrei i Emi na pomoći.

Zahvaljujem dr. sc. Mariju Cindriću i svom osoblju Zavoda za proteomiku Instituta Ruđer Bošković na stručnim savjetima i pomoći.

Veliko hvala Damiru Orosu na usmjeravanju, susretljivosti i strpljenju.

Hvala Marku koji je imao viziju ove suradnje.

Hvala Jerku na tehničkoj podršci.

Hvala mojoj učiteljici Mariji Pandži koja je u mene utkala ljubav prema biologiji i kemiji i koja me je usmjerila na put biokemije.

Posebna zahvala Hrvoju koji je najviše svakodnevno pomagao da ovaj doktorski rad bude završen i mojim curama; Tari i Riti bez kojih bi ovaj put bio mnogo lakši i besmisleniji. Hvala mojoj sestri i roditeljima, naročito mami, koja je taman dovoljno sumnjala u realizaciju ovoga doktorata da potakne njegov završetak. Hvala vam na velikoj ljubavi i razumijevanju.

.

SAŽETAK

Infekcije mokraćnoga sustava (IMS) jedne su od najčešćih bakterijskih infekcija, posebice u žena. U identifikaciji mikroorganizama koji su njihovi uzročnici najčešće se koriste klasične medicinsko-mikrobiološke metode. One obuhvaćaju postupke uzgoja mikroorganizama, njihovu identifikaciju i testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove. Glavni nedostatak tih metoda jest vrijeme potrebno za sve navedene postupke, stoga se u kliničkoj praksi najčešće započinje s antibiotskom terapijom širokoga spektra, a tek se naknadno terapija mijenja u specifičnu antimikrobnu terapiju, ako je prema mikrobiološkoj analizi indicirana. Upravo iz tih razloga kontinuirano se istražuju mogućnosti brzih i učinkovitijih postupaka za određivanje broja i vrste mikroorganizama te njihove osjetljivosti na antibiotike, u slučaju bakterijskih infekcija. U ovom doktorskom radu istraživane su mogućnosti uporabe masene spektrometrije (MS) i sekvenciranja gena za 16S rRNA u svrhu identifikacije bakterija iz mokraće. Za identifikaciju mikroorganizama izoliranih iz mokraće pacijenata sa simptomima cistitisa, kao kontrola koristila se klasična mikrobiološka dijagnostika uzgoja na hranjivim podlogama nakon koje se na istim uzorcima provodila analiza mikrobioma i metaproteoma. Analiza mikrobioma obuhvaćala je identifikaciju gena za 16S rRNA specifične za vrstu i genus, dok se analizom metaproteoma provedenoga na MALDI-TOF MS/MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight tandem Mass Spectrometry*) pokušala postići rezolucija na nivou soja. MALDI-TOF MS/MS je tandemna masena spektrometrija kod koje se ionizacija makromolekula postiže laserskom desorpcijom i ionizacijom pomognutom matricom (MALDI), a za identifikaciju makromolekula koristi se analizator vremena leta (TOF). Uz pomoć spektrometrije masa generirani su karakteristični spektri te potom i karakteristični profili peptida („otisak prsta“) za mikroorganizme, koji se nalaze u mokraći. Pretpostavlja se da iako srodni mikroorganizmi mogu dijeliti pojedinačno iste proteine, svaki mikroorganizam ima više od jedne kombinacije peptida koja ga jednoznačno određuje, što vrijedi i u slučaju vrlo srodnih sojeva.

U svrhu ovog istraživanja prikupljen je reprezentativan uzorak čija je razdioba uzročnika IMS-a uzoraka s $>10^5$ CFU/ml slijedila prethodno objavljene literaturne podatke. Postotak sterilnih urinokultura (UK) bio je značajno niži od literaturnih podataka, što pripisujemo profilu pacijenata tercijarne zdravstvene zaštite. Proces identifikacije mikroorganizama iz uzorka native mokraće, MALDI-TOF metodom, značajno je ovisio o predanalitičkim i analitičkim procesima poput uvjeta skladištenja uzoraka, te optimizaciji

postupaka liziranja bakterija, izolacije bakterijske biomase, kao i pročišćavanja, frakcioniranja i digestiji izoliranih proteina.

Metaproteomska identifikacija uropatogena značajno se razlikovala od identifikacije na klinički dostupnim uređajima poput Biotyper-a i Vitek-a, koji koriste isključivo „otisak prsta“ pojedinoga uzročnika pohranjenih u spektralnim bazama podataka. Za razliku od takvoga pristupa u ovom istraživanju korišteni su podaci o peptidima iz MS/MS obrade spektara, koji su prikupljeni pretraživanjem Mascot proteinske baze podataka, na temelju kategorizacije uropatogenih rodova koja je nastala tijekom izrade ovoga doktorskog rada.

Ovakva, izravna proteomska identifikacija koja stvara poveznicu s identificiranim monobakterijskim uzročnikom metodom standardne urinokulture (SUK-a), pružila je pouzdanu identifikaciju za rod *Klebsiella* (3 uzorka), *Proteus* (4 uzorka), *Enterococcus* (2 uzorka), *Enterobacter* (1 uzorak) i *Citrobacter* (1 uzorak). Sveukupno, 87 % uzoraka kod kojih je pomoću SUK-a identificirana monobakterijska infekcija, analizirano je ovim jednostavnim proteomskim pristupom i svi su pokazali dobru korelaciju s objavljenim rezultatima. Usprkos obećavajućim rezultatima, identifikacija uropatogena pomoću MALDI-TOF/TOF platforme tijekom istraživanja pokazala je i neke slabosti. MALDI-TOF MS identifikacija polimikrobnih kultura, izravno iz uzoraka mokraće nije dala pouzdane/podudarne rezultate u komparaciji sa SUK-om. Kako bi se procijenio pravi razmjer poklapanja SUK-a i metaproteomske metode bazirane na MS-u, u rad je uvedena i treća metoda bazirana na genomici. Sekvenciranjem gena za 16S rRNA postiže se taksonomska kategorizacija uropatogena do razine roda (44 %) i porodice (56 %), dok identifikacija na razini vrsta uglavnom nije postignuta. Usporedba rezultata SUK-a i ove metode bila je podudarna u 89 % uzoraka. Uočeno je da genomska analiza 16S rRNA nije bila informativna na razini roda i/ili vrste za porodicu *Enterobacteriaceae*, što joj je i glavna slabost. Nadalje, praćenjem urinarne mikrobiote pacijenata sa simptomima cistitisa te longitudinalnim praćenjem dinamike mokraćne mikrobiote za vrijeme primjene antibiotske terapije propisane prema analizi osjetljivosti, ispitan je utjecaj uobičajeno propisane terapije na dinamiku mokraćne mikrobiote. Zaključeno je da su simptomi cistitisa uvelike povezani s disbiozom mikrobiote urinarnoga trakta. Uz značajno i očekivano povećanje uropatogena koji uzrokuju uroinfekciju, zapaženo je i značajno smanjenje potencijalno korisnih bakterijskih rodova.

Odjeljak bakterija *Actinobacteria* potencijalno uključuje nekoliko vrlo korisnih predstavnika zdrave urinarne mikrobiote. Praćenjem mikrobioma pacijentice pod antimikrobnom terapijom opažene su brze i dinamične promjene sastava urinarne mikrobiote

koje naglašavaju potrebu revidiranja trenutnih smjernica u pogledu vremenskoga trajanja primjene antibiotske terapije.

Ključne riječi: standardna urinokultura (SUK), identifikacija mikroorganizama, MALDI-TOF, MS/MS, profil peptida (otisak prsta), sekvenciranje gena za 16S rRNA

SUMMARY

Background: Urinary tract infections are one of the most common bacterial infections, especially in women. Classic medical-microbiological methods are most commonly used in identification of microorganisms. They include the methods of cultivation of microorganisms, their identification and antimicrobial susceptibility testing. The main disadvantage of these methods is time required for all aforementioned procedures. Therefore, the usual clinical practice is to start wide spectrum antibiotic therapy, and then subsequently deescalate into specific antimicrobial therapy. Time and cost-effectiveness are the main incentives to continuously explore new, faster and more sensitive and specific procedures for evaluation of number and types of microorganisms and their susceptibility to antibiotics, if it is a bacterial infection. The dissertation explores and evaluates the possible uses of Mass Spectrometry (MS) and 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequencing for clinical purposes, in particular for the purposes of identification of microorganisms from urine. Genome and proteome analyses are used for identification of microorganisms from the patients' urine. Genome analysis includes the identification of 16S rRNA genes specific for the type and strain. Proteome analysis is carried out by MALDI-TOF MS, the MS in which the ionization of macromolecules is achieved by a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), and the Time Of Flight (TOF) is used for the identification of macromolecules. Mass spectrometry generates typical spectra and profiles of peptides („fingerprint“) for each microorganism. Each species of microorganism have more than one combination of peptides by which it is unambiguously defined. Even in the case of closely related strains, which share most of the peptides, there are unique combinations of peptides for a particular microorganism. Specifically developed computer program and algorithm are used for the analysis of spectra and the profiles of peptides. These specific program and algorithm find and compare unique combinations of peptides with those of microorganisms from an adequate and accessible database.

Aim: The main goal of the study was to design and test the MS method for a rapid and reliable identification of uropatogens which are present in concentration of $>10^5$ CFU/ml in urine samples, proven by Standard Urine culture method (SUC) method, and to compare it with the results of genomic analysis of urine microorganisms. Also, the aim of this study was to monitor changes in the composition of the urinary microbiota caused by cystitis and the dynamics of their change due to antibiotic therapy.

Participants and methods: As a part of the entire study, 444 samples were collected, of which 40 cultures and 404 urine samples arrived at the Department of Clinical Microbiology and Hospital Infection, University Hospital Dubrava, Zagreb, Croatia with a referral for urine culture. The sample was representative, which mean that distribution of the causative agent of UTI in samples with $>10^5$ CFU/ml followed previously published literature data. The percentage of sterile urine culture was significantly lower than the reference data, which we attribute to the profile of tertiary patients.

Results: The process of identification of microorganisms from a native urine sample, MALDI-TOF method, significantly depended on pre-analytical and analytical processes such as sample storage conditions, and optimization of bacterial lysis, bacterial biomass isolation, and purification, fractionation and digestion of isolated proteins. Metaproteomic identification of uropathogens differed significantly from identification on clinically available devices such as Biotyper and Vitek, which use only the “fingerprint” of a single pathogen stored in spectral databases. In contrast to this approach, data on peptides from MS/MS spectrum processing were used in this study, which were collected by searching the Mascot protein database, based on the categorization of uropathogenic genera that emerged during the preparation of this doctoral thesis. This direct proteomic identification, compared to SUC results, provided reliable identification for the genus *Klebsiella* (3 samples), *Proteus* (4 samples), *Enterococcus* (2 samples), *Enterobacter* (1 sample) and *Citrobacter* (1 sample). Overall, 87 % of the samples in which monobacterial infection was identified by SUC were analyzed by this simple proteomic approach and all showed a good correlation with SUC results. Despite promising results, the identification of uropathogens using the MALDI-TOF/TOF platform during the study also showed some weaknesses. As previously reported by other authors, MALDI-TOF MS identification of polymicrobial cultures, directly from urine samples did not give reliable/matching results compared to SUC.

In order to estimate the true match ratio between SUC and the MS-based metaproteomic method, a third, genomics-based method, was introduced. By sequencing the 16S rRNA gene, it was achieved taxonomic categorization of uropathogens to the level of genus (44 %) and family (56 %), while identification at the species level was generally not achieved. Comparison of the results of the SUC and this method was consistent in 89 % of the samples. It was observed that the genomic analysis of 16S rRNA was not informative at the genus and/or species level for the family *Enterobacteriaceae*, which is its main weakness. Furthermore, by monitoring the urinary microbiota of patients with symptoms of cystitis and longitudinal monitoring of the

dynamics of the urinary microbiota during the application of antibiotic therapy prescribed by sensitivity analysis, we examined the impact of commonly prescribed therapy on the dynamics of the urinary microbiota. We concluded that the symptoms of cystitis are largely related to dysbiosis of the urinary tract microbiota. In addition to a significant and expected increase in uropathogens that cause urinary tract infections, we also observed a significant decrease in potentially beneficial bacterial genera.

Conclusions: Storage time and temperature significantly influenced the results of protein isolation and the outcome of proteomic identification of uropathogens. Optimization of the process of purification and isolation of proteins from urine samples is a key step in the identification of uropathogens by the MALDI-TOF proteomic method. MALDI-TOF MS bacterial protein identification accurately identifies monomicrobial cultures at the genus level, whereas in polymicrobial cultures it still does not give reliable results. The standardization of the mass spectrum reading process significantly facilitates the process of identification and interpretation of the obtained results. Tandem MS monitors growing databases, which by processing data through a wide range of bioinformatics tools represents a potential that could enable polymicrobial identification in the future. Antibiotic therapy has a strong influence on the dynamics of changes in the composition of the urinary microbiota, and the duration of therapy is an extremely important therapeutic parameter as well as the initial choice of antimicrobial drug. By monitoring the microbiome of a patient under antimicrobial therapy, we observed rapid and dynamic changes in the composition of the urinary microbiota, which emphasizes the need to revise the current guidelines regarding the duration of antibiotic therapy.

Key words: standard urine culture, identification of microorganisms, MALDI-TOF, MS/MS, peptide profile (fingerprint), 16S rRNA sequencing

SADRŽAJ:

.....	1
1. UVOD	1
1.1. Infekcije mokraćnoga sustava	2
1.1.1. Etiologija urinarnih infekcija	3
1.1.2. Patogeneza urinarnih infekcija	4
1.1.3. Antimikrobno liječenje urinarnih infekcija	5
1.1.4. Izmjena uvriježenoga pogleda na infekcije urinarnoga trakta	7
1.2. Dijagnostika urinarnih infekcija	9
1.2.1. Standardna laboratorijska dijagnostika uroinfekcija	9
1.2.2. Novi dijagnostički pristupi u identifikaciji uropatogena	12
1.3. MALDI-TOF/TOF i sekvenciranje gena za 16S rRNA u identifikaciji mikroorganizama mokraće	16
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. Materijali	22
3.2. Kemikalije i oprema	23
3.2.1. Otopine	23
3.2.2. Hranjive podloge	24
3.2.3. Pribor	24
3.2.4. Tehnička oprema	24
3.2.5. Priprema otopina	25
3.2.6. Programi za upravljanje i obradu podataka	27
3.3. Mjerni postupci	28
3.3.1. Mikrobiološka analiza	28
3.3.2. Test antimikrobne osjetljivosti	28
3.3.3. Analiza fizikalno kemijskog pregleda mokraće	28

3.3.4. Proteomska identifikacija uzročnika mokraćnih infekcija pretragom baze podataka	29
3.3.5. Proteomska identifikacija uzročnika mokraćnih infekcija <i>de novo</i> sekvenciranjem peptida	32
3.3.6. Ekstrakcija DNA iz bakterijske biomase	37
3.3.7. Određivanje koncentracije DNA	37
3.3.8. Sekvenciranje gena za 16S rRNA	38
3.3.9. Analiza podataka dobivenih DNA sekvenciranjem- QIIME	40
3.3.10. Statistički model BEEM	42
4. REZULTATI	44
4.1. Razdioba etioloških čimbenika uroloških infekcija	45
4.2. Standardna mikrobiološka analiza uzoraka mokraće/urinokultura	48
4.3. Fizikalno-kemijski pregled mokraće	51
4.4. Klasifikacija najčešćih rezistencija uropatogena	52
4.5. Priprema uzoraka mokraće za proteomsku analizu	54
4.5.1. Utjecaj skladištenja i temperature na uzorke	54
4.5.2. Izdvajanje bakterijske biomase	57
4.5.3. Frakcioniranje peptida	57
4.6. Ispitivanje osjetljivosti metode	59
4.7. Proteomska identifikacija bakterija i Mascot analiza podataka	59
4.8. Identifikacija mokraćnih infekcija <i>de novo</i> sekveniranjem peptida	82
4.9. Sekvenciranje gena za 16S rRNA u identifikaciji uropatogena i mokraćnoga mikrobioma	86
4.9.1. Izolacija DNA	87
4.9.2. Usporedba metode sekvenciranja gena za 16S rRNA sa identifikacijom uropatogena SUK-om	89
4.9.3. Dinamika urinarne mikrobiote u pacijenata s urinarnom infekcijom	95
4.10. Usporedba metoda identifikacije mikroorganizama	98

4.11. Praćenje dinamike promjene urinarne mikrobiote djelovanjem antibiotika metodom sekvenciranja gena za 16S rRNA	98
4.11.1. Određivanje taksonomije	99
4.11.2. Mikrobiota mokraće pod utjecajem antibiotske terapije.....	100
5. RASPRAVA	111
5.1. Razdioba uzoraka.....	112
5.2. Fizikalno-kemijski pregled mokraće.....	113
5.3. Antimikrobna osjetljivost.....	113
5.4. Proteomska identifikacija uropatogena.....	114
5.4.1. Utjecaj skladištenja i temperature	114
5.4.2. Frakcioniranje i pročišćavanje peptida	115
5.4.3. Proteomska identifikacija uropatogena.....	116
5.4.4. Mascot program koji se koristi za analizu MS i MS/MS spektralnih podataka...	117
5.5. Urinarna mikrobiota u pacijenata s bakteriurijom	118
5.6. Praćenje dinamike urinarne mikrobite uz antibiotsku terapiju	119
5.7. Usporedba osjetljivosti ispitanih metoda	120
5.8. Usporedba ispitanih metoda.....	122
5.9. Standardizacija MS/MS proteomske metode u identifikaciji uropatogena.....	124
6. ZAKLJUČCI.....	125
7. LITERATURA	127
8. POPIS KRATICA.....	142
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	146

1. UVOD

1.1. Infekcije mokraćnoga sustava

Infekcije mokraćnoga sustava (IMS) jedne su od najčešćih bakterijskih infekcija, naročito u žena (1) te se ubrajaju u najčešća stanja koja zahtijevaju medicinsko liječenje. Navedene infekcije drugi su najčešći uzrok propisivanja antimikrobnih lijekova u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, što značajno pridonosi razvoju antimikrobne rezistencije (2). Uobičajena paradigma cistitisa do nedavno je bila bakterijska kontaminacija mokraćnog mjehura. Projekt *Human Microbiome* nije uključivao mikrobiom urinarnoga trakta jer se prije desetak godina smatrao sterilnim u zdrave populacije. Međutim otkrićem mikrobiote mokraćnoga mjehura otvorena su vrata novim spoznajama i istraživanjima (3). Danas se smatra da promjene u ravnoteži zdrave mikrobiote mokraćnoga mjehura utječu na razvoj urinarnih infekcija (4). Infekcije mokraćnoga sustava pogađaju preko 250 milijuna ljudi širom svijeta svake godine (5). Neadekvatan imunosni odgovor koji nije u mogućnosti spriječiti prodor patogena prema gornjem urinarnom traktu (ureteri, bubrezi) rezultira težim infekcijama kao što su pijelonefritis i urosepsa. Određena medicinska stanja, poput ozljeda leđne moždine i anatomske nepravilnosti u građi mokraćnoga sustava, mogu zahtijevati upotrebu urinarnoga katetera koji omogućava pražnjenje mjehura. Međutim, tada je kod kateteriziranih bolesnika rizik za kolonizacijom bakterijama, a time i IMS mnogo veći (6). Kod pacijenta koji razviju simptomatski IMS najčešće se, prema važećim preporukama, uključuje antimikrobna terapija (7). Ponekad su antimikrobne terapije neophodne, međutim, opetovani i dugotrajni tretmani mogu rezultirati promjenom normalne mikrobiote rodnice, urinarnoga i gastrointestinalnoga trakta te razvojem rezistentih mikroorganizama. Većina antimikrobne terapije nije selektivna te djelovanjem i na prirodnu mikrobiotu oslobađa niše koje mogu biti kolonizirane rezistentnim uropatogenima. Danas, kad se upotreba antimikrobne terapije raci onalizira, te se sve više inzistira na njenoj opravdanoj uporabi zbog prevenciji razvoja rezistentnih bakterijskih sojeva, postoji povećana potreba za proučavanjem alternativnih tretmana. Promjena paradigme polako mijenja i pristup u liječenju uroinfekcija (6, 8, 9).

1.1.1. Etiologija urinarnih infekcija

Na etiologiju IMS-a utjecaj ima zdravstveno stanje domaćina o kojem ovisi nastanak komplikacija same infekcije. IMS se dijele na simptomatske, asimptomatske, akutne (prve ili pojedinačne), rekurentne, kronične, komplicirane i nekomplicirane (10, 11). Najčešće IMS su bakterijske infekcije koje mogu zahvatiti donji dio (cistitis, prostatitis) ili gornji dio (pijelonefritis, bubrežni apsces, perinefritički apsces) mokraćnoga sustava. Razlučivanje kompliciranih od nekompliciranih IMS-a najčešće se temelji na prisutnosti strukturnih ili funkcijskih abnormalnosti mokraćnoga sustava koje povećavaju rizik od neuspjeha liječenja te razvoja teških komplikacija (10). Čimbenici koji povećavaju taj rizik jesu strana tijela, kamenci, opstrukcija, neurogeni mjehur, transplantacija bubrega, imunosupresija i trudnoća. Također, nepovoljnim komorbiditetima smatraju se dijabetes, imunokompromitiranost, ozljede leđne moždine ili kateterizacija (10). Komplicirane IMS imaju značajno različitu etiologiju od nekompliciranih IMS te mikroorganizmi koji rijetko uzrokuju bolest kod zdravih pacijenata mogu izazvati značajnu bolest kod domaćina s anatomskim, metaboličkim ili imunološkim bolestima u podlozi. Većina se simptomatskih IMS-a pojavljuje u starijoj ženskoj populaciji kod koje je najčešće identificiran uzročnik *Escherichia coli*. Međutim i gram-pozitivni mikroorganizmi česti su uzročnici urinarnih infekcija, dok se u trećine infekcija osoba starije dobi radi o polimikrobnim infekcijama (12).

Različite studije navode slične prevalencije uropatogena, međutim sve su suglasne da je najčešći uzročnik nekompliciranih kao i kompliciranih IMS-a uropatogena *E. coli* (UPEC) (čak do 80 %), (13). Uz minimalne razlike u poretku uropatogena među studijama, kod nekompliciranih IMS-a, nakon UPEC-a po prevalenciji slijede *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, beta hemolitički streptokok grupe B (BHSB), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Candida* spp. Kod kompliciranih IMS-a iza UPEC-a kao također najčešćeg uzročnika slijede *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* i BHSB.

Prema radu Vojvodić i Šebeđak (14) prevalencija nekompliciranoga cistitisa u Hrvatskoj je između 2005. i 2014. godine iznosila 38,2/1000 i 49,7/1000 svih urinarnih infekcija. Profesorica Škerk i sur. (11) su kroz period od dva mjeseca u 2006. godini proveli studiju diljem Hrvatske (20 uključenih gradova) s ukupno 3188 epizoda IMS-a (802 muškaraca; 2386 žena). Najčešće IMS u žena bile su: akutni nekomplicirani cistitis (62 %), komplicirane IMS-a kao što su cistitis i pijelonefritis (14 %), uretritis (9 %), akutni nekomplicirani pijelonefritis

(6 %), rekurentni cistitis (5 %), asimptomatska bakteriurija (3 %) i rekurentni pijelonefritis. Najčešće IMS u muškaraca bile su komplicirane IMS kao cistitis i pijelonefritis (48 %), uretritis (25 %), prostatitis (24 %) i asimptomatska bakteriurija (3 %). Etiološka dijagnoza postavljena je u 999 (31 %) epizoda IMS-a prije započete antimikrobne terapije, dok su najčešće izolirani uzročnici bili *E. coli* (77 %), *E. faecalis* (9 %), *P. mirabilis* (5 %), *Klebsiella* spp. (3 %), *Streptococcus agalactiae* (3 %) i *Enterobacter* spp. (1 %) (15).

Bakterijska etiologija obično se može utvrditi u većini urinarnih infekcija pa su i najčešći bakterijski uzročnici dobro definirani u različitim skupinama pacijenata, iako je koji puta etiologija nejasna (16).

1.1.2. Patogeneza urinarnih infekcija

Specifični čimbenici virulencije uropatogenih mikroorganizama nalaze se na njihovoj vanjskoj membrani te su odgovorni za bakterijsku otpornost na uobičajene obrambene mehanizme domaćina. Adhezivna svojstva bakterija čine ključna svojstva u patogenezi uroinfekcija, te se smatra da su adhezivnije bakterije i patogenije, dok one koje izazivaju asimptomatsku bakteriuriju imaju značajno slabija adhezivna svojstva (17). Ključni događaj patogeneze svake urinarne infekcije je prijanjanje patogena (adheriranje). Obično IMS započinje s periuretralnom kontaminacijom uropatogenima iz crijeva, nakon čega slijedi kolonizacija uretre i naknadna migracija patogena u mjehur uz pomoć dodatnih mehanizma kao što su flagele i pili. Složena interakcija imunosnoga odgovora domaćina i mehanizama patogena uzročnika, u konačnici, određuju hoće li uropatogeni biti uspješni u kolonizaciji mokraćnoga mjehura ili će biti eliminirani. Brojni bakterijski adhezini vezuju se na receptore epitela mokraćnoga mjehura (uroepitela) i posreduju kolonizaciju. Uropatogeni poput UPEC-a opstaju napadajući epitel mokraćnoga mjehura, sintetiziranjem toksina i proteaze kojima za sebe oslobađaju hranjive tvari iz stanica domaćina, te sintezom siderofora u svrhu osiguravanja željeza (6).

Učestalost IMS-a značajno se povećava tijekom adolescencije i kod mladih žena, u odnosu na učestalost u djece. Osim toga, epidemiološke su studije pokazale da 15 % do 20 % žena u dobi od 65-70 godina ima bakteriuriju, u usporedbi s 20 % do 50 % žena starijih od 80 godina. Unatoč visokoj učestalosti bakteriurije u žena u postmenopauzi, većina istraživanja IMS-a provedena je u skupinama mlađih žena kod kojih su najčešće utvrđeni rizični faktori poput učestalih vaginalnih odnosa, upotrebe spermicida, dijafragme ili kondoma, te prethodne

anamneze IMS-a (18). Procjena incidencije urinarnih infekcija kod mladih muškaraca u istoj dobi svodi se na manje od 5-8 infekcija na 10 000 muškaraca. Također, oko 10 % bolesnika s kratkotrajnom kateterizacijom razvijaju IMS (19). IMS-a mogu biti uzrokovane i gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama, kao i nekim gljivama. Uropatogeni koji uzrokuju nekomplikirane IMS, kao npr. UPEC, *K. pneumoniae* i *S. saprophyticus*, imaju sposobnost izravnoga vezivanja na površinske epitelne stanice mjehura, intermitentne stanice i bazične stanice (20). UPEC i *K. pneumoniae* vežu se na uroplakin. Uroplakin je glavni protein apikalne membrane površinske stanice i s njom tvori kristaličnu zonu koja štiti mokraćni mjehur sisavaca od utjecaja štetnih tvari iz mokraće. Uz uroplakin i $\alpha\beta 1$ integrini, koji su eksprimirani na površini uroepitelnih stanica, također mogu služiti kao receptori za UPEC (20). Nasuprot tome, komplicirane urinarne infekcije započinju prijanjanjem bakterija na mokraćni kateter, bubrežni kamenac, kamenac iz mjehura ili uslijed zadržavanja u mokraćnom sustavu zbog anatomske opstrukcije. Uropatogeni poput *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* i *Enterococcus* spp. pretežno uzrokuju komplicirane urinarne infekcije te često tvore biofilm koji je odgovoran za kolonizaciju i perzistenciju infekcije.

Kako je već opisano, mnogi uropatogeni započinju infekcije urinarnoga trakta koristeći pile koji omogućavaju prijanjanje za domaćina te tako olakšavaju invaziju u tkivo domaćina i potiču međubakterijske interakcije u svrhu stvaranja biofilma.

U *E. coli* identificirano je 38 različitih regija koje kodiraju za CUP (engl. *Chaperone-usheer fimbriae*) pile, a samo jedan soj UPEC-a može kodirati čak više od 12 različitih CUP pila (21). Međutim, raspodjela CUP pila nije ujednačena u različitim UPEC izolatima; već su neki pili uvijek eksprimirani, dok su drugi prisutni samo u nekoliko vrsta. Većina CUP pila koji se nalaze na UPEC-u tipični su po specifičnim adhezinima, te je poznato da posreduju različite tropizme u donjem i gornjem dijelu mokraćnoga trakta prepoznajući receptore sa stereokemijskim specifičnostima, osobito u epitelu mjehura ili bubrega (21).

1.1.3. Antimikrobno liječenje urinarnih infekcija

Otkriće antimikrobnih lijekova bilo je jedno od najvažnijih otkrića moderne medicine. Razdoblje suvremene antimikrobne kemoterapije započelo je 1936. godine primjenom sulfonamida, te se nastavilo primjenom penicilina i streptomcina od 1940. godine. U narednom periodu razvijeni su mnogobrojni novi antimikrobni kemoterapeutici, ali nažalost sve se češće susrećemo s rezistencijom mikroorganizama koja je uzrokovana njihovom nekritičkom i

neadekvatnom uporabom. Poznavanje mehanizama njihova djelovanja smatra se ključem ispravne primjene antimikrobnih lijekova. Hrvatske nacionalne smjernice, „ISKRA smjernice antimikrobnog liječenja i profilakse infekcija mokraćnog sustava“ izdane su 2007. godine te su bile u skladu s preporukama *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). ISKRA smjernice nadopunjene su 2014. godine. Prema tim smjernicama i njihovim izmjenama i dopunama, za liječenje IMS-a, preporuča se:

- za akutne nekomplikirane IMS donjega urotrakta žena kao prvi izbor nitrofurantoin u dozi 2×100 mg *p. o.* kroz 7 dana, ili fosfomicin $1 \times 3,0$ g *p. o.* jednokratno, kao alternativna terapija amoksisicilin/klavulanska kiselina- $2 \times 1,0$ g *p. o.* kroz 7 dana, cefaleksin $2 \times 1,0$ g *p. o.* kroz 7 dana, cefuroksim aksetil, ili cefiksim, zatim norfloksacin 2×400 mg *p. o.* kroz 3 dana,
- za akutni nekomplikirani pijelonefritis prvi izbor je amoksisicilin/klavulanska kiselina- $2 \times 1,0$ g *p. o.* kroz 10–14 dana, a alternativna terapija su cefalosporini II ili III generacije kroz 10–14 dana, te ciprofloksacin 2×500 mg *p. o.* kroz 7–10 dana,
- za komplicirane IMS-a žena lijek prvoga izbora je amoksisicilin/klavulanska kiselina $2 \times 1,0$ g *p. o.* kroz 10–14 dana, a alternativna terapija je ceftibuten, odnosno ciprofloksacin 2×500 mg *p. o.* kroz 7–10 dana,
- za akutne IMS-e muškaraca koji imaju i sustavne simptome, lijek prvoga izbora je ciprofloksacin 2×500 mg *p. o.* kroz 2 tjedna, a alternativna terapija je amoksisicilin/klavulanska kiselina $2 \times 1,0$ g *p. o.* kroz 14 dana, odnosno ceftibuten 14 dana,
- za IMS muškaraca koji imaju tegobe koje odgovaraju bakterijskom prostatitisu lijek prvoga izbora je ciprofloksacin 2×500 mg *p. o.* kroz 4 tjedna, a alternativna terapija su trimetoprim/sulfametoksazol ili ceftibuten,
- za IMS trudnica, prema kliničkom sindromu, trajanju trudnoće i antibiogramu uzročnika, preporuča se terapija 7–14 dana: ceftibuten, amoksisicilin/klavulanska kiselina, nitrofurantoin, amoksisicilin ili fosfomicin (7).

Kroz listopad i studeni 2006. godine Škerk i suradnici ispitali su 3188 epizoda IMS-a u ordinacijama liječnika obiteljske medicine diljem Republike Hrvatske, te njihovi rezultati sugeriraju da je empirijska antimikrobna terapija izdana u svrhu liječenja IMS-a propisana od strane liječnika obiteljske prakse u tom periodu bila u skladu s tada važećim nacionalnim smjernicama (22).

Upravljanje terapijom IMS-a postaje sve izazovnije zbog širenja rezistencije na antimikrobne lijekove. Naime, u Hrvatskoj se u 2/3 bolesnika s IMS-om započinje s empirijskom antimikrobnom terapijom bez nalaza urinokulture. Iz toga razloga postoji stalna

potreba za praćenjem i proučavanjem antimikrobnog liječenja (11). U 2014. godini učestalost rezistencije *E.coli* na kinolone bila je čak 17 %. Unatoč tome, upotreba antimikrobnih sredstava za IMS u Hrvatskoj karakterizirana je visokim udjelom fluorokinolona (norfloksacin i ciprofloksacin) u usporedbi sa starijim lijekovima poput nitrofurantoina i fosfomicina, koji su zadržali izvrsnu djelotvornost za većinu gram-negativnih patogena, uzročnika IMS-a (14). Otpornost na fluorokinolonske antibiotike smatra se posebno klinički značajnim zbog povezanosti s proizvodnjom enzima beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended Spectrum Beta-Lactamases*; ESBL) u gram negativnih patogena. Otpornost na kinolone u ESBL-u pozitivnih sojeva dosežala je čak do 70 %, te kod kompliciranih IMS-a i do 90 %. Cefalosporine, kao terapiju kod liječenja cistitisa i pijelonefritisa Europske urološke smjernice (2) ne navode, dok su u ISKRA smjernicama oni drugi izbor. Najčešća upotreba kroz 2014. godinu bila je upotreba beta-laktamskih antibiotika, te je premašila upotrebu fluorokinolona i cefuroksima (2).

1.1.4. Izmjena uvriježenoga pogleda na infekcije urinarnoga trakta

Prije dvadesetak godina mokraćna zdravih osoba smatrala se primarno sterilnim uzorkom, međutim 2012. godine po prvi put je opisana urinarna mikrobiota u žena (23, 24). Danas se već spominje zdravi mikrobiom mokraćnoga mjehura. Ipak, još uvijek nije jasno što sadrži zdravi mokraćni mikrobiom, kako u pogledu specifičnih bakterijskih vrsta, tako i njihove sveukupne raznolikosti (24, 25).

Otkrićem urinarnoga mikrobioma došlo je do značajnoga pomaka u pogledu na IMS. Budući da su bakterije normalno prisutne u mokraćnom mjehuru, patofiziologija IMS-a sada se objašnjava disbiozom mokraćne mikrobiote, a ne prodorom bakterija u sterilni prostor (24). Utvrđeno je da postoji velika individualna varijabilnost u sastavu mikrobiote mokraćne, međutim, kod velike većine žena radi se o miješanoj aerobnoj i anaerobnoj flori. Napretkom tehnologije sekvenciranja omogućena je izravna identifikacija mikroorganizama (26). Urinarni trakt jedna je od zadnjih tjelesnih niša u kojoj su otkriveni mikroorganizmi. Mikrobiotom nastanjenom u zdravom mokraćnom sustavu dominiraju sporo rastuće vrste kojima su za rast potrebne složene hranjive podloge i posebni uvjeti rasta, pa se često propuštaju identificirati tijekom postupka standardne urinokulture (SUK) (27).

Moguće je da kronična stanja urotrakta, koja se danas smatraju idiopatskim ili neinfektivnim, mogu imati svoje specifične profile mikrobioma. Urinarna mikrobiota, iako dijeli slične vrste

bakterija s mikrobiotom crijeva, sadrži značajno manju količinu biomase i nižu heterogenost (28). Najčešće i kod zdrave populacije urinarna mikrobiota nije bogata različitim vrstama mikroorganizama, te prevladava mali broj mikroba (29, 30). Kad normalnom mikrobiotom prevladava jedan rod, poput *Lactobacillus* on se naziva urotipom. Ponekad, u manjoj mjeri urotipovi su iz roda *Gardnerella*, *Streptococcus* ili *Corynebacterium*, a mnogo rjeđe rodovi poput *Escherichia*, *Aerococcus* ili *Staphylococcus*. Ipak, zdrava mikrobiota mokraćnoga mjehura u žena raznolikija je od muške i češće nema dominaciju isključivo jednoga roda. Mikrobiota mokraćnoga mjehura, uretre i periuretralnoga područja mlađih žena u premenopauzi pokazuje povećanu prevalenciju *Gardnerella* i *Lactobacillus* spp. Starenjem žena i snižavanjem razine estrogena dolazi do postupnog smanjenja prevalencije *Lactobacillus* spp. u mikrobioti rodnice. Kod žena u postmenopauzi pokazana je povećana prevalencija *Actinomyces*, *Corynebacterium* i *Streptococcus* (31). U nekim aspektima mikrobiota mokraćnoga mjehura žena sliči vaginalnoj mikrobioti (27). Vaginalna mikrobiota kojom dominira *Lactobacillus* smatra se „zdravom vaginalnom mikrobiotom“ (32). Isto tako, za *Lactobacillus* koji je najčešći urotip smatra se da ima zaštitnu ulogu od IMS-a (29, 32). S druge strane završna trećina uretre koja povezuje mjehur i vaginu sadrži rijetku miješanu floru o kojoj imamo spoznaja već četrdesetak godina (17).

Mikroorganizmi te flore također su prisutni u uzorcima mokraće do 10^4 CFU/ml (engl. *Colony Forming Units*), upravo iz toga razloga postoji predanalitički zahtjev prikupljanja srednjega mlaza mokraće u analizi urinokulture. Razlog je ispiranje flore uretre prvim mlazom. Budući da je završni dio uretre u neposrednom dodiru s vaginom, ne čudi da dijele sličnu mikrobiološku floru (31, 33). Na održavanje fiziološke flore u donjoj trećini uretre utječu razni mehanizmi, uključujući uklanjanje oštećene sluznice i protok mokraće koji ispire slabo vezane bakterije s površine uretre. Normalna flora uretre mijenja se tijekom života. Utvrđeno je da se fiziološka flora zdravih žena razlikuje u premenarhalnom, reproduktivnom i postmenopauzalnom razdoblju života. U žena koje trenutno imaju prisutnu infekciju urinarnoga trakta ta flora je kako kvalitativno tako i kvantitativno izmijenjena (12).

Kako se neki mikroorganizmi smatraju zaštitnim, pristup široko rasprostranjene upotrebe antibiotika za iskorjenjivanje bakterija iz mjehura te hipoteza o sterilnoj mokraći zastarjeli su (27, 34). Kliničari bi se trebali brinuti zbog nepravilne i prekomjerne upotrebe antibiotika koja često dovodi do poremećaja normalne ‘zdrave’ vaginalne, gastrointestinalne i urinarne mikrobiote (34). Infekcije mokraćnoga sustava neke su od najčešćih bakterijskih infekcija zabilježenih u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Iz toga razloga čine iznimno veliki dio

ukupne potrošnje u zdravstvu, te bi smanjenje upotrebe antimikrobnih lijekova moglo učiniti veliku uštedu (5, 35).

1.2. Dijagnostika urinarnih infekcija

Europske smjernice za analizu mokraće objavljene su 2001. godine u dokumentu koji je izradio ECLM (*European Confederation of Laboratory Medicine*) u suradnji s ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) (36). Ove smjernice klasificiraju metode mikrobiološke dijagnostike mokraće na četiri razine izvedbe, s obzirom na točnost mjerenja (36). Prvu razinu čine brzi postupci (urinske test trake koje se koriste u svrhu probira negativnih kultura i značajan rast uglavnom *E. coli*). Razina 2 uključuje kvantitativne postupke (rutinski postupak urinokulture u kojem se 1 μ L urina nasađuje na CLED ili krvni agar aerobno, nakon čega slijedi 24-satna inkubacija). Razina 3 kvalificira postupke usporedbe (10 μ L urina inokuliranoga pipetom na CLED agar, hematinski agar i krvni agar, aerobno i potom anaerobno uzgajano u atmosferi s CO₂ tijekom 48 sati) i konačno, 4. stupanj koji uključuje primarne referentne postupke mjerenja, poznate i kao konačne metode koje za sada još nisu definirane u mikrobiologiji (36).

U svibnju, 2017. godine Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju izdalo je Smjernice za mikrobiološku dijagnostiku infekcija mokraćnoga i spolnoga sustava, koje su u skladu s ESCMID preporukama (37). Prema njima dijagnostički postupnik ovisi o kategoriji IMS-a:

- akutni nekomplikirani cistitis u žena u premenopauzi koje nisu trudne;
- akutni nekomplikirani pijelonefritis;
- komplicirane IMS-a (uključujući i sve IMS-a u muškaraca);
- asimptomatska bakteriurija i
- rekurentne IMS (nekomplikirane, bez predisponirajućih čimbenika).

Također, ovim smjernicama definirane su predanalitička i postanalitička faza ispitivanja odnosno izvještavanje i interpretacija nalaza (37).

1.2.1. Standardna laboratorijska dijagnostika uroinfekcija

U patološki promijenjenim stanjima mokraća predstavlja važan potencijal za dijagnostička testiranja. Fizikalno-kemijski pregled mokraće i mikroskopski pregled sedimenta

mokraće koriste se u primarnoj procjeni stanja bolesti (38), te mogu biti iznimno dobar putokaz u postavljanju dijagnoze. SUK koja uključuje metode uzgoja mikroorganizama, njihovu identifikaciju i ispitivanje osjetljivosti na antimikrobna sredstva (39) uobičajeno se indicira kod sumnje na IMS. Najčešće vrijeme koje je potrebno od zaprimanja uzorka do izdavanja nalaza je 36-72 h (40). Upravo vrijeme trajanja ovoga testiranja smatra se njegovim glavnim nedostatkom, ali isto tako prisutan je i niz nedostataka u standardnom protokolu uzgoja mikroorganizama mokraće koji ograničavaju količinu potencijalno važnih informacija za kliničare, kao što je prikazano u studiji Price-a i sur. (40). Iz tih se razloga kontinuirano istražuju brži i učinkovitiji postupci za utvrđivanje broja i vrste mikroorganizama prisutnih u mokraći, kao i njihova osjetljivost na antimikrobne lijekove.

1.2.1.1. Medicinsko-biokemijska dijagnostika

U medicinsko-biokemijskim laboratorijima pregled slučajnoga uzorka ili srednjega mlaza prve jutarnje mokraće obuhvaća fizikalno-kemijski, biokemijski i mikroskopski pregled. Kemijski pregled mokraće rutinski se semikvantitativno provodi test trakom. U svrhu dijagnostike IMS-a najveća osjetljivost postiže se kombiniranjem pozitivnih rezultata nitrita i leukocitne esterase. Ipak, za postavljanje dijagnoze bubrežnih bolesti i infekcija mokraćnoga sustava mikroskopski pregled sedimenta mokraće smatra se osjetljivijim pokazateljem (36).

1.2.1.2. Mikrobiološka dijagnostika

Bakterije se iznimno brzo razmnožavaju u mokraći tako da je u prikupljanju ovoga uzorka predanalitička faza iznimno važna. Za mikrobiološku analizu potrebno je u sterilnu posudu prikupiti srednji mlaz (prvim mlazom isperemo uretru) uzorka mokraće najmanje 4 sata nakon zadnjega mokrenja, te nakon dobre toalete okoline ušća uretre. Uzorak se u najkraćem roku mora nasaditi na hranjive mikrobiološke podloge (unutar 2 sata) ili pohraniti na 2-8 °C ne dulje od 24 sata. Uzorak mokraće nasađuje se na standardne podloge prema Smjernicama za mikrobiološku dijagnostiku, HDKM (37). Nakon inkubacije uzgojene se kolonije izoliraju i mikroskopski se promatra njihov izgled, te se biokemijskim nizom utvrđuju njihova metabolička svojstva (41). Glavni problem dijagnostike IMS-a kod SUK-a je relativno visoka stopa lažno negativnih rezultata. Prije otkrića urinarnoga mikrobioma takvi slučajevi negativne urinokulture, posebno kod pojave zdravih mladih žena koje imaju simptome IMS-a, smatrali

su se posljedicom „uretralnoga sindroma“ ili psihosomatikom (42). Danas je poznato da uretralni sindrom ne postoji kao klinički entitet, a primjenom metoda poput lančane reakcije polimeraze (PCR) i tehnologije sekvenciranja nove generacije (engl. *Next-Generation Sequencing*, NGS), postalo je jasno da ti pacijenti imaju značajnu bakteriuriju, iako su nalazi SUK-e bili uredni (42, 43). Mnoge bakterijske vrste koje se ne kultiviraju standardnim mikrobiološkim postupcima, mogu se uzgojiti primjenom protokola poboljšanje kvantitativne urinokulture (engl. *Enhanced Quantitative Urine Culture*, EQUC) (5), koji je zahtjevan proces za prosječan klinički mikrobiološki laboratorij. Protokol EQUC koristi tri volumena mokraće (1 µl, 10 µl i 100 µl) i dodatne uvjete inkubacije. Svaki se uzorak mokraće kvantitativno nasadi na podlogu, a zatim se ploče inkubiraju u 5 % CO₂ na 35 °C tijekom 48 sati; BAP i MacConkey agari inkubiraju se aerobno na 35 °C tijekom 48 sati. Za EQUC, značajan broj kolonija izračunava se u odnosu na inokulirani volumen (17, 43). Godine 2016. Price i sur. u svojim opsežnim istraživanjima zaključuju da se EQUC treba preporučiti kao dopunski test kod osoba sa simptomima IMS-a koje nemaju porast bakterija u standardnoj kultivaciji urinokulture i kod osoba s trajnim simptomima IMS-a (17).

Standardni mikrobiološki postupak obrade mokraće je sljedeći; identifikacijski proces nepoznatoga mikroorganizma započinje nasađivanjem mokraće na sterilnu podlogu, a nakon prve inkubacije od 24 sata, slijedi izolacija uzročnika iz miješane kulture, te ponovna inkubacija kao čista kultura (monokultura) za identifikaciju. U slučaju čiste kulture mikroorganizma u mokraći nakon prve inkubacije, sutradan odmah slijedi identifikacija uzročnika. Identifikacija se izvodi specifičnim biokemijskim reakcijama, primjerice trostrukim šećerom (glukoza, laktoza, saharoza); biokemijskim nizom ICULAO (indol, citrat, urea, lizin, arginin, ornitin); koagulaza testom, DNA-zom, eskulinskim testom, novobiocin, bacitracin ili optohin diskovima, aglutinacijama s poznatim serumima i drugim sličnim testovima. Prema vrsti metabolizma pojedinoga mikroorganizma, takvim postupcima zaključuje se o identitetu mikroorganizma, koji se svrstava u rod, vrstu, a ponekad čak i biotip ili serotip. U slučaju nejasnoga rezultata identifikacije, po potrebi izvodi se i mikroskopski pregled (gram preparat) monokulture ili ponovni uzgoj soja na selektivnim podlogama radi vjerojatno miješane kulture. Slijedi nekoliko primjera identifikacije nekih bakterija. U identifikaciji gram negativnih bakterija može se koristiti biokemijski niz ICULAO. Indol test služi u svrhu identifikacije bakterija koje su sposobne katabolizirati triptofan do indola pomoću enzima triptofanaze. U mediju u kojem je prisutan triptofan bakterije koje posjeduju triptofanazu hidroliziraju ga u piruvat, indol i amonijak. Pozitivna indol reakcija identificira se promjenom boje Kovac ili

Ehrlich reagensa, koji se nalazi povrhu medija, u roza. Pozitivni citrat test daju neke *Enterobacteriaceae* kao i neke druge gram negativne bakterije iz reda *Enterobacterales*. Promjenom boje medija iz zelene u plavu utvrđuje se prisustvo enzima citraze. Ureaza test potvrđuje prisustvo ureaze, koja je prisutna u *Morganella* spp., *Providentia rettgeri*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* itd. Dekarboksilacijski medij može sadržavati jednu od tri aminokiseline; lizin, arginin ili ornitin, te dokazati prisustvo jednog od tri enzima (lizin-dekarboksilaze, arginin-dekarboksilaze ili ornitin-dekarboksilaze). Trostruki šećer test dizajniran je u svrhu razlučivanja bakterija koje fermentiraju glukozu, laktozu ili saharozu, te reduciraju organske ili anorganske spojeve koji sadrže sumpor (organski-aminokiseline poput cisteina i metionina, anorganski spojevi-tiosulfati, sulfati i sulfiti). Koagulaza test najčešće se koristi za diferenciranje *S. aureus* od ostalih vrsta stafilokoka.

1.2.2. Novi dijagnostički pristupi u identifikaciji uropatogena

Analiza mokraće, osim gore nabrojanih metoda, obuhvaća i druge pristupe poput protočne citometrije mokraće te proteomske i genomske analize. Međutim, za sada, ne postoje dostupni opći međunarodni standardi za akreditaciju ili validaciju tih novih tehnologija, unatoč činjenici da su neke od njih već u kliničkoj i istraživačkoj praksi, poput MALDI-TOF ili metoda tandemne masene spektrometrije (MS/MS) (36, 44).

1.2.2.1. Spektrometrija masa u identifikaciji mikroorganizama

Primjena MALDI-TOF MS u identifikaciji mikroorganizama datira još iz 1975. godine, kada je uočeno da svaki mikroorganizam ima jedinstven spektar molekulskih masa proteina. U tim početnim fazama ispitivali su se samo biljezi male molekulske mase, kao što su bakterijski lipidi (45), međutim osamdesetih godina, razvojem tehnika desorpcije i ionizacije omogućena je analiza velikih biomolekula, poput intaktnih proteina. Metoda otiska prsta (engl. *Peptide Mass Fingerprinting*, PMF) poznata je po karakterističnom otisku masenih spektara koji predstavlja jedinstveni potpis pojedinoga analiziranog mikroorganizama, što se pokazalo odličnim za točnu identifikaciju mikroorganizama na razini roda i vrste. Više skupina istraživača proučavalo je MALDI-TOF kao metodu detekcije staničnih proteinskih profila (46, 47). Od kasnih 1990-ih uspjeh ove tehnike za brzu identifikaciju bakterija, pokazuje se

eksponencijalnim porastom broja publikacija u vezi identifikacije mikroorganizama MALDI-TOF metodom. MALDI-TOF MS danas se koristi kako bi se identificirale različite vrste mikroorganizama, uključujući bakterije, gljive i viruse (48, 49). Sposobnost MALDI-TOF metode za brzu identifikaciju mikroorganizama potencijalno pruža mogućnost njene primjene u više područja, uključujući medicinsku dijagnostiku, te mikrobiološku kontrolu kvalitete hrane ili identifikaciju okolišnih mikroorganizama. Iz prethodno navedenih razloga danas se MALDI-TOF MS smatra metodom budućnosti koja će biti pogodna za brzu identifikaciju mikroorganizama uz relativno niske troškove, kao alternativa konvencionalnim laboratorijskim biokemijskim metodama i molekularnoj identifikaciji mikroorganizama (50). Upravo iz tih je razloga MALDI-TOF MS predložen kao brz i pouzdan postupak identifikacije mikroorganizama na temelju proteinskih ili peptidnih profila karakterističnih za svaki mikroorganizam.

Nekoliko MS metoda već je ušlo u rutinsku mikrobiološku uporabu, međutim to je i dalje novo područje za većinu mikrobioloških laboratorija te postoji iznimno veliki potencijal za daljnju primjenu u mikrobiološkim istraživanjima kao i njenom daljnjem razvoju (50).

Food and Drug Administration odobrila je uporabu MALDI Biotypera (Bruker) i VITEK MS (Shimadzu- Biomerieux) uređaja u kliničkoj praksi. To su platforme čiji je princip rada MALDI-TOF MS, a u ionizaciju ulaze ukupni stanični izolati proteina mikroorganizma bez prethodne obrade proteazama. Biotyper ili Vitek MS su dakle platforme koje ne uključuju tretman izolata bakterija proteazama te točan sastav spektra ostaje nepoznat. Gore navedeni uređaji koriste metode koje zahtijevaju prethodnu kultivaciju bakterija, gdje se nakon kultivacije uzimaju čiste kolonije i tretiraju jakim lizirajućim agensima, poput 70 % mravlje kiseline u 50 % acetonitrilu (ACN). Stanični ekstrakti miješaju se s matriksom i apliciraju na MALDI pločice. Ovako pripremljen uzorak izlaže se laserskoj zruci, te se u konačnici snima specifičan spektar masa mikroorganizma koji se uspoređuje s dostupnom bazom podataka, te se korištenjem bioinformatičkoga alata identificira mikroorganizam. Identifikacija mikroorganizma zasniva se na najboljoj podudarnosti spektra iz mikrobne baze podataka sa spektrom analiziranoga uzorka. Za svaku podudarnost analizator daje vrijednost koja označava razinu pouzdanosti ispravne identifikacije. Bodovni *score* jednak ili veći od 2 smatra se korektnom identifikacijom. Ove platforme imaju zadanu *score* kategorizaciju: <1,7 smatra se nepouzdanom identifikacijom, između 1,7-1,9 vjerojatnom identifikacijom, 2,0-2,29 vjerojatno pouzdanom identifikacijom, i 2,3-3,0 vrlo vjerojatno pouzdanom identifikacijom (49). Unatoč činjenici da tehnologija MALDI-TOF postaje nova tehnologija identifikacije

mikroorganizama uvedena u kliničku upotrebu i kod nje se primjećuju određeni nedostaci. Naime, ova tehnologija i dalje zahtjeva kultivaciju mikroorganizama, ima relativno malu specifičnost i ograničenu bazu podataka koja ograničava identifikaciju, te nije kvantitativna. Zahtjev za uzgojem mikroorganizama neminovan je jer se detekcija temelji na usporedbi s bazom podataka spektara monokolonija. Upravo to je razlog zbog kojega Biotyper i VITEK MS nisu u mogućnosti identificirati polimikrobne infekcije (51). Radi ovih ograničenja MALDI-TOF MS-a istraživački laboratoriji su krenuli u ispitivanje LC-MS (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) metodologije (51).

