

Nacionalni seminar „Primena molekularno-bioinformatičkog pristupa u predviđanju, detekciji i prevenciji epidemija izazvanih pretećim patogenima“

---

---

---

---

---

---

---

---

### Pregled

- Bolničke infekcije
- Kritični patogeni (multirezistentne Gram negativne bakterije)
- Prevenција i kontrola bolničkih infekcija
- Značaj molekularnih metoda i bioinformatike u kontroli infekcija

---

---

---

---

---

---

---

---

### Bolničke infekcije

Bolničke infekcije (engl. *hospital infections*)  
Nozokomijalne infekcije

Infekcije povezane sa zdravstvenom zaštitom (engl. *healthcare associated infections, HAIs*)

Infekcije pacijenata i/ili osoblja koje nastaju tokom pružanja zdravstvene zaštite u zdravstvenoj ustanovi ili u ustanovama koje pružaju socijalnu zaštitu

- Infekcija nije bila u periodu inkubacije u vreme prijema
- Simptomi se javljaju najranije trećeg dana aktuelne hospitalizacije ili ≥48h od prijema
- Svi mikroorganizmi mogu biti uzročnici (bakterije najčešći patogeni)

---

---

---

---

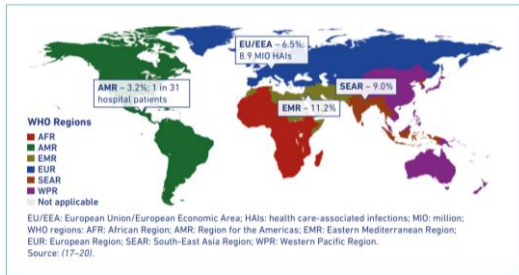
---

---

---

---

### Bolničke infekcije - epidemiološki podaci



Global report on infection prevention and control. Geneva: World Health Organization; 2022. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

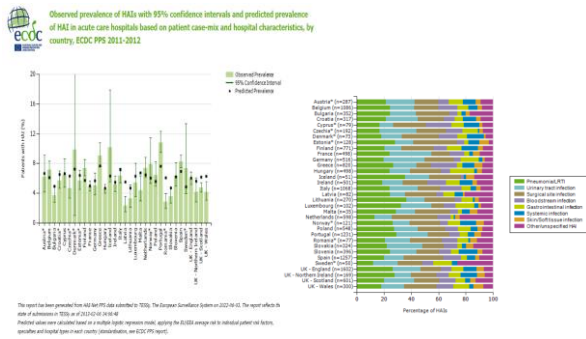
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Bolničke infekcije - epidemiološki podaci

- 8,3% (11 787) pacijenata u jedinicama intenzivnog lečenja - najmanje jedna hospitalna infekcija:
  - pneumonija: 6% (97% pneumonija je povezana sa intubacijom)
  - sepsa: 4% (37% sepsi udruženo sa kateterizacijom)
  - urinarna infekcija: 2% (98% urinarnih infekcija povezano sa plasiranjem urinarnog katetera)
- Najčešći uzročnici:
  - *