Pokazano je da MALDI-TOF MS platforma može biti korištena za ispitivanje bakterijske osjetljivosti na antibiotike, uzgojem bakterija u mediju koji sadrži normalnu i izotopom obilježenu aminokiselinu lizin s i bez antibiotika. Pomak mnogih MS pikova, pokazuje sposobnost rasta bakterija u prisustvu antibiotika te to označava rezistenciju na antibiotike (52).

Postoje i drugi masovni oblici peptidne analize otisaka prstiju, kao što je PMF koji zahtijeva tretman uzorka proteazama. Eksperimentalno dobiveni spektri masa uspoređuju se s teorijskim spektrima iz baze podataka koje su temeljene na uzorcima digestiranim proteazama umjesto baze spektara cjelovitih proteina što omogućuje identifikaciju proteina ili molekula od interesa. Proteini se prethodno razdvajaju pomoću postupaka kao što su gel elektroforeze ili kromatografija, nakon čega se najčešće tretiraju enzimima, uglavnom tripsinom.

1.2.2.2. Genomika u identifikaciji mikroorganizama

Molekularne metode poput PCR-a, sekvenciranja gena za 16S RNA i *shotgun* metagenomike ispituju se kao brže, točnije, pristupačne metode visoke kliničke korisnosti u identifikaciji mikroorganizama (42). PCR metoda pogodna je za ciljanu dijagnostiku, amplifikacija i sekvenciranje gena za 16S RNA određuje bakterijske rodove i njihovu brojnost, ali nije metoda odabira za preciznu analizu vrste, dok *shotgun* metaproteomika predstavlja novi način analize ukupne DNA. Razvoj i primjena NGS tehnologije omogućuje sekvenciranje genoma pojedinih organizama, te predstavlja najopsežniju metodu (42, 53, 54). Ipak još nedostaju randomizirana kontrolirana ispitivanja koja bi procijenila kliničku korisnost PCR-a ili NGS-a u usporedbi sa standardnom dijagnostikom (54). Unatoč tome, PCR se već uveliko primjenjuje u laboratorijima za kliničku mikrobiologiju, dok sekvenciranje gena za 16S RNA i metagenomika polako ulaze i u referentne laboratorije (55, 56).

Multipleks PCR još se ne koristi rutinski u dijagnostici IMS-a, ali činjenica da se on može koristiti izravno na nativnim uzorcima mokraće te na taj način skratiti vrijeme trajanja analize, čini ga vrijednom dijagnostičkom opcijom (57, 58).

Metoda amplifikacije i sekvenciranja gena za 16S rRNA, koja je dio male ribosomske podjedinice, danas je u upotrebi. Sekvenciranjem ovih gena utvrđeno je da sadrže kako visoko konzervirane regije, tako i varijabilna područja te su upravo iz toga razloga pogodni za otkrivanje srodstva između vrlo udaljenih vrsta. Konzervirane regije nukleotida čine funkcionalna mjesta ribosoma, dok varijabilne regije nemaju utjecaj na funkciju ribosoma. Upravo iz tih razloga sekvenciranje ovih gena najčešće se koristi u svrhu klasifikacije i identifikacije bakterija i arheja (59).

Usporedba sekvenci gena za 16S rRNA koristi se za uspostavljanje taksonomskih odnosa između prokariotskih sojeva s 98,65 % podudarnosti koja se trenutno prihvaća kao kriterij za razgraničenje vrsta. Usporedbom sekvenci gena za 16S rRNA u izolatima prokariota u usporedbi sa sekvencama svih prokariotskih vrsta iz baza podataka pruža točan i rutinski prihvatljiv način klasifikacije i identifikacije prokariota (60). Ova metoda, osim što je postala rutinski korišteno sredstvo identifikacije prokariota, koristi se i u utvrđivanju odnosa između bakterija. Unatoč velikim očekivanjima i mogućnostima metode, ipak postoje i neki prepoznati nedostaci. Rezolucija koju nudi sekvenciranje gena za 16S rRNA nije dovoljno visoka da bi se razlikovale srodne vrste. Jedan od primjera su bakterije poput *Psychrobacter*, poput *P. maricola* i *P. submarinus*, koje dijele 99,9 % podudarnih sekvenci. Nadalje, većina raspoloživih sljedova *Psychrobacter* izvedena je iz istraživanja biološke raznolikosti, koja često generiraju djelomične sljedove s neoptimalnim informacijama (60). Uz to, gotovo svi sojevi *Psychrobacter* dostupni u zbirci kultura pohranjeni su prije opisa većine poznatih vrsta i razvrstani prema fenotipskim podacima, što može dovesti do nepodudarne identifikacije sekvenciranjem gena za 16S rRNA. Prema iskustvu stečenom tijekom izrade ovoga doktorskog rada, kao i iskustvima drugih znanstvenih grupa, pokazano je da je analiza sljedova gena za 16S rRNA korisna za opisivanje rodova, ali ima ograničenu vrijednost u identifikaciji vrsta (59, 61).

1.3. MALDI-TOF/TOF i sekvenciranje gena za 16S rRNA u identifikaciji mikroorganizama mokraćne

Velika upotreba antibiotika širokoga spektra dovodi do sve veće pojave rezistentnih bakterija. Kako su današnje metode identifikacije mikroorganizama prisutne u kliničkoj upotrebi relativno dugotrajne često se antimikrobna terapija uvodi i prije identifikacije uzročnika bolesti. Iz toga razloga postoji potreba razvoja bržih i robusnijih metoda identifikacije mikroorganizama, a u svrhu poboljšanja i racionalizacije upotrebe antibiotika (51). U tom svijetlu Holland i sur. su po prvi puta 1996. godine koristili MALDI-TOF metodu u svrhu dobivanja spektralnoga otisaka cijele bakterijske stanice (62). Ovaj se pristup od tada proučava i koristi za identifikaciju bakterija na razini roda i vrste (63 - 69). Danas, komercijalno dostupni maseni spektrometri poput Biotypera i VITEK-a u osnovi su analizatori koji temeljem analize MS1 spektara detektiraju prvenstveno najzastupljenije proteine prisutne u većini bakterija (70). Pomoću ovih instrumenata, čiji programski paketi omogućuju usporedbu MS spektara sa spektrima pohranjenim u bazi mikroorganizama (oko 5600 mikroorganizama), moguća je identifikacija mikroorganizama do razine vrste. Drugi računalni programi koji dolaze skupa s masenim spektrometrima također omogućuju sličan nivo identifikacije mikroorganizama koji u potpunosti ne zadovoljava kliničke kriterije tj. potrebu identifikacije na razini vrste/soja (70). Čiste kulture daju stabilnije i dosljednije spektre, te iz toga razloga uzgoj/izolacija čistoga soja i dalje znatno utječe na kvalitetu spektra i identifikaciju mikroorganizama. Međutim, kako postupak zahtijeva proces kultivacije, a koja se zbog njenoga trajanja želi izbjeći, istražuju se metode koje zaobilaze taj korak. Cheng i sur. 2016. po prvi put uvode LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*) u svrhu identifikacije ciljane skupine specifičnih peptida bičeva *E. coli* čime se uspostavlja temelj identifikacije mikroorganizama metodama MS-a do razine soja (71). Međutim, i njihova je metodologija uključivala dugotrajan proces uzgoja bakterija kojim je postignuta indukcija bičeva. LC-MS/MS metoda koju razvijaju Roux-Dalvai i sur. 2019. godine po prvi put omogućava identifikaciju patogena iz uzoraka mokraćne bez prethodnog uzgoja, međutim uz ograničenje identifikacije na 15 najčešćih uropatogena (51) zbog ograničene baze referentnih spektara.

U okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Klinička proteomika mikroorganizama” razvija se inovativni programski sustav koji omogućava detekciju vrste mikroorganizma na temelju analize masenih spektara. Za razliku od sustava MS-a koji su danas

prisutni u kliničkoj primjeni, navedeni alat može se koristiti uz bilo koji tandem maseni spektrometar (MS/MS) neovisno o proizvođaču. To znači da se može primijeniti na većini postojećih uređaja koji ne podrazumijevaju određeni spektrofotometar masa i pripadajući programski paket. Drugo bitno svojstvo ovoga sustava jest komunikacija s javno dostupnom bazom podataka gdje su zastupljeni svi poznati mikroorganizmi, a koja je znatno veća od Biotyper-ove ili VITEK ove baze. Treća važna prednost programske aplikacije jest algoritam koji omogućava kombiniranje podataka dobivenih MS i MS/MS analizom. Na taj se način mogu utvrđivati proteinski fragmenti mikroorganizama i na temelju toga identificirati vrsta i soj mikroorganizama s obzirom da svaki mikroorganizam ima više od jedne kombinacije peptida koja ga jednoznačno određuje. Čak i u slučaju vrlo srodnih vrsta koje dijele većinu peptida, uvijek postoje jedinstvene kombinacije. Na temelju analize spektara peptida, algoritam pronalazi i uspoređuje jedinstvene kombinacije koje se nazivaju „otiscima prsta“ i mogu se uspoređivati s onima iz baze. Osim toga, napokon ova metodologija trebala bi omogućiti identifikaciju mikroorganizama i u uvjetima kad je više vrsta ili sojeva prisutno u uzorku (72). Bakterijski izolati pripremljeni za rutinsko MALDI-TOF-MS/MS ispitivanje također mogu biti tretirani proteinazama, nakon čega se dobivena smjesa peptida razdvaja kromatografskim metodama, te se nanosi na MALDI pločicu. Ovim razdvajanjem uzorka na frakcije koje se nanose zasebno, smanjuje se složenost te se daljnja fragmentacija odabranih masa prekursora olakšava, a peptidne sekvence točnije identificiraju. Također, dok su klasične mikrobiološke metode neadekvatne u identifikaciji kada je prisutna velika raznolikost mikrobnih vrsta u mokraći, genomske metode imaju mogućnost sveobuhvatnijega i kvantitativnoga pristupa u opisu mikrobioma mokraćnoga mjehura, te se ispituju kao brže, točnije, pristupačne metode visoke kliničke korisnosti i osjetljivosti. PCR je metoda pogodna za ciljanu dijagnostiku, amplifikacija 16S rDNA gena određuje bakterijske rodove i njihovu brojnost, ali nije metoda odabira za preciznu analizu vrste, dok NGS predstavlja novi način metagenomske analize DNA koja se bazira na *shotgun* sekvenciranju gena za RNA. (73). Sekvenciranje gena za 16S rRNA najčešće obuhvaća V1, V2, V3, V4 i V6 regije gena za 16S rRNA te se dobivene sekvence uspoređuju s odgovarajućim bazama podataka. Siddiqui i sur. pokazali su da uobičajeni uzorci mokraće žena, koji su prema SUK-u proglašeni negativnima ($<10^5$ CFU/ml), pokazuju bogatstvo bakterijske sekvence 16S rRNA, među kojima su identificirane i teže uzgojive i anaerobne bakterije. U ispitivanim uzorcima mokraće pojedinih žena uočene su značajne razlike u profilima bakterija te zajednički mikrobiološki potpis nije bio očit. Primijećena je značajna količina sljedova koji pripadaju bakterijama s poznatim patogenim potencijalom.

Tako se nameće zaključak da su metode genotipizacije, koje se temelje na djelomičnom sekvenciranju gena za 16S rRNA zbog visoke konzerviranosti ove regije bakterijskih vrsta i obitelji ograničene preciznosti na nedostatnu razinu roda, a metode sekvenciranja kompletnoga genoma, iako ne zahtijevaju kultivaciju bakterija, precizne su na razini vrste. Međutim, zbog visokih troškova i dugotrajnosti metodologije nisu adekvatne za rutinsku upotrebu u laboratorijima (51).

2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Danas najzastupljenije metode u identifikaciji mikroorganizama jesu klasične medicinsko-mikrobiološke metode. Njihov je glavni nedostatak vrijeme potrebno od zaprimanja uzoraka do izdavanja nalaza i potreba da se živi mikroorganizmi, uzročnici bolesti, uzgajaju na hranjivim podlogama. Potrebe kliničara za bržom i učinkovitijom identifikacijom vrste mikroorganizama, njihovom kvantifikacijom te određivanjem njihove osjetljivosti na antimikrobne lijekove, glavni su razlog kontinuiranoga i ubrzanoga rada na razvoju novih metoda.

Svrha ovoga rada bila je ispitati nove metode, poglavito one bazirane na analizi MS/MS spektara kao alate s potencijalom za bržu i učinkovitiju metodu identifikacije mikroorganizama.

Glavni cilj ovoga rada bio je dizajnirati i ispitati metodu MS-a za brzu i pouzdanu identifikaciju mikroorganizama u uzorku mokraće pacijenata kod kojih je klasičnim mikrobiološkim metodama dokazana prisutnost mikroorganizama $>10^5$ CFU/ml te je usporediti s rezultatima dobivenim genomskom analizom mikroorganizama mokraće. Nadalje, cilj rada bio je pratiti promjene sastava urinarne mikrobiote izazvane cistitisom i dinamiku njihove promjene uslijed antibiotske terapije.

Hipoteza ovoga istraživanja je da je analizom genoma i proteoma mikroorganizama izoliranih iz mokraće moguća njihova identifikacija i praćenje odgovora na antimikrobnu terapiju. Rezultati identifikacije mikroorganizama klasičnim mikrobiološkim postupcima uspoređeni su s rezultatima dobivenim MS-om i genomskom analizom te su na taj način evaluirani rezultati dobiveni novo uspostavljenom metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Istraživanje je provedeno u sklopu HRZZ projekata „Klinička proteomika mikroorganizama” i „MicroEquilibrium, a odobreno je od strane Etičkoga povjerenstva KB Dubrava, etičkoga povjerenstva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svaki sudionik ispitivanja bio je upoznat s tijekom studije te je potpisao informirni pristanak u kojem su mu bile dostupne sve informacije o njoj. Identitet sudionika je tajan, a svi su uzorci vođeni pod šiframa. Poštovani su svi važeći propisi u trenutku prikupljanja uzoraka (74).

Uzorci mokraće ljudskoga porijekla prikupljeni su u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije KB Dubrava, od pacijenata sa simptomima cistitisa upućenih od strane liječnika obiteljske medicine na pretragu urinokulture ili od bolničkih pacijenata s uroinfekcijom. Svi uzorci mokraće prikupljeni su prema uputama za uzorkovanje urinokulture (37). Prikupljanje uzoraka učinjeno je u četiri faze. U prvoj fazi sakupljeno je 279 uzoraka koji su grupirani u skupine prema kvantitativnom mikrobiološkom nalazu; sterilni, kontaminacija (više vrsta gram pozitivnih bakterija i više vrsta gram negativnih bakterija), određena vrsta bakterija u koncentraciji od $<10^4$ CFU/ml, $>10^4$ $<10^5$ CFU/ml i $>10^5$ CFU/ml. Iz svake od njih odabran je slučajni uzorak za daljnje testiranje. Uzorci su prikupljeni u razdoblju od dva mjeseca u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije KB Dubrava. U sljedeće tri faze ciljano su probrani uzorci mokraće s $>10^5$ CFU/ml različitih bakterija. Konačna namjera bila je ciljano izdvojiti što veći broj uzoraka urinokultura s različitim mikroorganizmima.

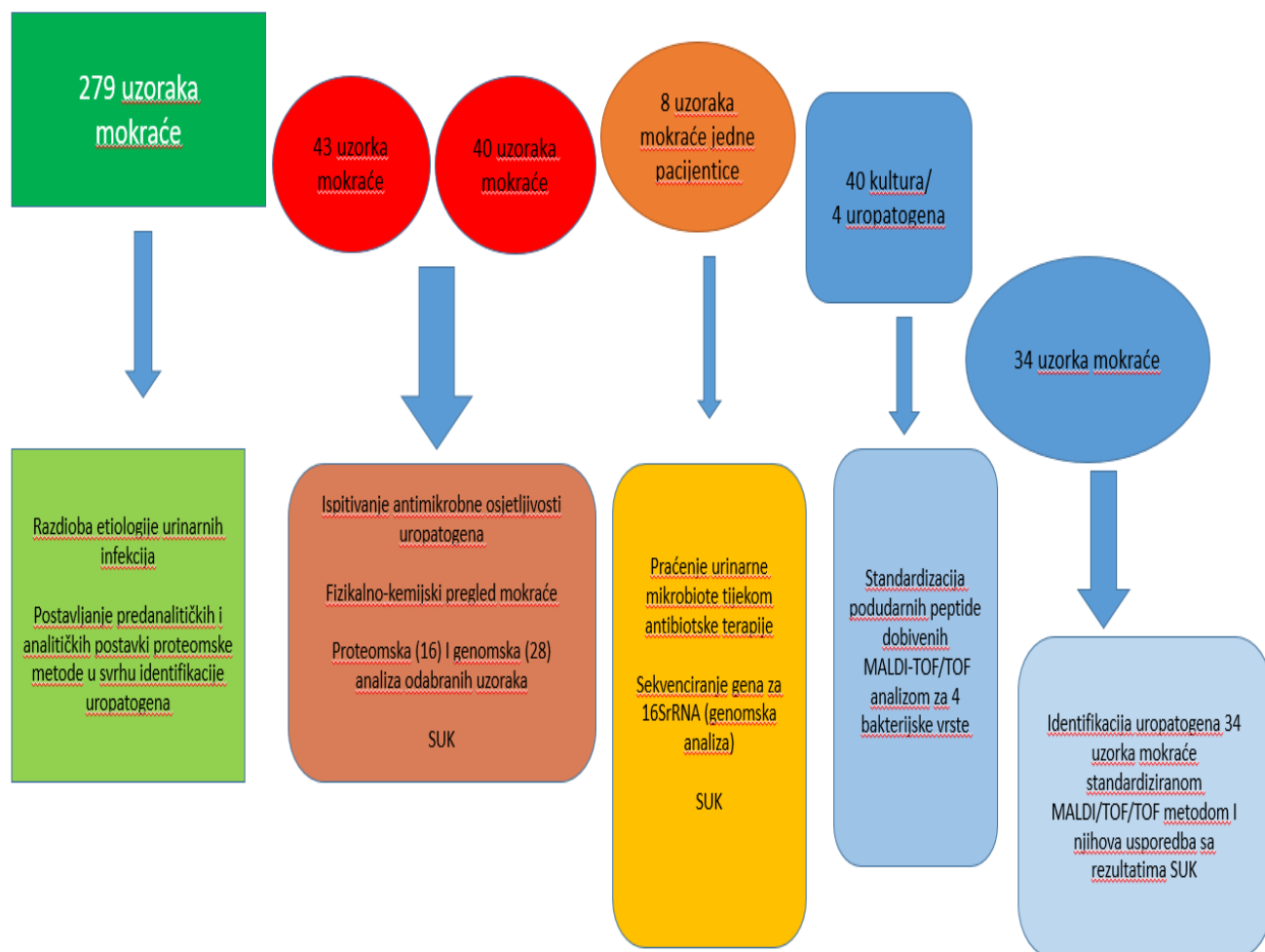
U drugoj fazi, (Tablica 1.) listopad - studeni, 2017. sakupljeno je 43 uzorka mokraće s $>10^5$ CFU/ml s 12 različitih uzročnika infekcije urinarnoga trakta.

U trećem ciklusu izdvojeno je još 40 uzoraka s 10 različitih mikroorganizama.

Posljednja serija od 34 uzorka prikupljena je u periodu od listopada 2019. do veljače 2020. u svrhu standardizacije metode. Također, u istu svrhu nasumično je odabrano po 10 kultura bakterija, najčešćih uzročnika urinoinfekcija (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*) koji su poslužili kao pozitivna kontrola te kao standardi. Sterilne mokraće filtrirane kroz filter veličina pora promjera 0,45 μ m poslužile su kao negativni kontrolni uzorci.

U svrhu praćenja antibiotske terapije i urinarnoga mikrobioma odabrane su prve jutarnje mokraće pacijentice na antibiotskoj terapiji. Sakupljeno je osam uzoraka mokraće, uzorkovanih neposredno prije i za vrijeme terapije. Uzorci su označeni oznakama LS1-LS8; te

su analizirani sekvenciranjem gena za 16S rRNA. Pretraga SUK-a učinjena je za uzorke LS1, LS4 i LS8. Uzorci su prikupljeni u razdoblju od 30.12. 2015. do 6. 1. 2016. u KB Dubrava. Dijagram tijeka uzorkovanja svih uzoraka za potrebe ove studije prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Dijagram tijeka uzorkovanja

3.2. Kemikalije i oprema

U radu su korišteni materijali te otopine pripremljene kako je u nastavku opisano.

3.2.1. Otopine

- Amonijev-hidrogenkarbonat, NH_4HCO_3 , Sigma-Aldrich, SAD

- Triton X-100, Sigma-Aldrich, SAD
- B-PER, Reagens za ekstrakciju bakterijskih proteina, Pierce Chemical Company, SAD
- Ditiotreitol (DTT), Sigma-Aldrich, SAD
- Natrijev-dodecilsulfat (SDS), Sigma Aldrich, SAD
- Aceton p. a., Kemika, Zagreb
- α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA), Sigma-Aldrich, SAD
- Tripsin, Merck, Njemačka
- Coomassie Brilliant Blue G, Sigma, SAD
- Jodoacetamid (IAA), Sigma, SAD
- Mill Q voda
- Mravlja kiselina p. a., Kemika, Zagreb

3.2.2. Hranjive podloge

- McConkey agar (Lab M)
- Krvni agar (Lab M)
- Mueller-Hinton agar (Lab M)
- Biokemijski niz: dvostruki šećer (Oxoid Ltd), indol, citrat (Oxoid Ltd), urea, aminokiseline/ lizin, arginin, ornitin/ (HiMedia Laboratories)

3.2.3. Pribor

- Multistix test trake 10 SG (Siemens)
- SCX kolonice
- staklene kuglice za liziranje, glasperlen Ø 0,10-0,11 (Sartorius AG)
- staklene kuglice za liziranje, glasperlen Ø 0,4-0,6 (Sartorius AG)

3.2.4. Tehnička oprema

- Analitička vaga, Mettler Toledo, Švicarska
- BioSpec Nano-drop spektrofotometar, Shimadzu Biotech
- Centrifuga Centric 400, Tehnica, Slovenija

- Centrifuga 5415 R, Eppendorf, Njemačka
- Centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Njemačka
- Maxwell 16, Promega, SAD
- Mikrovalna pećnica, Electrolux
- Termomiješalica Comfort, Eppendorf, Njemačka
- Termostat (35 °C)
- Ultrazvučni homogenizator Mini20, Bandelin, Njemačka
- Vakuum centrifuga Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka
- Vorteks MS 3 basic, IKA, Japan
- Zamrzivač Forma 900 (-86 °C), Thermo scientific, Njemačka
- Zamrzivač, Gorenje, Slovenija
- Automatizirani uređaj za pročišćavanje proteina *AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform*, Agilent Technologies, SAD
- 4800 MALDI TOF/TOF spektrometar masa, Applied Biosystems, MDS Sciex
- ESI SYNAPT G2-Si i nanoACQUITY UPLC-u (Waters, Milford, MA, SAD)

3.2.5. Priprema otopina

Amonijev-hidrogenkarbonat

50 mmol/L amonijev-hidrogenkarbonat pufer pH=7,8

Pufer je pripremljen otapanjem 4 g NH_4HCO_3 u 900 mL Milli Q vode. Vrijednost pH otopine je podešena na 7,8 fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$), te je volumen nadopunjen do 1000 mL Milli Q vodom.

25 mmol /L amonijev-hidrogenkarbonat pufer pH=7,8

Pufer je pripremljen otapanjem 2 g NH_4HCO_3 u 900 mL Milli Q vode. Vrijednost pH otopine je podešena na pH=7,8 fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$) te je volumen nadopunjen do 1000 mL Milli Q vodom.

Ekvilibracijski pufer

Ekvilibracijski pufer je po sastavu 75 mmol/L Tris-HCl, pH=8,8, 6 mol/L urea, glicerol ($\varphi=0,3$), 20 g/L SDS i nemjerljivo mala količina bromfenol modrila, a priprema se otapanjem 72,1 g uree, 4 g SDS uz dodatak 10 ml 1,5 mol dm^{-3} Tris-HCl, pH=8,8 pufera, 60 ml glicerola i proizvoljno male količine bromfenol modrila (na vrhu nastavka za pipetor) u oko 180 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 200 ml uz miješanje na magnetskoj miješalici. Kad je sve otopljeno, tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen, a ovako pripremljeni ekvilibracijski pufer alikvotiran je i skladišten na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Otopina tripsina

Matična otopina tripsina

Matična otopina tripsina pripremljena je dodavanjem 50 μL Milli Q vode u jednu ampulu koja sadrži 50 μg liofiliziranoga tripsina. Konačna masena koncentracija tripsina u matičnoj otopini iznosila je 1 g/dm^3 . Matična otopina alikvotirana je u obroke od po 10 μl i skladištena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do 3 mjeseca.

Radna otopina tripsina

Radna otopina tripsina po sastavu je 10 mg/L tripsin, a pripremljena je miješanjem 10 μl matične otopine tripsina i 990 μl Milli Q vode neposredno prije upotrebe.

Otopina CHCA matrice

Otopina CHCA matrice po sastavu je 5 g/L α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA) u 9,4 mol/L vodenoj otopini acetonitrila, a pripremljena je otapanjem 5 mg CHCA matrice u 500 μl Milli Q vode i 500 μl acetonitrila.

3.2.6. Programi za upravljanje i obradu podataka

- Protein Reader, software razvijen u Kabinetu za Bioinformatiku za spektrometriju masa, pisan u Javi
- Mascot (version 2.1. Matrix Science, UK)
- Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 1.9.1)

3.3. Mjerni postupci

U radu su korišteni mjerni postupci standardne mikrobiološke analize, testiranja antimikrobne osjetljivosti uropatogena, proteomska identifikacija uzročnika mokraćnih infekcija iz uzoraka uzgojenih kultura najčešćih uropatogena i uzoraka mokraće, ekstrakcija DNA iz bakterijske biomase prisutne u mokraći, sekvenciranje gena za 16S rRNA, te analiza podataka.

3.3.1. Mikrobiološka analiza

Sterilna kalibrirana eza (10 µl) korištena je za uzimanje uzorka mokraće koji je njome nasađen po cijeloj površini hranjive podloge (McConkey agar i krvni agar) i to u tri smjera ("glava" na jednoj trećini podloge, zatim dva puta razrijeđenje, ali bez spaljivanja eze između pojedinih razrjeđivanja). Nakon toga ploče su inkubirane u termostatu u aerobnoj atmosferi na 37 °C tijekom 24 sata. Na drugom i trećem dijelu kultivirane ploče očekuju se pojedinačne i prema tome čiste kolonije koje služe za daljnju identifikaciju i izradu testa osjetljivosti na antibiotike. Tijekom postupka svi parametri poput debljine i sastava hranjive podloge, pH, temperature i trajanja inkubacije su bili unutar standardom dopuštenih odstupanja.

3.3.2. Test antimikrobne osjetljivosti

Difuzijski su postupci izvedeni na Mueller-Hinton agaru (MH agar) s ili bez dodatka 5 % ovčje krvi. MH agar s dodatkom krvi koristi se za izolate streptokoka i *Aerococcus* spp. Za stafilokoke, enterokoke i gram-negativne bakterije korišten je MH agar bez dodatka ovčje krvi. Diskovi natopljeni antibiotikom stavljaju se na površinu agara koja je prethodno nasađena suspenzijom čiste bakterijske kulture turbiditeta 0,5 McFarlanda. Antibiotik iz diska difundira u hranjivu podlogu prethodno zasijanu ispitivanom bakterijskom kulturom.

3.3.3. Analiza fizikalno kemijskog pregleda mokraće

U fizikalno kemijskom pregledu mokraće korištene su Multistix test trake 10 SG, Siemens (Erlangen, Germany). Test traka ima 10 polja na kojima se semikvantitativno određuje

prisustvo proteina, hemoglobina, leukocita, ketonskih spojeva, glukoze, bilirubina, urobilinogena, nitrita, askorbinske kiseline te pH vrijednosti i specifične težine. Provjerom boje na test traki semikvantitativno se određuju koncentracije pojedinih analita u uzorcima mokraće. U svrhu ovoga ispitivanja bilo je značajno pratiti prisustvo leukocita, eritrocita, nitrita i proteina.

3.3.4. Proteomska identifikacija uzročnika mokraćnih infekcija pretragom baze podataka

3.3.4.1. Postupak izolacije bakterijske biomase iz uzoraka mokraće

Izolacija bakterijskoga taloga uzoraka mokraće koji imaju $>10^5$ CFU/ml započeta je odmrzavanjem uzoraka na sobnoj temperaturi. Otopljeni uzorci mokraće prvo su homogenizirani a zatim je izuzet volumen od 10 mL. Uzorci su centrifugirani jednu minutu na 1000 g, pri sobnoj temperaturi, u svrhu taloženja stanica humanoga porijekla, gljiva i ostalih nečistoća (npr. kristali). Nakon centrifugiranja talog je odbačen, a supernatant je uzet u daljnju proceduru. Nakon ponovnog centrifugiranja, supernatant je odstranjen, a na talog je dodan 1 mL svježeg pripremljenoga pufera, 25 mM NH_4HCO_3 . Uzorci su snažno promiješani, potom centrifugirani pri 16000 g (4 °C), 5 minuta. Postupak ispiranja taloga ponovljen je, ovisno o čistoći uzorka, dva do tri puta. Talog dobiven opisanim postupkom smatra se bakterijskom biomasom.

3.3.4.2. Ekstrakcija proteina

Supernatant je odbačen, a bakterijska biomasa ponovno je suspendirana u puferu (25 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8). Talog je homogeniziran miješanjem te centrifugiranjem na 16000 g, pri 4 °C tijekom 5 minuta. Ovaj je postupak dizajniran u svrhu ispiranja nečistoća poput ljudskih stanica te je ponovljen tri puta. Proteini su ekstrahirani iz bakterijske biomase pomoću 100 µL reagensa za ekstrakciju bakterijskih proteina B-PER (Thermo-Pierce, SAD). Slijedeći protokol proizvođača, uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturi 15 minuta, a zatim zagrijavan na 100 °C u vodenoj kupelji 2 minute. Netopljivi stanični ostaci uklonjeni su centrifugiranjem na 16000 g pri temperaturi od 4 °C tijekom 5 minuta. Ovim je postupkom supernatant obogaćen

otopljenim proteinima sadržanim u otopini B-PER te pripremljen za sljedeći korak u daljnjoj pripremi uzorka za proteomsku analizu.

3.3.4.3. Digestija u otopini

Uzorak proteina sadržan u B-PER (70 μ L) pomiješan je s 2 μ L otopine tripsina (1 mg/ml, Merck, Njemačka). Digestija u otopini provedena je na 37 ° C uz miješanje na termosilici (500 o/min) tijekom 18 sati (preko noći).

3.3.4.4. Frakcioniranje peptida

Nakon digestije proteina provedeno je njihovo frakcioniranje pomoću automatizirane platforme za rukovanje tekućim uzorcima Agilent Bravo (Agilent, SAD) (96-kanalna glava vrha) i filtera Assay MAP SCX prema uputama proizvođača i protokolu za frakcioniranja (primjena 5991-3602EN), SCX patrone su nabijene s 400 mM amonijevoga formata/1 % mravlje kiseline/25 % acetonitrila (ACN), uravnotežene s 1 % mravlje kiseline/25 % ACN, napunjene uzorcima i eluirane uzastopno pomoću 40 mM amonijevoga formata/25 % ACN (pH 3,5; 4,0) 40 mM amonijevog acetata/25 % ACN, (pH 4,5; 5; 5,5) i 100 mM amonijevoga hidroksida/25 % ACN (pH 9,5). Iz svakoga obrađenog uzorka, prikupljeno je ukupno šest frakcija te je primjenom kromatografije omogućeno njihovo postupno i pojedinačno eluiranje metodom moduliranja pH. U početku je korišteno svih šest frakcija, a naknadno je šesta frakcija izostavljena iz analize. Frakcioniranjem peptida povećan je ukupni broj detektiranih peptida, a time i broj proteina, što je u konačnici poboljšalo identifikaciju mikroorganizama.

3.3.4.5. Analiza MALDI-TOF / TOF metodom

Uzorci za analizu pripremljeni su dodatkom 1 μ l 5 mg/ml otopine matrice α -CHCA (α -cijano-4-hidroksi cimetne kiseline) pomiješane s 1 μ l svake frakcije uzorka (šest frakcija po uzorku). Iz rezultirajuće otopine, 1 μ l je nanesen na spot MALDI pločice. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, nanesheni uzorci analizirani su pomoću 4800 Plus MALDI-TOF/TOF masenoga spektrometra (Applied Biosystems Inc., Foster City, SAD) opremljenoga laserom od 200 Hz, 355 nm Nd: YAG. MS spektri su dobiveni u rasponu mase od 800-4500 m/z. Fragmentacija peptida izvedena je pri energiji sudara (CID) od 1 kV u načinu pozitivne

refleksije iona, koristeći dušik kao sudarni plin. Za svaki uzorak odabrano je do 20 najintenzivnijih pikova MS spektara za MS/MS analizu. Otprilike 1000 pojedinačnih hitaca akumulirano je iz različitih pozicija po spotu za MS analizu, a za sljedeće fragmentacijske ionske spektre korišteno je 2000 hitaca po istom spotu. Izvršena je unutarnja kalibracija pomoću fragmenata autolize tripsina. MS i MS/MS spektri dobiveni su pomoću softvera 4.000 Explorer (V 3.5.3, Applied Biosystems, SAD).

3.3.4.6. Obrada programom Mascot

Mascot analiza (verzija 2.1. Matrix Science, UK) provedena je kako bi peptidi bili identificirani pretraživanjem podudarnih proteina u NCBI bazi podataka "nr" (20140312) s filtriranjem pretragom na koljeno *Proteobacteria* (11838333 sekvence), *Firmicutes* (5487348 sekvence) i *Homo sapiens* (276468 sekvenci). Parametri pretraživanja baze podataka MS i MS/MS bili su postavljeni na toleriranje mase matičnih iona od 0,3 Da i toleriranje mase fragmenata iona od 0,5 Da, cijepanje tripsinom s maksimalno jednom pogreškom po peptidu i oksidacijom metionina kao varijabilnom modifikacijom. Specifičnost tripsina postavljena je na C-terminalni lizin i arginin, osim ako je sljedeći aminokiselinski ostatak prolin. Kvalitativna analiza podataka provedena je Mascot analizom koristeći interval pouzdanosti od 95 %, tako da je prag značajnosti prilagođen sa stopom lažnih rezultata ispod 5 %. U Mascot rezultatima korišten je minimalni zbirni rezultat od 48.

3.3.5. Proteomska identifikacija vzročnika mokračnih infekcij *de novo* sekvenciranjem peptida

3.3.5.1. Postupak izolacije bakterijske biomase iz bakterijskih kultura

32

(Sigma Aldrich). Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, stanice su homogenizirane ultrazvučnim homogenizatorom (SONOPULS mini-20, Bandelin, Njemačka). Uzorci su sonificirani u pet ciklusa po 1 minutu s intervalima hlađenja od 30 sekundi između ciklusa i ultrazvučne obrade. Nakon toga u uzorcima je inhibirana aktivnost proteaza grijanjem uzoraka u vodenoj kupelji; 2 minute na 100 °C. Stanični lizat uklonjen je centrifugiranjem na 16000 g; 20 min na 4 °C, a proteinska frakcija sadržana u supernatantu je korištena za daljnju obradu.

3.3.5.2. *Postupak ekstrakcije proteina iz bakterijske biomase*

Bakterijska biomasa iz uzoraka mokraće izolirana je postupkom opisanom u poglavlju 3.3.4.1. Na bakterijski talog dodano je 200 µL lizirajućeg reagensa (2 % SDS) (Sigma Aldrich), 100 mM Tris/HCl (Sigma, Aldrich), pH 7,8 i 0,1 M ditiotreitol (Sigma Aldrich) za ekstrakciju bakterijskih proteina i dobro homogenizirano automatskom pipetom. Uz povremeno miješanje uzorci su ostavljeni 15 min na sobnoj temperaturi. Kako bi uspješnost postupaka liziranja stanica bila veća (posebno gram pozitivnih) provedeno je i razaranje stanica ultrazvučnim homogenizatorom (SONOPULS mini-20, Bandelin, Njemačka). Tijekom pet ciklusa po jednu minutu (puls = 0,5 s, P = 50 %). Da bi se spriječila nekontrolirana denaturacija proteina nakon sonifikacije uzorci su inkubirani 2-3 minute u vodenoj kupelji (100 °C). Na kraju su uzorci centrifugirani u trajanju od 15-20 min (16000 g, 10 °C) pri čemu je uzet stanični lizat koji je odvojen od dobivenoga taloga, te je proteinska frakcija sadržana u supernatantu dalje obrađena.

3.3.5.3. *Pročišćavanje proteina i digestija korištenjem FASP filtera*

FASP (engl. *Filter Assisted Sample Preparation*; FASP) učinkovita je metoda generiranja triptičnih peptida iz složenih smjesa proteina. FASP filteri kombiniraju uporabu MWCO membrana (engl. *Molecular Weight Cut-Off*) na kojima se složene proteinske smjese kemijski modificiraju i digestiraju. Protokol pripreme uzorka s pomoću FASP filtera preuzet je od Yu i sur. i proveden s neznatnim izmjenama (38). Microcon-30 kDa, 0,5 ml (Merck, Njemačka) isprani su s 200 µL ultračiste vode i s 200 µL otopine uree (8 M uree u 100 mM Tris/HCL puferu). 200 µL otopine uree dodano je na filter i centrifugirano pri 12000 g tijekom 15 minuta na 20 °C. Ovaj je korak bio ponovljen, a filteri su isprani još dva puta s 200 µL amonijevog-bikarbonatnoga pufera. U postupku izolacije u nove epruvetice dodano je 70 µL staničnoga lizata i 2 µL otopine tripsina (1 µg/ µL).

3.3.5.4. Derivatizacija CAF/CAF reagensom

Ispareni uzorci nakon procesa digestije proteina bili su rekonstituirani s 30 μ L derivatizacijske otopine (12,5 mM 4-formil-1,3-benzenedisulfonske-dinatrijeve soli (Sigma-Aldrich) i 95,5 mM natrijevog-cijanoborohidrida (Merck), otopljen u 10 mM kalija-dihidrogen fosfata, te je pH podešen na 5. Derivatizacija je provedena pomoću mikrovalne pećnice za kućanstvo na 180 W tijekom 8 minuta.

3.3.5.5. Frakcioniranje peptida

Frakcioniranje peptidnih fragmenata provedeno je pomoću sustava za automatsku pripravu tekućih uzoraka AssayMAP Bravo (Agilent, SAD) (*Automated Liquid Handling Platform*) uz unaprijed određeni softverski protokol za frakcioniranje. Uzorci su pripremljeni miješanjem 60 μ L uzorka i 60 μ L 1 % HCOOH u jažicama. Prije nanošenja peptida kolonice (SCX) su kondicionirane ekvilibracijskim puferom, a elucija peptidnih fragmenata provedena je elucijskim puferima (pH 3,5; 4; 4,5; 5; 6 i 9,5). Po uzorku je dobiveno 6 frakcija, svaki volumena 25 μ L. Postupak frakcioniranja trajao je dva sata. Suhi peptidi su rekonstituirani u 1 % amonijevog-hidroksida (Sigma Aldrich) i bili su podvrgnuti snažnoj izmjeni aniona korištenjem stacionarne faze kvaternarnog metil-amina (QMA) koji je dobiven iz Sep-Pak Accell Plus uložaka (Waters) te su prebačeni u Agilent mikro patrone za kromatografiju. Prije nanošenja peptida na QMA kolonu, ulošci su pripremljeni dodatkom 400 mM amonijevog-formiata, 1 % amonijevog-hidroksida/25 % acetonitrila i uravnotežen s 1 % amonijevim-hidroksidom. Sve su frakcije sušene u vakuumskom koncentratoru i resuspendirane u 1 % mravljoj kiselini. Uložci su punjeni s 400 mM amonijevog formiata, 1 % octene kiseline/25 % acetonitril pufera i uravnoteženi s 1 % octenom kiselinom/25 % acetonitrilom. Na kraju, 36 frakcija svakog uzorka ponovno je ispareno u vakuum koncentratoru.

3.3.5.6. Analiza MALDI TOF/TOF metodom

Uzorci za analizu pripremljeni su dodatkom 10 μ L matrice CHCA (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 5mg/mL, $\geq 98,0$ % (Sigma-Aldrich) na osušenu peptidnu smjesu, od čega je 1 μ L te smjese nanesen na spot MALDI pločice. Analiza peptidnih fragmenata provedena je uz negativnu ionizaciju, pri čemu je u MS spektru odabrano 25 najintenzivnijih

peptidnih prekursora koji su podvrgnuti ponovnoj fragmentaciji za snimanje MS/MS spektara. MS akvizicija izvršena je analizatorom MALDI-TOF/TOF; 4800 Plus (200 Hz, 355 nm *neodymium-doped yttrium aluminium garnet* Nd: YAG laser). Parametri instrumenta postavljani su pomoću softverske verzije 4.000 Explorer (V 3.5.3, Applied Biosystems, SAD). Dobiveni su maseni spektri s prosječno 1800 laserskih snimaka koji pokrivaju raspon m/z od 1000 do 4000. MS/MS akvizicija je postignuta energijom sudara 1kV, prvo u negativnom a onda u pozitivnom ionskom načinu rada bez kolizije plina. Selekcija pikova izvršena je automatski kako bi se analizirali MS spektri i prikupili MS/MS podaci odabranih pikova. Parametri odabira pikova MS/MS bili su sljedeći:

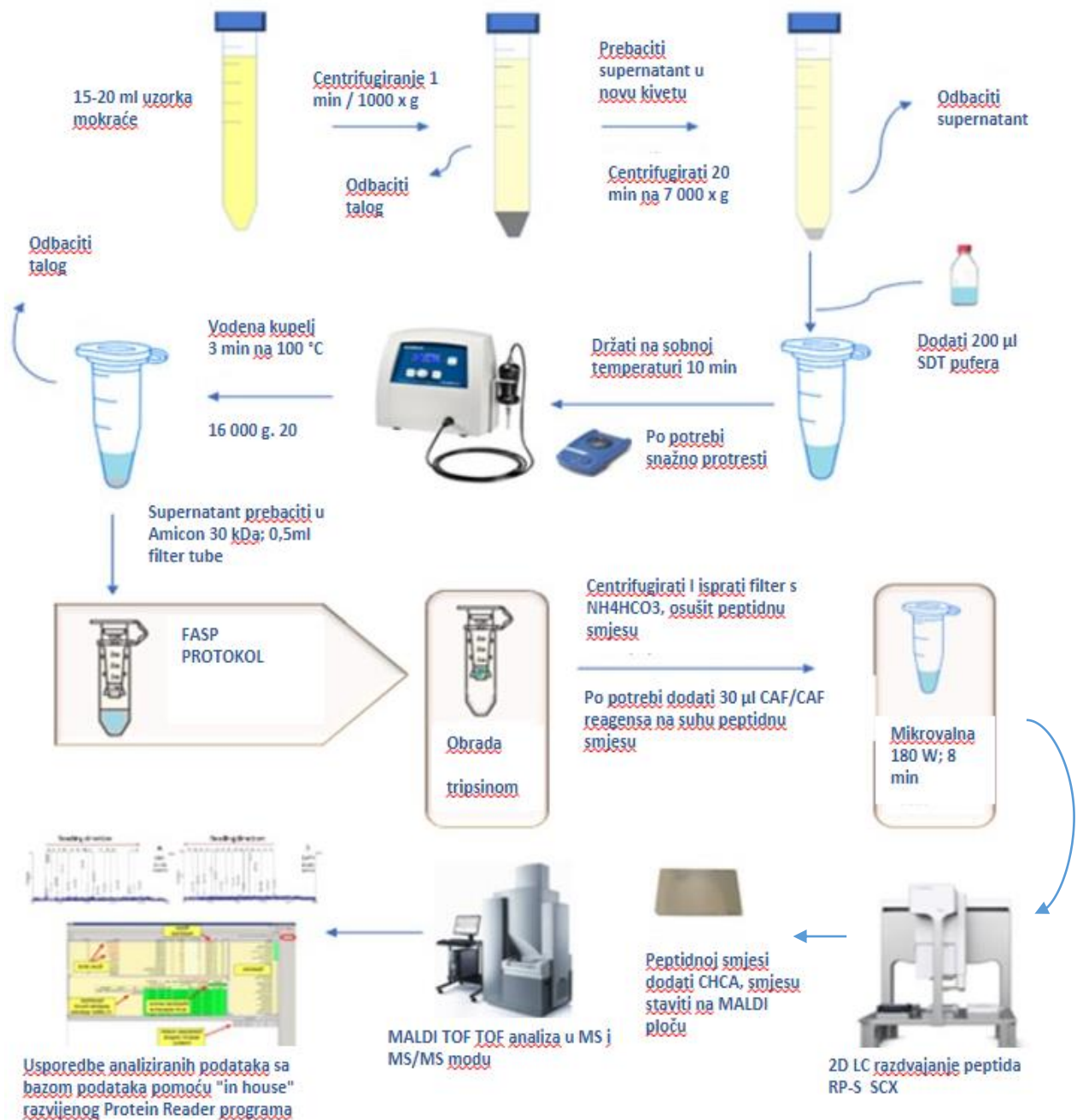
- minimalni S/N filter = 15,
- minimalna širina vrha kromatograma = 3 (koristi se za sprečavanje suvišne analize vrha u susjednim frakcijama),
- maksimum prekursora po frakciji = 20,
- preteča frakcije do frakcije tolerancija mase = 200 ppm.

3.3.5.7. *De novo* sekvenciranje peptida

Sekvenciranje peptida *de novo* provedeno je CAF/CAF metodom (CAF-/CAF+ derivatizacija).

Derivatizirani ion prekursor dobiven u MS negativnom ionskom načinu MALDI-TOF/TOF analize je fragment koji je dalje analiziran u MS/MS negativnom i pozitivnom ionskom načinu. MS/MS spektri poravnani su omogućujući *in silico* transformaciju b-iona u y-ione, te su samo y-ioni korišteni za predviđanje sekvence peptida algoritmom. Peptidni sljedovi su kategorizirani prema najvišim intenzitetima, a 10 najboljih sekvenci pretraživano je prema NCBI nr bazi podataka blastp. Rezultati pretraživanja predstavljaju identificirane vrste. Pomoću računalnih metoda temeljenih na stablu odluke učinjena je klasifikacija modela kojim se određuje razina pouzdanost (engl. *confidence score*) identifikacije uropatogena za svaki od 4 izolata uropatogena (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*) koji su služili kao standardi. Time je učinjen iskorak u standardizaciji bakterijske identifikacije tandemskom masenom spektrometrijom. Prema tom modelu učinjena je identifikacija 34 uzoraka mokraćne, prethodno podvrgnutih dijagnostičkoj identifikacije SUK-om. Broj podudarnih peptida rangiran je prema razini pouzdanosti u 3 kategorije; 3-visoka razina pouzdanosti ispravne

identifikacije, 2-srednja razina pouzdanosti ispravne identifikacije i 1-niska razina pouzdanosti ispravne identifikacije.



Slika 3. Slikovni prikaz ustroja proteomske identifikacije uzročnika mokraćnih infekcija *de novo* sekvenciranjem peptida

3.3.6. Ekstrakcija DNA iz bakterijske biomase

Ekstrakcija DNA provedena je na Maxwell 16 instrumentu (Promega, Madison) korištenjem Maxwell 16 Cell DNA i Maxwell 16 Tissue DNA kita (75) iz odabranih uzoraka mokraće, u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izolacije i pročišćavanje genomske DNA iz biomase prisutne u mokraći učinjena je automatiziranim metodom. Pročišćena DNA spremljena je za daljnje analize bez potrebe za predobradom (centrifugiranjem, precipitacijom ili rehidracijom) DNA taloga. Obrada uzorka za gram negativne bakterije nije zahtijevala predobradu. 2×10^9 stanica (talog stanica) dodano je u jažicu ili u 400 μ l hranjive podloge. Uklanjanje RNA učinjeno je dodatkom RNaze (5 μ l RNaze A po mililitru pufera za eluaciju). Obrada uzorka za gram pozitivne bakterije započela je prikupljanjem do 2×10^9 stanica centrifugiranjem i resuspendiranjem staničnog taloga u 400 μ l TE pufera (20 mL 1M Tris + 4 mL 500 mM EDTA; pohranjeno u zamrzivaču). Nako toga slijedio je korak dodavanja 100 μ l lizozima koncentracije 25 mg/ml te inkubacija na 37 °C kroz dva sata. Poslje inkubacije cijeli uzorak je prenesen u jažicu. Uklanjanje RNA također se provodi dodatkom 5 μ l RNaze A po mililitru pufera za eluaciju. Daljnja obrada učinjena je prema zadanom protokolu za pokretanje Maxwell 16 te izborom programa ovisno o tipu kompleta za izolaciju. Sam postupak izolacije u Maxwell 16 uređaju trajao je 30 – 45 minuta. Prije analize uzorci mokraće temperirani su na sobnu temperaturu, te je 2 mL mokraće prebačeno u sterilne epruvetice, centrifugirano na 12000 okretaja kroz 6 minuta, te je odstranjeno 1,6 mL supernatante da bi se dobilo potrebnih 400 μ l taloga.

3.3.7. Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija izolata DNA izmjerena je BioSpec Nano spektrofotometrom. Volumen uzorka iznosio je 2 μ l, a kao slijepa proba služio je pufer za eluaciju iz Maxwell® 16 kita za izolaciju. Duljina puta iznosila je 0,7 mm. Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije DNA prikazani su u Rezultatima (Tablica 12.). Omjer apsorbancije pri 260 nm i 280 nm odnose se na kvalitetu DNA i RNA. Za DNA omjer 260/280 je od 1,7-1,9, a za RNA vrijedi omjer oko 2,0. Ako je omjer manji to ukazuje na prisutnost proteina, fenola ili drugih prisutnih kontaminacija. Kao dodatni kriterij koristi se omjer 260/230, a preporučene vrijednosti su u

rasponu od 2,0 - 2,2. Ako je omjer manji moguća je kontaminacija spojevima kao što su EDTA, ugljikohidrati i fenoli.

3.3.8. Sekvenciranje gena za 16S rRNA

Izolirana DNA iz uzoraka mokraće poslana je na sekvenciranje pružatelju usluga (MR DNA, Texas, SAD). Kao rezultat sekvenciranja dobiveni su sirovi podatci i protokol koji je korišten. V3 i V4 regije gena za 16S rRNA umnožene su u 30 ciklusa PCR-a pomoću početnica specifičnih za te regije. Koristio se HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, SAD) pod sljedećim uvjetima: 94 °C kroz 3 minute, zatim 28 ciklusa na 94 °C po 30 sekundi, 53 °C kroz 40 sekundi i 72 °C kroz 1 minutu, te krajnji korak elongacije na 72 °C, 5 minuta. Nakon amplifikacije provedena je provjera uspješnosti amplifikacije i intenzitet vrpce na 2 %-om agaroznom gelu. Više uzoraka skupljeno je zajedno, u jednakim omjerima, na temelju njihove molekulske mase i koncentracije DNA. Tako skupljeni uzorci pročišćeni su s Ampure XP kuglicama. Pročišćeni PCR produkti korišteni su za pripremu DNA knjižnice prateći Illumina TruSeq DNA protokol. Sekvenciranje se provodilo u MR DNA (Shallowater, TX, SAD) na MiSeq uređaju po uputama proizvođača. Svakom uzorku dodijeljen je nukleotidni, jedinstveni barkod što je omogućilo sekvenciranje više uzoraka odjednom. U ovom slučaju sekvenciranje je provedeno za 24 uzorka na jednoj ploči. MR DNA koristila je kraće početnice (50 pb barkod, i 20 pb početnice). Kasnije tijekom analize sekvence barkoda su uklonjene kako bi se dobila čista sekvenca DNA koja se koristila u daljnjim analizama. Kreirana je knjižnica svakog produkta u 5'-3' orijentaciji kao što je uobičajeno, ali i u 3'-5' orijentaciji.

Sirovi podaci nakon analize dobiveni su u fastq formatu, a MR DNA generira još nekoliko dokumenata u različitim formatima. Fastq podatci označeni su oznakom .fna (Slika 4. a), a QUAL podaci oznakom .qual (Slika 4. b). Dobiveni sirovi podatci u fastq formatu korišteni su u daljnjoj analizi pomoću QIIME programa.

3.3.9. Analiza podataka dobivenih DNA sekvenciranjem- QIIME

QIIME (engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) predstavlja bioinformatički alat kojim su analizirani sirovi podatci DNA sekvenciranja, te time dobivene informacije o urinarnom mikrobiomu. Koraci obrade dijele se u *upstream* i *downstream* korake. *Upstream* koraci služe za generiranje operativnih taksonomskih jedinica (engl. *Operational taxonomic unit*; Otu), dok *downstream* koraci služe za analizu i određivanje alfa i beta raznolikosti i njihovu vizualizaciju.

3.3.9.1. Pre-procesiranje

Analiza rezultata započeta je pre-procesiranjem. Prvi korak jest spajanje sljedova generiranih Illuminom. Spajanje sljedova je nužno jer *pair-end* metoda omogućava dobivanje duljih sekvenci do 600 pb. Metoda kojom su spajani sljedovi naziva se fastq-join. Kao krajnji rezultat dobivaju se dvije datoteke – fastqjoin.join.fna (FASTA format) i fastqjoin.join.qual (QUAL format).

Sljedeći korak uključivao je provjeru *mapping dokumenta* s svim informacijama o uzorku, početnicama i barkodu kako bi on bio kompatibilan s QIIME-om, odnosno kako bi se mogli poduzeti daljnji koraci u analizi. Zadnji korak pre-procesiranja bio je demultipleksiranje i filtriranje sekvenci. Učinjene su analize sekvenci koje zadovoljavaju postavljene zahtjeve kvalitete i preimenovanje svakoga niza nazivom uzorka čime su formirani podaci za *downstream* analizu. Sekvence uzoraka koji se ne nalaze u *mapping dokumentu* ili sekvence bez odgovarajuće početnice isključene su. Postavljeni su zahtjevi za minimalnu i maksimalnu duljinu sekvence od 200 do 1000 nukleotida. Postavljen je maksimalni broj od 6 nesigurnih baza, isto kao i maksimalna dužina homopolimera.

3.3.9.2. Analize raznolikosti

Analiza raznolikosti započeta je odabirom Otu-a, operativne definicije koja se koristi za razvrstavanje skupina usko povezanih podjedinaca. QIIME nudi tri protokola za taj odabir: *de novo*, *closed-reference* i *open-reference*. Odabran je *de novo* pristup u kojem su sljedovi grupirani međusobno, bez vanjske referentne skupine sekvenci. Prednost metode je grupiranje svih sljedova, a mana je dugotrajnost analize (ukoliko ima puno sljedova). Odabir Otu-a sastoji

se od više podkoraka i započinje svrstavanjem svih sekvenci svakog uzorka u Otu-e na temelju njihove odabrane sekvencijske sličnosti. U QIIME-u Otu-i predstavljaju klastere sekvenci, te određeni stupanj taksonomske srodnosti. Slijedi odabir reprezentativnog seta sekvenci iz svakog Otu-a za daljnje analize (taksonomska identifikacija Otu-a i filogenetsko poravnavanje). Rezultat je FASTA dokument `seqs_rep_set.fna` koji sadrži jednu reprezentativnu sekvencu po Otu-u.

Nakon toga slijedi poravnavanje reprezentativnih sekvenci odabranom metodom PyNAST u kojoj NAST algoritam poravnava svaku sekvencu s najboljom sekvencom iz već poravnane baze podataka referentnih sekvenci.

3.3.9.3. Alfa raznolikost

Alfa raznolikost predstavlja raznolikost unutar uzorka te opisuje bogatstvo vrsta ili nedostatak istih u jednom uzorku i može se odrediti pomoću QIIME programa. Određivanje alfa raznolikosti obuhvaća četiri koraka. Prvi uključuje stvaranje Otu tablica koje predstavljaju bazu za određivanje alfa raznolikosti. Time se ne dobivaju krivulje raznolikosti po broju sekvenci u uzorku, nego se kreira serija poduzorkovanih Otu tablica slučajnim uzorkovanjem iz glavne Otu tablice. Svi uzorci koji sadrže manje sekvenci od traženog broja izostavljeni su iz analize. Naredba generira brojne dokumente čiji broj ovisi o minimalnom i maksimalnom broju sekvenci po uzorku. Dokumenti su istog formata kao i ulazna Otu tablica.

Sljedeći korak određivanja alfa raznolikosti uključuje mjerenje raznolikosti za svaku Otu tablicu dobivenu u prethodnom koraku. QIIME nudi više od 20 različitih metrika za mjerenje raznolikosti, svaku sa svojim prednostima i manama. Naredba uključuje Otu tablice iz prethodnoga koraka, odabrane metrike i filogenetsko stablo. Dobiveni su dokumenti tablično prikazanoga tekstualnog oblika gdje je u stupcima predstavljena odabrana metrika, a u redovima uzorci i njihove pripadajuće raznolikosti.

Te su tablice temelj za predzadnji korak – razvrstavanje rezultata alfa raznolikosti. Cilj ove naredbe je povezivanje brojnih dokumenata u jedan kako bi se mogle generirati krivulje raznolikosti.

Zadnji korak je generiranje dijagrama za vizualizaciju alfa raznolikosti pomoću mapiranja dokumenta i tablica iz prethodnog koraka. Svaka krivulja predstavlja jedan uzorak te se ovim korakom olakšava usporedba raznolikosti.

3.3.9.4. Beta raznolikost

Beta raznolikost predstavlja komparaciju mikrobne zajednice, temeljenu na njezinom sastavu, između svih uzoraka u analizi. Temeljni rezultat određivanja beta raznolikosti je kvadratni, šuplji matriks u kojem je izračunata „udaljenost“ ili različitost između svakog uzorka. Dobiveni se podaci mogu vizualizirati analizom glavnih koordinata (engl. *Principal Coordinates Analysis*; PCoA). Za izračunavanje beta raznolikosti u QIIME-u korišten je uobičajen način mjerenja; UniFrac (76). Za određivanje raznolikosti korištena je naredba koja istovremeno obavlja sljedeće korake:

- `single_rarefaction.py`, korak koji modificira Otu tablice da bi se uklonila heterogenost u uzorcima. Ovaj korak služi za nasumičnu analizu istoga broja sekvenci iz svakoga uzorka, neovisno o tome koliko je sekvenci u pojedinom uzorku, da bi se postigla analiza zajednice na jednakom nivou,
- `beta_diversity.py`, koristi se za procjenjivanje beta raznolikosti pomoću *weighted unifrac* metode za kvantitativno mjerenje i *unweighted unifrac* metode za kvalitativno mjerenje raznolikosti,
- `principal_coordinates.py`, korak za usporedbu skupina uzoraka na temelju filogenetskoga stabla ili metrika udaljenosti baziranih na broju Otu-ova i
- `make_emperor.py`, zadnji korak koji generira *emperor* dijagrame (interaktivni alat za analiziranje, vizualizaciju i razumijevanje mikrobnih podataka) koji omogućavaju 3D vizualizaciju PCoA dijagama (77).

Naredba koja je provedena zahtijevala je Otu tablicu, filogenetsko stablo i mapirani dokument, te je izračunata beta raznolikost koja je generirana u 3D PCoA grafove.

3.3.9.5. Skripta *core diversity*

Skripta core diversity je završna analiza podataka koja se sastojala od objedinjavanja QIIME analiziranih podataka. Ovom analizom mapirani su dokumenati i filogenetsko stablo.

3.3.10. Statistički model BEEM

BEEM (engl. *Biomass Estimation and model inference with an Expectation Maximization algorithm*) statički je algoritam koji je korišten u svrhu zaključivanja o modelu

mikrobne zajednice, a temelji se na podacima sekvenciranje gena za 16S rRNA. BEEM-*static* na osnovu R vrijednosti daje informaciju o mikrobnim interakcijama iz presječnih podataka profiliranja mikrobioma na temelju generaliziranoga modela Lotka-Volterra (gLVM). Proširujući osnovnu ideju izvornoga BEEM algoritma za longitudinalne podatke, BEEM-*static* izravno radi s relativnom biomasom kako bi objedinio procjenu ukupne biomase eliminirajući tako potrebu za eksperimentalnom kvantifikacijom apsolutnih količina.

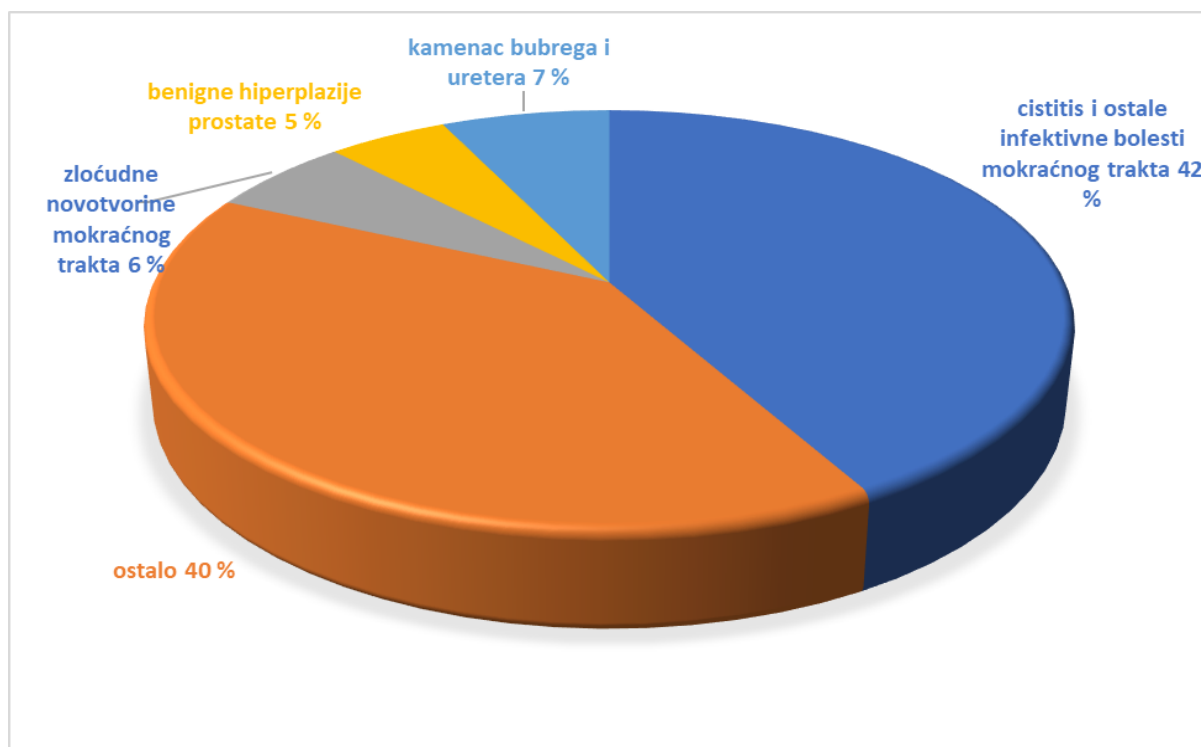
4. RESULTATI

4.1. Razdioba etioloških čimbenika uroloških infekcija

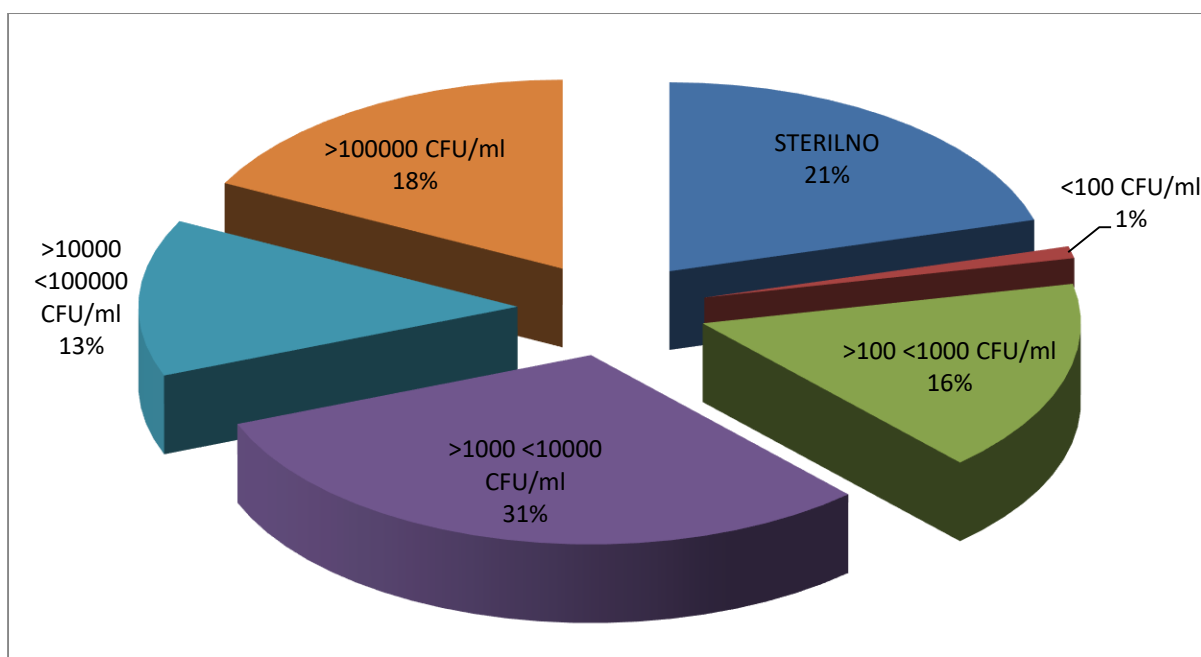
U prvoj fazi prikupljeno je 279 uzoraka koji su grupirani u skupine prema kvantitativnom i kvalitativnom mikrobiološkom nalazu. Sterilnih uzoraka bilo je 59 (21 %), uzoraka s $> 10^5$ CFU/ml 69 (19 %), s $> 10^4$ CFU/ml 107 (38 %), a s $< 10^4$ CFU/ml 113 (41%). Sterilni uzorci korišteni su kao negativna kontrola, a uzorci s $< 10^4$ CFU/ml (podijeljeni u podskupine ovisno o koncentraciji) u svrhu ispitivanja osjetljivosti metode.

Prva serija uzoraka podijeljena je prema:

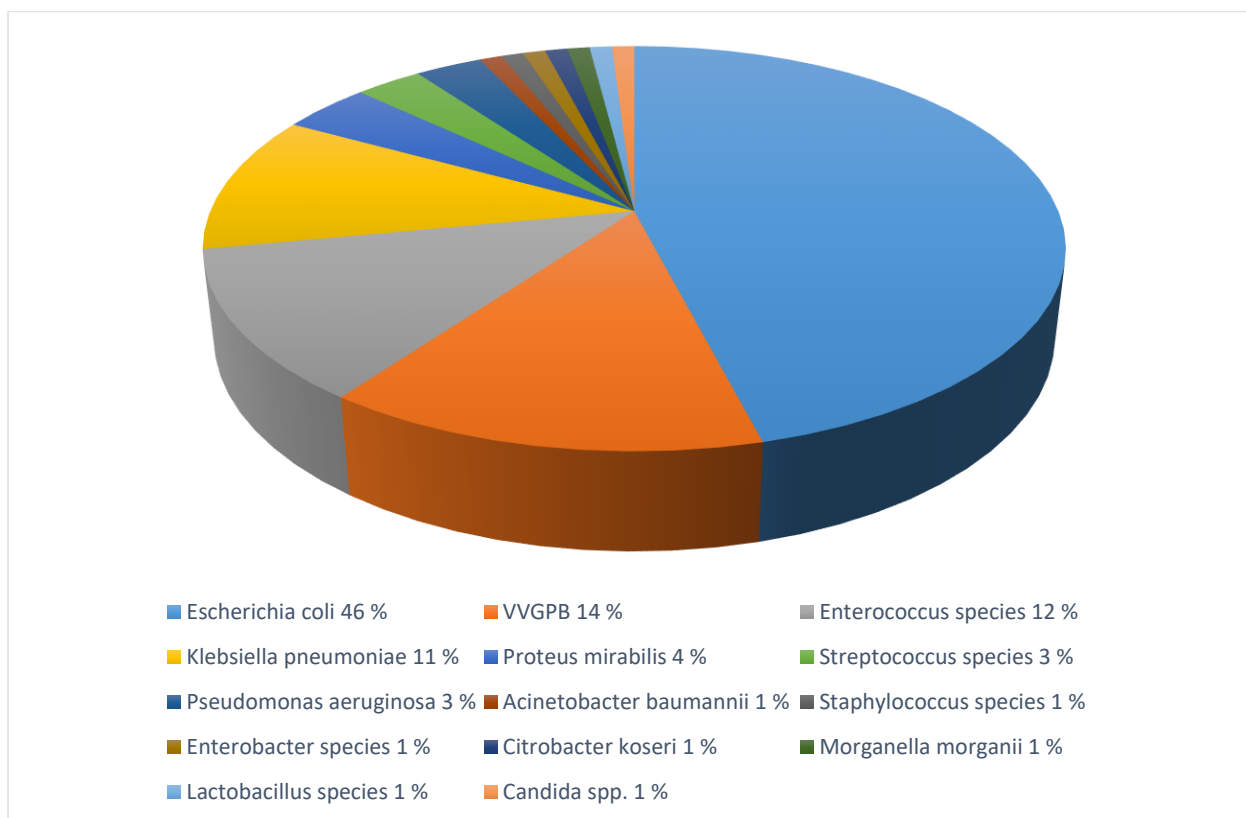
- uputnim dijagnozama
- koncentraciji CFU/ml
- učestalosti prisustva mikroorganizama u uzorcima s $> 10^4$ CFU/ml
- razdiobi značajnosti prisustva mikrororganizma.



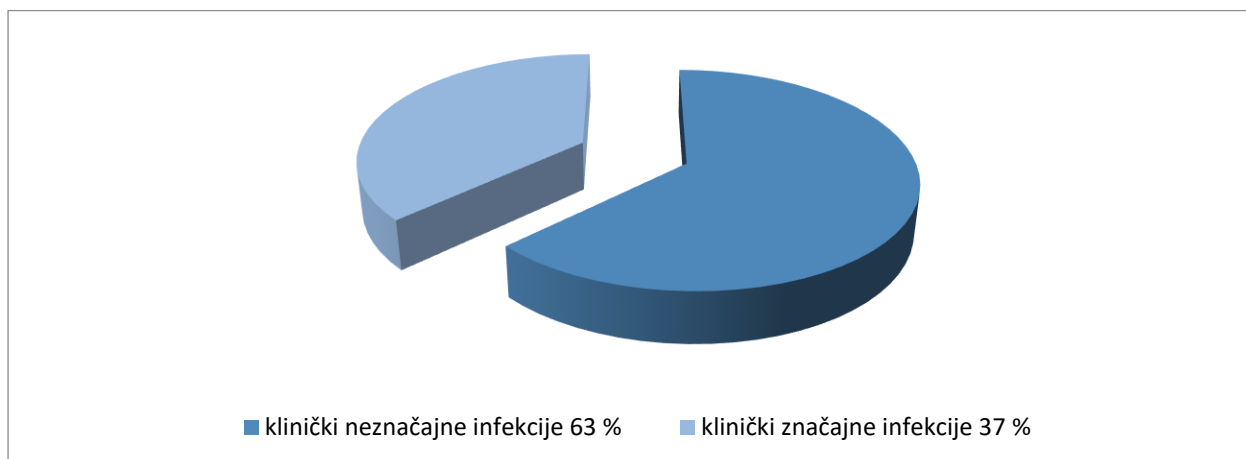
Slika 5. Razdioba uzoraka prema uputnim dijagnozama



Slika 6. Razdioba uzoraka prema koncentraciji mikroorganizama u mokraći



Slika 7. Razdioba uzoraka prema učestalosti prisustva mikroorganizama u uzorcima s $>10^4$ CFU/ml



Slika 8. Razdioba značajnosti prisustva mikrororganizma (klinički neznačajne; $<10^3$ CFU/mL *E. coli* i $<10^4$ CFU/mL ostalih uropatogena; klinički značajne; $>10^3$ CFU/mL *E. coli* i $>10^4$ CFU/mL ostalih uropatogena)

4.2. Standardna mikrobiološka analiza uzoraka mokraće/urinokultura

Postupak prikupljanja uzoraka detaljno je opisan u materijalima i metodama. Tablica 1. i Tablica 2. daju popis uzoraka druge i treće faze prikupljanja.

Tablica 1.

LAB broj	KVALITATIVNI NALAZ	CFU/mL	Rezistencija
42830	<i>Acinetobacter baumannii</i>	> 100000	gentamicin, amikacin, ciprofloksacin
40181	<i>Citrobacter freundii</i>	> 100000	ampicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina, cefaleksin
41492	<i>Enterobacter cloacae</i>	> 100000	ampicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina, cefaleksin
40296	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
42359	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
42567	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
42792	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
43072	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
39057	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
39063	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
39076	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	/
40225	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38324	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38368	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38369	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38371	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38386	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38530	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38535	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
38590	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	ampicilin, gentamicin, ciprofloksacin, norfloksacin, sulfametoksazol+ trimetoprim
38619	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	/
39928	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	ampicilin
41994	<i>Escherichia coli</i> ESBL	> 100000	ampicilin, cefaleksin, cefuroksim, ceftazidim, cefpodoksim, cefiksim, ciprofloksacin, norfloksacin,
42442	<i>Klebsiella oxytoca</i>	> 100000	ampicilin

4. REZULTATI

42545	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin, amoksisicilin + klavulanska kiselina, piperacilin + tazobactam, ertapenem, ciprofloksacin, sulfametoksazol + trimetoprim
41959	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin, sulfametoksazol + trimetoprim
42906	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin
38373	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin
38384	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin
39768	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	ampicilin
39692	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	ampicilin, cefuroksim, ceftazidim, cefriakson, cefepim, cefiksim, ciprofloksacin, norfloksacin, sulfametoksazol + trimetoprim
39817	<i>Morganella morganii</i>	> 100000	ampicilin, amoksisicilin + klavulanska kiselina, cefaleksin, cefiksim, ciprofloksacin, norfloksacin, sulfametoksazol + trimetoprim
42061	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	/
42626	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	/
41494	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	ampicilin, sulfametoksazol + trimetoprim
42209	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	sulfametoksazol + trimetoprim
42970	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	/
39993	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	imipenem + cilastatin
41941	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	/
42236	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	/
39059	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	ciprofloksacin, levofloksacin
39801	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	/
42344	<i>Serratia marcescens</i>	> 100000	ampicilin,-amoksisicilin+ klavulanska kiselina
42266	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupa B)	> 100000	/

Tablica 2.

LAB. broj	KVALITATIVNI NALAZ	CFU/ml	Rezistencija
34622	<i>Escherichia coli</i>	>100000	ampicilin
34497	<i>Escherichia coli</i>	>100000	ampicilin
34506	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34559	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100000	ceftazidim, cefepim, ciprofloksacin, levofloksacin

4. REZULTATI

34578	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	>100000	ampicilin, ceftazidim, cefuroksim, cefaleksin, ceftriakson, cefiksim, gentamicin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin, sulfametoksazol+trimetoprim
34682	<i>Klebsiella oxytoca</i>	>100000	ampicilin
34687	<i>Enterococcus faecalis</i>	>100000	/
34706	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34729	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34731	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34744	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34747	<i>Escherichiacoli</i> , <i>Candida species</i>	>100000; >1000<10000	ampicilin, sulfametoksazol+trimetoprim
34748	<i>Escherichia coli</i>	>100000	ampicilin, sulfametoksazol+trimetoprim
34927	<i>Escherichia coli</i>	>100000	ampicilin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin
34933	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34941	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34942	<i>Escherichia coli</i>	>100000	ampicilin, gentamicin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin, sulfametoksazol+trimetoprim
34950	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	>100000	ampicilin, ceftazidim, cefuroksim, cefaleksin, ceftriakson, cefiksim, cefepim, gentamicin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin, sulfametoksazol+trimetoprim, ceftibuten
34965	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
34966	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100000	/
35086	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35102	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35115	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35120	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35124	<i>Escherichia coli</i> ESBL	>100000	ampicilin, cefaleksin, cefuroksim, ceftriakson, cefepim, ceftibuten, ciprofloksacin, sulfametoksazol+trimetoprim, norfloksacin, levofloksacin,
35131	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35137	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35166	<i>Enterococcus faecalis</i>	>100000	ciprofloksacin
35167	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/

35181	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35261	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35267	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35272	<i>Escherichia coli</i>	>100000	sulfametoksazol+trimetoprim
35284	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
35300	<i>Escherichia coli</i>	>100000	/
40631	<i>Enterococcus faecalis</i>	>100000	
40727	<i>Enterococcus faecalis</i>	>100000	/
40748	<i>Proteus mirabilis</i>	>100000	/
41025	<i>Proteus mirabilis</i>	>100000	/

4.3. Fizikalno-kemijski pregled mokraće

Tablica 3. Rezultati SUK-a (vrsta i koncentracija mikroorganizama) uz rezultate fizikalno-kemijske analize mokraće

N.o.	Identificirana vrsta (urinokultura)	CFU/mL	Leukociti	Nitriti	Urobilinogen	Proteini	pH	Hemoglobin
UR1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	++	-	-	+++	8,5	-
UR2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	> 100000	-	+	-	++	8,5	-
UR3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	+	+	-	+	8	+++
UR4	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	++	+	-	++	8	+++
UR5	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	-	-	-	-	7	-
UR6	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	-	-	-	-	7,5	+
UR7	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL	> 100000	++	-	-	++	8	+++
UR8	<i>Citrobacter koseri</i>	> 100000	-	-	-	+	6	-
UR9	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	-	-	-	++	8,5	-
UR10	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	++	++	-	-	8,5	-
UR11	<i>Escherichia coli</i> ;	> 100000;	-	-	-	+	8	++
	<i>Proteus mirabilis</i> ESBL	> 100000;						

4. REZULTATI

UR12	<i>Proteus mirabilis</i>	>100000	++	-	-	+++	7	-
UR13	<i>Enterobacter aerogenes</i>	> 100000	++	-	-	-	5	-
UR14	<i>Enterobacter cloacae</i>	> 100000	++	++	-	++	6,5	+++
UR15	<i>Enterobacter cloacae</i> ;	10000;	-	-	-	++	7,5	+++
	<i>Enterococcus faecalis</i> ;	> 10000						
	<i>E coli</i> ;	< 100000;						
	<i>Proteus mirabilis</i>	100000;						
		> 100000;						
UR16	<i>Escherichia coli</i> ;	>100000;	++	-	-	+	6	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100000						

Urinske test trake dale su pozitivnu reakciju nitrita u 5/16 (31 %), leukocita u 9/16 (56 %) te proteina u 7/16 (44 %) uzoraka s dokazanom bakteriurijom $>10^5$ CFU/ml. Kombiniranjem pozitivne reakcije na nitrite ili leukocite osjetljivost trake u dijagnostici IMS-a povećana je na 10/16 (63 %).

4.4. Klasifikacija najčešćih rezistencija uropatogena

Tablica 4. Rezistencija najčešćih uropatogena ispitana na 83 uzorka

KVALITATIVNI NALAZ	Br.	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	
gentamicin,	1	100
amikacin,	1	100
ciprofloksacin	1	100
<i>Citrobacter freundii</i>	1	
ampicilin,	1	100
amoksisicilin + klavulanska kiselina,	1	100
cefaleksin	1	100
<i>Enterobacter cloacea</i>	1	
ampicilin,	1	100
amoksisicilin + klavulanska cefaleksin	1	100
	1	

<i>Enterococcus faecalis</i>	8	
ciprofloksacin	1	12
<i>Escherichia coli</i>	31	
ampicilin,	8	26
gentamicin,	2	6
ciprofloksacin,	4	13
norfloksacin,	5	16
sulfametoksazol + trimetoprim	6	19
cefaleksin,	2	6
cefuroksim,	2	6
ceftazidim,	1	3
cefpodoksim,	1	3
cefiksim,	1	3
levofloksacin	3	9
<i>Klebsiella spp.</i>	11	
ampicilin	11	100
amoksisicilin + klavulanska	1	9
piperacilin + tazobactam,	1	9
ertapenem,	1	9
ciprofloksacin,	4	36
sulfametoksazol + trimetoprim	5	45
cefepim	1	9
cefuroksim	3	27
ceftazdim	3	27
ceftriakson	2	18
cefiksim	2	18
cefaleksin	2	18
ceftibuten	1	9
gentamicin	1	9
norfloksacin	4	36
<i>Morganella morganii</i>	1	
ampicilin,	1	100
amoksisicilin + klavulanska	1	100
cefaleksin,	1	100
cefiksim,	1	100
ciprofloksacin,	1	100
norfloksacin,	1	100
sulfametoksazol + trimetoprim	1	100
<i>Proteus mirabilis</i>	7	
ampicilin,	1	13
sulfametoksazol + trimetoprim	2	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	
imipenem+cilastatin	1	17
ciprofloksacin	2	33
levofloksacin	2	33
ceftazidim	1	17
cefepim	1	17

<i>Serratia marcescens</i>	1	
ampicilin	1	100
amoksicilin + klavulanska	1	100
<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupa B)	1	
		-

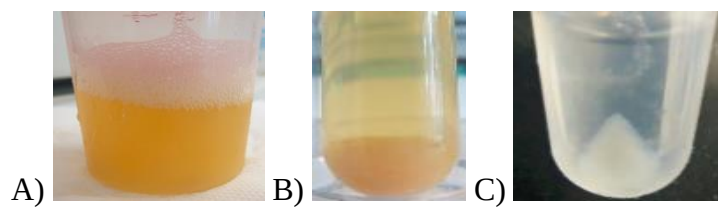
Podatci 83 ispitana izolata mokraće pokazuju 19 % *E. coli* rezistentnih na kotrimoksazol (sulfametoksazol + trimetoprim), 20 % na ampicilin i 16 % na fluorokinolone (ciprofloksacin 13 %, norfloksacin 16 %; levofloksacin 9 %), te na cefaleksin 3 % i cefuroksim 3 %. Od ukupno 31 *E. coli* dvije (6 %) su bile ESBL-producirajući sojevi. Od 11 *Klebsiella* spp. 3 (27 %) su bile ESBL-producirajući sojevi. 36 % *Klebsiella* spp. pokazala je rezistenciju na kotrimoksazol, 36 % na ciprofloksacin i norfloksacin, 9 % na amoksicilin + klavulansku kiselinu, 9 % na piperacilin+tazobactam, 27 % na cefuroksim i ceftazidim.

4.5. Priprema uzoraka mokraće za proteomsku analizu

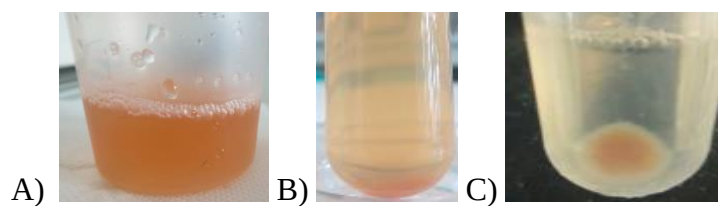
4.5.1. Utjecaj skladištenja i temperature na uzorke

U preliminarnoj fazi istraživanja ispitan je utjecaj pohrane uzoraka na dvije temperature, -20 °C i -80 °C. Zaključci o optimalnoj temperaturi skladištenja uzoraka utemeljeni su na vizualnom pregledu količine taloga nakon centrifugiranja i analizi probnih uzoraka. U slučaju uzoraka mokraća pohranjenih na -80 °C zabilježeni su manji prinosi taloga bakterijskih stanica, te se pokazalo da dobivena količina taloga nije bila dovoljna za metodu pripreme uzoraka s B-PER-om. S druge strane, uzorci pohranjeni na -20 °C nakon pripreme davali su vidljive količine biomase, što je kasnije potvrđeno i proteomskom analizom istih uzoraka (78).

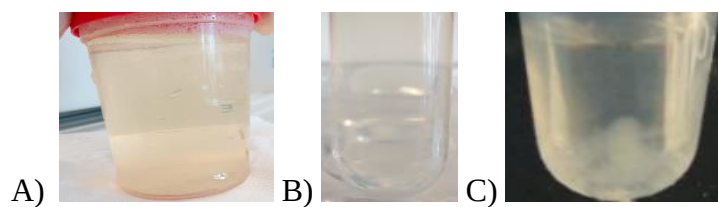
UR1



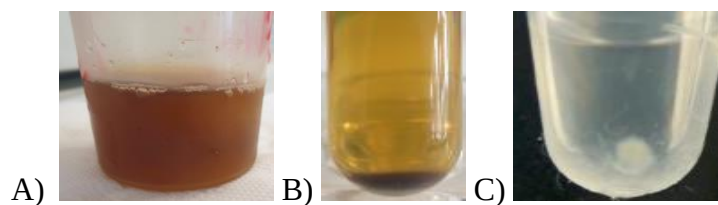
UR2



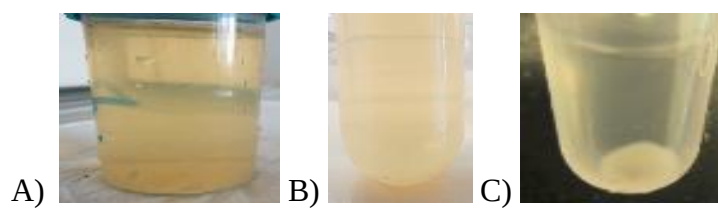
UR3



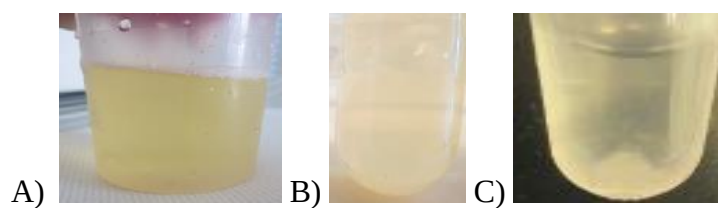
UR4



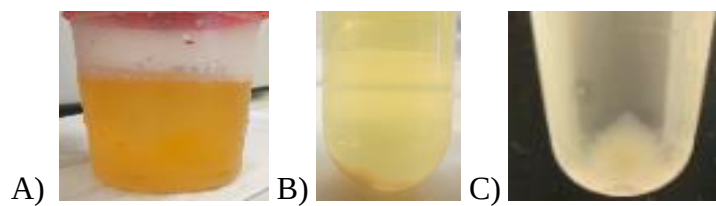
UR5



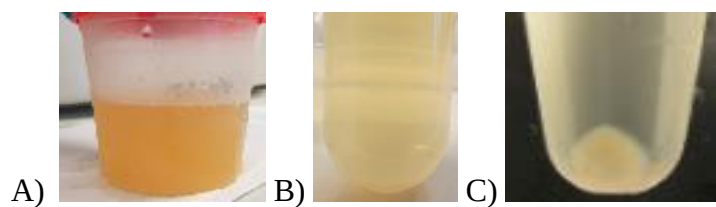
UR6



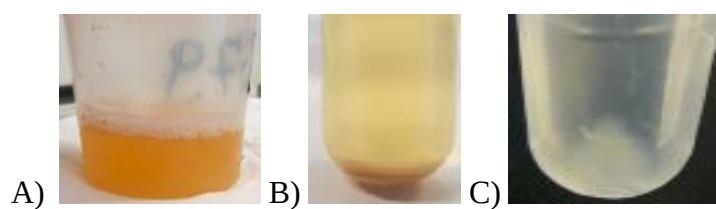
UR7



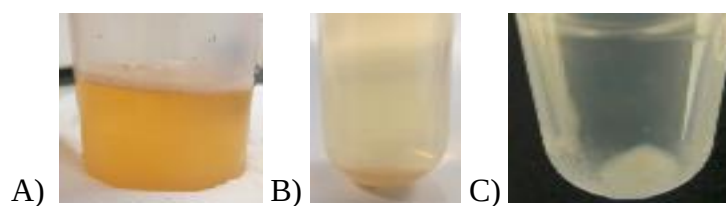
UR8



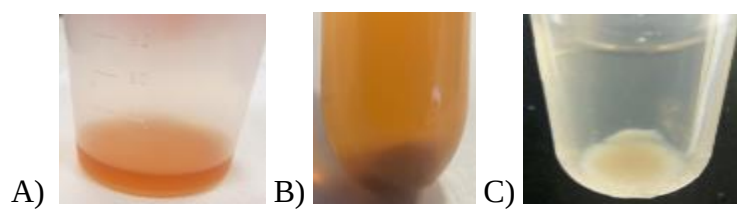
UR9



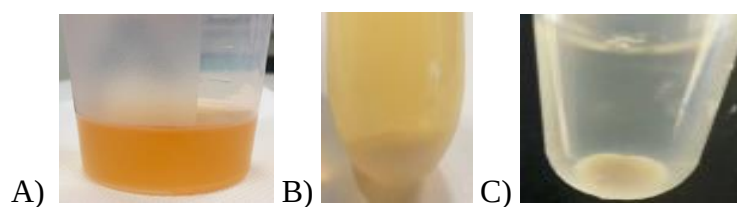
UR10



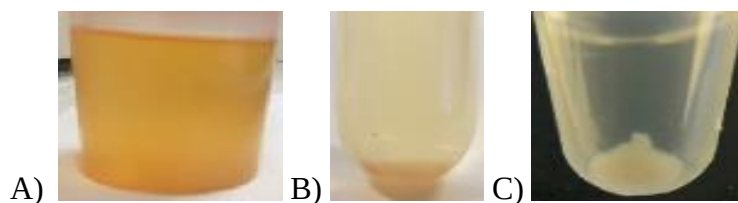
UR11



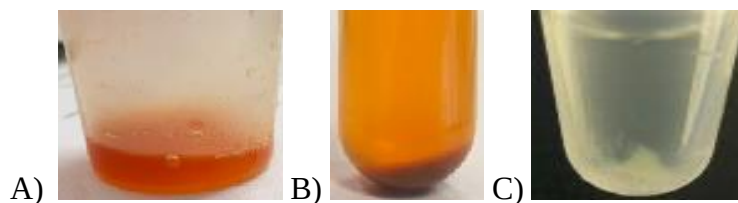
UR12



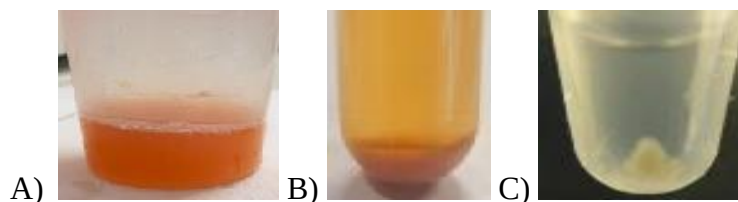
UR13



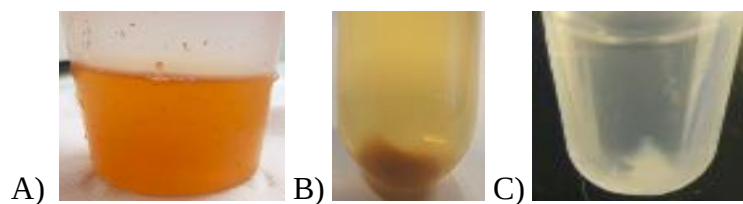
UR14



UR15



UR16



Slika 9. Uzorci mokraće: Prikupljeni uzorci mokraće (A), talog dobiven centrifugiranjem uzoraka mokraće (B), talog u B-PER-u (prije homogenizacije ultrazvučnom sondom) (C)

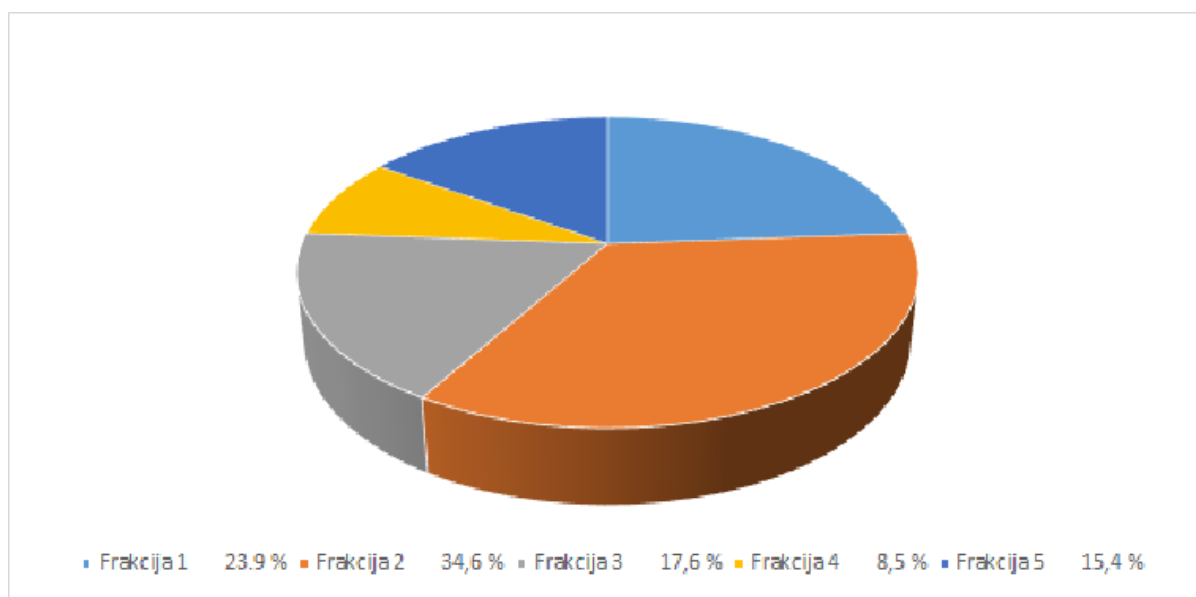
4.5.2. Izdvajanje bakterijske biomase

U ovom istraživanju optimizirana je izolacija bakterijske biomase početnoga uzorka mokraće diferencijalnim centrifugiranjem i ispiranjem nečistoća puferom. Optimalna provedena metoda izdvajanja i pročišćavanja opisana je u Materijalima i metodama (3.3.4.1. i 3.3.5.1.).

4.5.3. Frakcioniranje peptida

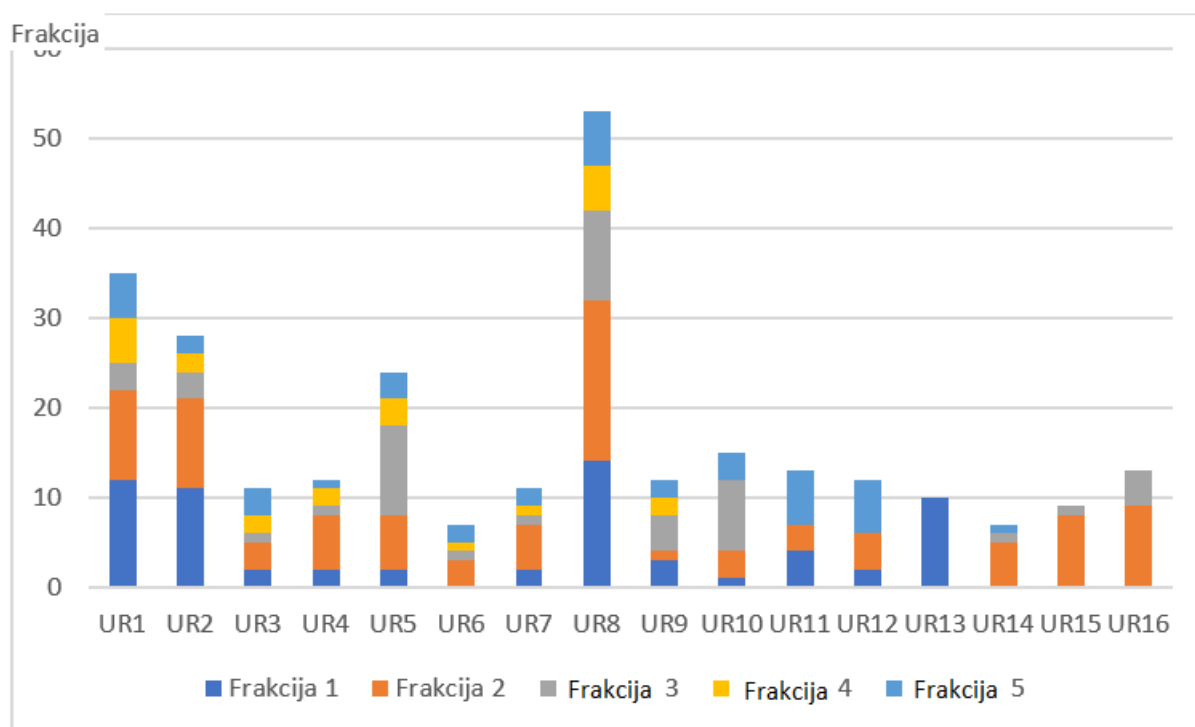
Tijekom istraživanja pokazalo se da broj analizom dobivenih peptida po jednom uzorku, nije bio dovoljan za identifikaciju uropatogena MALDI-TOF/TOF metodom. Prema

tome bilo je potrebno povećati broj identificiranih peptida. Poslije preliminarnih istraživanja problem je riješen frakcioniranjem uzorka uporabom platforme Agilent Bravo. Platforma se pokazala vrlo korisnom jer je povećan broj frakcija po jednom uzorku, od 1 na 6. U početku je korišteno svih šest frakcija, a kasnije je 6. frakcija izostavljena iz daljnjih analiza. Frakcioniranjem peptida povećan je ukupan broj detektiranih peptida, a time i broj proteina, što je u konačnici poboljšalo identifikaciju mikroorganizama.



Slika 10. Udio proteina pojedine frakcije u ukupnom broju proteina

Kod *de novo* proteinske identifikacije uropatogena 6 već opisanih frakcija dodatno je frakcionirano do ukupno 36 frakcija 2D tekućinskom kromatografijom, također uporabom platforme Agilent Bravo.



Slika 11. Broj proteina po frakciji za pojedini uzorak

4.6. Ispitivanje osjetljivosti metode

Osjetljivost metode ispitana je koncentracijskim slijedom uzoraka koji su mikrobiološkim metodama klasificirani u koncentracijske razrede prema CFU/ml. Za eksperiment su izdvojena po 3 uzoraka svakog razreda (<1000 CFU/ml, >1000 <10000 CFU/ml, >10000 <100000 CFU/ml i ≥ 100000 CFU/ml). Tek je na uzorcima s ≥ 100000 CFU/ml izolirana bakterijska biomasa i uspješno provedena proteomska analiza. Pokazalo se da je proteomska analiza limitirana početnom koncentracijom bakterija u uzorku (CFU/ml), nemogućnošću potpunog uklanjanja ljudskih proteina iz uzoraka, brojem peptida po frakciji, te brojem proteina dobivenih analizom potrebnih za identifikaciju.

4.7. Proteomska identifikacija bakterija i Mascot analiza podataka

Kako je ranije navedeno bioinformatička se analiza oslanja na identifikaciju peptidnih fragmenata (MS/MS spektara) koji su identificirani računalnim programom Mascot. Određivanje bakterijskih vrsta provedena je prvo pretragom na koljeno *Firmicutes*, a zatim na

Proteobacteria. Kod rangiranja dobivenih zbirnih rezultata (engl. $\sum$ Score) korištena je normirana vrijednost zbroja Mascot rezultata (engl. *Mascot summa score*). Mikroorganizam na vrhu liste uzet je kao relevantan rezultat i nadalje ga se navodi kao uropatogen identificiran proteomskom metodom. Identificirani bakterijski proteini poredani po zbirnom rezultatu i po uzorcima navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5. Mascot *summa score* identifikacija bakterijskih proteina za 16 pojedinačnih uzoraka mokraće

UR1 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakterija
1	YP_002920498.1	membranski protein, porin C	4	40008	830	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	4	8381	483	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	ACM07444.1	porin OmpK36	1	39854	274	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	1006243A	mutirani lipoprotein	1	8265	233	<i>Escherichia coli</i>
5	YP_001334652.1	A membranski protein	2	38021	203	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	WP_004133882.1	membranski protein, porin C	1	40676	198	<i>Klebsiella oxytoca</i>
7	WP_016189672.1	piruvat formijat liaza	1	85234	147	<i>Erwinia tracheiphila</i>
8	YP_001334597.1	formiat acetiltransferaza 1	1	85092	144	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	2K0L_A	Nmr transmembranska domena A membranskog proteina, lanac A,	1	23355	141	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	YP_007872516.1	Membranski protein, porin C	1	40486	13 3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
11	WP_016809062.1	membranski protein, porin C	1	/	102	<i>Klebsiella oxytoca</i>
12	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	100	<i>Serratia marcescens</i>
13	AAD32649.1	čimbenik istezanja Tu	1	39423	96	<i>Coxiella burnetii</i>
14	YP_007504946.1	piruvat - formiat liaza	1	85227	93	<i>Morganella morganii</i>
15	WP_006820044.1	membranski protein, porin C	1	/	77	<i>Yokenella regensburgei</i>
16	WP_006707774.1	murein lipoprotein	1	8805	75	<i>Candidatus Regiella insecticola</i>
17	ABS84845.1	čimbenik istezanja Tu	1	21970	73	<i>Bacillus subtilis</i>
18	NP_872680.1	čimbenik istezanja Tu	1	43400	73	<i>Haemophilus ducreyi</i>
19	NP_299905.1	čimbenik istezanja Tu	1	42849	70	<i>Xylella fastidiosa</i>
20	YP_001453698.1	F membranski protein	1	/	67	<i>Citrobacter koseri</i>
21	NP_667815.1	čimbenik istezanja Tu	1	/	67	<i>Yersinia pestis</i>
22	P09146.1	A membranski protein	1	37552	67	<i>Klebsiella aerogenes</i>

4. REZULTATI

23	YP_003755150.1	prekursor translacijskoga elongacijskoga faktora Tu	1	/	65	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>
24	YP_001334418.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18851	64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	YP_004393584.1	glavni membranski protein OmpAII	1	/	64	<i>Aeromonas veronii</i>
26	NP_455305.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18853	64	<i>Salmonella enterica</i>
27	NP_669338.1	bifunkcionalna acetaldehid- CoA/alkohol dehidrogenaza	1	96527	64	<i>Yersinia pestis</i>
28	YP_001335857.1	bifunkcionalna acetaldehid- CoA/alkohol dehidrogenaza	1	95834	62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

UR2 uзорak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_001338507.1	molekularni pratitelj	3	21493	372	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	2	8381	289	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	WP_000350438.1	protein toplinskoga šoka Hsp20	2	21465	253	<i>Escherichia coli</i>
4	1006243A	mutirani lipoprotein	1	8265	227	<i>Escherichia coli</i>
5	WP_004103993.1	membranski protein porin C	1	40047	196	<i>Klebsiella oxytoca</i>
6	EWf64901.1	membranski protein, porin CC	1	40621	185	<i>Klebsiella oxytoca</i>
7	WP_004133882.1	membranski porin	1	40676	174	<i>Klebsiella oxytoca</i>
8	YP_002920498.1	membranski protein porin C	1	40008	159	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	YP_005018909.1	membranski lipoprotein povezan s	1	18833	116	<i>Klebsiella oxytoca</i>
10	WP_016809062.1	membranski protein porin C	1	41545	110	<i>Klebsiella oxytoca</i>
11	YP_001334652.1	A membranski protein	1	38021	98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	P09146.1	A membranski protein	1	37552	98	<i>Klebsiella aerogenes</i>
13	YP_004393584.1	glavni membranski protein OmpAII	1	/	95	<i>Aeromonas veronii</i>
14	ABM66811.1	OmpE36	1	40538	86	<i>Enterobacter aerogenes</i>

4. REZULTATI

15	WP_006820044.1	membranski protein porin C	1	40792	81	<i>Yokenella regensburgei</i>
16	YP_005016763.1	hipotetski protein KOX_03925	1	15018	76	<i>Klebsiella oxytoca</i>
17	YP_001175110.1	S6, 30S ribosomski protein	1	15096	74	<i>Enterobacter sp.</i>
18	AAL56004.1	GroEL	1	52000	73	<i>Escherichia coli</i>
19	YP_001453698.1	F membranski protein	1	/	70	<i>Citrobacter koseri</i>
20	YP_004517370.1	tiodedoksin	1	11419	65	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
21	YP_960652.1	protein toplinskog šoka Hsp20	1	21458	62	<i>Marinobacter aquaeolei</i>
22	P02938.1	murein lipoprotein	1	8234	62	<i>Serratia marcescens</i>

UR3 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_001335857.1	bifunkcionalna acetaldehid- CoA/alkohol dehidrogenaza	3	95834	308	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	187	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	1006243A	mutirani lipoprotein	1	8265	187	<i>Escherichia coli</i>
4	WP_006777698.1	glavni membranski protein	1	11702	142	<i>Salmonella enterica</i>
5	YP_001177024.1	bifunkcionalna acetaldehid- CoA/alkohol dehidrogenaza	1	96203	74	<i>Enterobacter sp.</i>
6	ERE53009.1	djelomični 30S ribosomski protein, S2	1	25562	67	<i>Enterococcus gallinarum</i>
7	BAA32342.1	S2, ribosomski protein	1	31289	67	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	YP_001334860.1	gliceraldehid-3-fosfat- dehidrogenaza	1	35449	65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	YP_007344897.1	alkohol-dehidrogenaza; klasa 4	1	95701	64	<i>Serratia marcescens</i>

UR4 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	WP_004244438.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	19482	263	<i>Proteus mirabilis</i>
2	YP_002150530.1	porin vanjske membrane	2	40796	18 5	<i>Proteus mirabilis</i>

4. REZULTATI

3	YP_002150547.1	A membranski protein	2	38994	146	<i>Proteus mirabilis</i>
4	WP_017827341.1	membranski protein porin C	1	41648	106	<i>Proteus mirabilis</i>
5	YP_001334418.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18851	89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	NP_455305.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18853	89	<i>Salmonella enterica</i>
7	YP_002987255.1	porin Gram-negativni tip	1	39618	71	<i>Dickeya dadantii</i>
8	WP_022633981.1	membranski porin 1a	1	40140	69	<i>Dickeya</i>
9	WP_004256113.1	membrane protein	1	39141	69	<i>Providencia rettgeri</i>
10	ADO64273.1	porin 1	1	41193	69	<i>Providencia stuartii</i>

UR5 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	NP_815088.1	stresni protein toplinskoga šoka	3	7181	267	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	NP_814901.1	50S ribosomski protein L31	2	10119	240	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	NP_814526.1	protein hladnoga šoka	1	7109	136	<i>Enterococcus faecalis</i>
4	NP_814417.1	hipotetski protein EF0665	2	6666	132	<i>Enterococcus faecalis</i>
5	BAI53110.1	čimbenik istezanja Tu	1	28690	91	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
6	AAF17305.1	pretpostavljeni čimbenik istezanja Tu	1	27433	91	<i>Enterococcus avium</i>
7	ABS84849.1	translacijski čimbenik istezanja Tu	1	21843	91	<i>Serratia rubidaea</i>
8	NP_814237.1	OsmC/Ohr porodica proteina	1	14371	90	<i>Enterococcus faecalis</i>
9	WP_016173398.1	opći protein stresa	1	22194	86	<i>Enterococcus dispar</i>
10	NP_813885.1	gls24 protein	1	20540	86	<i>Enterococcus faecalis</i>
11	NP_267752.1	50S ribosomski protein L31	1	/	83	<i>Lactococcus lactis</i>
12	EUJ37103.1	protein koji sadrži domenu koja veže DNK hladnoga šoka	1	7459	74	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
13	WP_010765440.1	hipotetski protein	1	7260	70	<i>Enterococcus moraviensis</i>
14	EUK53620.1	50S ribosomski protein L31, tip B	1	/	68	<i>Staphylococcus aureus</i>

4. REZULTATI

15	NP_372644.1	50S ribosomski protein L31	1	/	68	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	NP_815637.1	enolaza	1	46482	67	<i>Enterococcus faecalis</i>
17	NP_816504.1	acil nosač protein	1	8610	67	<i>Enterococcus faecalis</i>
18	NP_816831.1	Dps porodica proteina	1	17877	67	<i>Enterococcus faecalis</i>
19	WP_002568043.1	protein hladnoga šoka	1	7270	66	<i>Clostridium</i>
20	WP_002586010.1	protein hladnoga šoka	1	7305	66	<i>Clostridium</i>

UR6 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	NP_814526.1	vezna domena proteina na DNK hladnoga šoka	4	7109	497	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	NP_815088.1	vezna domena proteina na DNK hladnoga šoka	2	7181	142	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	AAC80242.1	glavni protein hladnoga šoka	1	4967	88	<i>Enterococcus faecalis</i>

UR7 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	P24016.1	A membranski protein	3	25648	283	<i>Citrobacter freundii</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	208	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	1006243A	mutirani lipoprotein	1	8265	208	<i>Escherichia coli</i>
4	YP_049963.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8396	148	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
5	AHF77098.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8327	148	<i>Sodalis sp.</i>
6	WP_007664753.1	prekursor A, membranski protein	1	38294	113	<i>Cronobacter condimenti</i>
7	AAA24807.1	djelomični membranski protein II vanjskog dijela membrane	1	25538	113	<i>Enterobacter aerogenes</i>
8	ERE53009.1	djelomični 30S ribosomski protein, S2	1	25562	72	<i>Enterococcus gallinarum</i>
9	BAA32342.1	ribosomski protein S2	1	31289	72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

UR8 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	P24016.1	A membranski protein, , membranski protein II	3	25648	391	<i>Citrobacter freundii</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	2	8381	290	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	YP_001452149.1	membranski protein, porin C	2	40804	242	<i>Citrobacter koseri</i>
4	1006243A	mutirani lipoprotein	1	8265	204	<i>Escherichia coli</i>
5	YP_001334418.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	2	18851	165	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	YP_001337990.1	50S ribosomski protein L7 / L12	1	12334	163	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	NP_290617.1	50S ribosomski protein L7 / L12	1	12288	163	<i>Escherichia coli</i>
8	WP_002438624.1	50S ribosomski protein L7 / L12	1	12334	151	<i>Escherichia hermannii</i>
9	YP_049963.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8396	146	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
10	AHF77098.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8327	146	<i>Sodalis sp.</i>
11	WP_002438592.1	fosfoporinski protein E vanjska membrana	1	38178	143	<i>Escherichia hermannii</i>
12	WP_023490706.1	50S ribosomski protein L7/L12	1	12320	139	<i>Serratia sp.</i>
13	YP_001453952.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18655	132	<i>Citrobacter koseri</i>
14	YP_001570436.1	hipotetski protein SARI_01396	1	41232	124	<i>Salmonella enterica</i>
15	NP_456260.1	stresni protein toplinskoga šoka	1	17671	113	<i>Salmonella enterica</i>
16	YP_005196338.1	membranski protein F	1	/	112	<i>Pantoea ananatis</i>
17	AAQ96078.1	protein II vanjske membrane	1	17424	108	<i>Hafnia alvei</i>
18	YP_001455345.1	hipotetski protein CKO_03833	1	85023	106	<i>Citrobacter koseri</i>
19	ERE43463.1	podjedinica C alkil- hidroperoksid-reduktaze	1	20509	91	<i>Enterococcus gallinarum</i>

20	NP_455184.1	protein c22 alkil- hidroperoksid-reduktaze	1	20734	91	<i>Salmonella enterica</i>
21	NP_455305.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18853	88	<i>Salmonella enterica</i>
22	ADK27722.1	F membranski protein	1	/	86	<i>Yersinia aldovae</i>
23	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	86	<i>Serratia marcescens</i>
24	YP_003883508.1	F membranski protein	1	39421	85	<i>Dickeya dadantii</i>
25	YP_001336542.1	autonomni kofaktor glicil- radikala GrcA	1	14234	84	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
26	P18953.2	autonomni kofaktor-glicil- radikala	1	14366	84	<i>Serratia liquefaciens</i>
27	NP_460044.1	membranski protein A	1	37492	83	<i>Salmonella enterica</i>
28	YP_001175971.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18801	79	<i>Enterobacter sp.</i>
29	YP_538610.1	hipotetski protein UTI89_P011	1	19211	79	<i>Escherichia coli</i>
30	YP_001454596.1	hipotetski protein CKO_03069	1	9501	76	<i>Citrobacter koseri</i>
31	WP_021542859.1	hipotetski protein	1	9376	75	<i>Escherichia coli</i>
32	YP_004116947.1	enolaza	1	45393	74	<i>Pantoea sp.</i>
33	WP_006176733.1	autonomni kofaktor glicil- radikala GrcA	1	14432	71	<i>Enterobacter</i>
34	NP_457121.1	autonomni kofaktor glicil- radikala GrcA	1	14335	71	<i>Salmonella enterica</i>
35	YP_001338188.1	RNA-vezujući protein Hfq	1	10996	69	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
36	AAA24175.1	ORF, djelomično	1	8848	69	<i>Escherichia coli</i>
37	YP_006588965.1	RNA-vezujući protein Hfq	1	11375	69	<i>Heteropsylla cubana</i>
38	YP_454193.1	fosfopiruvat-hidrataza	1	45803	68	<i>Sodalis glossinidius</i>
39	EUD03787.1	membranski protein porin C	1	/	67	<i>Providencia alcalifaciens</i>
40	WP_019677784.1	50S ribosomski protein L7/L12	1	12157	67	<i>Rheinheimera perlucida</i>
41	1LR1_A	lanac A proteina H-Ns, koji strukturira kromatin	1	7005	67	<i>Escherichia coli</i>
42	WP_024131942.1	membranski protein	1	37713	65	<i>Salmonella enterica</i>
43	YP_001338154.1	pratilac GroEL	1	57090	64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
44	BAA25225.1	protein sličan GroEL proteinu	1	56351	64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

4. REZULTATI

45	ERE50858.1	membranski protein porin C	1	40831	62	<i>Enterococcus gallinarum</i>
46	YP_001336754.1	fosfopiruvat hidrataza	1	45521	62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
47	YP_002932251.1	porin Gram-negativne porodice proteina	1	/	62	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
48	YP_001336083.1	protein pore vanjske membrane	1	/	62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

UR9 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_002150354.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	4	18118	650	<i>Proteus mirabilis</i>
2	YP_001334418.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	2	18851	184	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	AAB86977.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	6732	76	<i>Allochromatium vinosum</i>
4	YP_003147027.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	19050	76	<i>Kangiella koreensis</i>
5	WP_017628417.1	protein C, porin vanjske membrane	1	41496	74	<i>Proteus mirabilis</i>
6	NP_290617.1	50S ribosomski protein L7/L12	1	12288	60	<i>Escherichia coli</i>
7	WP_017842506.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	/	60	<i>Methylobacterium buryatense</i>
8	YP_048349.1	50S ribosomski protein L7/L12	1	12424	60	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>

UR10 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_002151979.1	podjedinica koja veže supstrat za DL-metionin	2	29682	295	<i>Proteus mirabilis</i>
2	YP_002150354.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18118	225	<i>Proteus mirabilis</i>

4. REZULTATI

3	YP_001334418.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	2	18851	161	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	YP_002150599.1	receptor vanjske membrane	2	73933	160	<i>Proteus mirabilis</i>
5	P09461.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8246	119	<i>Proteus mirabilis</i>
6	NP_455305.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18853	104	<i>Salmonella enterica</i>
7	YP_051614.1	podjedinica koja veže supstrat za DL-metionin	1	29463	73	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
8	YP_001333901.1	podjedinica koja veže supstrat za DL-metionin	1	29366	72	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	AAA24507.1	djelomičan lipoprotein 28	1	10781	72	<i>Escherichia coli</i>
10	NP_670405.1	podjedinica koja veže supstrat za DL-metionin	1	/	72	<i>Yersinia pestis</i>
11	AAB86977.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	6732	57	<i>Allochromatium vinosum</i>
12	YP_003147027.1	lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	/	56	<i>Kangiella koreensis</i>

UR11 uzorak

	Protein_		Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	AAA24232.1	djelomičan protein vanjske membrane,	1	26114	164	<i>Escherichia fergusonii</i>
2	NP_287228.1	acil nosač protein	2	8634	134	<i>Escherichia coli</i>
3	ERE53009.1	djelomičan 30S ribosomski protein S2	1	25562	82	<i>Enterococcus gallinarum</i>
4	BAA32342.1	ribosomski protein S2	1	31289	82	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	68	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	68	<i>Serratia marcescens</i>
7	1BXW_A	protein Ompa, lanac A, transmembranska domena proteina vanjske membrane	1	18864	67	<i>Escherichia coli</i>

4. REZULTATI

8	YP_001336542.1	autonomni kofaktor glicil-radikala GrcA	1	14234	65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	P18953.2	autonomni kofaktor glicil-radikala	1	14366	65	<i>Serratia liquefaciens</i>
10	CAA57795.1	enolaza	1	46417	63	<i>Escherichia coli</i>
11	YP_001334138.1	adenilat-kinaza	1	23533	61	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	BAA14303.1	adenilat-kinaza	1	12103	61	<i>Escherichia coli</i>

UR12 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_002150599.1	receptor vanjske membrane	3	73933	382	<i>Proteus mirabilis</i>
2	YP_002150354.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18118	275	<i>Proteus mirabilis</i>
3	YP_002152262.1	pratitelj molekule GroEL	1	57615	150	<i>Proteus mirabilis</i>
4	NP_927927.1	pratitelj molekule DnaK	2	68818	142	<i>Photobacterium luminescens</i>
5	WP_021710396.1	proteinski pratitelj DnaK	2	69029	142	<i>Vibrio azureus</i>
6	YP_002150023.1	fosfoglicerat-kinaza	1	41197	121	<i>Proteus mirabilis</i>
7	YP_858397.1	receptor vanjske membrane	1	71927	72	<i>Aeromonas hydrophila</i>
8	YP_002152488.1	50S ribosomski protein L10	1	17640	72	<i>Proteus mirabilis</i>

UR13 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_004593040.1	membranski lipoprotein povezan s peptidoglikanom	1	18865	160	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2	1OEL_A	lanac A pratiteljske molekule	1	57031	157	<i>Escherichia coli</i>
3	YP_001337379.1	čimbenik istezanja G	1	77494	98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	NP_289887.1	čimbenik istezanja G	1	77532	98	<i>Escherichia coli</i>
5	YP_001334507.1	zaštitni protein za Dps	1	18697	89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	AAB49426.1	PexB, djelomičan	1	5584	89	<i>Salmonella enterica</i>

4. REZULTATI

7	YP_001334652.1	A membranski protein	1	38021	85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	P09146.1	protein vanjske membrane	1	37552	85	<i>Klebsiella aerogenes</i>
9	YP_004393584.1	OmpAII, glavni membranski protein	1	36565	83	<i>Aeromonas veronii</i>
10	WP_021015441.1	Dps, protein iz porodice feritina	1	/	74	<i>Serratia sp.</i>

UR14 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	188	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	188	<i>Serratia marcescens</i>
3	AAA24807.1	djelomičan protein vanjske membrane, protein II	2	25538	140	<i>Enterobacter aerogenes</i>
4	YP_049963.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8396	139	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
5	AHF77098.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8327	139	<i>Sodalis sp.</i>
6	P24016.1	protein vanjske membrane	1	25648	77	<i>Citrobacter freundii</i>

UR15 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	NP_814526.1	domena stresnog proteina toplinskog šoka	1	7109	94	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	90	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	90	<i>Serratia marcescens</i>
4	WP_005297706.1	glicer aldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	1	40057	64	<i>Photobacterium damsela</i>
5	WP_009972002.1	hipotetski protein	1	4391	59	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
6	YP_002602369.1	protein FeoB1	1	/	55	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>

4. REZULTATI

7	ETT00120.1	TcdA/TcdB domena proteina koji formira pore	1	/	55	<i>Providencia alcalifaciens</i>
8	NP_643074.1	PmbA protein	1	/	54	<i>Xanthomonas axonopodis</i>
9	WP_020491921.1	UDP-N-acetil-enopiruvoglukozamin-reduktaza	1	31795	53	<i>Dehalobacter sp.</i>

UR16 uzorak

		Protein	Σ Peptida	MW (Da)	Σ Score	Bakteria
1	YP_049963.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8396	212	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
2	AHF77098.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	2	8327	212	<i>Sodalis sp.</i>
3	YP_001335792.1	murein lipoprotein	1	8381	161	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	P02938.1	glavni vanjski membranski lipoprotein	1	8234	161	<i>Serratia marcescens</i>
5	YP_001463566.1	membranski protein porin C	1	40070	102	<i>Escherichia coli</i>
6	ABS84845.1	translacijski čimbenik istezanja Tu	1	21970	85	<i>Bacillus subtilis</i>
7	NP_299905.1	čimbenik istezanja Tu	1	42849	85	<i>Xylella fastidiosa</i>
8	0803214A	čimbenik istezanja Tu 59-263	1	22630	85	<i>Escherichia coli</i>
9	NP_667815.1	čimbenik istezanja Tu	1	/	84	<i>Yersinia pestis</i>
10	AAQ96088.1	protein II vanjske membrane	1	17373	62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	YP_003929643.1	hipotetski protein Pvag_pPag10133	1	/	61	<i>Pantoea vagans</i>
12	YP_001337372.1	50S ribosomski protein L4	1	22100	59	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	NP_289880.1	50S ribosomski protein L4	1	22073	59	<i>Escherichia coli</i>

Proteini ljudskoga porijekla poredani po zbirnom rezultatu navedeni su u Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati bioinformatičke obrade humanih proteina dobiveni pretražnim programom Mascot

UR1

		Protein_	Score	Σ Peptidi
1	BAG59381.1	neimenovani proteinski produkt	140	1
2	CAA34982.1	alfa-1 antitripsin	99	1
3	CAA26677.1	alfa-1-antitripsin (aa 268-394)	70	1
4	NP_000691.1	aneksin A1	67	1
5	740525A	lipoprotein Gln I	66	1
6	2A01_A	lanac A ljudskoga apolipoproteina A-I bez lipida	66	1
7	CAA37116.1	neimenovani proteinski produkt	55	1

UR2

		Protein_	Score	Σ Peptidi
1	CAA23759.1	neimenovani proteinski produkt	325, 200, 105	3
2	2YRS_B	lanac B, ljudski hemoglobin D, Los Angeles: kristalna struktura	325	1
3	AAN84548.1	inačica beta globinskog lanca	283	1
4	1NQP_B	Lanac B, Kristalna struktura humanog hemoglobina E	239	1
5	AAAY46275.1	beta globinski lanac	214	1
6	AAAY51976.1	hemoglobinski beta lanac	200	1
7	AAA36799.1	uromodulin	170, 51	2
8	CAA23749.1	alfa globin	152	1
9	AAA51747.1	proapolipoprotein, djelomičan	105, 76	2
10	740525A	lipoprotein Gln I	100	1
11	2A01_A	lanac A ljudskoga apolipoproteina A-I bez lipida	100	1
12	ACF16774.1	beta globin	85	1
13	AAA35597.1	beta-globin	64	1
14	1Y5K_B	lanac B, dio ljudskoga hemoglobina: Betad99a deoksi	64	1

4. REZULTATI

UR3

		Protein_	Score	Σ Peptidi
1	AAA36799.1	uromodulin	121, 91	2
2	NP_002956.1	protein S100-A9	101, 86	2
3	AAB50880.1	anitubulin IgG1 kappa VL lanac (N-terminalni), protein ljudskoga seruma djelomičan peptid 219 aa]	89	1
4	1COH_A	lanac A, strukturni hemoglobin deoksi stanja	82	1
5	CAA23759.1	neimenovani proteinski produkt	75	1
6	3KR3_L	lanac L, kristalna struktura kompleksa antitijela Igf-Ii	70	1
7	BAG59381.1	neimenovani proteinski produkt	65	1
8	AAA51747.1	proapolipoprotein, djelomičan	55	1
9	740525A	lipoprotein Gln I	54	1

UR4

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	NP_002956.1	protein S100-A9	89	1
2	CAA68390.1	neimenovani proteinski produkt	61	1
3	AAH13767.1	VASN protein	58	1

UR5

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA36799.1	uromodulin	148, 74	2
2	CAA23749.1	alfa globin	52	1

UR6

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA51747.1	proapolipoprotein, djelomičan	475, 344, 195	3
2	740525A	lipoprotein Gln I	354, 234, 195, 69	4
3	AAB59495.1	alfa-1-antitripsin	132, 59	2
4	1OR3_A	lanac A, apolipoprotein E3 (ApoE3)	131	1
5	AAA51547.1	prekursor alfa-1-antitripsina	104	1
6	AAB59372.1	apolipoprotein C-III	91	1

4. REZULTATI

7	AAB59518.1	apolipoprotein E	71, 60	2
8	CAA23749.1	alfa globin	65	1
9	1506383A	apolipoprotein E mutirani E3K	52	1

UR7

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	CAA23749.1	alfa globin	95	1
2	NP_002956.1	protein S100-A9	91	1
3	2CMR_L	lanac L, kristalna struktura Hiv-1 neutralizirajućeg antitijela D5 Fab vezanog za unutarnju jezgru <i>Mimetic 5-Helix</i>	84	1
4	CAA23759.1	neimenovani proteinski produkt	70	1
5	3KR3_L	lanac L, kristalna struktura kompleksa antitijela Igf-Ii	66	1
6	4JFY_A	lanac A, strukturni lanac fosfotirozina	77	1

UR8

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAM13690.1	protein poput delta 2-izopentenil pirofosfat transferaze	69	1

UR9

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA51747.1	proapolipoprotein, djelomičan	212, 87	2
2	CAA34982.1	alfa-1 antitripsin	68	1
3	AAA36799.1	uromodulin	50	1

UR10

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA36799.1	uromodulin	119	1
2	A37927	Ig kappa lanac C regije- ljudski	114	1
3	3KR3_L	lanac L, kristalna struktura kompleksa antitijela Igf-Ii	114	1
4	NP_002956.1	protein S100-A9	86	1
5	CAA33438.1	neimenovani proteinski produkt	61	1

4. REZULTATI

6	CAA40416.1	histone H2A.2	57	1
7	740525A	lipoprotein Gln I	56	1
8	CAA68390.1	neimenovani proteinski produkt	44	1
9	CAA37116.1	neimenovani proteinski produkt	42	1

UR11

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA36799.1	uromodulin	119	1
2	AAF00488.1	varijanta beta podjedinice hemoglobina	43	1

UR12

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	1AU8_A	lanac A, ljudski katepsin G	71	1
2	AAB57795.1	laktoferin	53	1
3	NP_001148.1	aneksin A11 izoforma 1	41	1

UR13

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	AAA36799.1	uromodulin	149	1
2	NP_002956.1	protein S100-A9	85	1

UR14

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	CAA23759.1	neimenovani proteinski produkt	104, 69	2
2	CAA23749.1	alfa globin	99, 77	2

UR15

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	CAA23759.1	neimenovani proteinski produkt	244, 138, 119	3
2	AAF00488.1	varijanta beta podjedinice hemoglobina	220	1
3	BAA33580.1	anti-HBsAg imunoglobulin, Fab kappa lanac	123	1
4	CAA23749.1	alfa globin	112	1
5	AAY46275.1	beta globin lanac	104	1
6	AAA35597.1	beta globin	104, 71	2

7	3KR3_L	lanac L, kristalna struktura kompleksa antitijela Igf-Ii	103	1
8	AAA36799.1	uromodulin	66	1
9	H7BZ55.3	strukturni protein proteinske uzvojnice	39	1

UR16

		Protein	Score	Σ Peptidi
1	NP_002956.1	protein S100-A9	97, 68	2

Provedbom proteomske identifikacije uzorka UR1 kao rezultat detektiran je uropatogen *K. pneumoniae* (Tablica 4.). Za navedeni uzorak detektirano je 35 specifičnih bakterijskih peptida (Tablica 5.) što je 83 % od ukupnih peptida samoga uzorka. Preostali postotak odnosi se na identificirane ljudske peptide. Ako se promatra svih 16 uzoraka dolazi se do 12,8 % peptida svih analiziranih uzoraka. Prema tabličnom prikazu najviši zbirni rezultat odnosi se na membranski protein porin C, OmpK36 porin te murein lipoprotein. Sumarno promatrajući, detektirano je 28 bakterijskih proteina, od čega *K. pneumoniae* pripada 13. U uzorku UR2 također je identificiran uropatogen *K. pneumoniae*. Za navedeni uzorak identificirano je 28 bakterijskih peptida, što čini 61 % peptida samoga uzorka. Zanimljiva je činjenica da su za samu analizu bile najznačajnije prve dvije frakcije. Pregledom liste za 22 proteina vidi se da najviši rezultat također pripada proteinu lipoproteinu mureinu, proteinu vanjske membrane porinu C, te molekularnom proteinskom pratitelju (engl. *molecular chaperone*). Najzastupljeniji proteini pripadaju skupini membranskih proteina. Prema urinokulturi radi se o bakteriji *Klebsiella oxytoca* (porodica *Enterobacteriaceae*), što se teže iščitava iz genomske analize koja sugerira 97 % *Enterobacteriaceae*. Udio analiziranih ljudskih peptida u uzorku bio je nešto viši, 39 %. Od prisutnih ljudskih proteina poznatiji su alfa i beta globin. Analizom uzorka UR3, gdje je također detektiran uropatogen *K. pneumoniae*, detektirano je 11 bakterijskih peptida što čini 50 % ukupnih proteina toga uzorka. Pregledom liste (za 9 proteina) razvidno je da najviši rezultat pripada proteinu murein lipoproteinu, a prisutan je i bifunkcionalni enzim acetil-CoA-alkohol dehidrogenaza. Laboratorijski nalaz urinokulture ranije je pokazao da se radi o bakteriji *K. pneumoniae*, što odgovara i proteomskoj analizi. S druge strane, genomska analiza ukazuje na *Enterobacteriaceae* (90 %). Udio ljudskih peptida u analizi bio je visokih 50 %. Od prisutnih ljudskih proteina značajniji su uromodulin i proapolipoprotein. Za razliku od prva tri uzorka, uzorak UR4 kao rezultat ima uropatogen *Proteus mirabilis*, što odgovara laboratorijskom

nalazu urinokulture. Frakcioniranjem uzorka dobiva se 12 bakterijskih peptida (89 %). Pregledom analiziranih proteina utvrđeno je da je identificirano 10 bakterijskih proteina, a najviši zbirni rezultat se odnosi na lipoprotein vanjske membrane i na protein vanjske membrane porin. Postotak ljudskih peptida u analizi bio je 20 %, od čega se izdvaja protein S100 - A9. Genomska analiza ukazuje da prevladava *Proteus* s 97,7 %. Uropatogen *P. mirabilis* identificiran je i u uzorcima UR9, UR10 i UR12. Za identifikaciju je bilo dovoljno, redom 8, 12 i 8 proteina, za što je analizom dobiveno 12, 15, i 12 peptida. Među proteinima prevladavaju peptidoglikani vanjske membrane, a zastupljeni su i ribosomski proteini, te molekularni proteinski pratitelji. Nešto manji broj ljudskih proteina detektiran je u uzorcima UR9 i UR12, dok je kod UR10 zabilježeno 9 proteina. Rezultat proteomske analize za uzorake UR5 i UR6 je uropatogen *E. faecalis*. Identificirano je 20 bakterijskih proteina za UR5 uz najviši zbirni rezultat od 179 za protein ribosomske podjedinice 50S. Za UR6 identificirana su samo tri proteina koji spadaju u proteine toplinskoga šoka, odnosno, identificirano je tek 7 bakterijska peptida (2,6 %). Udio ljudskih peptida za UR5 iznosio je 11%, gdje se izdvaja protein uromodulin. Nadalje, kod uzorka UR6 broj ljudskih proteina znatno je veći, a radi se o 9 proteina (16 peptida), uglavnom lipoproteina.

Genomska analiza za UR5 ukazuje da prevladavaju *Pseudomonas* (21,8 %), *Propionibacterium acnes* (13,7 %) i *Lactobacillus helveticus* (11 %). U uzorku UR6 jasnija je situaciju; potvrđeni su *Enterococcus* (51,4%) i *Enterococcaceae* (46,5 %). Kod uzorka UR7 proteomskom metodom određen je uropatogen *Citrobacter freundii*, a SUK metodom *E. cloacae* što je prvi uzorak kod kojeg su dobiveni različiti rezultati. Ako se pogleda rezultat sekvenciranja gena 16S rRNA radi se o rodu *Enterobacter*. Razvidno je da oba rezultata ukazuju na prođicu *Enterobacteriaceae*, ali su im rodovi različiti. Prema tome vjerojatnije je da se radi o bakteriji *E. cloacae*. Ako se razmotre podatci o identificiranim proteinima (11 peptida, 9 proteina) većina ih se odnosi na membranske proteine, dok su za ribosomske proteine dobiveni niski zbirni rezultati što je i utjecalo na konačan rezultat. Pokazalo se da uzorak sadrži 6 ljudskih proteina, gdje dominiraju alfa globulin i protein S100. Rod *Enterobacter* utvrđen je i u uzorcima UR13 i UR14. Za uzorak UR13 rezultati proteomske analize i SUK-a podudaraju se na razni vrste, a kod UR14 obje analize detektirale su iste rodove, ali različite vrste. Bitno je napomenuti da je kriterij odabira znatno pomogao u odabiru kod navedenih uzoraka; gdje je za UR13 određen zbirni rezultat 160, a za uzorak UR14 presudni utjecaj imao je broj identificiranih peptida. Nije potvrđena pretpostavka da će u uzorcima s manjim brojem identificiranih peptida biti veći udio ljudskih peptida. U uzorku UR13 identificirani su već

ranije spomenuti uromdulin i protein S-100, dok je kod UR14 zabilježen alfa globulin. Rezultatima genomske analize utvrđeno je da u uzorcima UR13 (74,5 %) i UR14 (95,4 %) prevladavaju *Enterobacteriaceae*, dok je u uzorku UR13, u niskom postotku prisutan i rod *Lactobacillus*. U posljednjem monobakterijskom uzorku, UR8 identificiran je uropatogen *Citrobacter koseri* što je i potvrđeno SUK-om, te je na razini genomike identificiran s 57,5 %. Proteomskom analizom proizlazi da se radi o *Citrobacter freundii*, dok se vrsta *C. koseri* nalazi kao druga opcija. Za navedeni uzorak proteomskom analizom je detektirano 48 proteina, tj. 53 identificirana peptida. Ako bi se u obzir uzimali samo ribosomski proteini rezultat identifikacije bila bi bakterija *K. pneumoniae* ili *E. coli*. Sličan rezultat dobio bi se isključivim promatranjem zbirnog rezultata proteina, te bi u tom slučaju bila identificirana *K. pneumoniae*. Iz ovog se može zaključiti da je za rezultat identifikacije proteomskom analizom ključan odabir i postavljanje kriterija identifikacije.

Najbrojniji proteini ljudskoga porijekla klasificirani su kao podjedinice hemoglobina (alfa i beta globin), apolipoproteini i uromodulin. Nisu detektirani proteini epitelnih stanica urogenitalnoga trakta.

Uspješnost detekcije peptida zasigurno reprezentira postignuti Mascot zbirni rezultat koji ako zadovoljava osnovne kriterije daje bodovnu listu uspješnosti detekcije peptida. Pretpostavlja se da su peptidi s većim zbirnim rezultatom preciznije detektirani i da predstavljaju vjerodostojniju identifikaciju.

Lista dobivena Mascot programom, a prema bodovnoj vrijednosti poredanih peptida koji su dodjeljeni odgovarajućim bakterijama, omogućila je identifikaciju bakterija u uzorcima. Pregledom tabličnih podataka najviši postignuti zbirni rezultat je 328, dok je najniži postignuti rezultat 53. Time se dolazi do zanimljivoga područja koje predstavlja ukupni broj peptida po identificiranoj bakteriji. Najveći udio peptida pripadao je bakterijskim proteinima (71 %). Iako se očekivalo da većina proteina pripada ribosomima, iz cjelokupne proteinske mase identificiran je tek njihov neznatan udio od 8%. U ovom ispitivanju najzastupljeniji su bili membranski proteini, koji obuhvaćaju membranski protein, porin C, peptidoglikan povezan s lipoproteinom i murein lipoprotein. Dobiveni rezultati zasigurno su povezani s upotrebom B-PER-a kod pripreme uzoraka (79).

U Tablici 7. prikazani su rezultati na razini roda za monobakterijske uzorake, a u Tablici 8. za polibakterijske kulture.

Tablica 7. Uzorci kod kojih su identificirane monobakterijske kulture

Bakterijska vrsta	Oznaka uzorka	Broj uzorka sa istim uropatogenom
<i>Citrobacter koseri</i>	UR8	1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	UR13	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	UR7, UR14	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	UR5, UR6	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	UR2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UR1, UR3	2
<i>Proteus mirabilis</i>	UR4, UR9, UR10, UR12	4

Tablica 8. Uzorci kod kojih su identificirane polibakterijske kulture

Bakterijska vrsta	Oznaka uzorka	Broj uzoraka
<i>Enterococcus faecalis</i>	UR15	1
<i>Escherichia coli</i>	UR11, UR15, UR16	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UR16	1
<i>Proteus mirabilis</i>	UR11, UR15	2

Za monobakterijske uzorke, kad se usporede rezultati proteomike sa SUK-om, dolazi se do podudarnosti u 87 % uzoraka (Tablica 9.). Nadalje, kod polibakterijskih uzoraka (UR11, UR15 i UR16) situacija je kompleksnija. Naime, identifikacija polimikrobnih kultura MALDI TOF/TOF metodom ne podudara se s rezultatima identifikacije SUK-om i sekvenciranjem gena za 16S rRNA (Tablica 9.).

Tablica 9. Usporedba metoda identifikacije uropatogena

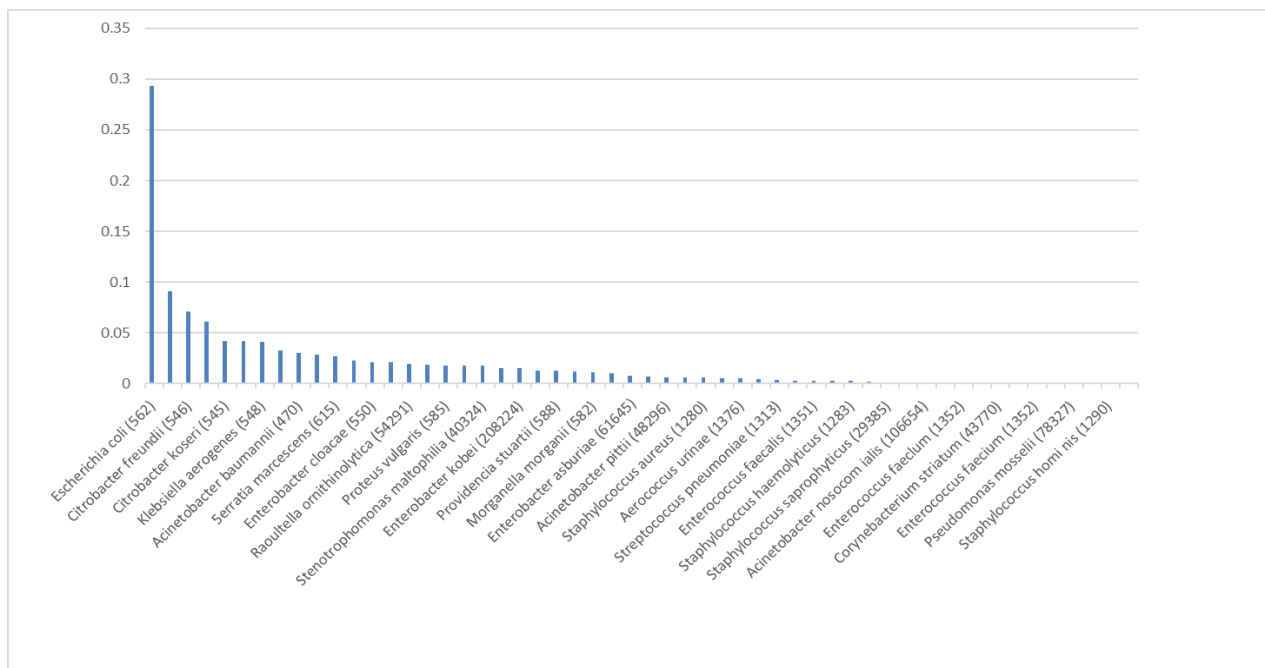
Uzorak	SUK	MALDI identifikacija	TOF/TOF Identifikacija sekvenciranjem gena za 16S rRNA
UR1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100 % <i>Enterobacteriaceae</i>
UR2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97 % <i>Enterobacteriaceae</i>
UR3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	90 % <i>Enterobacteriaceae</i> 5,1 % <i>Granulicatella</i> 1,1% <i>Anaerococcus</i>
UR4	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	97,7 % <i>Proteus</i> 1 % <i>Enterobacteriaceae</i>
UR5	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	21,8 % <i>Pseudomonas</i> ; 13,7 % <i>Propionibacterium acnes</i> 11 % <i>Lactobacillus helveticus</i> 8,1 % <i>Adhaeribacter</i> 8 % <i>Acinetobacter</i> 5,9 % <i>Staphylococcus</i> 4,9 % <i>Stenotrophomonas</i> 3,8 % <i>Hydrogenophaga</i> 3,6 % <i>Erysipelotrichaceae</i> 3,1 % <i>Corynebacterium</i> 3,1 % <i>Cellulomonas</i> 2,3 % <i>Aerococcus</i> 2 % <i>Acidovorax</i> 1,9 % <i>Lachnospiraceae</i> 1,6 % <i>Sphingobium</i>
UR6	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	51,4 % <i>Enterococcus</i> 46,5 % <i>Enterococcaceae</i>
UR7	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	98 % <i>Enterobacter</i> 0,9 % <i>Proteus</i>
UR8	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	57,5 % <i>Citrobacter koseri</i> 4,5 % <i>Bacteroides</i> 3,7 % <i>Dysgonomonas</i> 2,7 % <i>Bacteroides</i> 2,6 % <i>Rikenellaceae</i> 2,3 % <i>Parabacteroides</i> 2 % <i>Desulfovibrionaceae</i> 2 % <i>Lachnospiraceae</i>

			2 % <i>Ruminococcaceae</i> 1,9 % <i>Enterobacteriaceae</i> 1,3 % <i>Ruminococcus</i> 1,3 % <i>Erysipelotrichaceae</i> 1,2 % <i>Enterococcus</i> 1,1 % <i>Clostridiales</i>
UR9	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	96,7 % <i>Proteus</i> 2,4 % <i>Enterobacteriaceae</i> 1,2 % <i>Prevotella</i>
UR10	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	97 % <i>Proteus</i> 1,3 % <i>Enterobacteriaceae</i>
UR11	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	93 % <i>Enterobacteriaceae</i> 3,5 % <i>Proteus</i>
UR12	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	99,2 % <i>Proteus</i>
UR13	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	75,4 % <i>Enterobacteriaceae</i> 14 % <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 4,2 % <i>Kluyvera</i> 4 % <i>Enterobacter</i> 1 % <i>Lactobacillus helveticus</i>
UR14	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95,4 % <i>Enterobacteriaceae</i> 1,2 % <i>Clostridium perfringens</i> 1 % <i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
UR15	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	86,9 % <i>Proteus</i> 7,2 % <i>Enterobacteriaceae</i> 2,2 % <i>Enterobacter</i> 1 % <i>Rhodospirillaceae</i>
UR16	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	91,2 % <i>Enterobacteriaceae</i> 8,6 % <i>Klebsiella</i>

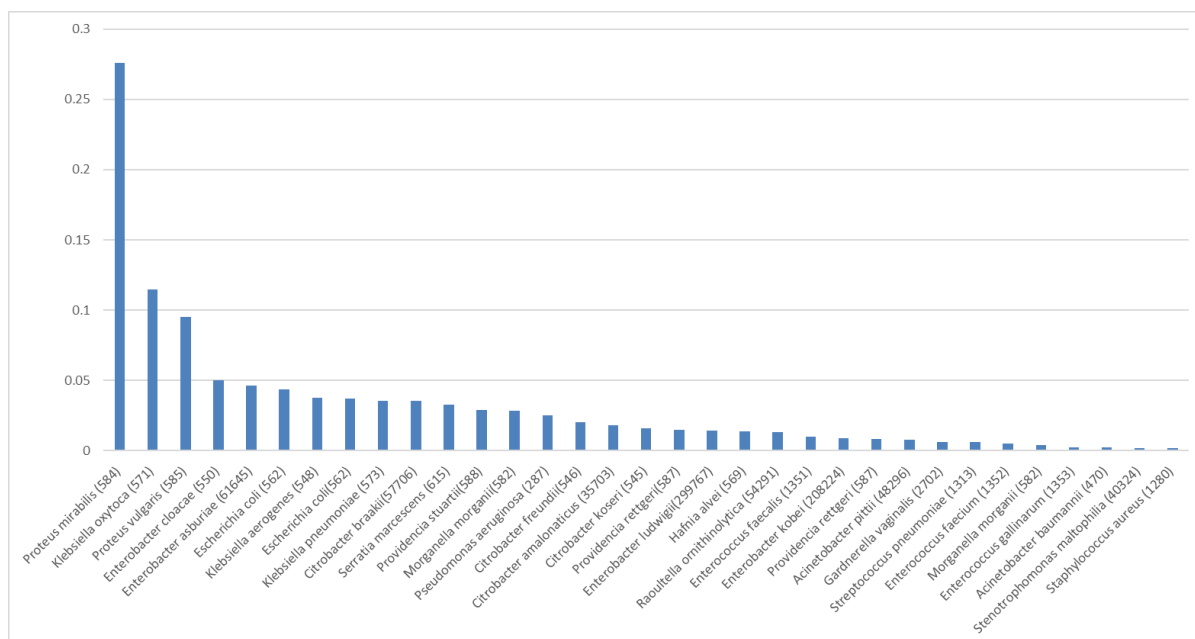
4.8. Identifikacija mokraćnih infekcija *de novo* sekveniranjem peptida

Pomoću klasifikacijskoga modela baziranoga na stablu odluke (engl. *Decision tree classification model-lowest common ancestor modela*) provedena je standardizacija proteomske identifikacije četiri najčešća uropatogena (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*), te je tim procesom određen stupanj pouzdanosti (engl. *confidence score*) njihove identifikacije. Identifikacija uzročnika mokraćnih infekcija direktno iz mokraće evaluirana je pomoću navedenog klasifikacijskog modela.

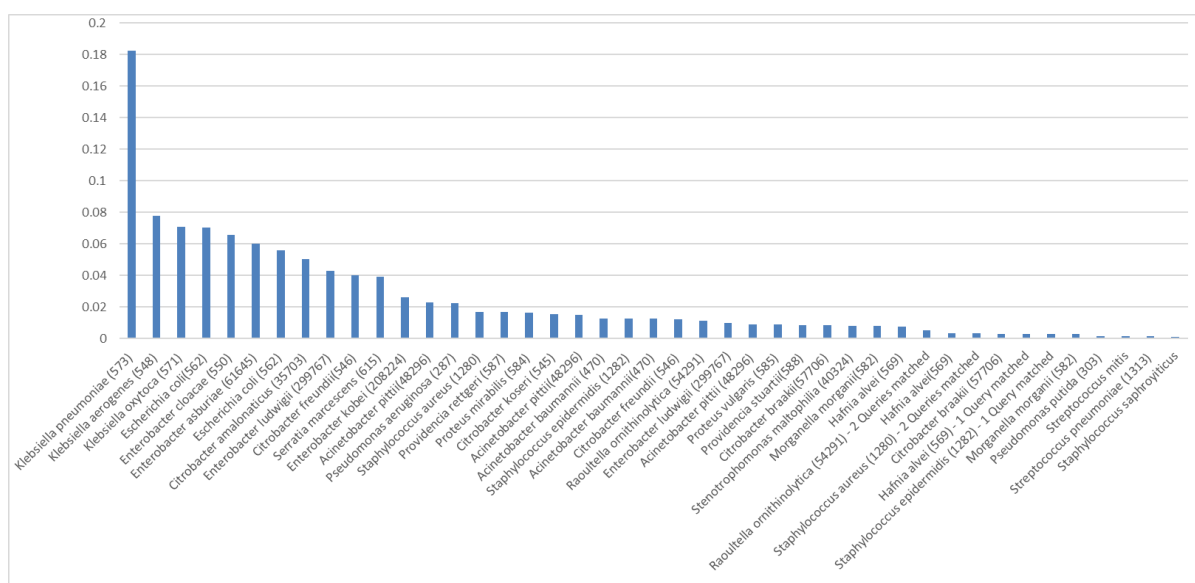
Broj eksperimentalno određenih peptida podudarnih s peptidima baze podataka dobiven MALDI-TOF/TOF analizom rangiran je prema stupnju pouzdanosti u 3 kategorije; 3-visoka razina pouzdanosti ispravne identifikacije; 2-srednja razina pouzdanosti ispravne identifikacije i; 1-niska razina pouzdanosti ispravne identifikacije.



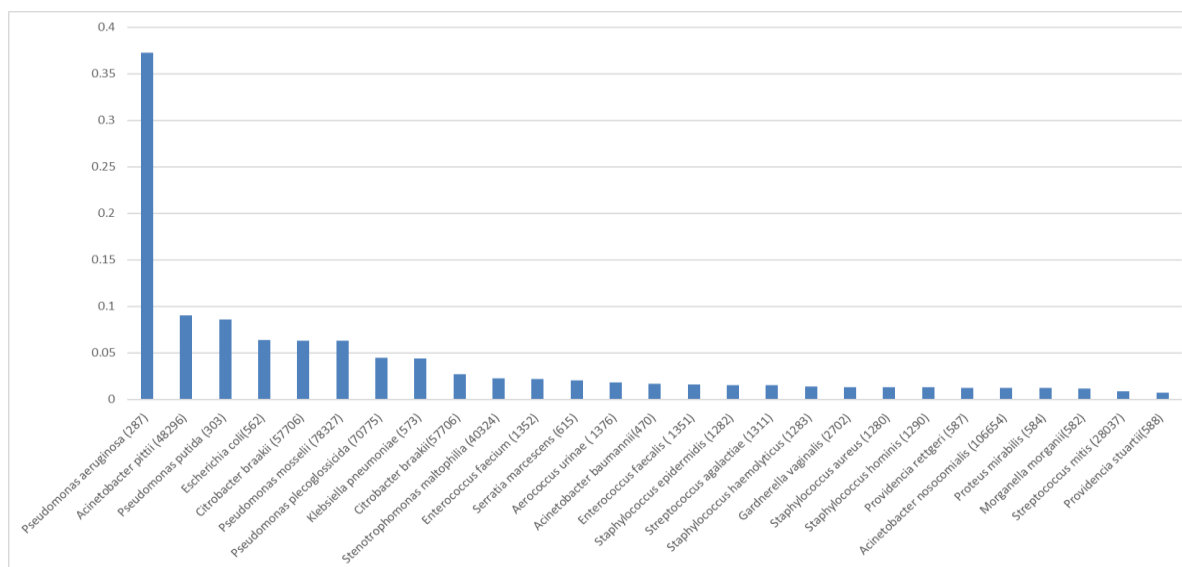
Slika 12. Grafički prikaz podudarnih peptida dobivenih MALDI-TOF/TOF analizom izolata *E. coli*



Slika 13. Grafički prikaz podudarnih peptida dobivenih MALDI-TOF/TOF analizom izolata *P. mirabilis*



Slika 14. Grafički prikaz podudarnih peptida dobivenih MALDI-TOF/TOF analizom izolata *K. pneumoniae*



Slika 15. Grafički prikaz podudarnih peptida dobivenih MALDI-TOF/TOF analizom izolata *P. aeruginosa*

U svakoj od 4 skupine (sumirani rezultati 10 izolata) uropatogena izvršena je analiza pronađenih peptidnih sekvenci koje su u bazi bile podudarne s peptidnim sekvencama određenoga uropatogena (Slike 12.-15.). Sva četiri testirana uropatogena u 10 replikata identificirani su s visokom vjerojatnosti (100 % razina identifikacije). Također, vjerojatnost točne identifikacije značajno opada s drugim najboljim pogotkom u bazi podataka što predstavlja nedvojbenu identifikaciju.

Tablica 10. Usporedba rezultata SUK-a i izravne identifikacije tandem masenom spektrometrijom uz razinu pouzdanosti kojom je identificiran uropatogen. Nepodudarni rezultati označeni su crvenom bojom.

SUK	<i>de novo:</i> identifikacija bakterije	broj peptida	2. podudarna bakterija	broj peptida	razina pouzdanosti identifikacije
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	73	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	3

4. REZULTATI

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	1
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	<i>Escherichia coli</i>	14	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	151	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	65	3
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	32	<i>Proteus vulgaris</i>	20	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	3
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	22	<i>Proteus vulgaris</i>	19	3
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	Ostale bakterije	12	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	2
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	6	<i>Morganella morganii</i>	5	2
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	<i>Citrobacter braakii</i>	9	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	28	<i>Escherichia coli</i>	11	3
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	7	/	/	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	<i>Pseudomonas putida</i>	14	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	<i>Escherichia coli</i>	11	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	14	<i>Enterobacter kobei</i>	7	2
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	7	<i>Acinetobacter pittii</i>	5	2

<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	15	<i>Enterococcus faecium</i>	7	2
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44	3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	80	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	2
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	71	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	3

Zaključno, 88 % uzoraka pravilno je identificirano u odnosu na identifikaciju SUK-om. 4/34 uzorka nisu jednoznačno identificirani objema metodama, međutim kod 3 od ova 4 uzorka razina podudarnosti bila je 1.

2/4 uzorka koja su imala nepodudarnu identifikaciju SUK-om, s jedne strane, i tandemskom analizom masene spektrometrije te *de novo* sekvenciranjem s druge, pokazali su slaganje rezultata ovih metoda s rezultatom druge najbolje identifikacije.

4.9. Sekvenciranje gena za 16S rRNA u identifikaciji uropatogena i mokraćnoga mikrobioma

Skupina od dvadeset i osam ispitanika (16 žena, 12 muškaraca) sa simptomima cistitisa, upućenih na urinokulturu odabrana je za genomsku dijagnostiku. Njihovi uzorci mokraće, nakon rutinske analize izdvojeni su za daljnu analizu u svrhu ove studije. Početna dijagnoza temeljila se na opisu simptoma pacijenta. Kriterij uključivanja u studiju bila je urinokulturom dokazana uroinfekcijom s CFU > 10⁵/ml. Prosječna dob pacijenata bila je 66 godina. Uz uzorke mokraće prikupljene metodom slučajnoga odabira, u istraživanje je bilo uključeno i šest pacijenata koji su imali kateter. Karakteristike pacijenata sažete su u Tablici 11.

Tablica 11. Opći podaci o ispitanicima i načinu prikupljanja uzoraka

Spol	Žene	16
	Muškarci	12
Način uzorkovanja	Srednji mlaz	22
	Kateter	6
	Prosječna dob ispitanika	66

4.9.1. Izolacija DNA

Nakon izolacije DNA mjerena je njena koncentracija BioSpec Nano spektrofotometrom. Koncentracije izolirane DNA prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Prikaz izmjerene koncentracije DNA izoliranih iz 28 uzoraka mokraćne

OZNAKA	SUK	CFU/ml	Spol	Godište	Uzorak	Koncentracija izolirane DNA (ng/μL)
U1	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Streptococcus species</i>	> 100000	Ž	1957.	S	9,80
U2	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	M	1950.	S	7,89
U3	<i>Citrobacter koseri</i> , vvGPB	> 100000	Ž	1939.	S	3,54
U4	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i>	> 100000	M	1971.	S	32,03
U5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , vvGPB	> 100000	M	1929.	K	5,60
U6	<i>Enterococcus faecium</i>	> 100000	M	1942.	S	28,98

	<i>Morganella morganii</i>					
U7	<i>Escherichia coli</i> ESBL, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	M	1937.	K	13,54
U8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100000	Ž	1940.	S	4,61
U9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	M	1949.	S	3,15
U10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	> 100000	M	1954.	S	9,14
U11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	> 100000	M	1952.	S	6,01
U12	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	Ž	1964.	S	6,96
U13	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	M	1943.	S	16,22
U14	<i>Enterococcus faecalis</i>	> 100000	Ž	1941.	K	4,93
U15	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL	> 100000	M	1940.	K	1,84
U16	<i>Citrobacter koseri</i>	> 100000	Ž	1967.	S	15,94
U17	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	Ž	2014.	S	0,45
U18	<i>Proteus mirabilis</i>	> 100000	Ž	1946.	S	3,66
U19	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ESBL	>100000; >100000;	Ž	1940.	K	9,39

U20	<i>Proteus mirabilis</i>	>100000	Ž	1951.	S	1,73
U21	<i>Enterobacter aerogenes</i>	> 100000	Ž	1945.	S	1,08
U22	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	M	1938.	S	20,16
U23	<i>Enterobacter cloacae</i>	> 100000	Ž	1941.	K	4,14
U24	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	10000; > 10000 <100000; 100000; >100000;	Ž	1936.	S	15,17
U25	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100000; >100000	Ž	1937.	S	15,04
U26	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	Ž	1951.	S	6,90
U27	<i>Escherichia coli</i>	> 100000	M	1958.	S	7,23
LS1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 100000	Ž	1979.	S	12,47

S-srednji mlaz; K-kateter ; vvGPB - veliki broj gram pozitivnih bakterija

4.9.2. Usporedba metode sekvenciranja gena za 16S rRNA sa identifikacijom uropatogena SUK-om

Za ukupno 28 pacijenata uključenih u ovu studiju, SUK-om je potvrđeno 19 monobakterijskih uroinfekcija pretežno uzrokovanih bakterijama; *P. mirabilis* (5 pacijenata), *Klebsiella* spp. (4 pacijenta), *Enterobacter* spp. (3 bolesnika), *E. coli* (3 bolesnika) i *E. faecalis* (2 bolesnika). Polimikrobne infekcije dijagnosticirane su kod 9 bolesnika (uzorci U1, U3, U4, U5, U6, U7, U9, U24 i U25). Rezultati ispitivanja urinokultura svih uzoraka prikazani su u Tablici 13.

U svih 28 uzoraka mokraće utvrđeno je 15 različitih vrsta bakterija, od kojih na *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria* otpada više od 99 %. Dominacija jedne porodice zabilježena je u 19 uzoraka mokraće u kojima su *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* ili *Pseudomonadaceae* sudjelovali s preko 90 %. Sekvenciranje gena za 16S rRNA uspješno je identificiralo 63 roda dok rang vrste nedostaje u većini uzoraka zbog inherentnih ograničenja sekvenciranja 16S rRNA gena stoga su rezultati sekvenciranja gena za 16S rRNA i SUK-a uspoređeni na razini bakterijske porodice (80). Nalaz urinokulture uglavnom je bio u skladu s metodom sekvenciranja gena za 16S rRNA gena, iako je u uzorcima U1, U3 i U13 uočena razlika između rezultata te dvije metode (u Tablici 13. označeno crvenom bojom). Rezultati usporedbe za sve uzorke prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Usporedni prikaz rezultata identifikacije mikroorganizama urinokulturom i genomskom analizom 28 uzoraka mokraće

Broj protokola	Uzorak	SUK	sekvenciranje gena za 16S RNA	%
1	U1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>Moraxellaceae</i>), <i>Streptococcus species</i> (<i>Streptococcaceae</i>)	<i>Actinomycetaceae</i>	18,51
			<i>Aerococcaceae</i>	74,25
			<i>Lactobacillaceae</i>	1,67
			<i>Veillonellaceae</i>	2,61
			ostale bakterije	2,97
2	U2	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Porphyromonadaceae</i>	4,06
			<i>Prevotellaceae</i>	1,01
			<i>Tissierellaceae</i>	15,01
			<i>Campylobacteraceae</i>	3,33
			<i>Enterobacteriaceae</i>	73,91
3	U3	<i>Citrobacter koseri</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>), nepoznate gram pozitivne bakterije	ostale bakterije	2,69
			<i>Actinomycetaceae</i>	2,91
			<i>Porphyromonadaceae</i>	1,78
			<i>Prevotellaceae</i>	61,47
			<i>Peptococcaceae</i>	1,16
			<i>Veillonellaceae</i>	12,93
			<i>Tissierellaceae</i>	6,93
			<i>Fusobacteriaceae</i>	1,64
			<i>Campylobacteraceae</i>	3,66
			<i>Moraxellaceae</i>	1,27
4	U4	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Enterococcaceae</i>), <i>Escherichia coli</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Pseudomonadaceae</i>	1,67
			ostale bakterije	4,59
			<i>Enterococcaceae</i>	97,20
			ostale bakterije	2,8
5	U5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>Pseudomonadaceae</i>), nepoznate gram pozitivne bakterije	<i>Bacteroidaceae</i>	9,09
			<i>Porphyromonadaceae</i>	1,79
			<i>Enterococcaceae</i>	6,04
			<i>Tissierellaceae</i>	2,34
			<i>Pseudomonadaceae</i>	78,89
			ostale bakterije	1,85

4. REZULTATI

6	U6	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	81,66
		(<i>Enterococcaceae</i>),	<i>Enterococcaceae</i>	15,29
		<i>Morganella morganii</i>	ostale bakterije	3,04
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)		
7	U7	<i>Escherichia coli</i>		
		(<i>Enterobacteriaceae</i>),	<i>Enterobacteriaceae</i>	72,48
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcaceae</i>	24,62
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	2,91
8	U8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	<i>Pseudomonadaceae</i>	99,19
		(<i>Pseudomonadaceae</i>)	ostale bakterije	0,81
9	U9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	100,00
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)		
10	U10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	97,89
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	2,11
11	U11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	4,35
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Tissierellaceae</i>	1,50
			<i>Enterobacteriaceae</i>	91,80
			ostale bakterije	2,35
12	U12	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,32
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	0,65
13	U13	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	1,56
		(<i>Enterococcaceae</i>)	<i>Corynebacteriaceae</i>	3,04
			<i>Microbacteriaceae</i>	1,22
			<i>Propionibacteriaceae</i>	13,45
			<i>Cytophagaceae</i>	7,99
			<i>Staphylococcaceae</i>	6,16
			<i>Aerococcaceae</i>	2,34
			<i>Lactobacillaceae</i>	11,89
			<i>Clostridiales*</i>	2,08
			<i>Lachnospiraceae</i>	2,26
			<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,04
			<i>Erysipelotrichaceae</i>	3,21
			<i>Sphingomonadaceae</i>	1,56
			<i>Alcaligenaceae</i>	1,22
			<i>Comamonadaceae</i>	6,51
			<i>Moraxellaceae</i>	8,33

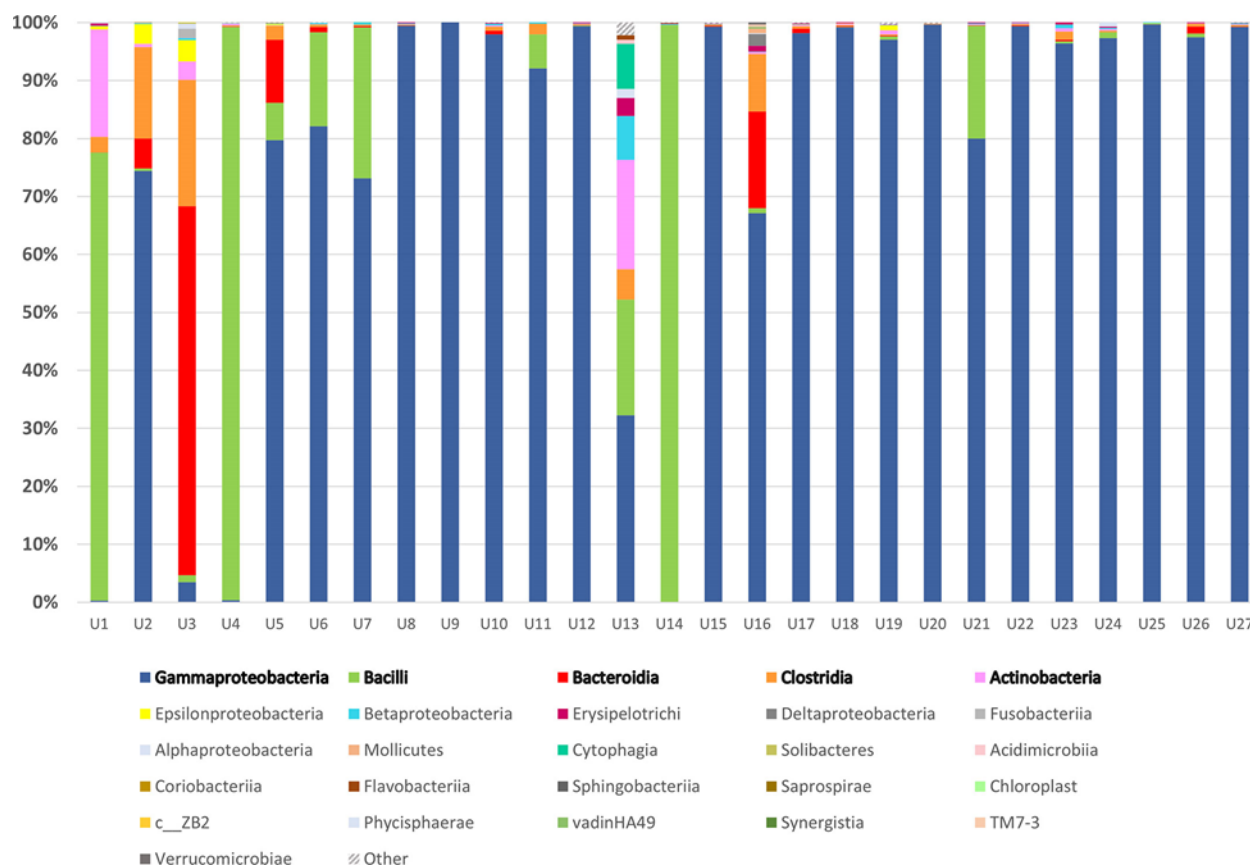
4. REZULTATI

			<i>Pseudomonadaceae</i>	20,05
			<i>Xanthomonadaceae</i>	4,60
			ostale bakterije	1,48
14	U14	<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Enterococcaceae</i>)	<i>Enterococcaceae</i>	99,65
			ostale bakterije	0,35
15	U15	<i>Enterobacter cloacae</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,24
			ostale bakterije	0,76
16	U16	<i>Citrobacter koseri</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Bacteroidales*</i>	1,97
			<i>Bacteroidaceae</i>	3,66
			<i>Porphyromonadaceae</i>	8,01
			<i>Rikenellaceae</i>	2,40
			<i>Christensenellaceae</i>	1,71
			<i>Lachnospiraceae</i>	2,86
			<i>Ruminococcaceae</i>	2,65
			<i>Erysipelotrichaceae</i>	1,03
			<i>Desulfovibrionaceae</i>	1,62
			<i>Enterobacteriaceae</i>	67,04
			ostale bakterije	7,06
17	U17	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	98,24
			ostale bakterije	1,76
18	U18	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,16
			ostale bakterije	0,84
19	U19	<i>Escherichia coli</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>), <i>Proteus mirabilis</i> ESBL (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	97,02
			ostale bakterije	2,98
20	U20	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,65
			ostale bakterije	0,35
21	U21	<i>Klebsiella aerogenes</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Lactobacillaceae</i>	19,40
			<i>Enterobacteriaceae</i>	80,03
			ostale bakterije	0,57
22	U22	<i>Escherichia coli</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,25
			ostale bakterije	0,75
23	U23	<i>Enterobacter cloacae</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	95,99
			ostale bakterije	4,01

4. REZULTATI

24	U24	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcaceae</i>	1,02
		(<i>Enterobacteriaceae</i>);	<i>Enterobacteriaceae</i>	96,92
		<i>Enterococcus faecalis</i>	ostale bakterije	3,08
		(<i>Enterococcaceae</i>),		
		<i>Escherichia coli</i>		
		(<i>Enterobacteriaceae</i>), <i>Proteus</i>		
		<i>mirabilis</i> (<i>Enterobacteriaceae</i>)		
25	U25	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,72
		(<i>Enterobacteriaceae</i>),	ostale bakterije	0,28
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)		
26	U26	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	97,34
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	2,66
27	U27	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	99,19
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	0,81
28	LS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	95,41
		(<i>Enterobacteriaceae</i>)	ostale bakterije	4,59

4.9.3. Dinamika urinarne mikrobiote u pacijenata s urinarnom infekcijom



Slika 16. Grafički prikaz zastupljenosti bakterijskih obitelji u 27 uzoraka mokraće

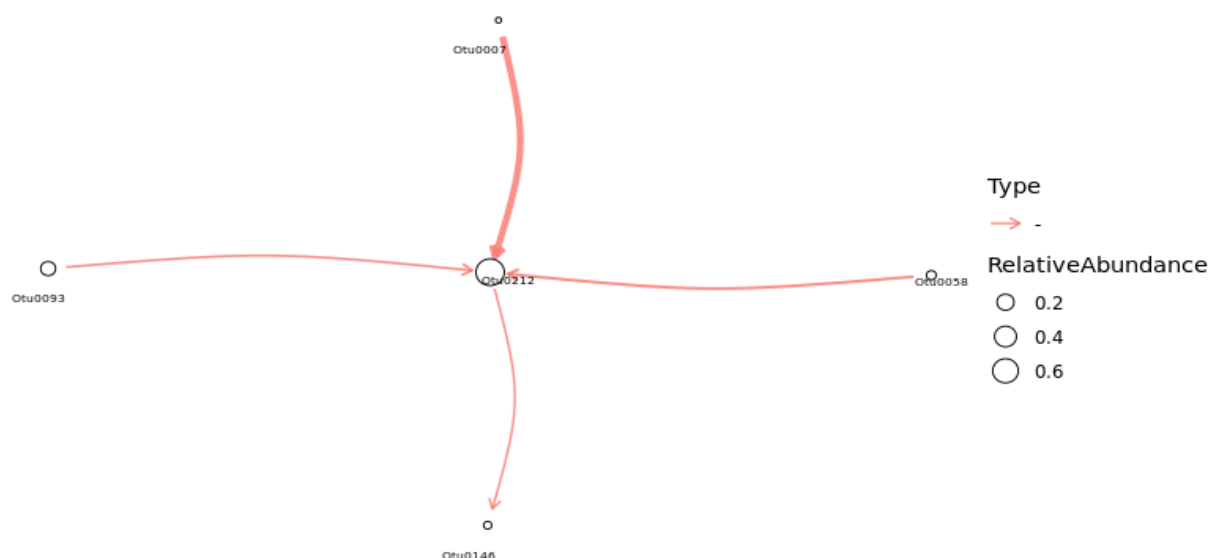
Sekvenciranjem V3 i V4 regije gena za 16S rRNA gena iz DNA izolirane iz 28 uzoraka mokraće utvrđena je taksonomska zastupljenost bakterija na razini klase. Razredi *Gammaproteobacteria* i *Bacilli* dominiraju u svim uzorcima, dok se sekvence koje pripadaju skupini označenoj kao ostale bakterije ne podudaraju ni s jednom sekvencom u bazi podataka.

Ulazna datoteka za BEEM-static bila je Otu tablica koja je sadržavala broj sekvenci koje se promatraju pojedinačno za svaku taksonomsku jedinicu, u svakom uzorku. U ovom istraživanju pronađeno je 249 različitih taksonomskih jedinica na razini soja. Grupirani su na klasnoj taksonomskoj razini, stvarajući 35 različitih klasnih taksonomskih jedinica. Otu vrijednosti su filtrirane, uklanjanjem Otu vrijednosti koje nisu pronađene u većini uzoraka. U svrhu izračuna upotrijebljen je BEEM-static model na podacima iz Tablice 14. kojom su prikazane Otu vrijednosti (filtrirani rezultati visoke prevalencije). Ukupno je ostavljeno 7 najzastupljenijih Otu-a koji su transformirani iz brojčane u

relativne količine te normalizirane za svih 28 uzoraka, stvarajući ulaznu datoteku za BEEM-static. Mreža mikrobnih interakcija na temelju datoteke mapiranja za 7 najzastupljenijih klasa prikazana je na Slici 17. Klase koje se ne pojavljuju u mreži, iako su obilne (Otu161 i Otu184), smatraju se neutralnima po modelu.

Tablica 14. Prema podacima o prevalenciji filtrirana tablica Otu vrijednosti

TAXID	Kingdom	Phylum	Class
Otu0007	k__Bacteria	p__Actinobacteria	c__Actinobacteria
Otu0058	k__Bacteria	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia
Otu0093	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Bacilli
Otu0146	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Clostridia
Otu0161	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Erysipelotrichi
Otu0184	k__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Betaproteobacteria
Otu0212	k__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria

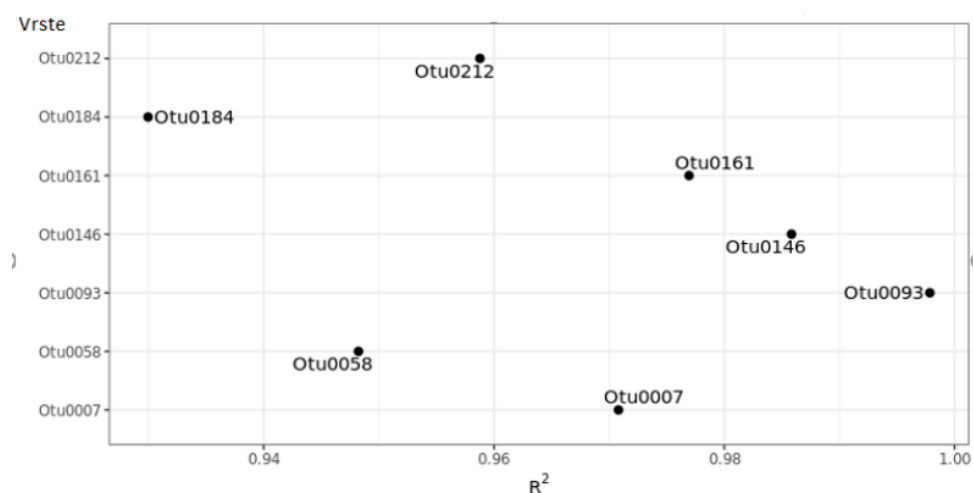


Slika 17. Mreža mikrobnih interakcija temeljena na isptivanju mikrobnoga profila 28 uzoraka mokraće ispitanika sa simptomima cistitisa

BEEM-static objedinjava gLVM pojedinačne modele dobivene iz profiliranja mikrobioma mokraće. Grafikonom na Slici 17. prikazani su pojmovi različiti od nule. Crvene linije predstavljaju negativne interakcije. U ovom modelu nisu otkrivene pozitivne interakcije. Širine strelica proporcionalne su jačini interakcije, a veličine čvorova proporcionalne su

logaritamskoj transformaciji srednje vrijednosti relativne zastupljenosti odgovarajuće klase. Kružnice označavaju taksonomsku razinu klase kako je opisano u Tablici 14. Determinacijski koeficijent (R^2) za svaku odabranu klasu prikazan je grafički na Slici 17. Determinacijski koeficijent udio je varijance u zavisnoj varijabli koji je predvidljiv iz neovisnih varijabli. Prema vrijednostima R^2 model prikazan na Slici 18. dobro prikazuje varijancu podataka ($R^2 > 0,75$ vrijedi za sve klase uključene u model), naime visoka vrijednost R^2 (blizu 1) ukazuje na to da model dobro prikazuje varijaciju podataka.

Interakcije prikazane ovim modelom, unatoč činjenici da je zadržano tek oko 52 % (28,6 % + 23,5 %) ukupnih podataka, uglavnom su usklađene s prethodno napravljenim PCA biplotom. Utvrđeno je da je klasa *Gammaproteobacteria* (Otu0212) bila smještena u srži modela kao zajednički nazivnik svojti u svim ispitivanim uzorcima. Zapaženo je da su bakterije klase *Actinobacteria* (Otu0007) negativno utjecale na *Gammaproteobacteria* klasu (kojima pripada većina uropatogena). Utvrđena je negativna interakcija koja je jača od interakcije između klase *Bacilla* (Otu0093), klase *Bacteroidia* (Otu0058) i klase *Gammaproteobacteria*, što je impliciralo da je relativna brojnost *Actinobacteria* bila negativno korelirana s razinom *Gammaproteobacteria* u ispitanih pojedinaca u kojih je SUK-om dokazana bakteriurija $>10^5$ CFU/ml. Koeficijent determinacije (R^2) udio je varijance u zavisnoj varijabli koja je predvidljiva iz neovisnih varijabli (81, 82). Budući da u modelu predstavljenom u ovom radu nije bilo neovisnih varijabli, iz čega proizlazi da relativno visok R^2 (blizu 1) upućuje da su razlike podataka dobro objašnjene modelom. Prema vrijednostima R^2 , svih sedam razreda koji su uključeni, mogli su biti opisani modelom.



Slika 18. Determinacijski koeficijenti za svaku pojedinačno odabranu klasu

4.10. Usporedba metoda identifikacije mikroorganizama

U Tablici 9. prikazani su i uspoređeni rezultati triju različitih metoda identifikacije bakterija prisutnih u mokraći; SUK, rezultat sekvenciranja gena za 16S rRNA i MALDI TOF/TOF analize. U Tablici 12. prikazani su rezultati SUK-a, DNA koncentracije i rezultat sekvenciranja gena za 16S rRNA. Taksonomska identifikacija putem sekvenciranja gena za 16S rRNA bakterije su identificirane na razini roda (44 %) i obitelji (56 %), dok je identifikacija na razini vrsta izostala.

4.11. Praćenje dinamike promjene urinarne mikrobiote djelovanjem antibiotika metodom sekvenciranja gena za 16S rRNA

38-godišnja ispitanica sa simptomima akutnog nekomplikiranoga cistitisa odabrana je za longitudinalno ispitivanje tijekom primjene antibiotske terapije. Metodom srednjega mlaza prve jutarnje mokraće svakodnevno su prikupljeni uzorci tijekom 7 dana antibiotske terapije (uzorci označeni prema vremenskom redu prikupljanja od LS1 do LS8). Pacijentici je propisana oralna terapija cefaleksinom, 1g/dnevno. Od osam prikupljenih uzoraka, prvi je prikupljen neposredno prije početka antibiotske terapije, a ostali su uzeti svakih 24 sata nakon započete terapije cefaleksinom. SUK je učinjena u tri uzorka (prvom, četvrtom i posljednjem; LS1, LS4 i LS8). Genomska analiza koja je obuhvatila sekvenciranje gena za 16S rRNA provedena je za svih osam uzoraka. Uz SUK gore navedena tri uzorka, svi uzorci (LS1; LS2, LS3, LS4, LS5, LS6, LS7 i LS8) podvrgnuti su sekvenciranju gena za 16S rRNA. Cilj longitudinalne studije bio je istražiti utjecaj uobičajeno propisane antimikrobne terapije na mikrobiotu mokraće, s posebnim naglaskom na dinamiku promjene njenoga sastava tijekom terapijskoga razdoblja.

Tablica 15. Prikaz izmjerene koncentracije DNA izolirane iz kontinuirano prikupljenih uzoraka mokraće prije i za vrijeme antibiotske terapije pacijentice s dijagnosticiranim cistitisom

OZNAKA	SUK	CFU/ml	Spol	Godište	Uzorak	Koncentracija izolirane DNA (ng/ μ L)
LS1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	>100000;	Ž	1979.	S	12,47
LS2	-		Ž	1979.	S	5,08
LS3	-		Ž	1979.	S	6,25
LS4	sterilno		Ž	1979.	S	12,74
LS5	-		Ž	1979.	S	12,61
LS6	-		Ž	1979.	S	14,53
LS7	-		Ž	1979.	S	12,80
LS8	<i>Candida albicans</i>	>1000 <100000	Ž	1979.	S	11,11

Nakon što su uzorci sakupljeni, provedena je izolacija DNA, te je učinjeno sekvenciranje kako je opisano u Materijalima i metodama (3.3.8). Dobiveni su sirovi podaci koje je bilo potrebno obraditi kako bi došli do konačnih rezultata i podataka. Obrada podataka izvršena je u QIIME programu za obradu. Serijom naredbi određene su Otu vrijednosti, te potom alfa i beta raznolikost. Pomoću alfa raznolikosti uočene su razlike u bakterijskoj populaciji unutar svakoga uzorka, dok je beta raznolikost dala uvid u raznolikost između svih osam uzoraka mokraće praćene pacijentice.

4.11.1. Određivanje taksonomije

Pomoću QIIME programa određene su taksonomske jedinice, odnosno određeno je koje su bakterije prisutne u uzorku, sve do taksonomske jedinice roda. Ovi rezultati ne obuhvaćaju podatke o gljivama i Archeama jer su pri sekvenciranju korištene početnice isključivo za bakterijski gen za 16S rRNA.

4.11.2. Mikrobiota mokraće pod utjecajem antibiotske terapije

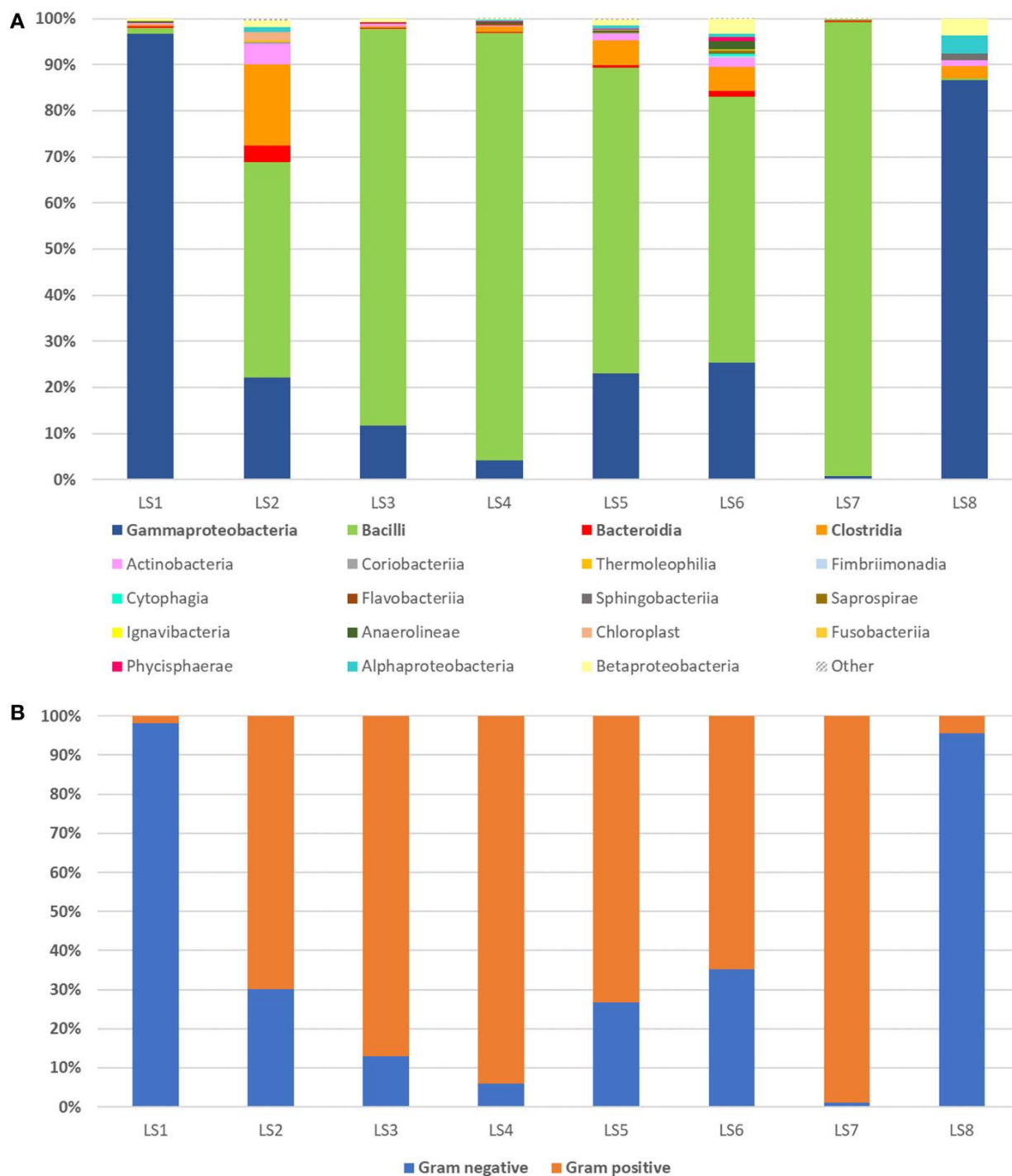
Mikrobiota mokraće pod utjecajem antibiotske terapije mijenja se svakodnevno. Taksonomska raspodjela mikrobiote u mokraći ispitanice koja je primala antibiotsku terapiju tijekom 7 dana prikazana je na Slici 19.

U prvom uzorku LS1, čak 97,69 % prisutnih bakterija pripada koljenu *Proteobacteria*, uz 1,14 % *Firmicutes* bakterija, od čega su bakterije vrste *Lactobacillus* bile prisutne sa 0,3 %. Ostatak čine *Chloroflexi* (0,19 %), *Actinobacteria* (0,13 %) i 0,44 % bakterija koje su nepoznate odnosno nije im dodijeljeno koljeno. Prvi uzorak uzorkovan je neposredno prije primjene cefaleksina, te je utvrđena dominacija bakterija neodređene vrste iz porodice *Enterobacteriaceae* s 92,40 % čime je potvrđena prethodna mikrobiološki identificirana infekcija *K. pneumoniae*. Uzorak LS2 sadrži znatno manje *Proteobacteria* (26,95 %), a znatno više *Firmicutes* (61,51 %), od kojih *Lactobacillus* vrste čine 36,50 %. Naime, *Enterobacteriaceae* koje su činile preko 95 % svih bakterija otkrivenih prvog dana, pale su na samo 1,28 %. Ostatak čine *Proteobacteria* (26,95 %), *Bacteroides* (5,02 %), *Actinobacteria* (3,83 %), *Cyanobacteria* (1,99 %), a nepoznatih vrsta je 0,60 %. Treći uzorak LS3 sadrži sličan udio *Proteobacteria* i *Firmicutes* kao i uzorak LS2; 15,76 % i 82,32 %. Osim njih pojavljuju se *Bacteroidetes* i *Actinobacteria* sa sličnim udjelom od 0,40 % i 0,44 %. LS4 uzorak, također, sličan je prethodnom. Raznolikost mikrobiote bila je niža 3. i 4. dana s prekomjernom zastupljenošću roda *Lactobacillus*, koji je obuhvaćao 85,5 % mikrobiote 3. dana i 91,9 % 4. dana. Smanjio se udio *Proteobacteria* na 6,19 %, a udio *Firmicutes* se povećao na 91,32 %. U petom uzorku došlo je do smanjenja udjela *Firmicutes* bakterija s 91,32 % na 65,50 %, a porastao je broj *Proteobacteria* s 6,19 % na 30,49 %. Udio *Planctomycetes* ostao je skoro isti (0,23 %), kao i *Chloroflexi* (0,39 %) te *Bacteroidetes* (0,85 %). Udio *Actinobacteria* porastao je na 1,89 %. Nepoznatih je 0,55 %. Peti dan terapije, odnosno šesti uzorak LS6 opet je u najvećoj mjeri sadržavao *Proteobacteria* i *Firmicutes* 38,73 % i 52,31 %. Udio *Planctomycetes* se i dalje nije značajnije mijenjao te je iznosio 1,00 %. Udjeli *Chloroflexi* i *Bacteroidetes* bili su vrlo slični 2,58 % i 2,53 %. *Firmicutes* bakterije prevladavaju u uzorku LS7 sa visokih 97,75 %. Udio *Proteobacteria* pao je na 1,08 %. Osim ta dva koljena, u sedmom uzorku nisu prisutne bakterije ranije spomenutih koljena. Taj uzorak sadrži tek 0,69 % nepoznatih bakterija. Osmi uzorak ne prati trend svih prethodnih uzoraka. Kod njega se uočava veliki iznenadni porast *Proteobacteria* na 92,39 %, od čega na *Pseudomonadaceae* otpada 74,61 %. U tom se razdoblju odnos gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija u uzorcima mokraće dramatično promijenio.

Na nivou vrste udio *Lactobacillus* raste u prva četiri uzorka i to od 0,30 % u prvom uzorku, do 36,50 % u LS2, 80,00 % u LS3 i 88,30 % u trećem danu terapije (LS4). Nakon toga udio im se smanjuje na 55,30 % u petom uzorku i 45,00 % u uzorku LS6. Maksimalni udio *Lactobacillus* bakterija bio je u uzorku LS7, šesti dan terapije i iznosio je čak 95,60 %. Zadnji dan *Lactobacillus* vrste zastupljene su samo sa 0,10 %.

U ukupnoj bakterijskoj masi porodica *Pseudomonadaceae* zastupljena je s 16,50 %, od čega 16,40 % čine bakterije vrste *Pseudomonas*. Porodica *Enterobacteriaceae* neodređene vrste najzastupljenije su, kako je već spomenuto u prvom uzorku. Nakon toga njihov broj pada i iznosi stalno oko 1,00 %, sve do šestog uzorka u kojem se penje na 2,40 %. U uzorku LS7 skoro niti nema tih bakterija (0,10 %), a u zadnjem uzorku udio raste na 2,90 %. Bakterija vrste *Pseudomonas* čine mali udio bakterija u prvom uzorku od samo 0,40 %. Nakon toga udio im raste na 18,90 % u uzorku LS2 i 13,00 % u uzorku LS3. Zatim naglo pada u četvrtom uzorku na 4,20 % da bi se opet povisio četvrtog dana terapije (LS5) na 23,00 %. LS6 uzorak sadrži 19,20 % tih bakterija, a predzadnji uzorak ima slični udio kao i prvi 0,60%. Zadnji uzorak pokazuje maksimalni udio *Pseudomonas* bakterija i on iznosi 51,60 %

Brojnost gram-negativnih bakterija postupno se smanjuje od prvog do četvrtoga dana, ali se opet povećava, kao što se vidi 5. i 6. dana. *Lactobacillus* spp., koja je gram-pozitivna bakterija, dominira profilom mikrobiote 7. dana, dok je 8. dan, više od 90 % bakterija pripadalo gram-negativnim vrstama zbog prekomjernog prisustva *Pseudomonadaceae*.



Slika 19.

a) Relativna zastupljenost bakterijskih porodica identificiranih sekvenciranjem 16S rRNA gena u uzorcima mokraće pacijentice tijekom sedmodnevne antibiotske terapije cefaleksinom.

b) Grafički prikaz promjene odnosa gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (omjer) tijekom sedmodnevne antibiotske terapije cefaleksinom.

4.11.2.1. Alfa raznolikost

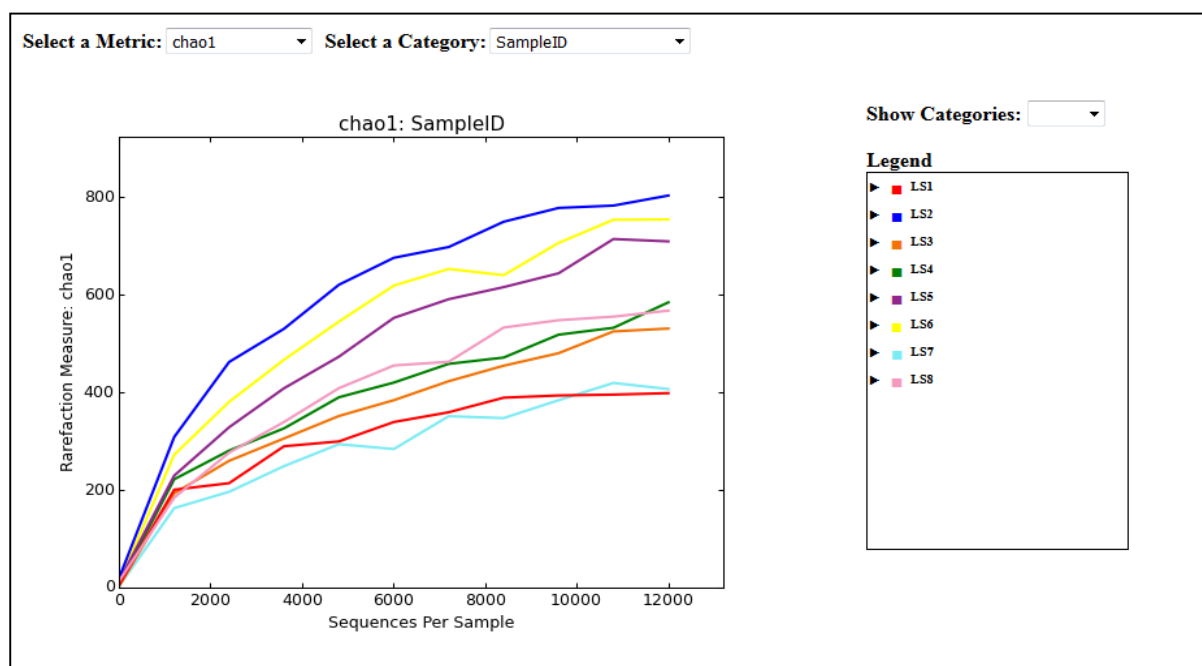
QIIME program nudi uporabu raznih mjernih alata za određivanje alfa raznolikosti, a tri najčešće korištene su; *PD whole tree*; *chao1* i *observed otus*. Serijom naredbi u QIIME-u generirani su grafovi krivulja koje služe za vizualizaciju samih rezultata i utvrđivanje točnosti karakterizacije bakterijskih zajednica. Krivulje se stvaraju tako da se svaka zajednica nasumično poduzorkuje bez zamjene u različitim intervalima, te se za svaki interval odredi prosječan broj Otu-a te prikazuje u odnosu na veličinu poduzorka. Točka u kojoj se broj Otu-a ne povećava s daljnjim uzorkovanjem je točka u kojoj je uzeto dovoljno uzoraka za preciznu karakterizaciju zajednice.

Koristeći *observed otus* mjernu metodu očitava se da je najveća alfa raznolikost prisutna u uzorku LS2 koji predstavlja uzorak prvog dana terapije antibiotikom cefaleksinom. Nakon toga, slijedi uzorak LS6 s malo manjom raznolikošću, te LS5 koji sadrži još manje bakterijskih vrsta od prethodnih uzoraka. Raznolikost uzoraka smanjuje se redom – LS4, LS8, LS3 i LS1. Najmanju raznolikost, odnosno najmanji broj bakterijskih vrsta ima uzorak LS7. Krivulje završavaju s 12 000 sekvenci po uzorku (maksimalni broj sekvenci u svih osam uzoraka). Krivulje nisu postigle izgled hiperbole, odnosno nisu se ustalile što može upućivati na to da rezultati broja vrsta nisu maksimalni, odnosno da bi veći broj sekvenci po uzorku dao i pouzdanije podatke, odnosno veći broj vrsta u svakom uzorku.

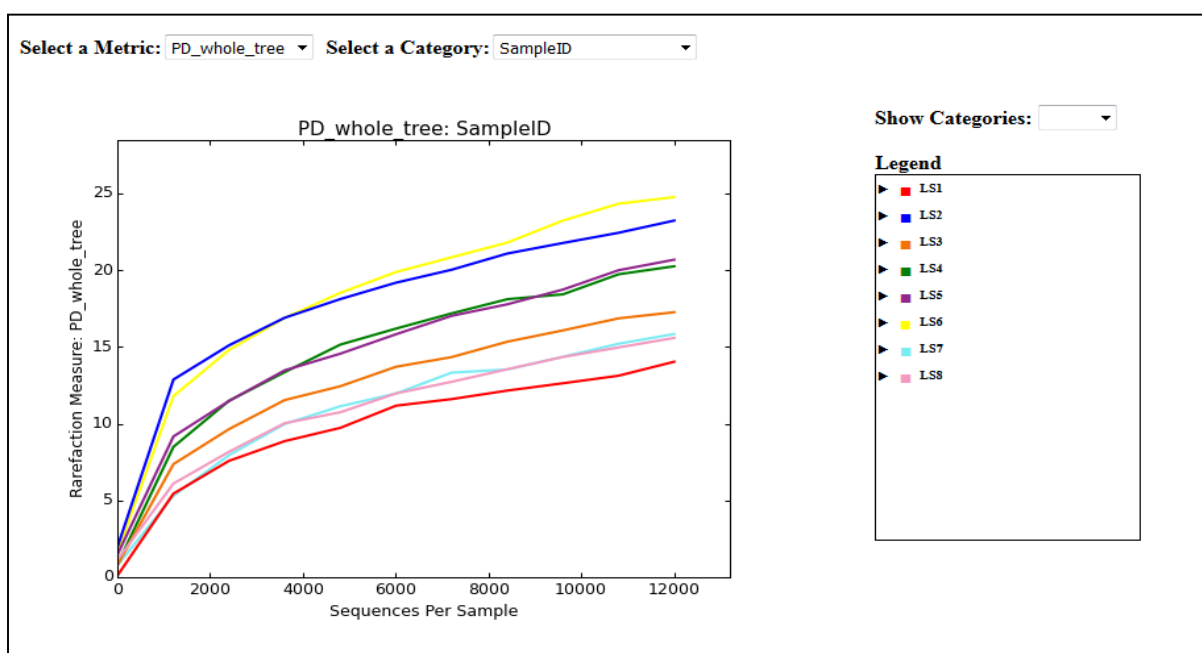
Zaključke dobivene *observed otus* metrikom većinom podupiru i rezultati određivanja alfa raznolikosti provedeni s druge dvije korištene metrike; – *chao1* i *PD whole tree*. Njihovi grafički prikazi pokazani su na Slici 20. a i 20. b. Na njima je razvidno da se kod metrike *chao1* pojavljuju mala odstupanja u odnosu na *observed otus* metriku. Ipak, razlike u raznolikosti uzoraka jednake su kao i u prethodnoj metrici, s iznimkom da najmanju raznolikost u ovom slučaju sadrži uzorak LS1, a ne uzorak LS7 kao što je prethodno zaključeno, iako je razlika među njima u ovom slučaju minimalna. Ostali se rezultati slažu s prethodnim zaključcima. Treća korištena metrika – *PD whole tree* također ima manja odstupanja u odnosu na *observed otus*, i poneka slaganja s *chao1* metrikom. U ovom slučaju najveća raznolikost vrsta pridodaje se uzorku LS6, a ne LS2 kao do sada. Kod redoslijeda uzoraka LS4 i LS5 nema promjene, dok se u ovom slučaju uzorak LS3 našao na petom mjestu po raznolikosti. Uzroci LS7 i LS8 imaju gotovo identičan broj vrsta, a najmanju raznolikost u ovom slučaju pokazuje uzorak LS1, kao i kod analize *chao1* metrikom. Unatoč malim odstupanjima u rezultatima raznolikosti korištenjem tri različite metrike rezultati se mogu smatrati pouzdanima i može se zaključno

reći da je uzorak najveće raznolikosti uzorak LS2, a najmanje uzorak LS1. To je u skladu s očekivanjima jer je uzorak LS1 uzorak mokraće prije terapije u kojem prevladava većinom uropatogen koji izaziva bolest, dok je uzorak LS2 uzorak mokraće uzet 24 h nakon početka terapije cefaleksinom, te je i očekivana znatna promjena u broju i vrstama bakterija. Terapija antibiotikom je naglo uništila veliki broj patogenih bakterija prisutnih prvoga dana, koje su se zamijenile s dijelom bakterija inače prisutnih u mokraći uz ostatak patogenih koje su još uvijek prisutne.

a)



b)

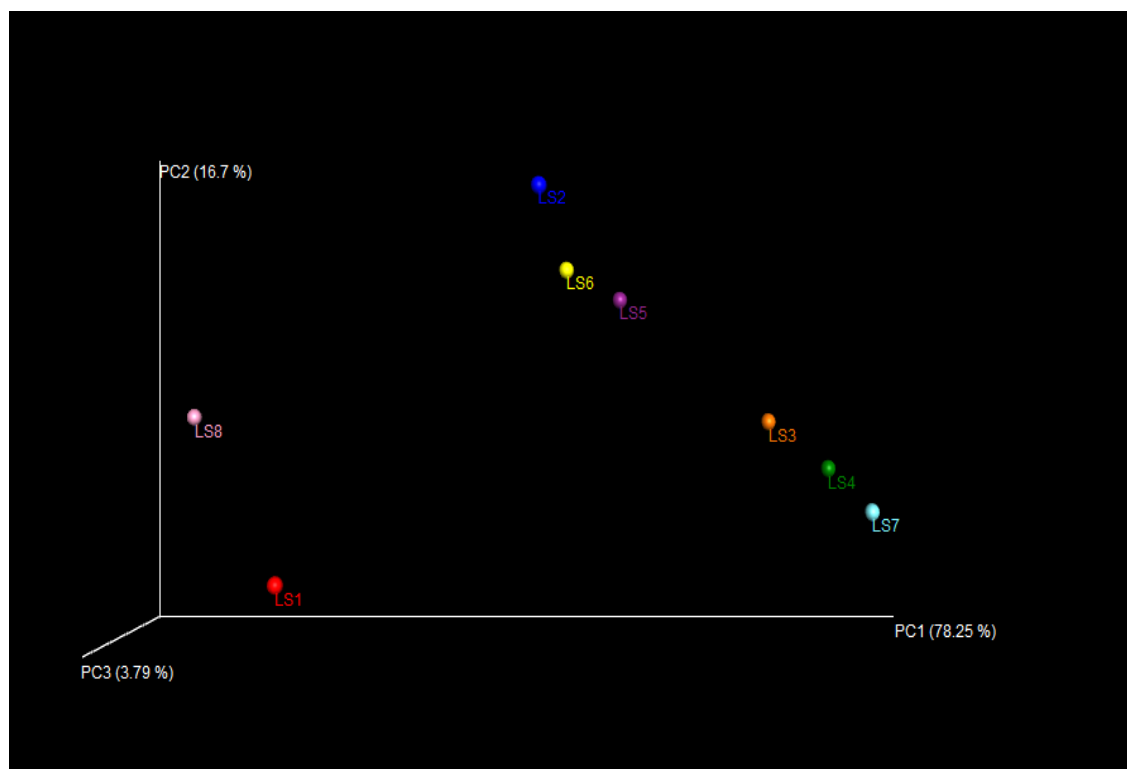


Slika 20. a) prikaz krivulja razrjeđenja chao1 metrikom i b) PD whole tree metrikom

4.11.2.2. Beta raznolikost

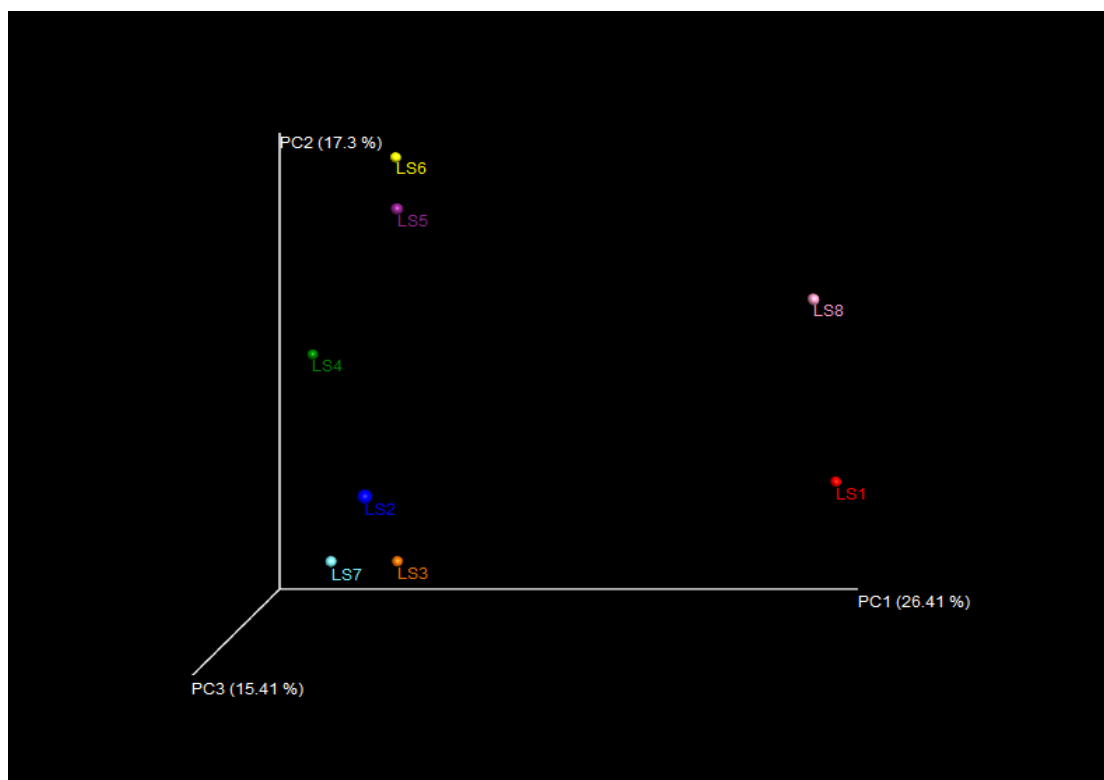
Beta raznolikost predstavlja međusobnu usporedbu uzoraka (mjeru udaljenosti ili različitosti između uzoraka). Korištene su dvije mjerne metode za određivanje beta raznolikosti dostupne programom QIIME; *Weighted UniFrac* i *Un-Weighted UniFrac*. *UniFrac* izračunava udaljenost između parova uzoraka tako da pozicionira sve taksonomske jedinice prisutne u jednom ili oba uzorka na filogenetsko stablo. Grana stabla koja vodi do taksonomske jedinice zajedničke za oba uzorka označava se kao dijeljena dok ona koja vodi do taksonomske jedinice prisutne u samo jednom uzorku kao nedijeljena. Udaljenost između uzoraka izračunava se kao omjer dužine nedijeljenih grana i ukupne dužine grana (dijeljene + nedijeljene). Razlika između *Weighted* i *Un-Weighted UniFrac* metrike je u tome da *Weighted UniFrac* kod izračunavanja udaljenosti između uzoraka uzima u obzir i zastupljenost pojedinih taksonomskih jedinica, a ne samo njihovu prisutnost. PCoA je metoda korištena za istraživanje sličnosti i različitosti podataka beta raznolikosti.

Weighted UniFrac program prilagođen je za otkrivanje razlika zastupljenosti mikroorganizama, čak i kada skupine organizama prisutne u svakom uzorku ostaju iste. PCoA analiza pokazuje da je beta raznolikost uzoraka LS2, LS6 i LS5 slična, kao i uzoraka LS3, LS4 i LS7 (Slika 21.). Uzorci LS8 i LS1 svojom se raznolikošću međusobno razlikuju, te odudaraju od ostalih uzoraka. Ove rezultate potvrđuje i Slika 16. iz koje je razvidno da uzorci LS1 i LS8 imaju najmanje zajedničkih bakterijskih vrsta u odnosu na ostale uzorke a razlikuju se i međusobno. Također, uočljivo je da uzorci LS2, LS5 i LS6 dijele veliki broj istih bakterijskih vrsta, kao i ostala tri uzorka (LS3, LS4 i LS7). Logično je da uzorak LS1 odudara od ostalih jer je to uzorak uzet prije korištenja antibiotika, a ostalih sedam uzoraka predstavljaju uzorke uzete za vrijeme terapije, te se vrste drastično mijenjaju korištenjem cefaleksina. Uzorak LS8 odskaka od ostalih uzoraka. Ostali uzorci grupirani su u dvije skupine raznolikosti. Uzorci LS6 i LS7 vrlo su slični bakterijskim sastavom što je i logično jer su to dva uzastopna uzorka, kao i uzorci LS3 i LS4 iz druge skupine.



Slika 21. PCoA prikaz beta raznolikosti koristeći „Weighted UniFrac“

Un-Weighted UniFrac program prilagođen je za detektiranje razlike u prisutnosti ili odsutnosti vrsta bakterija u različitim uzorcima. Rezultati se, očekivano, razlikuju od rezultata dobivenih *Weighted* programom (Slika 21.). U ovom su slučaju grupiranja drugačija nego u prethodnom slučaju. Najveću sličnost pokazuju uzorci LS2, LS3 i LS7, zatim uzorci LS5 i LS6 što znači da je njihova beta raznolikost mala. Logična je povezanost uzoraka LS5 i LS6 jer su to uzorci uzeti dva dana za redom. To se odnosi i na uzorke LS2 i LS3. Uz njih imamo i uzorak LS7. Uzorak LS4 u ovom mjerenju odudara svojom raznolikošću od ostalih, što u prethodnom mjerenju nije bio slučaj. No, ako se promatra po osi PC1 i dalje svi uzorci osim prvog i posljednjega pokazuju veliku sličnost što se slaže s prije opaženim rezultatima. Što se tiče uzoraka LS1 i LS8 oni i dalje ostaju daleko od ostalih uzoraka, a nemaju velike sličnosti ni međusobno, odnosno imaju veliku beta raznolikost. Budući da su određeni uzorci grupirani u slučaju korištenja *Weighted* metode, a nisu u slučaju *Un-Weighted* metode, tada je veća ili manja brojnost nekoliko Otu-a glavni razlog grupiranja u prvom slučaju. No, kada se u *Un-Weighted* metodi u obzir uzmu svi Otu-i, te razlike se gube i grupiranje više nije jednako (Slika 22.).

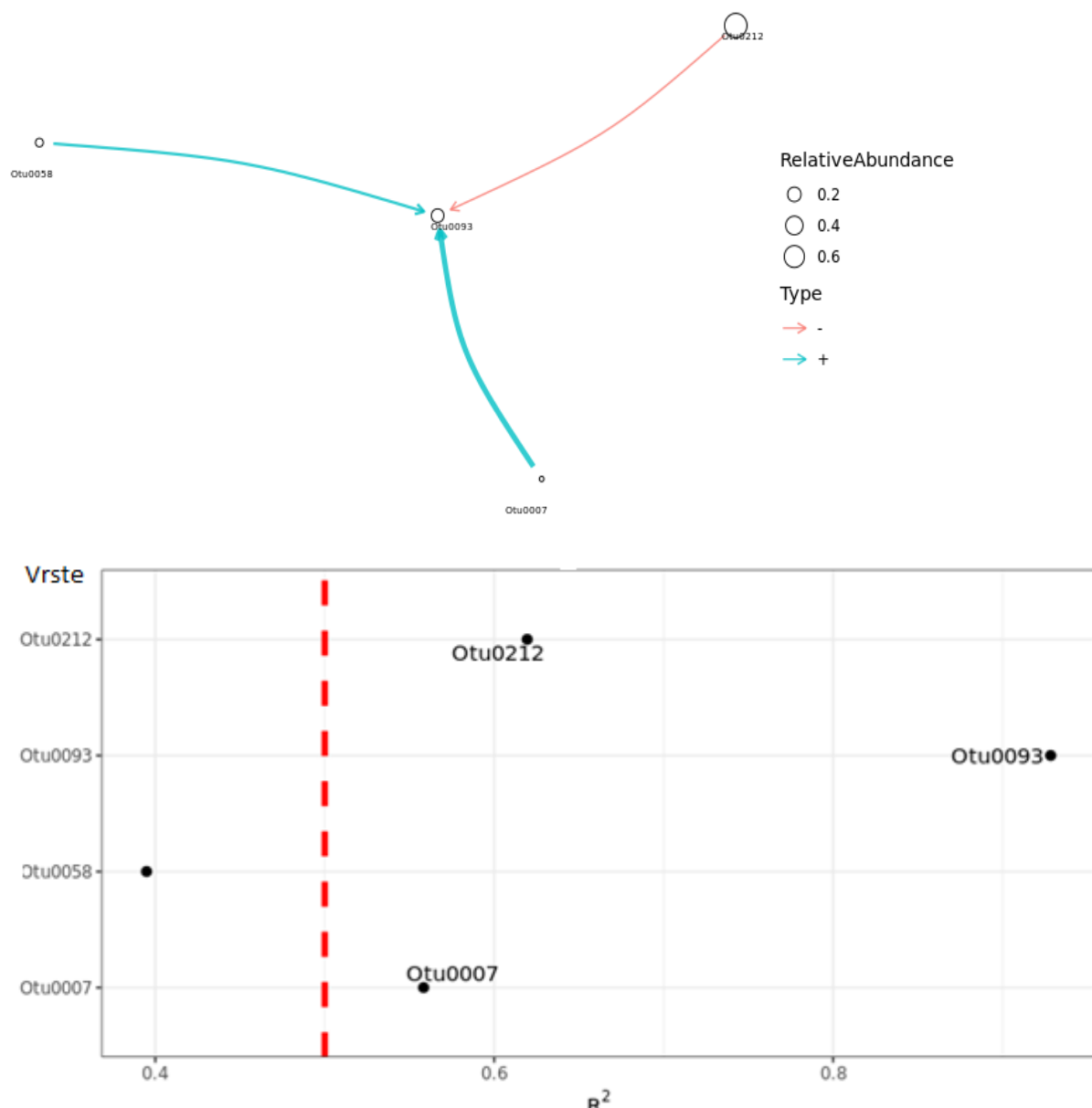


Slika 22. PCoA prikaz beta raznolikosti koristeći *Un-Weighted UniFrac* metriku

4.11.2.3. Praćenje promjene dinamike rodova uzrokovane primjenom antibiotske terapije

Tablica 16. Filtrirana tablica Otu vrijednosti

TAXID	Kingdom	Phylum	Class
Otu0007	k__Bacteria	p__Actinobacteria	c__Actinobacteria
Otu0058	k__Bacteria	p__Bacteroidetes	c__Bacteroidia
Otu0093	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Bacilli
Otu0146	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Clostridia
Otu0161	k__Bacteria	p__Firmicutes	c__Erysipelotrichi
Otu0184	k__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Betaproteobacteria
Otu0212	k__Bacteria	p__Proteobacteria	c__Gammaproteobacteria



Slika 23. Grafički prikaz profiliranja mikrobioma uzoraka mokraće pomoću BEEM programa

U grafičkom prikazu crvene linije predstavljaju negativne interakcije, a plave pozitivne. Širine strelica proporcionalne su jačini interakcije, a veličine čvorova proporcionalne su logaritamskoj transformaciji srednje vrijednosti relativne zastupljenosti odgovarajuće klase. Čvorovi označavaju taksonomsku razinu klase kako je opisano u Tablici 16.

U Otu tablici upisan je broj sekvenci koje se promatraju za svaku taksonomsku vrstu svakoga pojedinog uzorka. U svrhu modeliranja promjena mikrobiote tijekom terapije antibiotikom koji se primjenjuje svakih 24 sata korišten je izvorni BEEM algoritam za longitudinalne podatke. Ulazni podaci za BEEM (83) sastojali su se od dvije datoteke: Otu tablice koja sadrži broj sekvenci koje su se promatrale za svaku taksonomsku jedinicu u

svakom uzorku i metapodataka mjerenja ovisnih o vremenu. Različite su taksonomske jedinice grupirane u 35 različitih klasa. Samo najbrojniji Otu-i (koji su se pojavljivali u >50% uzoraka mokraća) uvršteni su u model. U ovom su slučaju bila 4 Otu-a normalizirana u relativne količine u svih 8 uzoraka, služeći kao ulazni podaci za BEEM model. Mreža mikrobnih interakcija temeljena na tim Otu-ima prikazana je na Slici 23.

Za razliku od prethodnog modela koji je ispitan na različitim pacijentima bez terapije antibioticima, ovaj model stavlja klasu *Bacilli* (Otu0093) u samo središte modela, te pokazuje da na nju negativno utječe klasa *Gammaproteobacteria* (Otu0212), koja je najrasprostranjenija. Ovaj model isto tako ukazuje na razliku u odnosu između dvije pozitivne interakcije; slabija interakcija utvrđena je između klase *Bacteroidia* (Otu0058) i *Bacilli* (Otu0093), a jača između *Actinobacteria* (Otu0007) i *Bacilli* (Otu0093) klase. To ukazuje da su kod ove ispitanice *Actinobacteria* podržavale klasu *Bacilli* kojoj pripada *Lactobacillus*, dok su se bakterije iz klase *Gammaproteobacteria* aktivno natjecale protiv njega za vrijeme antibiotskog liječenja.

5. RASPRAVA

5.1. Razdioba uzoraka

IMS se dijele na nekomplikirane i komplicirane. Nekomplikiranim infekcijama smatraju se infekcije kod kojih nisu prisutne anatomske anomalije mokraćnoga sustava, bubežna oštećenja kao ni popratne bolesti i stanja koja bi promovirala IMS. Komplicirane IMS-a se povezuju sa svim stanjima koja povećavaju rizik od neuspjeha liječenja. U ovom radu učinjena je razdioba uzoraka prema uputnoj dijagnozi, koncentraciji patogena, njihovoj kliničkoj značajnosti te prema uzročniku.

Brojne studije navode iznimno visok postotak sterilnih urinokultura u kliničkoj praksi, te dok jedne navode čak 70-80 % njihove zastupljenosti (84, 85), druge bilježe znatno niže vrijednosti između 40 i 60 % (86, 87). Danas, u doba izmjene paradigme sterilne mokraće više se ne govori o nalazu sterilne mokraće već o nalazu fiziološke flore mokraće ili nalazu mokraće u kojoj nisu identificirani mikroorganizmi. Od 279 prikupljenih uzoraka mokraće 24 % uzoraka označeni su kao sterilni, što se značajno razlikuje od rezultata prethodnih studija. Međutim, ovakav rezultat može se objasniti profilom pacijenata KB Dubrava, te činjenicom da je laboratorij bio smješten u sklopu objekta tercijarne zdravstvene zaštite. Iz rezultata je vidljivo da su uputne dijagnoze zbog kojih je zatražena pretraga urinokulture raznolike. Uz 45 % urinokultura upućenih zbog sumnje na cistitis i ostale infektivne bolesti bilo je 6 % kamenaca bubrega i uretre, 4 % benignih hiperplazija prostate, 5 % zloćudnih novotvorina mokraćnoga trakta te 40 % ostalih uputnih dijagnoza. U skladu s uputnim dijagnozama očekivan je veći udio kompliciranih IMS-a, te u skladu s tim i manji udio sterilnih urinokultura. Ipak, primjenom preporuka Europskih smjernica za prihvatljive pragove *E. coli* $<10^2$ CFU/ml, te ostale uropatogene $<10^4$ CFU/ml (36) dobiveno je 63 % uzoraka mokraće s koncentracijom uropatogena nižom od navedenoga praga, te su dobiveni rezultati u korelaciji s prethodno navedenim studijama. Literaturni podatci *E. coli* (UPEC) navode kao vodeći uropatogen, koji uzrokuje čak do 80 % IMS-a, (13). Kod nekomplikiranih IMS-a, nakon UPEC-a po prevalenciji slijede *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, streptokok grupe B (BHSB), *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *Candida* spp., dok kod kompliciranih IMS-a iza UPEC-a kao najčešćeg uzročnika slijede *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis* i *P. aeruginosa*.

Razdioba uzročnika IMS-a u analiziranim uzorcima s $>10^5$ CFU/ml je sljedeća: *E. coli* 48 %; vvGPB 17 %; *Enterococcus* spp. 6 %; *K. pneumoniae* 6 %, *Lactobacillus* spp. 5 %; *E. geraviae*

4 %, *P. mirabilis* 4 %, *P. aeruginosa* 4 %, *M. morgani* 3 %, *Candida* spp. 3 %, *Streptococcus* species 3 %, *C. coseri* 1 % te je pratila literaturne podatke (36).

5.2. Fizikalno-kemijski pregled mokraće

Uobičajeni probirni test mokraće provodi se test trakom (za određivanje leukocita i/ili nitrita). Ovaj test karakterizira niska specifičnost i osjetljivost. Leukociti u mokraći najvećim su dijelom neutrofilni granulociti pa se i dokazivanje u mokraći zasniva na reakciji esteraze iz te vrste leukocita. Prisutnost leukocita u mokraći povezana je s infekcijama mokraćnoga trakta, ali i neinfektivnim bolestima bubrega. Nitrati se izlučuju u mokraću, te se u prisustvu bakterija reduciraju u nitrite. Prisutnost nitrita u mokraći jedan je od najvažnijih znakova bakterijske infekcije mokraćnoga sustava. Test traka će detektirati nitrite ukoliko se u mokraćnom traktu nalaze bakterije koje sadrže enzim nitrat-reduktaze. Takve bakterije su gram negativne *E. coli*, *Proteus* spp., *Klebsiela* spp. te *Pseudomonas* spp. Iz toga razloga, negativan rezultat ne isključuje infekciju zbog moguće prisutnosti bakterija koje ne reduciraju nitrate u nitrite, poput *Enterococcus* spp. i *Staphylococcus* spp. (88).

Test trakama ispitano je 16 uzoraka s $>10^5$ CFU/ml, a rezultati su dali pozitivnu reakciju nitrita u 5/16 (31 %) i leukocitne esteraze u 9/16 (56 %), te proteina u 7/16 (44 %) uzoraka. Kombiniranjem rezultata pozitivne reakcije nitrita i/ili leukocita osjetljivost trake u dijagnostici IMS povećana je na 9/16 (56 %), te dodavanjem proteina na čak 13/16 (82 %). U rutinskoj upotrebi patološka urinska test traka ili normalna test traka zamućenoga uzorka mokraće uvijek se nadopunjuje pregledom sedimenta. Literaturni podatci navode osjetljivost leukocitne esteraze od 48-86 %, te je vidljivo da su prikazani rezultati u skladu s tim podacima. Osjetljivost nitrita varira od 45 do 60 % te je utvrđena osjetljivost od 31 % niža od literaturno dostupnih podataka. S obzirom na mali broj uzoraka kod kojih je učinjen fizikalno-kemijski pregled mokraće razlike u vrijednostima nisu statistički evaluirane (89).

5.3. Antimikrobna osjetljivost

IMS druga su najčešća indikacija za primjenu antibiotske terapije. Ključ upravljanja terapijskim mogućnostima podrazumijeva poznavanje uobičajenih patogena, i njihove antimikrobne osjetljivosti, te empirijski odabir liječenja. Mikrobiološka provjera antimikrobne

osjetljivosti provodi se najčešće kod neuspjeha empirijske ili početne terapije ili u kompliciranim infekcijama. Kako je rezistencija bakterija na antibiotike jedan od vodećih problema današnje medicine, međunarodne smjernice u liječenju nekomplikiranih mokraćnih infekcija inzistiraju na strategiji koja uključuje procjenu djelotvornosti (eradikaciju patogena) terapije kao i minimalizaciju rizika nastanka antibiotske rezistencije neracionalnom uporabom antimikrobnih lijekova. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj, na godišnjoj razini prati i izvještava o osjetljivosti i rezistenciji bakterija na antibiotike (90). Antimikrobne rezistencije praćene u sklopu ovog istraživanja prate objavljene literaturne podatke (91). Također, usporedbom ovih rezultata iz 2017. godine s rezultatima autora Vojvodić i Daus Šebeđak moglo bi se zaključiti da u periodu od 3 godine nije došlo do značajnog porasta rezistencije *E. coli* na fluorokinolone (14)

5.4. Proteomska identifikacija uropatogena

5.4.1. Utjecaj skladištenja i temperature

Jedan od postupaka liziranja suspenzije stanica temelji se na postupku izmjena temperatura. S obzirom da voda mijenja volumen promjenom temperature dolazi do izmjena volumena staničnoga sadržaja te u konačnici pucanja staničnih membrana (92). Pretpostavka je da dugotrajno smrzavanje uzoraka uzrokuje veću krhkost bakterija, što dovodi do većeg gubitka taloga tijekom centrifugiranja, te je zaključeno da dugotrajno skladištenje, više od 3 mjeseca, na -80 °C, pridonosi gubitku bakterijske biomase.

S druge strane, uzorci pohranjeni na -20 °C pokazali su obilnu biomasu, međutim uz bakterijsku, znatno je povećan sadržaj i ljudske biomase te se pojavio izazov ispiranja takvih taloga. Razlog tome najvjerojatnije je bila agregacija humanih stanica, pogotovo jer je u nekim uzorcima bilo dokazano prisustvo krvnih stanica. Nadalje, dobro odvajanje bakterijske stanice od drugih elemenata potencijalno prisutnih u mokraći kao što su gljive, epitelne stanice, leukociti, eritrociti, sluz, mokraćni kristali i cilindri ovisi o brzini centrifugiranja (92, 93). Naime, pri velikim brzinama centrifugiranja talog će vjerojatno biti bogat ljudskim staničnim ostacima. Oštećene stanice će se isprati tijekom postupka pripreme uzorka. Volumen taloga identificiran je kao važan element koji je utjecao na uspjeh pozitivne identifikacije proteina. Mikrobna biomasa je nakon pranja morala biti vidljiva golim okom (Slika 1.). U ovom

istraživanju, kratkotrajno skladištenje mokraće, do 4 tjedna na - 20 °C pokazalo se dobrim izborom za očuvanje bakterija u prikupljenim uzorcima.

Prethodne studije razmatrale su utjecaj ultrazvuka na mikroorganizme radi poboljšane pripreme uzoraka (93 - 96), koji je korišten u ovoj studiji u izolaciji bakterijske biomase iz bakterijskih kultura. Prema provedenom istraživanju ekstrakcija proteina iz bakterijske biomase iz uzoraka mokraće pomoću ne-ionskog detergenta, B-PER-a, i SDS lizirajućeg pufera bila je uspješna i za gram-negativne i gram-pozitivne bakterije, pa nije bilo potrebe za dodatnim mehaničkim metodama za destrukciju stanica.

5.4.2. Frakcioniranje i pročišćavanje peptida

Tijekom preliminarne studije kompletna smjesa peptida nakapana je na MALDI pločicu te je utvrđeno da njihovo razlučivanje nije dovoljno za identifikaciju bakterijskih vrsta. Iz tog razloga izolirani talog mokraće tretiran je tripsinom te je izvršeno frakcionacije dobivenih peptida automatskom platformom Agilent Bravo (96-kanalna). Koristeći platformu Agilent Bravo, smjesa peptida razdvojena je na 6 frakcija od kojih je 5 korišteno za daljnje analize, s obzirom da šesta frakcija nije sadržavala dostatan broj peptida. Frakcioniranjem peptida povećan je ukupan broj detektiranih peptida, a time i broj proteina, što je u konačnici omogućilo/poboljšalo identifikaciju mikroorganizama. Frakcioniranje smjese peptida u 36 frakcija (opisano u poglavlju 3.3.5.5) dodatno je poboljšalo razlučivost peptida te omogućilo pouzdano *de novo* sekvenciranje većeg broja peptida. Filter za proteomsku predobradu uzorka (FASP) korišten je u svrhu daljnjega poboljšanja proteomske obrade. FASP je filterski sustav za ultrafiltraciju pri čemu su pore membrane dovoljno male da omogućuju prolazak kontaminirajućih detergenata, dok su proteini preveliki i zadržavaju se i koncentriraju na površini filtra. Ova metoda pripreme uzoraka i digestije proteina univerzalno je primjenjiva i jednostavna za rutinsku upotrebu. Protokol korišten u ovom radu, uz prethodno opisane korekcije, preuzet je od Yu i sur. (87) te je potvrđena njegova učinkovitost.

Ovim dodatnim postupcima uključenim u predpripremu i izolaciju proteina iz nativnih uzoraka mokraće postiže se bolja topljivost kako mikrobnih tako i ljudskih proteina, generira se enzimska smjesa peptida, te optimizira postupak odsoljavanja kako bi se osigurala frakcija peptida za osjetljiviju i sveobuhvatniju MS/MS analizu.

5.4.3. Proteomska identifikacija uropatogena

Rezultati ovoga rada ukazuju da se, na relativno malom broju identificiranih bakterijskih proteina po uzorku, točno identificiraju patogene vrste na razini roda. Iako rezultati ukazuju na to da je identifikacija bakterija temeljena na proteomskoj analizi s malim brojem proteina izvediva, ipak više spektara i dostupnost većih frakcija proteoma povoljniji su i pouzdaniji kad se radi o identifikaciji mikroorganizama (97). U istraživanju polimikrobnih kultura (UR11, UR15 i UR16) uspoređeni su rezultati dobiveni SUK-om, sekvenciranjem gena za 16S rRNA i proteomskom analizom (Tablica 8.).

Prethodno iskustvo s MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom pokazalo je da korištenje ove platforme za proteomiku u svrhu identifikacije bakterija u polimikrobnim uzorcima mokraće ima svoja ograničenja. Kao što su prethodno izvijestili drugi autori, MALDI-TOF MS identifikacija polimikrobnih kultura izravno iz uzoraka mokraće nije davala pouzdane rezultate, te ta ograničenja, kako je razvidno iz ovoga doktorskog istraživanja, nisu nadvladana (94, 98). Proteomska identifikacija bakterija na razini soja i dalje se smatra izazovom. Temeljni čimbenici koji ugrožavaju osjetljivost ove metode u identifikaciji bakterija su: prisutnost tj. onečišćenje uzorka proteinima ljudskoga porijekla, mala zastupljenost bakterijskih proteina u uzorku (99), nedovoljna pokrivenost urinarnih bakterijskih vrsta u bazama podataka, zajedničke sekvence peptida među proteinima različitih mikroorganizama (100) kao i mogućnost stvaranja nedovoljne razine podataka pojedinačnom injekcijom MS po uzorku (101). Tandem MS popraćena je sa sve većim bazama podataka i obradom podataka kroz širok spektar alata za bioinformatiku te to predstavlja potencijal koji bi u budućnosti mogao omogućiti polimikrobnu identifikaciju (102, 103), iako je to danas još uvijek u području eksperimentalnih istraživanja i daleko od kliničke prakse.

Uobičajena ljudska mokraća zdrave osobe sadrži preko 2000 proteina (104, 105), dok se čak preko 5000 proteina može naći u uzorku mokraće za vrijeme uroinfekcije (38). U ovom istraživanju uočeno je da je u ukupnim proteinima dobivenim obradom mokraće prosječno prisutno oko 29 % ljudskih proteina. U Tablici 5. i Tablici 6. prikazan je kvantitativni pregled bakterijskih i ljudskih proteina svakoga uzorka. Glavnim ograničenjem proteomske metode identifikacije urinarnih mikroorganizama smatra se mali broj identificiranih proteina po uzorku. Većina studija koje su provodile analizu proteoma u svrhu identifikacije bakterija bile su ograničene na monomikrobne uzorke s visokom koncentracijom CFU/ml. Pokušaji nadilaženja ovoga problema obuhvatili su povećanje broja proteina i njihovih peptidnih

fragmenata metodom dvostrukoga frakcioniranja i uvođenjem FASP protokola. Unatoč tome, proteomskom analizom, bilo pretragom baze podataka ili *de novo* sekvenciranjem peptida, nije bilo moguća identifikacija na razini soja.

5.4.4. Mascot program koji se koristi za analizu MS i MS/MS spektralnih podataka

Mascot je robustan pretraživački programski paket koji se koristi za analizu MS i MS/MS spektralnih podataka, odnosno identifikaciju proteina pomoću baze podataka primarnih sekvencija proteina. Mascot program može koristiti podatke producirane iz različitih spektrometara masa.

Tri su najčešće kategorije njegovoga načina rada:

- pretraživanje pomoću otiska prsta,
- pretraživanje pomoću aminokiselinskih sekvencije kao upita (engl. *Sequence Query*) i
- MS/MS pretraživanje iona.

Metodom pretraživanja pomoću otiska prsta, mase peptida određene spektrometrijom masa (MS analizom) dobivenih prethodnom enzimskom digestijom čine ulazne podatke za pretragu baza podataka primarnih aminokiselinskih sekvencija proteina. Moguće je definirati željenu proteinsku bazu podataka pomoću koje će se vršiti pretraga (npr. SwissProt ili NCBIInr). S obzirom na činjenicu da je enzimska digestija specifična (najčešće se koristi enzim tripsin koji kida proteine iza arginina i lizina ako se prije ne nalazi prolin), ovim jednostavnim pristupom moguće je na temelju MS informacija pronaći odgovarajući peptid pretragom baza podataka. Ako se protein ne nalazi u bazi podataka ili ako se iz MS informacija ne može doći do jedinstvenoga identifikacijskog odgovora, tada se pomoću homolognih proteina pronalaze najbliži proteini. Pretragu uvelike olakšava povezivanje MS podataka i MS/MS podataka dobivenih dodatnim kidanjem svih peptida u spektrometru masa kod kojih metoda otiska prsta nije dala jednoznačan rezultat.

Parametri analize koji otežavaju konačnu identifikaciju proteina su: izmješteno kidanje (engl. *Missed Cleavage Site*); peptidi mase manje od 500 Da i autoliza proteolitičkog enzima. Izmješteno kidanje proizlazi iz nesavršenosti djelovanja proteolitičkih enzima. Ako proteolitički enzim ne pokida protein na točno određenom mjestu pojavljuje se peptid koji veličinom prelazi očekivanu veličinu u bazi podataka. Izmješteno kidanje valja uzeti u obzir prije same bioinformatičke analize identifikacije proteina, a definira se brojem očekivanih

izmještenih kidanja po peptidu (npr. manje od jednog, dva, tri ili više). Nakon definiranja broja izmještenih kidanja, pretražni program uzet će u obzir modificirani algoritam, koji cjelokupnu proteinsku bazu prilagođava zadanim vrijednostima. Poželjan je broj izmještenih kidanja manji od dva, jer inače broj kombinacija mogućih peptida postaje prevelik te pretražna analiza može trajati predugo. Preporuke za peptide mase <500 Da su da se peptidi, dužine, od najčešće tri ili četiri aminokiseline, niti ne pokušavaju identificirati, a algoritmom ih sa uobičajenim postavkama zanemaruje. Treća stavka o kojoj valja voditi računa je autoliza proteolitičkoga enzima. Autoliza proteolitičkoga enzima producira peptide koji mogu interferirati s identifikacijom ciljanih proteina i valja je definirati prije početka pretrage. Algoritam za pretraživanje već ima definirane mase fragmenata peptida više vrsta proteolitičkih enzima (npr. triptički fragmenti proteina svinjskoga ili goveđega tripsina), te ih ne uzima u obzir prilikom pretrage. Različiti spektrometri masa mjere mase fragmenata proteina s različitom točnošću, te je zato neophodno definirati očekivane vrijednosti pogreške mjerenja masa koje su vezane uz upotrebu različitih analizatora u spektrometriji masa (106). Algoritmu za pretraživanje moguće je zadati toleranciju mase ili postotak mase koji se može razlikovati od prave vrijednosti analiziranih fragmenata peptida.

Rezultati opisani pod točkom 4.7. pokazuju identifikaciju uzoraka pripremljenih izravno iz uzoraka mokraća, prema protokolu koji je uspostavljen u svrhu ovoga istraživanja. Rezultati pokazuju značajan udio humanih peptida, što je bilo očekivano. Međutim, prema literaturnim podacima nije bilo očekivano da će analiza računalnim programom Mascot, gdje je korištena pretraga na razini koljena, omogućiti identifikaciju uropatogena do razine vrste. S obzirom na relativno niski broj izoliranih bakterijskih peptida, ova proteomska metoda za monobakterijske uzorke pokazala se obećavajuća. Nadalje, kod polimikrobnih uzoraka LC-MS/MS analiza imala bi više smisla, jer bi se time riješio problem maloga broja proteina u identifikaciji. Kako je ranije navedeno, osim Mascot programa korištena je i jednostavna statistika u svrhu rangiranja proteina prema zbirnom rezultatu što se pokazalo uspješnim.

5.5. Urinarna mikrobiota u pacijenata s bakteriurijom

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju dominantnu zastupljenost vrsta *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u uzorcima mokraće ispitanika sa simptomima cistitisa, kao i relativno mali broj rodova po pojedinačnom uzorku, što je u skladu s prethodnim istraživanjima

koja su se bavila cistitisom (107). Biološki značaj prevladavanja bilo kojega određenog organizma (urotipa) ili nedostatak pretežitog mikroba još nije poznat, međutim, dobiveni rezultati ukazuju da razred bakterija *Gammaproteobacteria* dominira u uzorcima bolesnika sa simptomima cistitisa. Upravo su uropatogeni iz toga razreda SUK-om definirani kao uzročnici cistitisa u ovoj studiji. Iako je urinarna mikrobiota relativno jednostavna u usporedbi s drugim tjelesnim nišama (108), prekomjerna zastupljenost Otu-a koji pripadaju jednoj klasi mogla bi ukazivati na to da bi „Otu -ravnoteža“ mokraćne mikrobiote mogla biti još jedan iznimno važan faktor koji doprinosi zdravlju urinarnoga trakta. Podatci sekvenciranja prikupljeni od 28 pacijenata pokazuju da klasa *Bacilli* s *Lactobacillus* kao dominantnim rodом aktivno inhibira prekomjerni rast patogena koji pripadaju klasi *Gammaproteobacteria*.

5.6. Praćenje dinamike urinarne mikrobite uz antibiotsku terapiju

Longitudinalnom studijom odabrana je pacijentica (trudnica) koja je praćena kroz 3 mjeseca. SUK-om identificiran je *Lactobacillus* spp $>10^5$ CFU/ml. Urinarna mikrobiota kojom dominiraju bakterije *Lactobacillus* roda korelira sa zdravom uro-vaginalnom mikrobiotom te se dominacija *Lactobacillus* roda u mokraćnoj mikrobioti obično smatra zaštitnom protiv IMS-a (29, 32). Dva mjeseca nakon ovoga nalaza pacijentica je imala vaginalni porod bez komplikacija. Ubrzo nakon poroda, kod ispitanice se javljaju simptomi cistitisa te je SUK-om u njenom uzorku mokraće identificiran uropatogen, *K. pneumoniae*. Prema važećim smjernicama za terapiju cistitisa i prema testu osjetljivosti ispitanici je uvedena terapija cefaleksinom, 1g/24 h. Primjenom terapije uropatogen je ubrzo značajno eradican. Ova je studija pokazala da je *K. pneumoniae* bila iznimno osjetljiva na ovu terapiju te je njen udio u mokraći nakon dva dana smanjen sa 94,1 % na 1,04 %. Međutim, i udio *Lactobacillus* spp., kojim su uzorci obilovali prije početka terapije, također se drastično smanjio posljednjega dana terapije. Pretpostavka je da je to urinarni trakt učinilo znatno osjetljivijim na reinfekciju. Može se zaključiti da je značajni pad *Lactobacillus* spp. uzrokovan sedmodnevnom terapijom pridonio razvoju infekcije *Candida* spp., koja je bila potonji uzrok ponavljajućega cistitisa u ove pacijentice. Modeli su razrađeni pomoću generaliziranoga Lotka-Volterra modela (82, 109) koji se zasniva na QIIME mikrobiomskoj analizi sirove DNA. Model ove longitudinalne studije ističe ulogu patogena klase *Gammaproteobacteria*. Utvrđen je negativan utjecaj klase *Gammaproteobacteria* na klasu *Bacilli*.

Ovim modelom definiran je važan doprinos klase *Actinobacteria* ravnoteži mikrobiote urinarnoga trakta kao klasi koja aktivno suzbija prekomjerni rast patogena te ima zaštitni utjecaj na *Lactobacillus* tijekom liječenja. Izražena razlika u obrnutim pozitivno-negativnim interakcijama između klasa *Bacilli* i *Gammaproteobacteria* u gLVM modelima može biti pripisana uvođenju antibiotika. Sveukupno, rezultati pokazuju da je ovaj antibiotik bio izvrstan izbor za brzo uklanjanje uropatogena kod pacijentice, međutim, nastavak terapije nakon 3 dana u ovom konkretnom slučaju imao je dramatični utjecaj na mokraćni mikrobiom domaćina i omogućio oportunističkim patogenima iz klase *Pseudomonadaceae* i u konačnici *C. albicans* da zauzmu svoje niše u mokraćnom sustavu te na kraju uzrokuju recidiv simptoma cistitisa. To snažno sugerira da je i vrijeme pod terapijom jednako važan terapijski parametar kao i početni izbor antimikrobnoga lijeka. Ovo istraživanje sugerira da uvođenje metoda zasnovanih na genomici, uz tradicionalni SUK, može biti izvrsna pomoć u procjeni optimalnoga trajanja terapije. Unatoč ograničenja predstavljenoga istraživanja u pogledu praćenja promjene mikrobioma u mokraći tijekom terapije antibioticima u jedne pacijentice, tim se otvara novo područje istraživanja koje u budućnosti treba pratiti i nadzirati više pacijenata s različitim trajanjem različitih antibiotskih terapija koje bi bilo poželjno provoditi u duljim razdobljima i nakon završetka antibiotske terapije.

5.7. Usporedba osjetljivosti ispitanih metoda

Limitirajućim korakom niske osjetljivosti proteomske analize smatra se izolacija bakterijske biomase, te nemogućnost potpunog otklanjanja ljudskih proteina iz uzoraka. Biomasa ljudskoga porijekla, u materijalima s niskom bakterijskom koncentracijom prekriva spektre bakterijskih peptida, te otežava ili onemogućuje njihovu identifikaciju. Unatoč tome, rezultati ovoga istraživanja pokazali su da je osjetljivosti metode bila u skladu s drugim istraživanjima (110-112). U sklopu prikazanoga istraživanja nije ispitivana osjetljivost metode identifikacije uropatogena sekvenciranjem gena za 16S rRNA, međutim literaturni podatci ukazuju na iznimno visoku osjetljivosti (29, 32, 107). Naime, ovom metodom identificiran je znatno veći broj bakterija u pojedinim uzorcima, na razini roda, nego SUK-om ili proteomskom analizom.

Wojno i sur. su u svojoj studiji uspoređivali identifikaciju uroinfekata *multiplex* PCR-om na nativnim uzorcima mokraće s rezultatima SUK-a. Njihovo je istraživanje provedeno na 582 uzoraka mokraće pacijenata za koje se sumnjalo da imaju IMS, prema procijeni urologa.

Značajna bakteriurija u skladu s IMS-om otkrivena je u 56 % (326/582) uzoraka kad se koristio PCR, dok je SUK-om otkrivena bakteriurija u samo 37 % (217/582) uzoraka (57).

Metode PCR-a i SUK-a imale su jednoznačne rezultate u 74 %, s oba pozitivna nalaza u 34 % (196/582), i s oba negativna nalaza u 40 % (282/582). U 22 % uzoraka PCR je bio pozitivan dok je urinokultura bila negativna, a u 4 % (21/582) urinokultura uzoraka bila je pozitivna dok je PCR bio negativan. Postavlja se pitanje otkriva li visoka osjetljivost PCR-a uropatogene koji iz bilo kojeg razloga ne rastu u kulturi ili otkriva bakterijsku kontaminaciju (42). Odgovor na ovo pitanje pokušali su dati Haytens i sur. analiziranjem uzoraka mokraće simptomatskih i asimptomatskih žena. Ova skupina autora utvrdila je da je 95,9 % bolesnika u simptomatskoj skupini bilo qPCR pozitivno na *E. coli* (43). Istovremeno urinokulturom je dijagnosticirana *E. coli* ili druge uropatogene bakterije u 80,9 % ispitanih simptomatskih žena. U asimptomatskoj skupini bilo je 10,5 % pozitivnih uzoraka utvrđenih urinokulturom i 11,6 % PCR-om (43). Autori su došli do zaključka da bi veći udio pozitivnih rezultata dobivenih kao rezultat bakterijske kontaminacije u simptomatskoj skupini žena, bio jednako očekivan i kod asimptomatske skupine (42, 43). Stoga rezultati ove studije sugeriraju da je vjerojatnije da PCR detektira patogene, a ne kontaminaciju ili zanemariv rezultat uzrokovan većom osjetljivošću PCR-a (42, 43). Svakako, PCR metode nadmašuju metode uzgoja kao i proteomske metode u identifikaciji polimikrobnih kultura, iako u većini slučajeva ostavljaju otvoreno pitanje koja je identificirana vrsta najzastupljenija. U tom kontekstu, visoka osjetljivost PCR metoda značajno smanjuje njihovu specifičnost za identifikaciju uzročnika IMS-a. Unatoč tome, PCR metode imaju prednost u pregledu urinarne mikrobiote. Otkrićem mikrobioma u mokraći došlo je do značajnoga pomaka u paradigmi IMS-a. Patofiziologija IMS-a sada se objašnjava u smislu disbioze mikrobioma mokraće, a ne prodorom bakterija u sterilni prostor (54, 113). Moguće je da kronična stanja mokraćnoga sustava, koja su se do sad smatrala idiopatskim ili neinfektivnim, imaju svoje specifične mikrobiomske profile (54, 114).

Osim veće osjetljivosti u otkrivanju patogena, molekularne metode imaju i nedostatke. Jedna od značajnih je nemogućnost informiranja kliničara o fenotipskom profilu antimikrobne osjetljivosti relevantnih patogena i njegovom razlikovanju od rezidencijalne flore (54) (42) (56). Uz to, prisutnost gena koji uvjetuju osjetljivost na antibiotike ne korelira dobro s fenotipskom osjetljivošću (42, 54, 56, 114), stoga je standardno ispitivanje osjetljivosti na antibiotike temeljeno na uzgoju još uvijek zlatni standard. Postoje ambiciozni planovi za razvoj metode utemeljene na NGS-u koja ne samo da bi trebala moći točno predvidjeti fenotip

rezistencije, već bi trebala dati i minimalnu inhibitornu koncentraciju za antibiotik od interesa (56).

5.8. Usporedba ispitanih metoda

Tablica 9. prikazuje identifikaciju uropatogena s tri različite metode. Razlikovanje *Klebsiella* spp. (UR1-UR3) i *Enterobacter* spp. (UR13-UR14) bilo je neadekvatno zbog različitih razina taksonomije dodijeljene dostupnim metodama (115), dok među ostalim rezultatima postoji značajna pozitivna korelacija proteomske metode sa SUK-om i genomičkim metodama. Genomska analiza 16S rRNA nije bila informativna na razini roda i/ili vrste porodice *Enterobacteriaceae* (115). Postojala je iznenađujuća razlika između SUK-a i rezultata genomske analize u uzorku UR 5. SUK-om je identificiran *E. faecalis* kao jedini uropatogen u ovom uzorku, dok 16S rRNA ukazuje na polimikrobnost bez navedenog roda *Enterococcus*. Dva su moguća objašnjenja ove nepodudarnosti; jedno koje ukazuje na kontaminaciju uzorka prilikom prikupljanja mokraće (116) koje, zbog visoke osjetljivosti metode može uzrokovati pogrešku u rezultatima genomske analize, a drugo može biti lažno pozitivan nalaz *E. faecalis* u nalazu SUK-om.

Uspostavljen postupak za analizu uropatogena uporabom MALDI-TOF/TOF masene spektrometrije pretragom baze podataka pokazao se učinkovitim u identifikaciji bakterija iz nativnoga uzorka mokraće, bez prethodnoga uzgoja. Rezultati ovoga istraživanja jasno pokazuju da masena spektrometrija može učinkovito identificirati različite uropatogene iz svježih ili kratkotrajno pohranjenih (na -20 °C) uzoraka ljudskih mokraća, bez prethodnoga uzgoja. Izravni pristup uspio je pružiti pouzdanu identifikaciju bakterija na razini roda u monobakterijskim uzorcima, unatoč inherentnim ograničenjima korištene platforme masene spektrometrije. U slučaju uzoraka s prisustvom polimikrobnih uropatogena izravni pristup korištenjem ovdje opisanih metoda nije omogućio jednoznačnu identifikaciju. Unatoč značajnom napretku genomike i proteomike i prethodno navedenim nedostacima standardne metode temeljene na uzgoju, ona je i dalje zlatni standard u dijagnostici IMS-a, te se i dalje smatra klinički najznačajnijom i najinformativnijom metodom.

Ipak, važno je biti svjestan ograničenja i nedostataka ove metode te po potrebi razmotriti dodatne protokole. Visoki troškovi, dugo vrijeme obrade i veliki postotak negativnih urinokultura u simptomatskih bolesnika razlozi su za poboljšanje postojećih protokola i primjenu novih, lakših i bržih metoda. Uvođenje primarnoga probira metodom protočne

citometrije može značajno pridonijeti uštedi i bržem izdavanju negativnih urinokultura. Međutim, u simptomatskih bolesnika, kod kojih su urinokulture više puta sterilne, treba razmotriti obradu dodatnim EQUC protokolom. Ovaj protokol se koristi sporadično, ovisno o prezentaciji kliničke slike, međutim, u većini laboratorija za kliničku mikrobiologiju rutinski nije dostupan. U kontekstu IMS-a i značajne bakteriurije koja nije utvrđena SUK-om, genomske, proteomske i metaproteomske metode pružaju nam dublje znanje o vrstama patogena i upalnom odgovoru koji ti patogeni izazivaju. U bolesnika s IMS-om danas se inzistira na identifikaciji stvarnoga uzročnika. Međutim, u budućnosti je moguće da će se u određenim kliničkim slučajevima morati napustiti sadašnju paradigmu jednoga konvencionalnog uropatogena kao dominantnoga uzročnika. Metode koje se koriste u identifikaciji uropatogena imaju svrhu kliničarima dati odgovarajuće, relevantne i pravovremene mikrobiološke rezultate. Neadekvatnost rezultata često dovodi do uvođenja neodgovarajuće terapije, a to je glavni pokretač bakterijske rezistencije i smanjenoga zadovoljstva pacijenta. Stoga se sve češće SUK-i dodaju proteomske metode, PCR i NGS kako bi se točno identificirao potencijalni mikrobni uzrok infekcije. Prag od 10^5 CFU/ml u razlikovanju kliničke značajnosti bakteriurija, prema SUK-u svakako se više ne smatra adekvatnim, što je već i potvrđeno u studijama koje koriste osjetljivije dijagnostičke metode kao što su EQUC, PCR i NGS. Novi pragovi implementirani su i u smjernicama prihvaćenim u kliničkoj mikrobiološkoj praksi (37). S druge strane, otkrivanje i identificiranje mikroorganizama u mokraći ne čine ih sigurnim krivcem, što znači da osjetljivije metode ne daju uvijek i klinički korisne informacije. Ako se definira zdrava urinska mikrobiota i ako se karakteristični mikrobni obrasci povežu s pojavom određenih stanja mokraćnoga sustava, genomika bi mogla postati atraktivan dijagnostički alat u kliničkoj praksi. Uz to, kad upravljanje mnoštvom informacija generiranih genomskim i proteomskim metodama bude olakšano i pojednostavljeno, te metode bi mogle početi igrati značajnu ulogu u donošenju kliničkih odluka, posebno za najsloženije slučajeve poput ponavljajućih IMS-a s više uzastopnih sterilnih nalaza urinokultura, preaktivnim mokraćnim mjehurom, urinarnom inkontinencijom, intersticijskim cistitisom/sindrom bolnog mjehura ili kod pacijenata s transplantiранim bubregom. Kod 25-30 % pacijenata s kliničkim simptomima IMS-a nalaz SUK-a je uredan. Smatra se da je to posljedica uroinfekcije izazvane bakterijskim populacijama koje su ograničene na biofilm, te je njihov uzgoj u kulturi neadekvatan (42, 43, 54). Druga mogućnost je da su, u nekim slučajevima, anaerobi i druge bakterije glavni uzročnici IMS-a, a one ne mogu rasti u uvjetima pod kojima se provodi SUK (42). Isto tako interpretacija

polimikrobnih nalaza predstavlja izazov. Kod polimikrobnih uzoraka uvijek se postavlja pitanje kliničkoga značaja ukupnoga rezultata i jednoga patogena, jer čak i kvantificiranjem bakterija, nije uvijek jasno jesu li najbrojnije bakterijske vrste otkrivene PCR-om ili NGS-om uzročnici IMS-a (42). Ova pitanja ostaju neriješena, posebice primjenom sve osjetljivijih metoda u otkrivanju bakteriurije (54, 56).

5.9. Standardizacija MS/MS proteomske metode u identifikaciji uropatogena

Programi za identifikaciju mikroorganizama na temelju MS i MS/MS spektara pretraživanjem interne baze podataka (koja se sastoji od triptičnih peptida proteina preuzetih iz NCBI nr baze podataka) mogu identificirati mikroorganizme. Identifikacija se temelji na preklapanju podataka iz dostupnih baza podataka s dobivenim rezultatima. Baza podataka *Matching Protein Reader* odgovara pikovima iz MS/MS spektara zajedno s MS-podacima iz NCBI nr baze podataka za identifikaciju peptida/proteina. Ako se proteini ne nalaze u bazi podataka tad se pomoću homolognih proteina pronalaze najsličniji proteini. Identifikacija uropatogena pomoću *Protein Reader* programa standardizirana je na četiri najčešća uropatogena (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*) u sklopu ovoga istraživanja. Standardizacija metode provedena je prikupljanjem po deset kultura svake od četiri najčešća uropatogena. Ti su uzorci pripremljeni te je učinjena njihova obrada. Učinjena je analiza spektara te su grafički prikazani rezultati podudarnosti peptidne identifikacije. Prema jasno postavljenim kriterijima određeni su rangovi prema stupnju pouzdanosti u tri kategorije. Ovaj postupak standardizacije omogućio je procjenu točnosti i pogreške prilikom korištenja algoritma, te dao jasan uvid u poželjne i potrebne podudarnosti, kao i mikroorganizme sa sličnim peptidima s kojima identifikacija najlakše može biti zamijenjena. Ovakvom pretragom dobiva se rezultat između 0 i 1 koji odgovara vjerojatnosti točne identifikacije uropatogena.

6. ZAKLJUČCI

- Razdioba uzročnika IMS-a u analiziranim uzorcima s $>10^5$ CFU/ml slijedila je literaturne podatke.
- Vrijeme i temperatura skladištenja uzoraka mokraće značajno utječu na rezultate izolacije proteina te na ishod same proteomske identifikacije uropatogena.
- Optimizacija procesa pročišćavanja i izolacije proteina iz uzoraka mokraće ključni je korak u identifikaciji uropatogena tandem masenom spektrometrijom.
- Identifikacija bakterijskih proteina pomoću MALDI-TOF/TOF MS-a točno identificira monomikrobne kulture na razini roda, dok kod polimikrobnih kultura ne daje pouzdane rezultate.
- Tandem MS prate sve veće baze podataka što obradom podataka kroz širok spektar alata za bioinformatiku predstavlja potencijal koji bi mogao omogućiti polimikrobnju identifikaciju.
- Proteomska identifikacija na razini soja nije ostvarena.
- Identifikacija bakterijskih vrsta sekvenciranjem gena za 16S rRNA nije bila moguća, te je postignuta identifikacija na razini roda i porodice.
- Sekvenciranjem gena za 16S rRNA nije omogućena identifikacija na razini porodice za *Klebsiella* spp. i *Enterobacter* spp., već samo na razini roda.
- Analiza gena za 16S rRNA nije bila informativna na razini roda i/ili vrste u porodici *Enterobacteriaceae*.
- *Lactobacillus* kao dominantni rod klase *Bacilla* aktivno inhibira prekomjerni rast patogena koji pripadaju klasi *Gammaproteobacteria*.
- Antibiotička terapija ima snažan utjecaj na dinamiku promjena sastava urinarne mikrobiote, te je trajanje terapije iznimno važan terapijski parametar kao i početni izbor antimikrobnog lijeka.
- Standardizacija procesa očitavanja masenih spektara pridonosi olakšavanju procesa identifikacijske, te lakšoj interpretaciji dobivenih rezultata.

7. LITERATURA

1. Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry EJ, Bottomley AL. Metabolic adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(JUN).
2. Tambić Andrašević A, Tambić T, Žmak L, Obrovac M, Marina PP, Debeleć D, et al. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017. g. The Croatian Academy of Medical Sciences; 2017. 1–120 p.
3. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER, et al. Urine is not sterile: Use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):871–6.
4. Brubaker L, Wolfe AJ. The New World of the Urinary Microbiome in Women. *Am J Obs Gynecol* [Internet]. 2015;213(5):644–649. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876712/pdf/nihms785683.pdf>
5. Barišić Z, Babić-Erceg A, Borzić E, Zoranić V, Kaliterna V, Carev M. Urinary tract infections in South Croatia: Aetiology and antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22:61–4.
6. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2000;13(March):269–84.
7. Škerk V, Tambić Andrašević A, Sušić E. Dopune i promjene ISKRA hrvatskih nacionalnih smjernica za liječenje i profilaksu infekcija mokraćnog sustava odraslih. Vol. 34, *Infektoloski Glasnik.* 2014.
8. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA, Hultgren SJ. Host-Pathogen Checkpoints and Population Bottlenecks in Persistent and Intracellular Uropathogenic *E. coli* Bladder Infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):616–48.

9. Schroeder DC, Stephen MJ. Deformed wing virus: The main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide. *Virulence* [Internet]. 2012;3(7):592–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1220941>

10. Ćosić I, Ćosić V. Komplikirane Infekcije Mokraćnog Sustava U odraslih. *Acta Med Croat.* 2016;70:249–55.

11. Škerk V, Dujnić Špoljarević T. Infekcije mokraćnog sustava. *Medicus* [Internet]. 2012;21(1):23–7. Available from: [file:///C:/Users/Marina/Downloads/KOK03_Skerk \(1\).pdf](file:///C:/Users/Marina/Downloads/KOK03_Skerk%20(1).pdf)

12. Ronald AM. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *Dis Mon.* 2003;49:71–82.

13. Thomas M. Hooton. Uncomplicated urinary tract infection. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;2(3):143–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22417256/>

14. Vojvodić Ž, Daus Šebadak D. Outpatient antibiotic consumption for urinary infections in Croatia 2005 - 2014: What can be learned from utilization trends. *Zdr Varst.* 2018;57(4):183–91.

15. Škerk V, Tambić Andrašević A, Andrašević S, Markotić A, Škerk V. Antimikrobno liječenje i profilaksa infekcija mokraćnog sustava odraslih osoba. *Medicus.* 2006;15(2):251–6.

16. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2110–5.

17. Thomas JM, Swantee CA, Hartlen M. Aerobic and Anaerobic Urethral Flora of Healthy Females in Various Physiological Age Groups and of Females with Urinary Tract Infections. *J Clin Microbiol.* 1980;11(6):654–9.

18. Raz R. Urinary Tract Infection in Postmenopausal Women. *Korean J Urol*. 2011;801–8.
19. Stamm WE, Norrby SR. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. *J Infect Dis*. 2001;183(1):1–4.
20. Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS, Isaacson-Schmid ML, Hultgren SJ. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):29–30.
21. Worpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2013;8(1).
22. Škerk V, Škerk V, Jakšić J, Lakoš AK, Matrapazovski M, Maleković G, et al. Research of urinary tract infections in family medicine physicians' offices - Empiric antimicrobial therapy of urinary tract infections - Croatian experience. *Coll Antropol*. 2009;33(2):625–31.
23. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, FitzGerald MP, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1376–83.
24. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knobloch S, Suh MJ, et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med [Internet]*. 2012;10(174):1–17.
25. Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(46):17994–9.
26. Oulas A, Pavludi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, et al. Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights*. 2015;9:75–88.

27. Brubaker L, Wolfe A. The urinary microbiota: A paradigm shift for bladder disorders? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016;28(5):407–12.
28. Karstens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, et al. Does the urinary microbiome play a role in urgency urinary incontinence and its severity? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6(JUL):1–13.
29. Mueller ER, Wolfe AJ, Brubaker L. Female urinary microbiota. *Curr Opin Urol*. 2017;27(3):282–6.
30. Forbes JD, Chen CY, Knox NC, Marrie RA, El-Gabalawy H, De Kievit T, et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases - Does a common dysbiosis exist? *Microbiome*. 2018;6(1):1–15.
31. Chen YB, Hochstedler B, Pham TT, Alvarez MA, Mueller ER, Wolfe AJ. The urethral microbiota: A missing link in the female urinary microbiota. *J Urol*. 2020;204(2):303–9.
32. Stapleton AE. The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6):1–6.
33. Stapleton AE. The Vaginal Microbiota and Urinary Tract Infection. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016;4(6):139–48.
34. Pearce MM, Zilliox MJ, Rosenfeld AB, Thomas-White KJ, Richter HE, Nager CW, et al. The female urinary microbiome in urgency urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(3):347.e1-347.e11.
35. Johanesen PA, Mackin KE, Hutton ML, Awad MM, Larcombe S, Jacob MA, et al. Disruption of the gut microbiome: *Clostridium difficile* infection and the threat of antibiotic resistance. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1347–60.

36. Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: A collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;7(4):173–8.
37. Tonkić M, Sušić E, Goić-Barišić I, Kaliterna V TAA. Bakteriološka dijagnostika infekcija mokraćnog i spolnog sustava. HRVATSKI LIJEČNIČKI ZBOR; HRVATSKO DRUŠTVO ZA KLINIČKU MIKROBIOLOGIJU; 2017. 1–46 p.
38. Yu Y, Sikorski P, Bowman-Gholston C, Cacciabeve N, Nelson KE, Pieper R. Diagnosing inflammation and infection in the urinary system via proteomics. *J Transl Med*. 2015;13(1):1–14.
39. Yu Y, Pieper R. Using Proteomics to Identify Inflammation During Urinary Tract Infection. In: *Methods in Molecular Biology*. 2019. p. 259–72.
40. Price TK, Dune T, Hilt EE, Thomas-White KJ, Kliethermes S, Brincat C, et al. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* [Internet]. 2010;7(12):653–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
41. Wilson ML, Gaido L. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. *Med Microbiol* [Internet]. 2004;38.
42. Dixon M, Sha S, Stefil M, McDonald M. Is it Time to Say Goodbye to Culture and Sensitivity? The Case for Culture-independent Urology. *Urology* [Internet]. 2020;136:112–8.
43. Heytens S, De Sutter A, Coorevits L, Cools P, Boelens J, Van Simaey L, et al. Women with symptoms of a urinary tract infection but a negative urine culture: PCR-based quantification of *Escherichia coli* suggests infection in most cases. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017;23(9):647–52.
44. Rabinovitch A, Arzoumanian L, Curcio KM, Dougherty B, Halim A-B. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens (GP16-A3). *Clin Lab Stand Inst*. 2009;21(19):1–40.

45. Shah HN, Collins DM. Prevotella, a New Genus To Include Bacteroides melaninogenicus and Related Species Formerly Classified in the Genus Bacteroides. Int Union Microbiol Soc [Internet]. 1990;40(2):205–8.
46. Cain TC, Lubman DM, Weber WJ, Vertes A. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1994;8(12):1026–30.
47. Girault S, Chassaing G, Blais JC, Brunot A, Bolbach G. Coupling of MALDI-TOF mass analysis to the separation of biotinylated peptides by magnetic streptavidin beads. Anal Chem. 1996;68(13):2122–6.
48. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. In: Advances in applied microbiology [Internet]. Elsevier Inc.; 2010. p. 149–84.
49. Byun JH, Yu AR, Kim MS, Lee K. Performance of microflex LT biotyper and VITEK MS for routine identification of yeasts. Ann Lab Med. 2018;38(5):487–9.
50. Li W, Sun E, Wang Y, Pan H, Zhang Y, Li Y, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing for urinary tract pathogens by direct analysis of urine samples using a MALDI-TOF MS-based combined protocol. Front Microbiol. 2019;10:1–10.
51. Roux-Dalvai F, Gotti C, Leclercq M, Hélie MC, Boissinot M, Arrey TN, et al. Fast and accurate bacterial species identification in urine specimens using LC-MS/MS mass spectrometry and machine learning. Mol Cell Proteomics. 2019;18(12):2492–505.
52. Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2018;24(7):738–43.

53. Sabat AJ, Van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, Van Slochteren K, De Boer RF, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.

54. Gasiorek M, Hsieh MH, Forster CS. Utility of DNA next-generation sequencing and expanded quantitative urine culture in diagnosis and management of chronic or persistent lower urinary tract symptoms. *J Clin Microbiol*. 2020;58(1):1–12.

55. Graf EH, Pancholi P. Appropriate Use and Future Directions of Molecular Diagnostic Testing. *Curr Infect Dis Rep*. 2020;22(2).

56. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018;24(4):355–60.

57. Wojno KJ, Baunoch D, Luke N, Opel M, Korman H, Kelly C, et al. Multiplex PCR Based Urinary Tract Infection (UTI) Analysis Compared to Traditional Urine Culture in Identifying Significant Pathogens in Symptomatic Patients. *Urology* [Internet]. 2020;136:119–26.

58. Van Der Zee A, Roorda L, Bosman G, Ossewaarde JM. Molecular diagnosis of urinary tract infections by semi-quantitative detection of uropathogens in a routine clinical hospital setting. *PLoS One*. 2016;11(3):1–10.

59. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/rna-16s>, 20.05.2020.

60. Kim M, Chun J. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server [Internet]. 1st ed. Vol. 41, Bacterial Taxonomy. Elsevier Ltd.; 2014. 61–74 p.

61. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2008;69(2):330–9.
62. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(10):1227–32.
63. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The Rapid Identification of Intact Microorganisms Using Mass Spectrometry. *Nat Biotechnol*. 1996;14(11):1584–6.
64. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(15):1992–6.
65. Haag A, Taylor S, Johnston K, Cole R. Rapid identification and speciation of haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* [Internet]. 1998;33(8):750–6.
66. Pribil P, Fenselau C. Characterization of Enterobacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2005;77:6092–5.
67. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):1963–70.
68. Vargha M, Takáts Z, Konopka A, Nakatsu CH. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J Microbiol Methods*. 2006;66(3):399–409.

69. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anaerobe* [Internet]. 2012;18(1):163–5.
70. Zhou C, Tao L, Hu B, Ma J, Ye X, Huang S, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of beta-hemolytic streptococci. *J Thorac Dis*. 2015;7(4):591–5.
71. Cheng K, She YM, Chui H, Domish L, Sloan A, Hernandez D, et al. Mass spectrometry-based *Escherichia coli* H Antigen/flagella typing: Validation and comparison with traditional serotyping. *Clin Chem*. 2016;62(6):839–47.
72. Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003;14(9):931–42.
73. Moustafa A, Li W, Singh H, Moncera KJ, Torralba MG, Yu Y, et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–12.
74. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html
75. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/maxwell-16-dna-purification-kits-protocol>
76. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*. 2009;19(7):1141–52.
77. Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*. 2013;2(1):2–5.
78. Oros D, Cepnija M, Zucko J, Cindric M, Hozic A, Skrlin J, et al. Identification of pathogens from native urine samples by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Clin Proteomics* [Internet]. 2020;17(1):1–9.

79. Zhang X, Li L, Mayne J, Ning Z, Stintzi A, Figeys D. Assessing the impact of protein extraction methods for human gut metaproteomics. *J Proteomics* [Internet]. 2018;180:120–7.
80. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*. 2014;9(4):1–12.
81. Steel R.G.D., Torrie J.H. *Principles and Procedures of Statistics: with special reference to the biological sciences*. 1960;15:207–8.
82. Glantz SA, Slinker BK, Neilands T. *Primer of applied regression and analysis of variance*. 3rd ed, editor. New York, N.Y: MccGraw-Hill; 2016.
83. Li C, Chng KR, Av-Shalom T V., Tucker-Kellogg L, Nagarajan N. An expectation-maximization-like algorithm enables accurate ecological modeling using longitudinal metagenome sequencing data. *Microbiome* [Internet]. 2019;1–14.
84. Brilha S, Proença H, Cristino JM, Hänscheid T. Use of flow cytometry (Sysmex® UF-100) to screen for positive urine cultures: In search for the ideal cut-off. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(2):289–92.
85. De Rosa R, Grosso S, Bruschetta G, Avolio M, Stano P, Modolo ML, et al. Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010;411(1–16):1137–42.
86. Broeren MAC, Bahçeci S, Vader HL, Arents NLA. Screening for urinary tract infection with the sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):1025–9.
87. Jolkkonen S, Paattiniemi EL, Kärpänoja P, Sarkkinen H. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3117–21.

88. Kouri TT, Gant VA, Fogazzi GB, Hofmann W, Hallander HO, Guder WG. Towards European urinalysis guidelines: Introduction of a project under European Confederation of Laboratory Medicine. *Clin Chim Acta*. 2000;297(1–2):305–11.

89. Devillé W., Yzermans J., van Duijn N., et al. The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. *BMC Urol* 2004;4. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-4-4>.

90. ISKRA. Available from: <https://iskra.bfm.hr/otpornost-bakterija-na-antibiotike-u-hrvatskoj/>)

91. Tambić Andrašević A, Tambić T, Žmak L, Obrovac M, Marina PP, Debeleć D, et al. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2017. g. Antibiotic resistance in Croatia , 2017 [Internet]. 2019. 1–125 p.

92. Gagné F. Tissue Preparation and Subcellular Fractionation Techniques. In: *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. Elsevier Inc.; 2014. p. 21–31.

93. Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, et al. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(3):1–7.

94. Lough ME, Shradar E, Hsieh C, Hedlin H. Contamination in Adult Midstream Clean-Catch Urine Cultures in the Emergency Department: A Randomized Controlled Trial. *J Emerg Nurs* [Internet]. 2019;45(5):488–501.

95. Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, et al. Direct detection and identification of bacterial pathogens from urine with optimized specimen processing and enhanced testing algorithm. *J Clin Microbiol*. 2017;55(5):1488–95.

96. Sigdel TK, Nicora CD, Hsieh SC, Dai H, Qian WJ, Camp DG, et al. Optimization for peptide sample preparation for urine peptidomics. *Clin Proteomics* [Internet]. 2014;11(7):1–8.

97. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology [Internet]. Vol. 138, Journal of Microbiological Methods. Elsevier B.V.; 2017. 20–29 p.
98. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22(6):561.e1-561.e6.
99. Harpole M, Davis J, Espina V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery. Expert Rev Proteomics. 2016;9450(6):609–26.
100. Alves G, Wang G, Ogurtsov AY, Drake SK, Gucek M, Sacks DB, et al. Rapid Classification and Identification of Multiple Microorganisms with Accurate Statistical Significance via High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 2018;29(8):1721–37.
101. Karlsson R, Davidson M, Svensson-Stadler L, Karlsson A, Olesen K, Carlsohn E, et al. Strain-level typing and identification of bacteria using mass spectrometry-based proteomics. J Proteome Res. 2012;11(5):2710–20.
102. Karlsson R, Gonzales-Siles L, Boulund F, Svensson-Stadler L, Skovbjerg S, Karlsson A, et al. Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms - A prospectus. Syst Appl Microbiol [Internet]. 2015;38(4):246–57.
103. Boulund F, Karlsson R, Gonzales-Siles L, Johnning A, Karami N, AL-Bayati O, et al. Typing and characterization of bacteria using bottom-up tandem mass spectrometry proteomics. Mol Cell Proteomics. 2017;16(6):1052–63.
104. Koenig T, Menze BH, Kirchner M, Monigatti F, Parker KC, Patterson T, et al. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. J Proteome Res. 2008;7(9):3708–17.

105. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen J V., Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 2006;7(9).
106. Chernushevich I V., Loboda A V., Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2001;36(8):849–65.
107. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Jeansson SL, Jakobsen KS. Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012;12(1):1.
108. Karstens L, Asquith M, Caruso V, Rosenbaum JT, Braun J, Gregory T, et al. Community profiling of the urinary microbiota: Methodological considerations for low microbial biomass biological samples. *Nat Rev Urol.* 2018;15(12):735–49.
109. <https://dokumen.pub/primer-of-applied-regression-amp-analysis-of-variance-third-edition-3nbsped-0071824111-9780071824118.html>
110. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, et al. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(9):1787–95.
111. Haiko J, Savolainen LE, Hilla R, Pätäri-Sampo A. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2016;129:81–4.
112. Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE. Phyloproteomics: Species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(1):103–12.
113. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Medicine (Baltimore).* 2010;107(21):361–7.

114. Mouraviev V, McDonald M. An implementation of next generation sequencing for prevention and diagnosis of urinary tract infection in urology. *Can J Urol*. 2018;25(3):9349–56.

115. Kotaskova I, Obrucova H, Malisova B, Videnska P, Zwinsova B, Peroutkova T, et al. Molecular techniques complement culture-based assessment of bacteria composition in mixed biofilms of urinary tract catheter-related samples. *Front Microbiol*. 2019;10:1–15.

116. Lough ME, Shradar E, Hsieh C, Hedlin H. Contamination in Adult Midstream Clean-Catch Urine Cultures in the Emergency Department: A Randomized Controlled Trial. *J Emerg Nurs* [Internet]. 2019;45(5):488–501.

8. POPIS KRATICA

Kratika	Engleski naziv	Hrvatski naziv / prijevod
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
BEEM	Biomass estimation and model inference with an expectation maximization	Procjena biomase i zaključivanje o modelu s maksimalizacijom očekivanja
BHSB	-	Beta hemolitički streptokok grupe B
B-PER	Bacterial Protein Extraction Reagent	Reagens za ekstrakciju bakterijskih proteina
CAF	Chemically Activated Fragmentation; Chemically Assisted Fragmentation	Kemijski aktivni fragment
CFU	colony-forming unit	Jedinka koja formira kolonije
CHCA	α -cyano-4- hydroxycinnamic acid	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
CID	Collision-induced dissociation	Disocijacija izazvana sudarom
CUP	Chaperone-usher fimbriae	-
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoksiribonukleinska kiselina
EQUC	Enhanced Quantitative Urine Culture	Poboljšana kvantitativna urinokultura/ protokol modificiranih uvjeta
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamases	Beta-laktamaze proširenog spektra
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases	Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Europski odbor za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne bolesti
FASP	Filter aided sample preparation	Filter za proteomsku predobradu uzorka
HDKM	Croatian society of Clinical Microbiology	Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju

IAA	iodoacetamide	Jodoacetamid
ICULAO	indole, citrate, urea, lysine, arginine, ornithine	Indol, citrat, urea, lizin, arginin, ornitin
ISKRA		Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije
IMS/UTI	Urinary tract infections	Infekcije mokraćnoga sustava
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry	Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemom masenom spektrometrijom
MH agar	Mueller-Hinton agar	Mueller-Hinton agar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization	Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MWCO	molecular weight cut-off	Granična vrijednost molekularne težine
MS	Mass spectrometry	Spektrometrija masa
MS/MS	Tandem mass spectrometry,	Tandemna spektrometrija masa
NCBI	National Center for Biotechnology Information	-
NGS	next-generation sequencing	Sekcenciranje novih generacija
OTU	Operational Taxonomic Unit	Operativnih taksonomskih jedinica
PCA	Principal Component Analysis	Analiza glavnih komponenti
PCoA	Principal Coordinates Analysis	Analiza glavnih kordinata
PCR	Polymerase chain reaction	Lančana reakcija polimeraze
PMF	Peptide mass fingerprinting	Metoda otiska prsta mase peptida
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinska kiselina

QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology	-
QMA	quaternary metil-amin	Kvaternarni metil-amin
qPCR	Quantitative Polymerase chain reaction	Kvantitativna lančana reakcija polimeraze
SUK / SUC	standard urine culture	Standardna urinokultura
TOF	time-of-flight	Analiza koja mjeri vrijeme leta
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>	Uropatogena <i>Escherichia coli</i>
vvGPB		Više vrsta gram pozitivnih bakterija

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Marina Čepnja rođena je 31. 7. 1979. godine u Beogradu. Osnovnu školu „Murterski škoji“ pohađala je u Murteru, a matematičku gimnaziju „Antun Vrančić“ u Šibeniku. Godine 1998. upisala je studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a 2002 i studij farmacije na istom fakultetu. Tijekom studiranja dobila je Rektorovu nagradu za rad pod nazivom “Proteini toplinskog šoka HSP70”, te CEPUS stipendiju za boravak na Odjelu za kliničku biokemiju Farmaceutskog fakulteta u Ljubljani. Diplomirala je 2004. godine stekavši zvanje diplomiranoga inženjera medicinske biokemije, te 2007. zvanje magistre farmacije. Pripravnički staž iz područja medicinske biokemije u periodu od ožujka 2004. do ožujka 2005. godine obavila je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničke bolnice Rijeka, a iz područja farmacije 2007. godine u Ljekarni Kaštel Farm, Benkovac. 2008. godine zaposlila se u Kliničkoj bolnici Dubrava kao specijalizant, te specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila 2012. godine stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije. Od 2016. godine do danas radi u medicinsko biokemijskom laboratoriju Specijalne bolnice Agram.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB) i Hrvatskoga društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). Također, član je europskoga registra specijalista u području laboratorijske medicine (EFLM). Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor 7 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u *Current Contents* i *Web of Science Core Collection*, 2 znanstvena članka u ostalim časopisima, 8 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenim u časopisima s međunarodnom recenzijom, te jednoga poglavlja knjige.

Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u *Current Contents (CC)* i *Web of Science Core Collection*

1. Ceprnja M, Oros D, Melvan E, Svetlicic E, Skrlin J, Barisic K, et.al. Modeling of Urinary Microbiota Associated With Cystitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. 11,1-10. doi:10.3389/fcimb.2021.643638
2. Oros D, Ceprnja M, Zucko J, Cindric M, Hozic A, Skrlin J, et al. Identification of pathogens from native urine samples by MALDI TOF / TOF tandem mass spectrometry. *Clin. Proteomics.* (2020). 17, 1–9. doi: 10.1186/s12014-020-09289-4
3. Čepnija M, Oros D, Janeš A, Žučko J, Barišić K, Škrilin J. and Starčević A. SYSTEMATIC REVIEW–HOW DO WE IDENTIFY URINARY TRACT INFECTION TODAY? *Acta Clin Croat.*- **accepted for publication**
4. Ceprnja M, Derek L, Unic A, Blazev M, Fistonić M, Kozarić-Kovacic D, Franić M, Romić Z. Oxidative stress markers in patients with post-traumatic stress disorder. *Coll Antropol.* 2011;35(4):1155-60.
5. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, Krhac M, Romić Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med.* 2011;21(3):231-42. Review.
6. Saftić M, Batinac T, Zamolo G, Čoklo M, Šimat M, Mustać E, Bosnar A, Grahovac B. HPV 6 positive giant keratoacanthoma in an immunocompetent patient. *Tumori.* 2006.92(1):79-82.
7. Hadžisejlić I, Šimat M, Bosak A, Krasevic M, Grahovac B. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cervical cancer and precursor lesions. *Coll Antropol.* 2006;30(4):879-883.

Znanstveni radovi objavljeni u drugim časopisima

1. Šimat M, Mudrinić M, Turčić P. Genital infections caused by human papilloma virus. *Farmaceutski Glasnik.* 2006;62(6):303-310.
2. Grahovac B, Šimat M, Krašević M. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa - imunopatogeneza i molekularna dijagnostika. *Medix.* 2005;58 (11).

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka

1. 9th Congress of the Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine, Zagreb, 9 th-12th May 2018. Marina Čepnja, Koraljka Đurić. Tumor markers CA 125, HE4, and ROMA index in benign gynecological diseases.
2. 2nd Microbiome R&D and Business Collaboration Forum, London 7 th -8 th May. 2015. Janko Diminic, Mario Cindric, Kristina Perica, Marina Cepnja, Ena Melvan, Daslav Hranueli, Jurica Zucko. A novel computational approach applicable to human microbiome studies – urinary tract microbiome example.
3. 2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase: Preanalytical quality improvement- in quality we trust, Zagreb, March 1-2, 2013. Čepnja M., Serdar T., Hodak N., Živković M., Marijančević D., Romić Ž. Unsuitable specimens in clinical practice: before and after an educational lecture
4. Simpozij Locus, Vodice 2013. Čepnja M., Živković M., Unić A., Vuletić V. Usporedba INR vrijednosti izmjerenih POCT uređajem CoaguChek Roche i BCS-Xp automatskim analizatorom
5. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Berlin 2011 Romić Z, Čepnja M, Derek L, Unić A, Serdar T, Marijančević D. Oxidized DNA in patients with post-traumatic stress disorder
6. First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisbon, Portugal, from 13th to 16th October 2010. Čepnja M, Unić A, Derek L, Živković M, Romić Z. Comparison of The Erythrocyte Sedimentation Rate Measured By The Two Automated Analyzers And Conventional Westergren Method
7. EMBO Workshop, 10th European Summer School / Küster B., Lemeer S., Marcus K., Urlaub H. 2016, 60-60. Oros D; Andjelković U, Kraljević Pavelić S, Josić, D, Čepnja M, Melvan E, Žučko J, Starčević A. Identification of pathogens from urine samples by MALDI-TOF/TOF
8. Belgrade BioInformatics Conference 2018. Oros D, Čepnja M, Žučko J, Cindrić M, Hozić A, Škrilin-Šubić J, Starčević A. MALDI-TOF/TOF and diagnosis of bacterial UTIs

Poglavlje u knjizi

1. Čepnja M, Vuletić V. Oxidative Stress and Anxiety Disorder. Studies on Psychiatric Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, doi: 10.1007/978-1-4939-0440-2_5

PRILOG 1

PRILOG 2



Modeling of Urinary Microbiota Associated With Cystitis

Marina Cepnja^{1,2}, Damir Oros³, Ena Melvan^{3,4}, Ema Svetlicic³, Jasenka Skrlin⁵, Karmela Barisic², Lucija Starcevic³, Jurica Zucko³ and Antonio Starcevic^{3*}

¹ Biochemical Laboratory, Special Hospital Agram, Polyclinic Zagreb, Zagreb, Croatia, ² Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb University, Zagreb, Croatia, ³ Laboratory for Bioinformatics, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb University, Zagreb, Croatia, ⁴ Department of Biological Science, Faculty of Science, Macquarie University, Sydney, NSW, Australia, ⁵ Department for Clinical Microbiology and Hospital Infection, University Hospital Dubrava, Zagreb, Croatia

OPEN ACCESS

Edited by:

Alan J. Wolfe,
Loyola University Chicago,
United States

Reviewed by:

Qunfeng Dong,
Loyola University Chicago,
United States
Linda Brubaker,
University of San Diego, United States

*Correspondence:

Antonio Starcevic
antonio.starcevic@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiome in Health and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Cellular
and Infection Microbiology

Received: 18 December 2020

Accepted: 10 February 2021

Published: 16 March 2021

Citation:

Cepnja M, Oros D, Melvan E, Svetlicic E, Skrlin J, Barisic K, Starcevic L, Zucko J and Starcevic A (2021) Modeling of Urinary Microbiota Associated With Cystitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:643638. doi: 10.3389/fcimb.2021.643638

A decade ago, when the Human Microbiome Project was starting, urinary tract (UT) was not included because the bladder and urine were considered to be sterile. Today, we are presented with evidence that healthy UT possesses native microbiota and any major event disrupting its “equilibrium” can impact the host also. This dysbiosis often leads to cystitis symptoms, which is the most frequent lower UT complaint, especially among women. Cystitis is one of the most common causes of antimicrobial drugs prescriptions in primary and secondary care and an important contributor to the problem of antimicrobial resistance. Despite this fact, we still have trouble distinguishing whether the primary cause of majority of cystitis cases is a single pathogen overgrowth, or a systemic disorder affecting entire UT microbiota. There are relatively few studies monitoring changes and dynamics of UT microbiota in cystitis patients, making this field of research still an unknown. In this study variations to the UT microbiota of cystitis patients were identified and microbial dynamics has been modeled. The microbial genetic profile of urine samples from 28 patients was analyzed by 16S rDNA Illumina sequencing and bioinformatics analysis. One patient with bacterial cystitis symptoms was prescribed therapy based on national guideline recommendations on antibacterial treatment of urinary tract infections (UTI) and UT microbiota change was monitored by 16S rDNA sequencing on 24 h basis during the entire therapy duration. The results of sequencing implied that a particular class of bacteria is associated with majority of cystitis cases in this study. The contributing role of this class of bacteria – *Gammaproteobacteria*, was further predicted by generalized Lotka-Volterra modeling (gLVM). Longitudinal microbiota insight obtained from a single patient under prescribed antimicrobial therapy revealed rapid and extensive changes in microbial composition and emphasized the need for current guidelines revision in regards to therapy duration. Models based on gLVM indicated protective role of two taxonomic classes of bacteria, *Actinobacteria* and *Bacteroidia* class, which appear to actively suppress pathogen overgrowth.

Keywords: urinary tract infection, microbiome, 16S rRNA sequencing, microbial interaction modeling, antibiotics, therapy duration

INTRODUCTION

Human microbiome is a fairly new concept, fueled by the advances in sequencing technology which allowed identification of microorganisms directly from the environment (Oulas et al., 2015). Combined with advances in computational tools and databases it allowed for identification of microorganisms living in and on our body - microbiota, as well as reading out the collective genome encoded in those microorganisms - microbiome (Qin et al., 2010). UT is one of the last body niches discovered to be inhabited by microorganisms. Microbiota inhabiting a healthy UT is dominated by slow-growing species, which require complex nutrients for growth and are often missed during standard urine culture (SUC) procedure (Brubaker and Wolfe, 2016). Reason for that is the long prevailing dogma about sterility of the UT, recently overturned thanks to advances in sequencing methods and enhanced urine culture methods (Whiteside et al., 2015; Thomas-White et al., 2016). Discovery of urinary microbiome (Nelson et al., 2010; Wolfe et al., 2012; Lewis et al., 2013; Hilt et al., 2014; Brubaker and Wolfe, 2015) shifts our perception about treating UTI as it acknowledges normal presence of microorganisms not causing inflammation symptoms. Whether composition of “normal” urinary microbiota has a protective, detrimental or neutral role in it is still in focus of research. UTI being one of the most commonly diagnosed infections in the world, especially among women present great burden to health systems and to quality of life of affected individuals, especially in case of recurring infections. Urinary microbiota, unlike microbiota at other body niches, has low-biomass and fairly low species richness, usually dominated by one or two species. Some studies are suggesting that majority of organisms identified in healthy humans are common to men and women and that male urinary microbiota is just a subset of female one (Gottschick et al., 2017). Others suggest male and female urinary microbiota can be distinguished based on abundance of specific genera, with higher abundance of *Lactobacillus* and *Prevotella* genera being characteristic for female and higher abundance of genus *Corynebacterium* for healthy male urinary microbiota (Fouts et al., 2012). By sequencing and culture techniques, most commonly found microbes in healthy females at a genus level are *Lactobacillus*, followed by *Gardnerella*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* species (Wolfe et al., 2012; Mueller et al., 2017; Neugent et al., 2020). Due to the fact that male and female lower UT are structured differently, it is challenging to distinguish from healthy male and female urinary microbiota. Current SUC results have shown urinary microbiota during an UTI is dominated by standard urinary pathogens such as uropathogenic *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter* species, but have also identified novel bacteria associated with infection such as *Acidovorax*, *Rhodanobacter*, and *Oligella* species (Flores-Mireles et al., 2015; Moustafa et al., 2018). However, innate limitations of SUC, which relate to culturing conditions and differences in growth media, differences in interpretation dependent on clinical condition and time to completion of

findings have to be considered when interpreting these studies results. UTI-related urinary microbiota's metagenome showed a number of antimicrobial resistance genes present, questioning efficacy and wisdom of prescribing antibiotic treatment without determining antibiotic sensitivity (Hasman et al., 2014; Mulder et al., 2019). Applying oral antibiotics for UTI treatment has led to decrease in the diversity of urinary microbiota and impacted “equilibrium” of microorganisms present, with unexpected increase in abundance of *Lactobacillus* species (Siddiqui et al., 2012). However, there are a few studies exploring the link between urinary microbiota, UTIs and antibiotic use (Gottschick et al., 2017; Mulder et al., 2019). Excessive and irrational use of antibiotics results in over-treatment of cystitis and promotes growth of antibiotic resistant strains (Frost et al., 2019; Malik and Bhattacharyya, 2019). In order to change this negative trend, two major therapy parameters have to be reassessed. Although the first parameter, antimicrobial susceptibility is satisfactory, being performed routinely, the second one - therapy duration is much more difficult to assess. Despite good evidence that shorter duration of antibiotics therapy have led to less adverse effects (Jancel and Dudas, 2002; Milo et al., 2005), optimal duration is still largely unrecognized by medical community. Unfortunately, this leads to rather arbitrary duration of treatment (“magic” numbers such as 7, 10, and 14 days), being prescribed to patients in practice (Pezzani et al., 2020). The main reason for this is mainly historical; due to the fact that antibiotics research is neglected by modern pharma (Harbarth et al., 2015) we rely on outdated studies. Beside this issue, a rather slow take-up of new technologies coming from genomics and proteomics in medical practice is causing a gap between cutting edge research in fields such as precision medicine on one side and primary care on the other (Ho et al., 2020). The fact that highly interdisciplinary teams are conducting research while primary care physicians usually work alone is probably the main reason why this gap will not be closing any time soon.

In this work, we present the results of 16S rRNA sequencing of urinary microbiota from 28 patients with suspected cystitis. Moreover, we have investigated a daily change in urine microbiota content in a patient receiving prescribed antibiotic treatment based on current national guidelines. Illumina sequencing and bioinformatics estimated relative abundances of taxa comprising patients urinary microbiota were used to build generalized Lotka-Volterra models (gLVM), which indicated a common taxonomic denominator in all analyzed urine samples. Furthermore, gLVM suggested that interactions between major taxonomy classes or UT microbiota modeled according to simple predator-prey dynamics indicate protective role of bacteria belonging to *Actinobacteria* and *Bacilli* classes in case of bacterial cystitis associated with *Gammaproteobacteria* class pathogen. Monitoring of one patient microbiota for the entire duration of prescribed antimicrobial therapy on 24 h basis, suggested that current national guidelines on antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections should be revised when it comes to therapy duration.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Urinary Culture

The Ethics Committee of University Hospital Dubrava approved the study protocol. Thirty-five urine samples were collected from 28 patients in Department for Clinical Microbiology and Hospital Infections of the University Hospital Dubrava in Zagreb, Croatia. Samples were collected in the period from January to December 2016. All patients were volunteers and gave the informative consent to donate their urine samples for research purposes. There were 16 females and 12 male participants and the average age was 66. In addition to urine samples collected by clean catch method where each patient provided first voided morning urine, six hospitalized catheter patients were included in the study; patient demographics can be seen in **Supplementary Figure 1**.

The initial cystitis diagnosis was based on SUC test, as described previously (Oros et al., 2020). Inclusion criteria was bacterial infection with $>10^5$ CFU/ml before introducing any antibiotic therapy. No antibiotic therapy was started until SUC result returned $>10^5$ CFU/ml result. Longitudinal study of antibiotic influence on urobiome was monitored on 38-year-old female patient with acute cystitis symptoms. Urine samples were collected from the same female patient in form of first-void specimen for 8 consecutive days during which this female patient was taking 1 g daily monodose of Cephalexin (beta-lactam antibiotic which belongs to class of first-generation cephalosporins) oral therapy, as prescribed. From the eight samples taken, first sample was collected after antimicrobial susceptibility test and before starting the antibiotic therapy, and the other 7 were taken successively after starting antibiotic therapy in 24 h interval. Routine hospital microbiology SUC was repeated on three samples (1st, 4th, and the last one). All urine samples were stored at minus 20°C prior to further processing.

Sequencing of 16S rRNA Genes and Subsequent Bioinformatics Analysis

Frozen samples were thawed at room temperature and homogenized volume of 1.5 ml urine sample was centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min at 4°C, and supernatant was removed. DNA was isolated from the urine pellet using a Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit on the Maxwell 16 research instrument (Promega, Madison), according to the manufacturer's protocol. DNA concentrations were measured using a BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu Biotech), and samples were stored at -80°C. Extracted DNA from all 35 urine samples was used to sequence regions V3 and V4 of the gene coding for 16S rRNA using the Illumina MiSeq platform following paired-end sequencing protocol. Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 - QIIME2 (Bolyen et al., 2019) was used to perform the analysis of sequenced reads. Raw data, obtained from Illumina's BaseSpace as fastq files, was demultiplexed and quality filtered using q2-demux plugin and subsequently denoised using DADA2 (Callahan et al., 2016). Taxonomy was assigned to amplicon sequence variants (ASV) using the naive Bayes taxonomy classifier, as implemented in QIIME2, against

the Greengenes 13_8 99% OTUs as reference taxonomic sequences (McDonald et al., 2012). A total number of features at the taxonomic level family (Level 5) were 468,817 with an average number of features per sample being 17,363. The microbial diversity and sample completeness were assessed using rarefaction curve of alpha diversity, estimated using the q2-diversity plugin with samples rarefied to 1130 sequences per sample. The rarefaction curve of observed OTU-s dependent on sequencing depth is shown in **Supplementary Figure 2**, showing that all samples except LS2 reached saturation. In urine samples U1-U27 the average number of OTUs at the maximum sequencing depth is 24.7, minimal observed depth being 3 and maximal 107. The average number of OTUs in urine samples where the antibiotic effect was monitored (LS1-LS8) was 54.1. Initial number of OTUs before the first Cephalexin dose was administered was 30 (LS0), while the highest number of OTUs (123) was observed on second day of antibiotic therapy (LS2) and the lowest number of OTUs of 21 was observed on day 7 (LS7). The data can be found in **Supplementary Dataset 1**.

Learning Directed Microbial Interactions From Cross-Sectional Microbiome Profiling Data Based on the Generalized Lotka-Volterra Model

In order to learn directed microbial interaction from cross-sectional microbiome profiling data BEEM-static R package (Li, 2020a) was utilized. BEEM-Static is based on generalized Lotka-Volterra model (Metz et al., 1996; Hofbauer and Sigmund, 1998) designed for cross-sectional datasets in order to learn and model the directed microbial interactions (Li, 2020a). BEEM-static in an extension of the original BEEM algorithm that enables a precise ecological modeling based on the microbiome sequencing longitudinal data (Li et al., 2019). Working directly with the relative abundances, the experimental measurement of the absolute abundances is unnecessary and therefore suitable for microbiome datasets where the equilibrium status is unknown. The input file for BEEM-static was an OTU table containing the number of sequences that were observed in each taxonomic unit in each sample, provided by QIIME. In this study, 249 different taxonomic units were found on strain level. The model was built on all taxonomy levels and the coefficient of determination, denoted R^2 , was the highest on the class level (Steel et al., 1960; Glantz et al., 2016). Because the coefficient of determination provides a measure of how well observed outcomes are replicated by the model, class level was chosen as a baseline. Therefore, all OTUs were grouped on a class taxonomic level, creating 35 different class taxonomic units. To remove the OTUs not detectable in the majority of samples and reduce the number of OTUs for a model, the original OTU table was filtered to keep only top OTUs based on prevalence (OTU is found in at least half of the samples), which was later transformed into relative abundance. Usually, the default criteria are to keep the OTUs that are found in at least 25% of the overall samples. However, when these default criteria were used, only one more OTU was retained in the model calculation. Due to our restricted number of samples and the fact that BEEM-static

has been tested on >4,000 microbiome data points, we decided to use 50% prevalence as a more stringent criteria. In both 25% and 50% prevalence, the same OTUs are still significant and because overall they are the most abundant, any pruning variant in-between these criteria would lead to the same outcome. Microbiomes, which were not in equilibrium states, were detected by BEEM-static and automatically removed from the further analysis. In the pooled dataset originating from a cohort consisting of 28 volunteers, seven classes were found in at least 50% of samples and were kept. All seven were in equilibrium state and were used to build the model. In the second dataset, obtained from single patient receiving an antibiotic therapy for 7 days, out of 11 classes present in at least 50% of samples, seven classes were not in equilibrium and were thus removed. Remaining four classes were used to build the model. The package was obtained from GitHub (Li, 2020b) and installed in RStudio (version 1.3.959) under R-4.0.2 on Windows 10 computer. Both the input data and dedicated R scripts used in this study can be accessed at <https://github.com/enmelvan/Dynamics-of-urinary-microbiota-associated-with-cystitis>.

RESULTS

Study Design

A gender-balanced cohort consisting of 28 volunteers (16 female, 12 male) referred to SUC test for cystitis symptoms was involved in the study after signing the informative consent. The initial diagnosis was based on patient's symptom description and further confirmed by standard urine culture test. Culture test inclusion criteria were associated with bacterial infection characterized by $> 10^5$ colony-forming units per ml (CFU/ml). The average age of patients was 66 years. In addition to urine samples collected by clean catch method, small number of catheterized patients was included in the study. One patient with uncomplicated cystitis symptoms caused by common urinary pathogen was singled out and included in longitudinal study in order to monitor dynamics of UT microbiota under prescribed treatment. Beside SUC tests, all samples were subjected to Illumina 16S rRNA sequencing. The goal of the study was to compare SUC tests with genomics based tests and to assess the link between urinary microbiome and cystitis. The goal of the longitudinal study monitoring urinary microbiome dynamics under prescribed antimicrobial therapy was to investigate the impact of the commonly prescribed antimicrobial therapy on the urinary microbiota and to assess the possibility of recommending optimal duration of the antimicrobial therapy.

SUC Reveals Infections Caused by Common Uropathogens

Out of total 28 subjects, SUC indicated 19 monobacterial infections related to *Proteus mirabilis* (five patients), *Klebsiella* spp. (four patients), *Enterobacter* spp. (three patients), *Escherichia coli* (three patients), *Enterococcus faecalis* (two patients), and *Pseudomonas aeruginosa* (two patients). Polymicrobial infections were associated

with seven patients (samples U1, U4, U6, U7, U19, U24, and U25). Urine culture test results of all samples are displayed in **Supplementary Table 1**.

The influence of antibiotic therapy on urinary microbiome was investigated on a patient whose cystitis symptoms were linked to common bacterial pathogen by SUC displaying $> 10^5$ CFU/ml of *K. pneumoniae*. Based on recommendations of clinical practice guidelines in Croatia (Skerk et al., 2009), an antibiogram was used to prescribe standard antibiotic therapy in optimal duration of seven days. Antimicrobial susceptibility test indicated that infection caused by *K. pneumonia* strain was resistant to Ampicillin thus the patient was prescribed Cephalexin (Cefalexin). As part of the study, SUC monitoring was performed on the third and final, seventh day of prescribed antibiotic therapy. On the third day of antibiotic therapy SUC revealed no pathogen and urine was proclaimed sterile. After completing the antibiotic therapy course for the entire 7 days, SUC test indicated *Candida albicans* infection in concentration $>10^3$ and $<10^5$ CFU/ml.

Taxonomic Profiling of UT Microbiota

There were 15 distinct phyla shared by all 28 urine samples collected from all study included patients, out of which *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Actinobacteria* accounted for more than 99% of detected taxa. Classes *Gammaproteobacteria* and *Bacilli* dominated across all samples (**Figure 1**). Single-family dominance was observed in 19 urine samples in which *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, or *Pseudomonadaceae* contributed with over 90% of total bacterial abundance. The more diverse spectrum of bacteria was observed in samples U1, U2, U3, U5, U13, and U16 in which more than four bacterial families were identified. 16S rRNA sequencing successfully identified 123 different genera (**Supplementary Dataset 1**), while the species rank was missing in majority of samples due to inherent limitations of 16S rRNA sequencing (Poretsky et al., 2014), therefore the results of 16S rRNA sequencing were compared with SUC at the family taxonomic level. SUC results were largely in accordance with 16S rRNA sequencing, although a discrepancy between two methods was observed in samples U1, U3, and U13 (**Supplementary Table 1**).

Dynamics of Urinary Microbiota During Cystitis

We have used BEEM-static (Biomass Estimation and model inference with an Expectation Maximization) to infer a model based on 16S rRNA sequencing data for microbial community dynamics (Li et al., 2019). This expectation-maximization algorithm is based on generalized Lotka-Volterra (gLVM) ecological model that can provide useful insights into microbial interactions and dynamics (Venturelli et al., 2018). Before using BEEM-Static, principal-component analysis (PCA) based on patient gender and most abundant operational taxonomic units (OTUs), was used to assess heterogeneity of urinary microbiome. PCA biplot indicated that male and female samples cannot be clearly separated and therefore we modeled them together and not separately (**Figure 2D**).

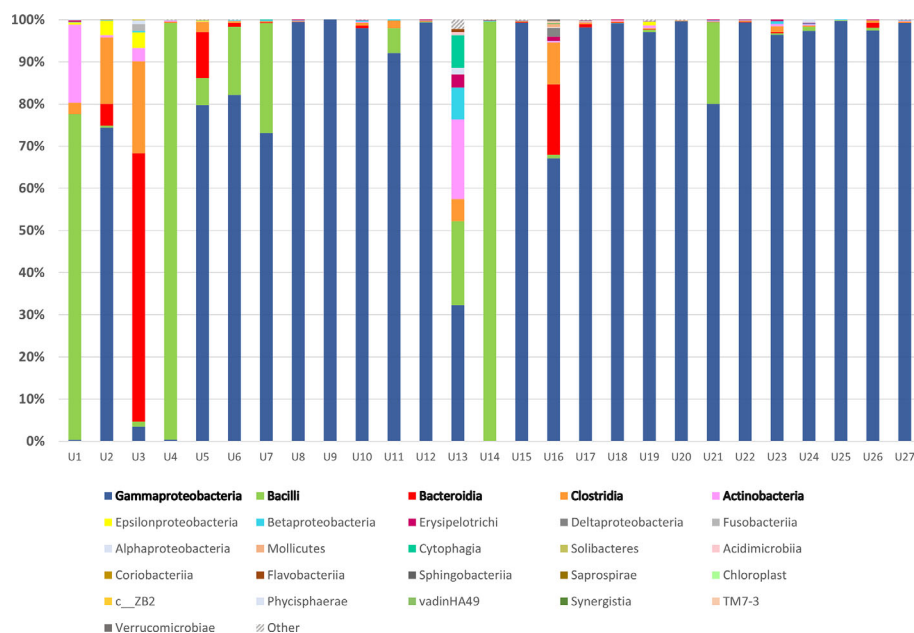


FIGURE 1 | 16S rRNA sequencing of urine samples from patients diagnosed with UTI: Taxonomic representation of bacterial classes as identified by sequencing of V3 and V4 region of 16S rRNA gene. The most abundant classes were marked in bold and sequences belonging to group marked as “Other” were not matched to any sequence in Greengenes database.

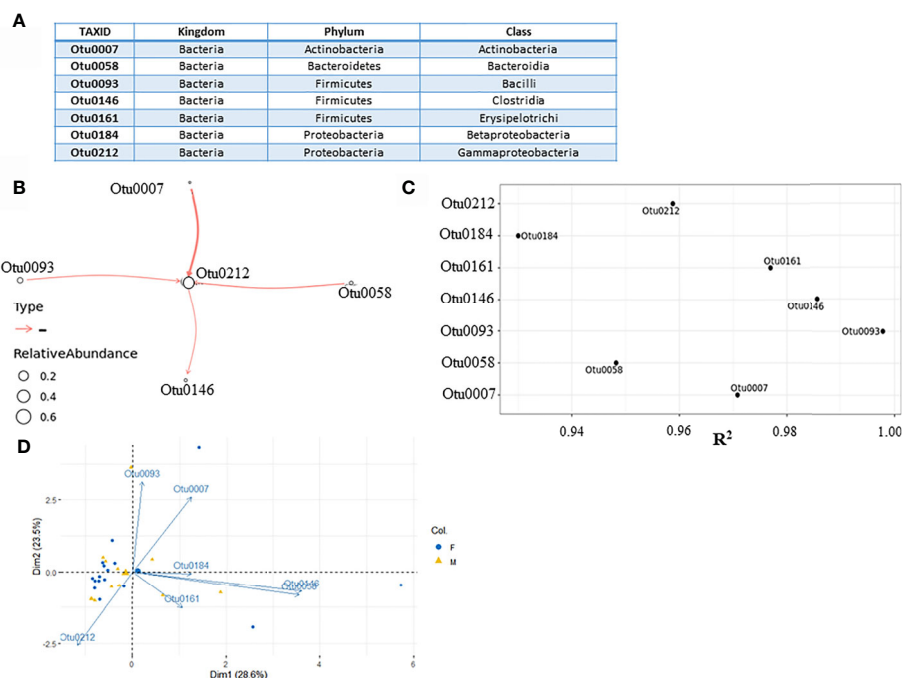


FIGURE 2 | Microbial interaction network based on microbiome profiling of 28 urine samples from patients displaying cystitis symptoms. **(A)** Seven most abundant classes used for modeling. **(B)** Coefficient of determination R^2 for each class input. **(C)** Network graph representing nonzero interaction terms in gLVM models learnt individually from urine microbiome profiling using BEEM-static. Graph edges in red represent negative interactions. Edge widths are proportional to the interaction strength, and node sizes are proportional to the log-transformed mean relative abundance of the corresponding class. Nodes are labeled with the class level taxonomic annotations. **(D)** PCA biplot displaying microbiome variation between male and female patients.

The input file for BEEM-Static was an OTU table containing the number of sequences that are observed in each taxonomic unit in each sample. In this study, 249 different taxonomic units were found on taxonomic levels ranging from kingdom to species (**Supplementary Dataset 1**). They were grouped on a class taxonomic level, creating 35 different class taxonomic units. To reduce the number of OTUs in order to use BEEM-Static model, seldom appearing OTUs were removed. The original OTU table was filtered based on the prevalence of OTUs, retaining only those found in > 50% of the samples. In this manner, seven most abundant OTUs (**Figure 2A**) were transformed from counts into relative abundances across all 28 samples, creating an input file for BEEM-static (**Supplementary Dataset 2**). Microbial interaction network based on mapping file for seven most abundant classes is shown below (**Figures 2B, C**). Classes which do not appear in the network, despite being abundant (Otu161 and Otu184) are considered to be neutral by model. Regarding the interactions depicted by the model, the model was generally aligned with PCA biplot made previously, despite the fact that Dimensions 1 and 2 retained about 52% (28.6% + 23.5%) of the total information contained in the data set.

Gammaproteobacteria class (Otu0212), which was positioned at the core of the model appears to be a common denominator taxa in all tested urine samples. There was one notable negative interaction between *Actinobacteria* class (Otu0007) negatively impacting *Gammaproteobacteria*, which most of the UT pathogens belong to. This negative interaction was predicted to be stronger than interaction between both *Bacilli* (Otu0093) and *Bacteroidia* (Otu0058) classes and *Gammaproteobacteria* class, which implied that *Actinobacteria* relative abundancy was negatively correlated with the level of *Gammaproteobacteria* in affected individuals. The coefficient of determination (R^2) is the proportion of the variance in the dependent variable that is predictable from the independent variable(s) (Steel et al., 1960; Glantz et al., 2016). Since in our case, there were no independent variables, we argue that relatively high R^2 (close to 1) indicated that the variation in the data was well explained by the model. According to R^2 values (**Figure 2B**), all seven classes which were included, could be described by the model.

The Urinary Microbiota Under the Influence of Antibiotic Therapy

The taxonomic distribution of urinary microbiota for the single patient receiving an antibiotic therapy for 7 days is shown in **Figure 3**. Before administration of Cephalexin, *Gammaproteobacteria* were identified as a predominant class, further confirming previous SUC indicated *Klebsiella pneumoniae* infection. In a sample taken 24 h after taking the first antibiotic monodose, *Enterobacteriaceae*, which constituted over 95% of all bacteria detected 24 h before starting therapy, were reduced to 1.28%. Concurrently, heterogeneity of overall microbiota deepened, accompanied by rise in families *Lactobacillaceae* and *Pseudomonadaceae*. Diversity of microbiota was lower on days 3–4 with over representation of genus *Lactobacillus*, which comprised 85.5% of microbiota on

day 3 and 91.9% on day 4, based on QIIME results. While an increase of diversity is shown on days 5 and 6, *Lactobacillus* spp. was relatively most abundant on day 7. On day 8, the last day of 1 g monodosis oral Cephalexin therapy, family *Pseudomonadaceae* had dominated microbiota with relative abundance of 74.61% (**Figure 3A**).

In this period, ratio of Gram-positive to Gram-negative bacteria in urine samples altered dramatically. Gram-negative bacteria relative abundance has been gradually decreasing from day one to day 4, followed by its increase on days 5 and 6 (**Figure 3B**).

Dynamics of Urinary Microbiota Under Antibiotic Influence

In order to model the change of the microbiota during antibiotic therapy on 24 h basis, the original BEEM algorithm for longitudinal data was used. The input data for BEEM (Li et al., 2019) consisted of an OTU table containing the number of sequences that were observed in each taxonomic unit in each sample and metadata containing time measurements (**Supplementary Dataset 3**). Different taxonomic units were grouped on a class taxonomic level, creating 35 different classes. Only the most abundant OTUs (appearing in > 50% of urine samples) were used to construct the model (**Figure 4A**). In this case, four OTUs were normalized from counts into relative abundances across all eight samples, serving as input data for BEEM model. Microbial interaction network based on those OTUs is displayed in **Figure 4B**.

Unlike in the previous model, which was based on different patients with no antibiotic therapy, this model puts *Bacilli* class (Otu0093) at the core of the model, and this class appears to be negatively impacted by the *Gammaproteobacteria* class (Otu0212), which is the most abundant one. This model revealed one more difference regarding two positive interactions, weaker one between *Bacteroidia* class (Otu0058) and *Bacilli* (Otu0093) and stronger one between *Actinobacteria* (Otu0007) and *Bacilli* (Otu0093) classes. We argue that in this patient receiving antibiotic therapy *Actinobacteria* class appears to be positively correlated with *Bacilli* class *Lactobacillus* genus belongs to, while the *Gammaproteobacteria* class appears to be negatively correlated with *Bacilli*, which favors the hypothesis of *Lactobacillus* protective role. Having said this, the question remains whether the choice of gLVM is really appropriate? Since no method is perfect, BEEM estimations of gLVM parameters are not error free. Therefore, we performed a simple correlation analysis, which included taxa used by our models in order to further assess inferred interactions between them (**Figure 5**).

DISCUSSION

Overall, our research indicates that major phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*, which were detected in urine samples of subjects with cystitis symptoms, as well as relatively low number of genera per sample, are in accordance with

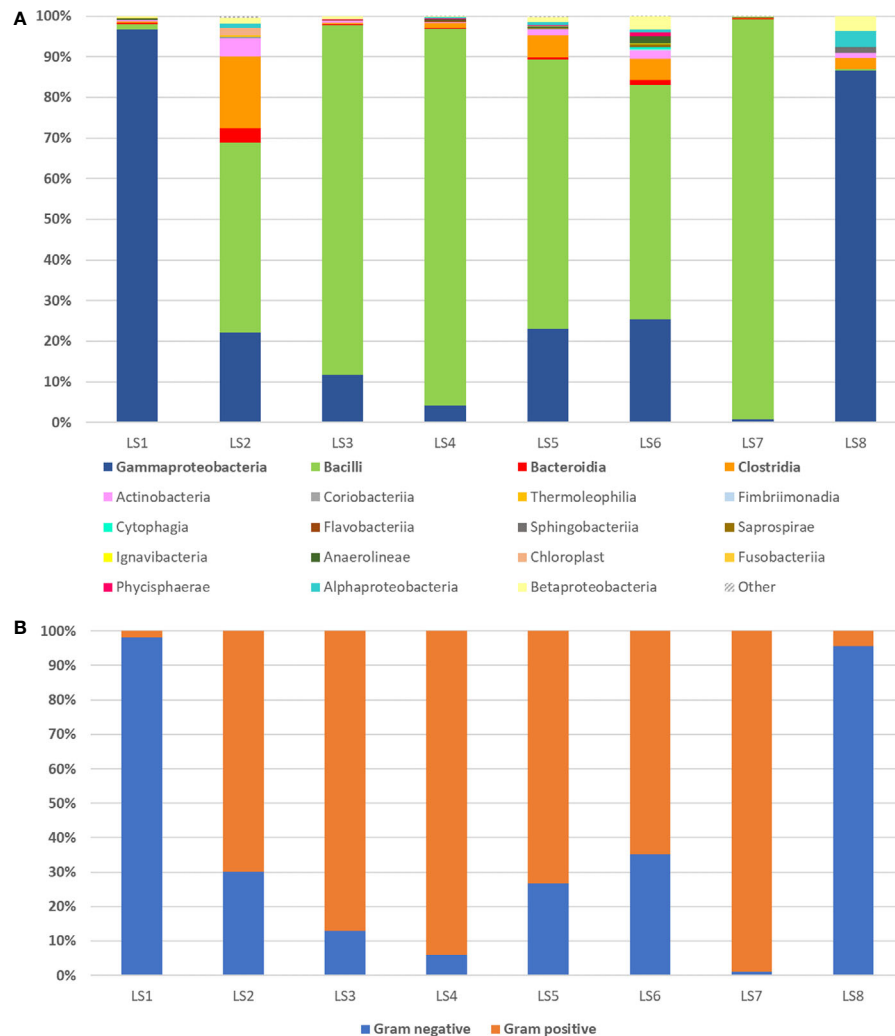


FIGURE 3 | 16S rRNA sequencing of urine samples during and 7-day antibiotic therapy observed in single patient with cystitis symptoms caused by *K. pneumoniae* infection determined with standard urinary culture test. **(A)** Eight day period measurements of relative abundance of bacterial classes detected by urine sample 16S rRNA sequencing coming from a single patient receiving antibiotic therapy for 7 days (first measurement taken one day prior therapy). Group “Other” represents organisms, which contributed with less than 1% or could not be assigned. **(B)** Bar chart displaying a change in Gram-positive and Gram-negative bacteria abundance during 7-day antibiotic therapy with Cephalexin monodose, 1 g per day.

previous research dealing with cystitis patients (Siddiqui et al., 2012). The biological significance of predominance by any specific organism or the lack of a predominant microbe is not yet known. However, our results indicate overabundance of one class of bacteria in the urine of patients with cystitis symptoms—*Gammaproteobacteria*, was the main causative agents of cystitis in our study. Although urinary microbiota is low complexity in comparison with other bodily niches (Karstens et al., 2018), overrepresentation of an OTU belonging to a single class might indicate that OTU “equilibrium” in urine microbiota could be another equally important contributing factor.

In our longitudinal study, we had selected a single female patient. This patient was selected because of clear clinical presentation, having a last documented SUC finding of 10^5 CFU/ml *Lactobacillus* species and no cystitis symptoms for at

least 1 year, based on patient’s recollection and medical exams in this period. Because this patient was pregnant, we were able to establish sufficiently strict monitoring in order to rule out antibiotics usage and unreported cystitis episodes. Shortly after delivery, a common pathogen, *K. pneumoniae* was detected in this patient’s urine after sudden onset of acute cystitis. This pathogen was quickly eradicated with oral Cephalexin therapy, taken in form of monodose 1 g per day. Our study has shown that *K. pneumoniae* was extremely sensitive to this antibiotic since its relative abundance in urine plummeted from 94.1% to marginal 1.04% after just 2 days under therapy. However, *Lactobacillus* sp., although initially abundant were also depleted by the last day of therapy, making the urinary tract significantly more susceptible to reinfection. We believe that the significant decline in *Lactobacillus* sp. caused by 7-day therapy contributed to the development of

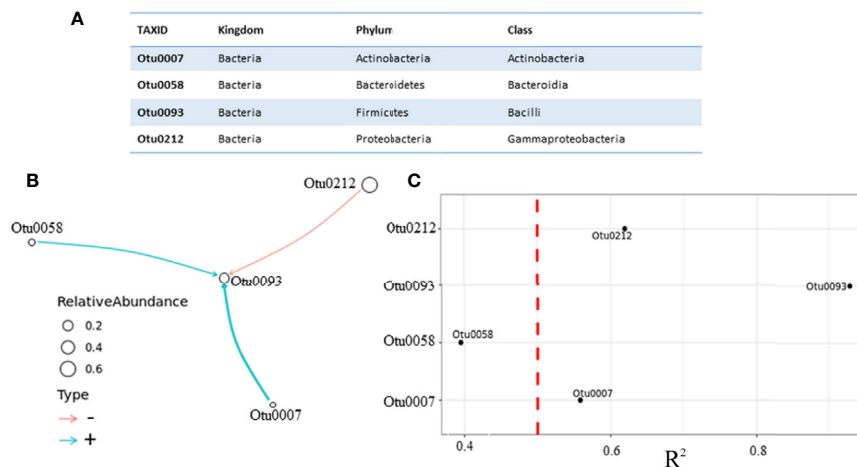


FIGURE 4 | Microbial interaction network based on daily monitoring of urine from a single patient under prescribed antibiotic therapy. **(A)** Four most abundant classes, which were in equilibrium state **(B)** Network graph representing nonzero interaction terms in gLVM models learnt individually from urine microbiome profiling using BEEM-static. Graph edges in red represent negative interactions and blue edges represent positive. Edge widths are proportional to the interaction strength, and node sizes are proportional to the log-transformed mean relative abundance of the corresponding class. Nodes are labeled with the class level taxonomic annotations described in the table. **(C)** Coefficient of determination (R^2) for each class used by the model, vertical dashed line depicted in red color was set at $R^2 = 0.5$, indicating that interaction with Otu0058 ($R^2 = 0.39$) should be taken with caution.

Candida infection, which was the latter cause of recurring cystitis in this patient. Generalized Lotka-Volterra model based on QIIME microbiome analysis of raw DNA sequencing data collected from 28 patients predicted *Bacilli* class with *Lactobacillus* as dominant genus negatively impact on overgrowth of pathogens belonging to *Gammaproteobacteria* class. The second model based on longitudinal study data has further highlighted the role of *Gammaproteobacteria* class pathogens related to cystitis symptoms. However, this model is markedly different. This second model predicted *Gammaproteobacteria* class negative impact on the *Bacilli* class. Both models indicated members of *Actinobacteria* class as an important contributor to UT microbiota “equilibrium” both actively suppressing pathogen overgrowth and having a protective influence on *Lactobacillus* during treatment.

The marked difference in reversed positive-negative interactions between *Bacilli* and *Gammaproteobacteria* classes in these two gLVM models could arguably be attributed to the introduction of antibiotic.

Overall, our results indicate this antibiotic was an excellent choice for rapid removal of pathogen from the patient’s UT, however, continuation of therapy after 3 days in this particular case has dramatically impacted host’s urinary microbiome, and enabled opportunistic pathogens from class *Pseudomonadaceae* and ultimately *C. albicans* to occupy their niches in UT and in the end cause cystitis symptoms to relapse. This strongly suggests that time under therapy is an equally important therapy parameter as the initial choice of antimicrobial drug. Our study suggests that introduction of genomics based methods, alongside traditional

First gLVM model based on pooled dataset originating from a cohort consisting of twenty-eight volunteers		
Class 1	Class 2	PPMCC
Otu0093	Otu0212	-0.32718
Otu0058	Otu0212	-0.14561
Otu0007	Otu0212	-0.29684
Second gLVM model based data obtained from single patient receiving an antibiotic therapy for 7 days		
Class 1	Class 2	PPMCC
Otu0058	Otu0093	-0.24439
Otu0007	Otu0093	-0.26527
Otu0212	Otu0093	-0.693

FIGURE 5 | Table displaying calculated Pearson Product Moment correlation coefficients for all model inferred interactions for both pooled patient dataset and single patient dataset. In the table, column marked Class 1 corresponds to model’s interaction network outlier classes, while Class 2 denotes the class centered at the core of model. Third column contains calculated Pearson Product Moment correlation coefficients (PPMCC). This is a measure of linear correlation between two sets of data, and although the results obtained can be correlated with those obtained by the gLVM model based on pooled patient dataset, direct comparison is nontrivial because PPMCC ignores many other types of relationship or correlation.

culture-based ones, can be a great aid in assessing this second parameter. We are fully aware that our study was limited in a sense that we monitored urinary microbiome change during antibiotic therapy in a single patient. In future, more patients with different therapy durations should be monitored and monitoring should be performed in prolonged periods after completing antibiotic therapy.

CONCLUSIONS

In the present study, dysbiosis of UT microbiota associated with cystitis was characterized. Briefly, the results revealed increases in the abundances of bacteria associated with UT infections, decrease in the abundances of potential beneficial bacteria, and changes in the interactions of the constituent taxa making up microbiota in patients with cystitis. The two gLVM models based on 16S rDNA sequencing suggested that *Actinobacteria* phylum bacteria are interacting with both pathogen and beneficial representatives of UT microbiota. This highly diverse bacterial phylum characterized by extraordinary metabolic versatility and ability to produce most of the clinically used antibiotics and a plethora of other natural products is not sufficiently explored in regards to human UT and from this study it appears to harbor some highly beneficial representatives of healthy UT microbiota. Moreover, longitudinal microbiota insight obtained from a single patient under prescribed antimicrobial therapy revealed rapid and extensive changes in microbial composition of UT and emphasized the need for current guidelines revision in regards to Cephalexin therapy duration, although further studies are needed to explore this for other commonly prescribed antibiotics.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s): <https://www.ebi.ac.uk/>, Project: PRJEB42164, deposited on 18-12-2020 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB42164>).

REFERENCES

- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9
- Brubaker, L., and Wolfe, A. J. (2015). The new world of the urinary microbiota in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, 644–649. doi: 10.1016/j.ajog.2015.05.032
- Brubaker, L., and Wolfe, A. (2016). The Urinary Microbiota: A Paradigm Shift for Bladder Disorders. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 28, 407–412. doi: 10.1097/GCO.0000000000000298
- Callahan, B. J., Mcmurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., and Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432

ETHICS STATEMENT

The studies involving urine samples from human participants were reviewed and approved by the Ethics Committee of University Hospital Dubrava affiliated with Faculty of Food Technology and Biotechnology and Faculty of Pharmacy and Biochemistry. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS and JZ performed the study design, data analysis, drafting, revising, final approval, and handled the accountability of all aspects of the work. EM, ES, and MC performed the bioinformatics analysis and data acquisition. MC, LS, and DO performed the data analysis and acquisition. AS, JZ, JS, KB, and MC performed the study design, clinical sample collection, data analysis, revising, and final approval and were also involved in the accountability of all aspects of the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the Croatian Science Foundation under research project “Exploring Gut Microbiome Equilibrium” (Grant HRZZ_IP_06_2016_3509) and by the Croatian Government and the European Union through the European Regional Development Fund: Competitiveness and Cohesion Operational Programme (KK.01.1.1.01) The Scientific Centre of Excellence for Marine Bioprospecting–BioProCro.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.643638/full#supplementary-material>

- Fouts, D. E., Pieper, R., Szpakowski, S., Pohl, H., Knobloch, S., Suh, M., et al. (2012). Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J. Transl. Med.* 10, 1–14. doi: 10.1186/1479-5876-10-174
- Frost, L., Van Boeckel, T. P., Pires, J., Craig, J., and Laxminarayan, R. (2019). Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J. Travel Med.* 26, 1–13. doi: 10.1093/jtm/taz036
- Glantz, S. A., Slinker, B. K., and Neillands, T. (2016). *Primer of applied regression and analysis of variance*. 3rd ed (New York, N.Y: McGraw-Hill).
- Gottschick, C., Deng, Z., Vital, M., Masur, C., Abels, C., Pieper, D. H., et al. (2017). The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome* 5, 99. doi: 10.1186/s40168-017-0305-3
- Harbarth, S., Theuretzbacher, U., and Hackett, J. (2015). Antibiotic research and development: business as usual? *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1604–1607. doi: 10.1093/jac/dkv020

- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, A., Frimodt-Møller, N., et al. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 52, 139–146. doi: 10.1128/JCM.02452-13
- Hilt, E. E., McKinley, K., Pearce, M. M., Rosenfeld, A. B., Zilliox, M. J., Mueller, E. R., et al. (2014). Urine is not sterile: Use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.* 52, 871–876. doi: 10.1128/JCM.02876-13
- Ho, D., Quake, S. R., McCabe, E. R. B., Chng, W. J., Chow, E. K., Ding, X., et al. (2020). Enabling Technologies for Personalized and Precision Medicine. *Trends Biotechnol.* 38, 497–518. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.12.021
- Hofbauer, J., and Sigmund, K. (1998). *Evolutionary Games and Population Dynamics* (Cambridge, U.K: Cambridge University Press). doi: 10.1017/CBO9781139173179
- Jancel, T., and Dudas, V. (2002). Management of uncomplicated urinary tract infections. *West. J. Med.* 176, 51–55. doi: 10.1136/ewjm.176.1.51
- Karstens, L., Asquith, M., Caruso, V., Rosenbaum, J. T., Fair, D. A., Braun, J., et al. (2018). Community profiling of the urinary microbiota: considerations for low-biomass samples. *Nat. Rev. Urol.* 15, 735–749. doi: 10.1038/s41585-018-0104-z
- Lewis, D. A., Brown, R., Williams, J., White, P., Jacobson, S. K., Marchesi, J. R., et al. (2013). The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 3, 1–14. doi: 10.3389/fcimb.2013.00041
- Li, C., Chng, K. R., Kwah, J. S., Av-Shalom, T. V., Tucker-Kellogg, L., and Nagarajan, N. (2019). An expectation-maximization algorithm enables accurate ecological modeling using longitudinal microbiome sequencing data. *Microbiome* 7, 118. doi: 10.1186/s40168-019-0729-z
- Li, C. (2020a). BEEM-Static. In: (GitHub). Available at: <https://github.com/lch14forever/beem-static> (Accessed July 28, 2020).
- Li, C. (2020b). lch14forever. In: (GitHub). Available at: <https://github.com/lch14forever> (Accessed May 12, 2020).
- Malik, B., and Bhattacharyya, S. (2019). Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Sci. Rep.* 9, 1–12. doi: 10.1038/s41598-019-46078-y
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610–618. doi: 10.1038/ismej.2011.139
- Metz, J. A., Geritz, S. A., Meszéna, G., Jacobs, F. J., and Heerwaarden, J.S.V. (1996). “Adaptive dynamics: A geometrical study of the consequences of nearly faithful reproduction,” in *Stochastic and Spatial Structures of Dynamical Systems*. Eds. S. J. van Strien and S. M. Verduyn Lunel (Amsterdam: North-Holland), 183–231.
- Milo, G., Katchman, E., Paul, M., Christiaens, T., Baerheim, A., and Leibovici, L. (2005). Duration of antibacterial treatment for uncomplicated urinary tract infection in women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 18:CD004682. doi: 10.1002/14651858.CD004682.pub2
- Moustafa, A., Li, W., Singh, H., Moncera, K. J., Torralba, M. G., Yu, Y., et al. (2018). Microbial metagenome of urinary tract infection. *Sci. Rep.* 8, 4333. doi: 10.1038/s41598-018-22660-8
- Mueller, E. R., Wolfe, A. J., and Brubaker, L. (2017). The Female Urinary Microbiota. *Curr. Opin. Urol.* 27, 282–286. doi: 10.1097/MOU.0000000000000396
- Mulder, M., Radjabzadeh, D., Hassing, R. J., Heeringa, J., Uitterlinden, A. G., Kraaij, R., et al. (2019). The effect of antimicrobial drug use on the composition of the genitourinary microbiota in an elderly population. *BMC Microbiol.* 19, 9. doi: 10.1186/s12866-018-1379-1
- Nelson, D. E., Van Der Pol, B., Dong, Q., Revanna, K. V., Fan, B., Sodergren, E., et al. (2010). Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One* 5, e14116. doi: 10.1371/journal.pone.0014116
- Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., and Nisco, N. J. (2020). Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *MBio* 11, e00218–e00220. doi: 10.1128/mBio.00218-20
- Oros, D., Cepnija, M., Zucko, J., Cindric, M., Hozic, A., Skrlin, J., et al. (2020). Identification of pathogens from native urine samples by MALDI TOF / TOF tandem mass spectrometry. *Clin. Proteomics* 17, 1–9. doi: 10.1186/s12014-020-09289-4
- Oulas, A., Pavlou, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., et al. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform. Biol. Insights* 9, 75–88. doi: 10.4137/BBI.S12462
- Pezzani, M. D., Be, G., Cattaneo, P., Zaffagnini, A., Gobbi, F., Rodari, P., et al. (2020). Evidence based review on optimal duration of antibiotic therapy for bacterial infections to support antimicrobial stewardship recommendations. Available at: https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/22/applications/ABWG_optimal_duration_AB.pdf (Accessed September 5, 2020).
- Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., and Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS One* 9, e93827. doi: 10.1371/journal.pone.0093827
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. doi: 10.1038/nature08821
- Siddiqui, H., Lagesen, K., Nederbragt, A. J., Jeansson, S. L., and Jakobsen, K. S. (2012). Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiol.* 12, 205. doi: 10.1186/1471-2180-12-205
- Skerk, V., Tambić Andrasević, A., Andrasević, S., Susić, E., Džepina, A., Madarić, V., et al. (2009). ISKRA guidelines on antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections - Croatian national guidelines. *Lijec. Vjesn.* 131, 105–118.
- Steel, R. G. D., Steel, R. G., Steinberg, D. J., and Torrie, J. H. (1960). *Principles and procedures of statistics: with special reference to the biological sciences* (New York; Toronto: McGraw-Hill).
- Thomas-White, K., Brady, M., Wolfe, A. J., and Mueller, E. R. (2016). The bladder is not sterile: History and current discoveries on the urinary microbiome. *Curr. Bladder Dysfunct. Rep.* 11, 18–24. doi: 10.1007/s11884-016-0345-8
- Venturelli, O. S., Carr, A. V., Fisher, G., Hsu, R. H., Lau, R., Bowen, B. P., et al. (2018). Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities. *Mol. Syst. Biol.* 14, e8157. doi: 10.15252/msb.20178157
- Whiteside, S. A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G., and Burton, J. P. (2015). The microbiome of the urinary tract — a role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.* 12, 81–90. doi: 10.1038/nrurol.2014.361
- Wolfe, A. J., Toh, E., Shibata, N., Rong, R., Kenton, K., Fitzgerald, M., et al. (2012). Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1376–1383. doi: 10.1128/JCM.05852-11

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Cepnija, Oros, Melvan, Svetlicic, Skrlin, Barisic, Starcevic, Zucko and Starcevic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESEARCH

Open Access



Identification of pathogens from native urine samples by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry

Damir Oros¹, Marina Ceprnja², Jurica Zucko¹, Mario Cindric³, Amela Hozic³, Jasenka Skrlin⁴, Karmela Barisic⁵, Ena Melvan⁶, Ksenija Uroic¹, Blazenska Kos¹ and Antonio Starcevic^{1*} 

Abstract

Background: Reliable high-throughput microbial pathogen identification in human urine samples is crucial for patients with cystitis symptoms. Currently employed methods are time-consuming and could lead to unnecessary or inadequate antibiotic treatment. Purpose of this study was to assess the potential of mass spectrometry for uropathogen identification from a native urine sample.

Methods: In total, 16 urine samples having more than 10⁵ CFU/mL were collected from clinical outpatients. These samples were analysed using standard urine culture methods, followed by 16S rRNA gene sequencing serving as control and here described culture-independent MALDI-TOF/TOF MS method being tested.

Results: Here we present advantages and disadvantages of bottom-up proteomics, using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, for culture-independent identification of uropathogens (e.g. directly from urine samples). The direct approach provided reliable identification of bacteria at the genus level in monobacterial samples. Taxonomic identifications obtained by proteomics were compared both to standard urine culture test used in clinics and genomic test based on 16S rRNA sequencing.

Conclusions: Our findings indicate that mass spectrometry has great potential as a reliable high-throughput tool for microbial pathogen identification in human urine samples. In this case, the MALDI-TOF/TOF, was used as an analytical tool for the determination of bacteria in urine samples, and the results obtained emphasize high importance of storage conditions and sample preparation method impacting reliability of MS2 data analysis. The proposed method is simple enough to be utilized in existing clinical settings and is highly suitable for suspected single organism infectious etiologies. Further research is required in order to identify pathogens in polymicrobial urine samples.

Keywords: Urine, Sample preparation, Pathogen identification, Proteomics, MALDI-TOF/TOF, 16S rRNA sequencing

Background

Urinary tract infections (UTIs) are the most common form of bacterial infections both in the general population and in hospital patients, attributing to nearly 25% of all infections [1]. UTIs are much more common

in females than males. It is estimated that 40–50% of women will develop a UTI during their lives, and approximately 33% of women will have recurrent acute uncomplicated UTI [2]. Common primary bacterial uropathogens are *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis*, and *Klebsiella pneumoniae*. While most common secondary uropathogens are *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*

*Correspondence: astar@pbf.hr

¹ Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb University, 10000 Zagreb, Croatia
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

and fungal pathogen *Candida* spp. [3–6]. Approximately 60–80% of all uncomplicated bacterial UTIs are caused by *E. coli*. Researchers have recognized that urine is not sterile and confirmed the importance of resident bacterial flora (urinary microbiota) in the lower urinary tract. Resident urinary microbiota is mostly composed of *Lactobacillus gasseri*, *Corynebacterium coyleae*, *Actinobaculum schaalii*, *Aerococcus urinae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus epidermis*, *Actinomyces neuui* and *Bifidobacterium* spp. [7, 8].

In order to identify microorganisms in clinical microbiology laboratories, most used methods are microbiological techniques which are still based on cultivation on different culture media [9]. Despite advances in genomics and proteomics, urine culture method is still the golden standard for the diagnosis of UTIs. Urine samples containing more than 10^5 CFU/mL of a single microbial species usually indicate clinical relevance. However, there are significant shortcomings to these cultivation-oriented methods. The first limitation is the time required for the cultivation of microorganisms and subsequent identification [10]. Standard incubation times range from 12 to 24 h in order to enable reliable detection of the presence of uropathogens [11]. The second limitation is the requirement for fresh urine samples. Some of these limitations may result in overall negative urine cultures in up to 80% of cases, in many microbiology laboratories [12]. Unfortunately, a wide variety of sampling methods and inappropriate specimen transport are major cause of pre-analytical errors [13].

Various methods have been used for detection of microorganisms in clinical microbiology [14–16]. For fast screening of urine samples, flow cytometry (such as Sysmex analyser) has been used. However, urine flow cytometer is not able to provide bacteria identification [17, 18]. Genomic methods relying on DNA analysis, such as Sep-tiFast, FilmArray or GeneXpert, are being used, however they are still not approved by the FDA for UTI identification [14]. Usage of real-time PCR methods in the identification of uropathogens has been proven as feasible [19], however it is limited in its scope. Techniques using DNA sequencing regularly show more sensitivity compared to standard urine culture test. For this reason, bacterial identification relying on sequencing of the 16S rRNA genes is becoming a method of choice for detection of uropathogens in urine samples [20, 21].

Field of proteomics also offers methods for microbial identification, mass spectrometry (MS) being the most prominent one. MS platforms used include matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) based analysis producing characteristic spectrum called peptide mass fingerprint (PMF), or less frequently used liquid

chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based peptide sequencing. LC-MS/MS depends on initial isolation of bacterial colonies from urine and their subsequent cultivation [22, 23], while MS based analysers claim ability to directly process samples or swabs. Today, MS-based analysers are in routine use, such as the Bruker BioTyper (Bruker Daltonics) and VITEK MS Plus (bioMérieux), both detecting MS1 spectra fingerprint consisting of most abundant proteins present in a wide array of microorganisms [24–26]. The US Food and Drug Administration (FDA) has issued regulatory approval for using MALDI-TOF mass spectrometry-based platform for routine identification of pathogenic microbes from human specimens in clinical microbiology laboratories [23, 27]. This instrument is coupled with dedicated software and database so it can perform a comparison of the recorded MS1 spectra with the mass spectra of known microorganisms stored in the database. However, MALDI-TOF MS has its limitations and does not allow identification of microorganisms at the species level, nor it performs well when more than one species or strain is present in the sample [28–30]. Furthermore, in order to obtain reliable results, samples have to be cultured on selective agar and a single microbial colony is then used to identify an organism. To bypass time-consuming and selective cultivation stage, culture-independent methods have been developed [17, 31–34]. More recently, there has been growing interest in mass spectrometry based proteomic analyses directly from urine samples, thus skipping the cultivation stage [35, 36]. Ideally, the metaproteomic analysis should be able to provide sufficient numbers of strain-specific peptides useful for microbial identification at the genus, species and even strain-level, and it could also be applied to urine samples containing more than one species, including even potential biomarkers used for non-invasive monitoring of human diseases [37–40].

Methods

Urine samples collection and storage

Urine specimens were collected from the Centre for Clinical Microbiology and Hospital Infections, University Hospital Dubrava with only exclusion criteria being antimicrobial therapy. Through the period from October to December 2016 total of 2993 urine specimens were received from patients for whom a urinary culture analysis was requested (Additional file 2: Table S1). The samples were collected from patients according to the instructions for collecting the urine by midstream clean-catch technique [41].

Urine culture test

The microorganisms were identified by routine microbiology methods [42]. Aliquots made from urine specimens

were inoculated onto McConkey agar and blood agar plates using a 1 µl calibrated loop and incubated aerobically at 37 °C from 18 to 48 h, according to the standard operating procedure at the Centre for Clinical Microbiology and Hospital Infections, University Hospital Dubrava. Single colonies were counted to determine the bacterial concentration. Clinically significant infections were considered those with more than 10⁵ CFU/mL.

Samples for genomics and proteomics analysis

From samples that tested positive (total of 1571) on urine culture test, 16 samples were randomly selected, matching the following criteria: a.) more than 10⁵ CFU/mL and b.) more than 30 ml of urine. All sixteen urine samples (associated with corresponding laboratory reports) were stored at −20 °C and used for further genomic and proteomic analyses.

Genomic analysis

DNA extraction

Frozen samples were thawed at room temperature and homogenised. Bacterial genomic DNA was extracted using the Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit on the Maxwell 16 research instrument (Promega, Madison) according to the manufacturer's instructions. The concentration of DNA was determined using a Nano-Drop spectrophotometer (Shimadzu Biotech).

16S rRNA sequencing and bioinformatics analysis

Extracted DNA was sent to Next Generation Sequencing Service Provider (MR DNA, Texas, USA). Sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform using paired-end sequencing protocol. Amplicons of the 16S rRNA gene were generated using primers targeting V3 and V4 variable regions of the ribosomal RNA. A 30-cycle PCR reaction was performed using the Hot-StarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA). Microbiome bioinformatic analysis was performed using QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software package version 2018.4 [43]. Paired-end raw sequences were demultiplexed and quality filtered using the q2-demux plugin followed by de-noising with DADA2 [44]. First 7 bases of forward and reverse reads were trimmed, forward reads were truncated to 290 bases, and reverse reads to 240 bases. Taxonomy was assigned to obtained amplicon sequence variants using the q2-feature-classifier [45] which relies on classify-sklearn naive Bayes taxonomy classifier and Greengenes v. 13.8 from which 99% OTUs reference sequences were trimmed to variable regions 3 and 4 [46]. Amplicons were analysed using the QIIME 2 (version 2017.4).

Proteomics

Sample preparation

For each sample, a homogenized aliquot of 10 ml urine sample was centrifuged at 1000 g at room temperature for 1 min (Additional file 1: Figure S1). Insoluble sediment was discarded, and supernatant was transferred to a new tube and centrifuged at 16,000 g at 4 °C for 5 min. The supernatant was discarded, and the bacterial pellet was re-suspended in a buffer (25 mM NH₄HCO₃, pH 7.8). The pellet was homogenized on vortex and centrifuged at 16,000 g, at 4 °C for 5 min. This procedure was designed to “wash out” mainly excess human cells and it was repeated three times. Proteins were extracted from the bacterial pellet using 100 µL of bacterial protein extraction reagent B-PER (Thermo-Pierce, USA). Following the manufacturer's protocol, sample was incubated at room temperature for 15 min and subsequently heated at 100 °C in a water bath for 2 min. Insoluble cellular debris was removed by centrifugation at 16,000 g at 4 °C for 5 min. Finally, supernatant with soluble proteins contained in B-PER solution was ready for the next step in proteomics sample preparation.

In solution digestion

Protein sample contained in B-PER (70 µL) was mixed with 2 µL of trypsin solution (1 mg/mL, Merck, Germany). The in-solution digestion was carried out at 37 °C on a thermoshaker (500 rpm) for 18 h (overnight).

Peptide fractionation

After 18 h of trypsin in-solution digestion, fractionation was performed using the Agilent Bravo automated liquid handling platform (96-channel tip head) and AssayMAP SCX cartridges according to the manufacturer's instructions, and fractionation protocol (application note 5991-3602EN), SCX cartridges were primed with 400 mM ammonium formate/1% formic acid/25% acetonitrile (ACN), equilibrated with 1% formic acid/25% ACN, loaded with samples, and eluted sequentially using a 40 mM ammonium formate/25% ACN (pH 3.5; 4.0) 40 mM ammonium acetate/25% ACN, (pH 4.5; 5; 5.5) and 100 mM ammonium hydroxide/25% ACN (pH 9.5). From each processed sample, a total of six fractions were collected by chromatography using a pH modulated stepwise elution method.

MALDI-TOF/TOF mass spectrometry analysis

For sample analysis, 1 µl of 5-mg/mL α-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) matrix solution was mixed with 1 µl of each sample fraction (six fractions per sample). From the resulting solution, 1 µl was spotted onto the Opti-TOF MALDI 384 target plate (AB

Sciex). After drying at room temperature, spotted samples were analysed using a 4800 Plus MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) equipped with a 200 Hz, 355 nm Nd: YAG laser. MS spectra were acquired over a mass range of 800–4500 m/z. Peptide fragmentation was performed at collision energy (CID) of 1 kV in positive ion reflection mode, using nitrogen as collision gas. For each sample up to 20 most intense peaks of MS spectra were selected for MS/MS spectra analysis. Approximately 1000 single shots were accumulated from different positions for MS analysis, and 2000 shots spectra were recorded for the subsequent fragment ion spectra. Internal calibration using trypsin autolysis fragments was performed. MS and MS/MS spectra were acquired using the 4000 Series Explorer software v 3.5.3 (AB Sciex).

Analysis of proteomics data

Mascot (version 2.1. Matrix Science, UK) analysis was carried out to identify peptides and to search for matching proteins in the NCBI “nr” database (20140312) with taxonomy filter set for *Proteobacteria* (11838333 sequences), *Firmicutes* (5487348 sequences) and *Homo sapiens* (276468 sequences). Search parameters for MS and MS/MS database were as follows: parent ion mass tolerances of 0.3 Da and 0.5 Da fragment ion mass tolerance, trypsin digestion with a maximum of one miscleavage per peptide and methionine oxidation as variable modification. Trypsin specificity was set at C-terminal lysine and arginine unless next residue is proline. Qualitative data analysis was performed with MASCOT using a 95% confidence interval, so the significance threshold was adjusted with the false discovery rate below 5%. In Mascot reports a minimum score of 48 was used.

Results and discussion

Urine culture test

All samples, which have undergone proteomics and genomics analyses, were benchmarked against standard urine culture test that accompanied all the samples (Additional file 2: Table S2). Among the 16 clinical samples analysed, 13 were classified as monobacterial infections and 3 were classified as polymicrobial (at least two identified uropathogens). Thirteen samples showed presence of Gram-negative and only three to Gram-positive bacteria. Regarding taxonomic diversity of the samples analysed, according to standard tests, there were 7

different bacterial species in total, belonging to 4 respective genera (Additional file 2: Table S3).

Effect of storage time and temperature on bacteria in urine samples

Guidelines for the collection and storage of urine specimens differ for different diagnostic purposes. This is something we should be aware of. Urine samples should be collected and stored having in mind exact diagnostic procedures to be carried out. In our study, short-term storage (up to 4 weeks) of urines at -20°C showed to be a good choice for the preservation of bacteria in collected samples. Long-term storage (for more than 3 months) at -80°C led to biomass loss, most likely due to prolonged freezing which caused greater bacterial cell fragility, thus leading to greater extent of cell disruption during centrifugation (unpublished observations).

Identification of microorganisms using genomics

16S rRNA sequencing results

Identification of bacterial taxa is shown in Table 1. Lowest obtainable taxonomic level for which assignment was possible is being shown as a result of genomic identification. Table 1 provides following information: sample number, conventional urine culture result, DNA concentration and 16S rRNA gene sequencing result.

What stands out in this table is a disparity in taxonomic identification obtained through 16S rRNA gene sequencing—in the majority of cases bacteria were identified on genus level (44%) and family level (56%), while the identification on species level is usually lacking.

It is apparent that *Klebsiella* spp. (UR1-UR3), and *Enterobacter* spp. (UR13-UR14) identifications are difficult to compare due to different levels of taxonomy assignment by the method [47], while there is a significant positive correlation amongst other results for both conventional and genomics methods. A possible explanation for this difficulty might be related to bacterial nomenclature, taxonomy and very high sequence identity. Furthermore, genomic based 16S rRNA analysis was not informative at the genus and/or species level in the family *Enterobacteriaceae* [48]. There was a surprising difference between standard test and genomics results in sample UR 5. Standard urine culture test indicated *Enterococcus faecalis* as a single uropathogen in this sample, while 16S rRNA indicated polymicrobial mixture without *Enterococcus* genus listed. There are two possible explanations for this disparity, one indicating a urine collection sample contamination [49] which would likely cause a genomics test error, and the other

Table 1 Identification results based on conventional urine culture and 16S rRNA gene sequencing

N.o.	Urine culture identification	DNA concentration (ng/μL)	16S rRNA sequencing results
UR1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	3.15	100% Enterobacteriaceae
UR2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	9.14	97% Enterobacteriaceae
UR3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	6.01	90% Enterobacteriaceae; 5.1% Granulicatella; 1.1% <i>Anaerococcus</i>
UR4	<i>Proteus mirabilis</i>	6.96	97.7% <i>Proteus</i> ; 1% Enterobacteriaceae
UR5	<i>Enterococcus faecalis</i>	16.22	21.8% <i>Pseudomonas</i> ; 13.7% <i>Propionibacterium acnes</i> ; 11% <i>Lactobacillus helveticus</i> ; 8.1% <i>Adhaeribacter</i> ; 8% <i>Acinetobacter</i> ; 5.9% <i>Staphylococcus</i> ; 4.9% <i>Stenotrophomonas</i> ; 3.8% <i>Hydrogenophaga</i> ; 3.6% <i>Erysipelotrichaceae</i> ; 3.1% <i>Corynebacterium</i> ; 3.1% <i>Cellulomonas</i> ; 2.3% <i>Aerococcus</i> ; 2% <i>Acidovorax</i> ; 1.9% <i>Lachnospiraceae</i> ; 1.6% <i>Sphingobium</i>
UR6	<i>Enterococcus faecalis</i>	4.93	51.4% <i>Enterococcus</i> ; 46.5% Enterococcaceae
UR7	<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL	1.84	98% <i>Enterobacter</i> ; 0.9% <i>Proteus</i>
UR8	<i>Citrobacter koseri</i>	15.94	57.5% <i>Citrobacter koseri</i> ; 4.5% <i>Bacteroides</i> ; 3.7% <i>Dysgonomonas</i> ; 2.7% <i>Bacteroides</i> ; 2.6% <i>Rikenellaceae</i> ; 2.3% <i>Parabacteroides</i> ; 2% <i>Desulfovibrionaceae</i> ; 2% <i>Lachnospiraceae</i> ; 2% <i>Ruminococcaceae</i> ; 1.9% Enterobacteriaceae; 1.3% <i>Ruminococcus</i> ; 1.3% <i>Erysipelotrichaceae</i> ; 1.2% <i>Enterococcus</i> ; 1.1% <i>Clostridiales</i>
UR9	<i>Proteus mirabilis</i>	0.45	96.7% <i>Proteus</i> ; 2.4% Enterobacteriaceae; 1.2% <i>Prevotella</i>
UR10	<i>Proteus mirabilis</i>	3.66	97% <i>Proteus</i> ; 1.3% Enterobacteriaceae
UR11	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ESBL	9.39	93% Enterobacteriaceae; 3.5% <i>Proteus</i>
UR12	<i>Proteus mirabilis</i>	1.73	99.2% <i>Proteus</i>
UR13	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.08	75.4% Enterobacteriaceae; 14% <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ; 4.2% <i>Kluyvera</i> ; 4% <i>Enterobacter</i> ; 1% <i>Lactobacillus helveticus</i>
UR14	<i>Enterobacter cloacae</i>	4.14	95.4% Enterobacteriaceae; 1.2% <i>Clostridium perfringens</i> ; 1% <i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
UR15	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	15.17	86.9% <i>Proteus</i> ; 7.2% Enterobacteriaceae; 2.2% <i>Enterobacter</i> ; 1% <i>Rhodospirillaceae</i>
UR16	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.04	91.2% Enterobacteriaceae; 8.6% <i>Klebsiella</i>

being false-positive result of standard culture-based urine test giving a false positive *Enterococcus* result.

Method for proteomics-based identification of uropathogens

The present study was undertaken to assess the potential of bottom-up proteomics for identification of pathogens directly from the urine samples of patients with UTIs by benchmarking the results obtained against the reference ones (standard urine tests) and using the 16S rRNA gene sequencing—genomics for arbitration in cases where proteomics gives results which differ from the standard urine test.

Sample preparation

For the proteomic analysis, a minimum concentration of 10^5 CFU/mL and a volume of 5 mL of fresh urine sample or urine stored in the refrigerator up to 4 weeks were used. In this preliminary study, we investigated and compared the preparation of samples stored at -20°C and -80°C . We based our decision on the optimal storage temperature of samples on visual inspection of pellets during centrifugation. In the case of urine samples stored at -80°C bacterial cells were lost, and the pellet was

deemed insufficient for further downstream analysis. On the other hand, samples stored at -20°C showed abundant biomass, however, this proved to be a challenge to wash. Reason for this could be cell aggregation, probable auto-aggregation, especially since blood was present in tested samples [32]. Furthermore, good separation of bacterial cells from other materials such as yeast cells, epithelial cells, leukocytes, erythrocytes, mucus, urinary casts, and different types of crystals that can be present in urine depends on centrifugation speed [32, 49]. Moreover, at high-speed the pellet will likely be abundant with cell debris. Consequently, damaged cells will be washed off during the sample preparation process. Pellet volume was identified as an important element that influenced the success of positive protein identification. Microbial biomass had to be visible to the naked eye after washing steps. The obtained pellet biomass can be seen in Additional file 1: Figure S2.

Previous studies had considered the impact of ultrasonication on microorganisms to improve sample preparation [32, 50, 51]. In our research protein extraction using B-PER worked for both gram-negative and gram-positive bacteria, so there was no need for additional mechanical methods of cell rupture. In reviewed

literature, no data was found on the efficiency of protein digestion in the presence of B-PER. We believe that no other group has reported the use of trypsin in the B-PER solution.

Peptide fractionation

During a preliminary study, we found that the amount of data we could get from one sample spot was insufficient. Thus, to overcome this obstacle we used peptide fractionation. We hypothesised that peptide fractionation would help to enrich the low-abundance peptides (Additional file 1: Figure S4).

MALDI-TOF/TOF mass spectrometry results

Protein identifications and data analysis

While BioTyper and Vitek use reference databases to identify and classify the microorganisms according to their mass spectra fingerprint, we relied on peptide ion fragments from MS/MS scans and MASCOT protein search results which were translated into MASCOT based uropathogen identification ranks. For this purpose, we have combined MASCOT score with a peptide count and made a simple Python script that ranks organisms suspected to be in the sample based on probability of their proteins being detected. First step was protein identification of tryptic peptides conducted using MASCOT search engine [52]. This provided us with both score and number of queries matched for proteins belonging to one or more organisms. The Mascot Score is a statistical score for how well the spectra generated match the database protein sequence [52, 53]. Plainly, a higher score indicates a more confident protein match while the number of queries matched indicates the number of spectra that were matched to this protein. Although it is not unusual for a portion of peptides to be scanned multiple times, overall, the greater the score and greater the number of queries matched—greater the probability of a true positive match. Therefore, we have combined these two measures into a “summa score”, simply by summing up all individual peptide scores for a given protein match. Proteins and respective taxa were ordered based on this “summa score” in descending order and highest scoring taxa was taken as most likely uropathogen identification. Table 2 compares the results of this analysis with the standard urine culture test. Summarized report on MASCOT identified bacterial proteins is listed in Additional file 2: Table S4.

The proteins ordered by summa score were listed in Additional file 3: Table S1. Significant minimum MASCOT summa score obtained for all samples was 53, while maximum reported score was 830. A total number of 382 peptides were reported for all 16 samples. Most of these peptides belong to bacterial proteins (71%).

Table 2 MALDI-TOF/TOF analysis with MASCOT identification of uropathogens

N.o.	Urine culture identification	Mascot identification
UR1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UR2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UR3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UR4	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
UR5	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
UR6	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
UR7	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
UR8	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
UR9	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
UR10	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
UR11	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ESBL	<i>Escherichia fergusonii</i>
UR12	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
UR13	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
UR14	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UR15	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
UR16	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>

Although we expected the majority of proteins belonging to ribosomes, we identified a rather small percentage of ribosomal proteins (8%). In our case proteins with the highest scores, were membrane proteins including outer membrane porin protein C, peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) and murein lipoprotein (MLP). This interesting result might be associated with the usage of the B-PER [54]. Considering all monobacterial samples, direct identifications provided reliable identification for genus *Klebsiella* (3 samples), *Proteus* (4 samples), *Enterococcus* (2 samples), *Enterobacter* (1 sample) and *Citrobacter* (1 sample). Overall, 87% of correlation with standard urine test was obtained with this simple proteomics approach for monobacterial samples.

These results are very encouraging since pathogenic species were correctly identified at the genus level using a relatively small number of identified bacterial proteins per sample, and in the absence of unique peptides. Although our results indicate that proteomics-based identification with a small number of proteins is feasible, high-throughput setup yielding more spectra and retrieving larger fractions of proteomes would be more favourable.

Microbial identification in polymicrobial cultures

To investigate polymicrobial cultures (UR11, UR15 and UR16), we compared the results obtained from the conventional urine culture, 16S rRNA gene sequencing and proteomics (Additional file 2: Table S5). Our previous

experience with MALDI-TOF/TOF mass spectrometer indicated that bacterial identification in polymicrobial urine samples using this platform for proteomics has some limitations. As reported previously by other authors, MALDI-TOF MS identification of polymicrobial cultures directly from urine samples did not provide reliable results [17, 49]. Therefore, bacterial identification at the strain-level is still regarded as a challenge. Some of the underlying factors that compromise this method sensitivity in bacterial identification are: sample impurity substances (human proteins), low abundance of bacterial proteins in the sample [55], insufficient coverage of urinary bacterial species in the databases, shared peptide sequences among proteins from different taxa [38] as well as possibility of generating insufficient level of data by single MS injection per sample [39]. Bottom-up tandem MS accompanied with ever-growing proteomics and genomics databases and data processing through wide range of bioinformatics tools has made polymicrobial identification feasible [30, 36] but it still remains in domain of experimental research and far from clinical practice.

Human proteins versus contamination

Normal human urine of a healthy individual contains over 2000 proteins [56, 57], while over 5000 proteins can be found when the urinary tract is under inflammation [33]. Due to low protein concentration, urine is a difficult proteomic sample to work with [58].

We recorded 29% of human proteins in our samples, of which 33% were found to be repetitive (Additional file 2: Table S6). The most abundant of these repeated human proteins were classified as haemoglobin subunits (alpha and beta-globin), apolipoprotein and uromodulin. We did not find any evidence of epithelial cells from the urinary or vaginal tract, or any biomarkers.

As can be seen from Additional file 1: Figure S3, first two fractions cover more than 50% of the total number of proteins. Furthermore, Additional file 1: Figure S4 shows a quantitative overview of bacterial and human proteins of each sample. In terms of future work, it would be interesting to consider two-dimensional fractionation to increase bacterial proteome coverage and enhance the ratio of bacterial vs human proteins.

Limitations and future direction

With regard to the research method, the major limitation identified by this study is a small number of identified proteins per sample. Many proteomic analyses for bacterial identification were limited to monomicrobial specimens with high CFU/mL concentration based on our need to compare results with those of standard urine culture tests, which have own inherent

drawbacks. This study lays the groundwork for future research. In the future, a possible direction could be dealing with lower abundant proteins to enhance effectiveness in proteome identification. Switching to a high-throughput platform such as ESI could solve this issue. Furthermore, to increase the number of proteins, a possible solution could be usage of peptide double fractionation or FASP (filter-aided sample preparation) method. To improve bacterial identification, we are developing bioinformatics software based on natural language processing. Urine is clinically underutilized and has a much greater potential in development of non-invasive tests and techniques. Proteomics approach and direct sample analysis have potential to provide us with a broader clinical picture that could bring us closer to precision medicine.

Conclusion

The main goal of the current study was to establish a procedure for analysis of uropathogens by proteomics, the procedure was tested using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry directly from urine specimens. This study has shown that identification of bacteria from a native urine sample, without prior culturing step, depends on storage conditions, sample preparation method, as well as data analysis. Overall, the results of this study demonstrate that mass spectrometry based proteomics can effectively identify different uropathogens from fresh or cold stored, human urine samples directly, without cultivation step. The direct approach was able to provide reliable identification of bacteria at the genus-level in monobacterial samples, despite inherent limitations of mass spectrometry platform used. In case of polymicrobial urine samples, direct approach using the methods here described did not allow for unambiguous identification.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12014-020-09289-4>.

Additional file 1: Figure S1. Experimental workflow for the identification of uropathogen from a native urine sample. **Figure S2.** Images of 16 urine specimens. **Figure S3.** Protein content of each fraction as a percentage of the total protein. **Figure S4.** Cumulative number of bacterial and human proteins for each sample per fraction.

Additional file 2: Table S1. General information about patients. **Table S2.** Results of conventional urine culture and urine dipstick analysis for 16 urine samples. **Table S3.** Uropathogenic bacteria in urine samples. **Table S4.** Summary reports of identified bacterial proteins for each urine sample sorted by "MASCOT summa score". **Table S5.** The comparative view of urine culture, proteomics and genomic results. **Table S6.** Identified human proteins ranked by MASCOT score for each urine sample.

Additional file 3: Excel tables.

Abbreviations

ACN: Acetonitrile; CFU/mL: Colony-forming units per millilitre; LC: Liquid chromatography; MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization; MS: Mass spectrometry; PMF: Peptide mass fingerprint; TOF: Time of flight; UTI: Urinary tract infection.

Authors' contributions

DO, AH and MČ: Carried out the experiments. DO, JŽ, MC, MČ and AS: Performed data analysis. All authors contributed to the design of the work. DO, MČ, JŽ and AS: Provided major contributions to manuscript writing. JŠ and MČ: Were responsible for management of patients and helped in processing patient samples. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by the Croatian Science Foundation under research project "Exploring Gut Microbiome Equilibrium" (Grant HRZZ_IP_06_2016_3509). Grant No. "CoRE for Marine Bioprospecting - BioProCro", Funder name "H2020 European Research Council". All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Availability of data and materials

All the datasets analysed in the current study are available upon reasonable request. There is an archive available at: http://proteinsreader.bioinfo.pbf.hr/urine/urine_spectrum.zip with the mass spectrometry raw data used.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics committee of the University Hospital Dubrava, by the Ethics committee of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, and by the Research Ethics committee of the Faculty of Food Technology and Biotechnology. Written informed consent was obtained from all our patients.

Consent for publication

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Author details

¹ Department of Biochemical Engineering, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb University, 10000 Zagreb, Croatia. ² Biochemical Laboratory, Special Hospital Agram, Polyclinic Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia. ³ Division of Molecular Medicine, Ruder Boskovic Institute, Zagreb, Croatia. ⁴ Department for Clinical Microbiology and Hospital Infection, University Hospital Dubrava, 10000 Zagreb, Croatia. ⁵ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb University, Zagreb, Croatia. ⁶ Department of Biological Science, Faculty of Science, Macquarie University, Sydney, Australia.

Received: 10 May 2020 Accepted: 17 June 2020

Published online: 23 June 2020

References

- Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010;7(12):653–60.
- Dason S, Dason JT, Kapoor A. Guidelines for the diagnosis and management of recurrent urinary tract infection in women. *J Can Urol Assoc*. 2011;5(5):316–22.
- Bouchillon SK, Badal RE, Hoban DJ, Hawser SP. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of gram-negative bacilli in the United States: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009–2011. *Clin Ther*. 2013;35(6):872–7.
- Brubaker L, Wolfe AJ. The new world of the urinary microbiome in women. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(5):644–9.
- Koves B, Wullt B. The roles of the host and the pathogens in urinary tract infections. *Eur Urol Suppl*. 2016;15(4):88–94.
- Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Dtsch Arzteblatt Int*. 2010;107(21):361–7.
- Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER, et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):871–6.
- Wolfe AJ, Brubaker L. "Sterile Urine" and the presence of bacteria. *Eur Urol*. 2015;68(2):173–4.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs extraction method. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1007–12.
- Burd EM, Kehl KS. A critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis of urinary tract infections. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):34–8.
- Cavagnolo R. Evaluation of incubation times for urine cultures. *J Clin Microbiol*. 1995;33(7):1954–6.
- Brilha S, Proença H, Cristino JM, Hänscheid T. Use of flow cytometry (Sysmex UF-100) to screen for positive urine cultures: in search for the ideal cut-off. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(2):289–92.
- Delanghe J, Speeckaert M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochem Medica*. 2014;24(1):89–104.
- Davenport M, Mach KE, Shortliffe LMD, Banaei N, Wang H, Liao JC. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat Rev Urol*. 2017;14(5):296–310.
- Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*. 2019;7:130.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6:791.
- Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):561.e1.
- De Rosa R, Grosso S, Lorenzi G, Bruschetta G, Camporese A. Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clin Chim Acta*. 2018;484:171–8.
- Van Der Zee A, Roorda L, Bosman G, Ossewaarde JM. Molecular diagnosis of urinary tract infections by semi-quantitative detection of uropathogens in a routine clinical hospital setting. *PLoS ONE*. 2016;11:3.
- Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods*. 2006;67(3):574–81.
- Sabat AJ, Van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, Van Slochteren K, De Boer RF, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species. *Sci Rep*. 2017;7:3434.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437–73.
- Cheng K, Chui H, Domish L, Hernandez D, Wang G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(4):346–57.
- Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo MC, Bekal S, Lefebvre B, et al. A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0144878.
- Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Microbiol*. 2018;56(4):209–16.
- Li Y, Shan M, Zhu Z, Mao X, Yan M, Chen Y, et al. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. *BMC Infect Dis*. 2019;19:941.
- Lathrop JT, Jeffery DA, Shea YR, Scholl PF, Chan MM. US food and drug administration perspectives on clinical mass spectrometry. *Clin Chem*. 2016;62(1):41–7.
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):100–11.
- Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003;14(9):931–42.

30. Karlsson R, Gonzales-siles L, Boulund F, Svensson-stadler L, Skovbjerg S, Karlsson A, et al. Proteotyping: proteomic characterization, classification and identification of microorganisms—a prospectus. *Syst Appl Microbiol*. 2015;38(4):246–57.
31. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, et al. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(9):1787–95.
32. Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, et al. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Lab Anal*. 2018;32:3.
33. Yu Y, Sikorski P, Bowman-Gholston C, Cacciabeve N, Nelson KE, Pieper R. Diagnosing inflammation and infection in the urinary system via proteomics. *J Transl Med*. 2015;13:111.
34. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):988–93.
35. Shao W, Zhang M, Lam H, Lau SCK. A peptide identification-free, genome sequence-independent shotgun proteomics workflow for strain-level bacterial differentiation. *Sci Rep*. 2015;5:14337.
36. Boulund F, Karlsson R, Gonzales-Siles L, Johnning A, Karami N, AL-Bayati O, et al. Typing and characterization of bacteria using bottom-up tandem mass spectrometry proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(6):1052–63.
37. Boulund F, Karlsson R, Gonzales-Siles L, Johnning A, Karami N, AL-Bayati O, et al. Typing and Characterization of Bacteria Using Bottom-up Tandem Mass Spectrometry Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(6):1052–63. <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M116.061721>.
38. Alves G, Wang G, Ogurtsov AY, Drake SK, Gucek M, Sacks DB, et al. Rapid classification and identification of multiple high-resolution tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2018;29:1721–37.
39. Karlsson R, Davidson M, Svensson-Stadler L, Karlsson A, Olesen K, Carlsohn E, et al. Strain-level typing and identification of bacteria using mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res*. 2012;11(5):2710–20.
40. Yu Y, Sikorski P, Smith M, Bowman-Gholston C, Cacciabeve N, Nelson KE, et al. Comprehensive metaproteomic analyses of urine in the presence and absence of neutrophil-associated inflammation in the urinary tract. *Theranostics*. 2017;7(2):238–52.
41. Lifshitz E, Kramer L. Outpatient urine culture: does collection technique matter? *Arch Intern Med*. 2000;160(16):2537–40.
42. Price TK, Dune T, Hilt EE, Thomas-White KJ, Kliethermes S, Brincat C, et al. The clinical urine culture: enhanced techniques improve detection of clinically relevant microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1216–22.
43. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7.
44. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–3.
45. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6:90.
46. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012;6(3):610–8.
47. Kotaskova I, Obrucova H, Malisova B, Videnska P, Zwinsova B, Peroutkova T, et al. Molecular techniques complement culture-based assessment of bacteria composition in mixed biofilms of urinary tract catheter-related samples. *Front Microbiol*. 2019;10:462.
48. Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ. Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae? *J Mol Evol*. 2008;66:630–42.
49. Lough ME, Shradar E, Hsieh C, Hedlin H. Contamination in adult midstream clean-catch urine cultures in the emergency department: a randomized controlled trial. *J Emerg Nurs*. 2019;45(5):488–501.
50. Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, et al. Direct detection and identification of bacterial pathogens from urine with optimized specimen processing and enhanced testing algorithm. *J Clin Microbiol*. 2017;55(5):1488–95.
51. Sigdel TK, Nicora CD, Hsieh SC, Dai H, Qian WJ, Camp DG, et al. Optimization for peptide sample preparation for urine peptidomics. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):1–8.
52. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 2011;74(10):1842–51.
53. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551–67.
54. Zhang X, Li L, Mayne J, Ning Z, Stintzi A, Figeys D. Assessing the impact of protein extraction methods for human gut metaproteomics. *J Proteomics*. 2018;180:120–7. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.001>.
55. Harpole M, Davis J, Espina V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(6):609–26.
56. Koenig T, Menze BH, Kirchner M, Monigatti F, Parker KC, Patterson T, et al. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J Proteome Res*. 2008;7(9):3708–17.
57. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol*. 2006;7:9.
58. Lin L, Yu Q, Zheng J, Cai Z, Tian R. Fast quantitative urinary proteomic profiling workflow for biomarker discovery in kidney cancer. *Clin Proteomics*. 2018;15:42.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA IZ URINA GENOMSKOM I PROTEOMSKOM ANALIZOM

MARINA ČEPRNJA

U identifikaciji bakterija koji su najčešći uzročnici infekcija mokraćnoga sustava najčešće se koriste klasične medicinsko-mikrobiološke metode. Glavni nedostatak tih metoda je njihova dugotrajnost. Upravo iz toga razloga kontinuirano se istražuju mogućnosti bržih i učinkovitijih postupaka za određivanje broja i vrste mikroorganizama. U ovom doktorskom radu istraživane su mogućnosti upotrebe masene spektrometrije (MS) i sekvenciranja gena za 16S rRNA u svrhu identifikacije bakterija iz mokraće. Za identifikaciju mikroorganizama izoliranih iz mokraće ispitanika sa simptomima cistitisa, kao kontrola koristila se klasična mikrobiološka dijagnostika nakon koje se na istim uzorcima provodila analiza mikrobioma i metaproteoma. Analiza mikrobioma obuhvaćala je identifikaciju gena za 16S rRNA, dok se analizom metaproteoma provedenoga na MALDI-TOF MS/MS (engl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight tandem mass spectrometry*) pokušala postići rezolucija na nivou soja. Cilj ovoga rada bio je dizajnirati i ispitati metodu MS-a za izravnu, brzu i pouzdanu identifikaciju mikroorganizama u uzorcima mokraće ispitanika kod kojih je klasičnim mikrobiološkim metodama dokazana prisutnost mikroorganizama $>10^5$ CFU/ml te je usporediti s rezultatima dobivenim genomskom analizom mikroorganizama mokraće. Također, cilj rada bio je pratiti promjene sastava mokraćne mikrobiote izazvane cistitisom i dinamiku njihove promjene uslijed antibiotske terapije. Istraživanje je obuhvatilo analizu ukupno 396 uzoraka mokraće prikupljenih u KB Dubrava. Osim toga, analizirano je dodatnih osam uzoraka mokraće istoga ispitanika koji je bio na antimikrobnoj terapiji s ciljem praćenja promjena u mokraćnoj mikrobioti, te 40 uzoraka kultura četiri najčešća uropatogena. Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da se koristeći masenu spektroskopiju mogu identificirati bakterije u monomikrobnim kulturama na razini roda. Međutim, ukoliko se radi o polimikrobnim kulturama MS ne daje pouzdane rezultate identifikacije. Sekvenciranjem gena za 16S rRNA postignuta je taksonomska kategorizacija uropatogena do razine roda (44 %) i obitelji (56 %), dok identifikacija na razini vrste nije postignuta. Također, utvrđeno je da antibiotska terapija ima snažan utjecaj na dinamiku promjena sastava mokraćne mikrobiote, te da je trajanje terapije iznimno važan terapijski parametar, kao i početni izbor lijeka.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 150 stranica, 23 slike, 16 tablica i 116 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: standardna urinokultura, identifikacija mikroorganizama, MALDI-TOF, MS/MS, profil peptida (otisak prsta), 16S rRNA sekvenciranje

Mentori: izv. prof. dr. sc. Jasenka Škrlin-Šubić

prof. dr. sc. Karmela Barišić

Povjerenstvo: izv. prof. dr. sc. Antonio Starčević

prof. dr. sc. Maja Abram

dr. sc. Mario Cindrić

Rad je prihvaćen: 22. 9. 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARS

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

IDENTIFICATION OF URINE MICROORGANISMS BY GENOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS

MARINA ČEPRNJA

The bacteria that are the most prevalent causes of urinary tract infections are typically identified using standard microbiological procedures. The biggest downside of these approaches is that they take a long time to complete. As a result, researchers are always looking for new ways to determine the quantity and kind of microorganisms faster and more efficiently. The possibility of utilizing mass spectrometry (MS) and sequencing of 16S rRNA genes to detect bacteria from urine were studied in this doctoral thesis. Classical microbiological tests were utilized to identify bacteria isolated from the urine of patients with cystitis symptoms, after which microbiomes and metaproteome were analyzed. Microbiome investigation included identifying genes for 16S rRNA, while MALDI-TOF MS/MS (matrix aided laser desorption ionization-time of flight tandem mass spectrometry) analysis of the metaproteome tried to acquire strain-level resolution. The aim of the study was to design and test an MS method for direct, rapid, and reliable identification of microorganisms in urine samples of patients whose presence of microorganisms $> 10^5$ CFU / ml was confirmed by traditional microbiological methods, and to compare the results with those of genomic analysis of urine microorganisms. Also, the aim of the study was to monitor changes in the composition of the urinary microbiota caused by cystitis and the dynamics of their change due to antibiotic therapy. The research included the analysis of a total of 396 urine samples collected through four phases in KB Dubrava. In addition, 40 culture samples from the four most frequent uropathogens were studied, as well as 8 urine samples from the same person who had been on antibiotic therapy to monitor changes in the urinary microbiota. The findings of this study revealed that mass spectroscopy can be used to identify bacteria in monomicrobial cultures at the genus level. Mass spectroscopy, on the other hand, does not yield good identification results in polymicrobial cultures. The 16S rRNA gene provided taxonomic categorization of uropathogens down to the genus (44 %) and family (56 %) levels, but not species level identification. It was discovered that monitoring the urine microbiota during antibiotic therapy has a substantial influence on the dynamics of changes in its composition, and that the duration of therapy, as well as the initial drug choice, is an extremely essential therapeutic parameter.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 141 pages, 23 figures, 16 tables and 116 references. Original is in Croatian language.

Keywords: standard urine culture, identification of microorganisms, MALDI-TOF, MS / MS, peptide profile (fingerprint), 16S rRNA sequencing

Supervisors: Associate Professor Jasenka Škrlin-Šubić, PhD

Professor Karmela Barišić, PhD

Reviewers: Associate Professor Antonio Starčević, PhD

Full Professor Maja Abram, PhD

Mario Cindrić, PhD

Accepted: 22nd September. 2021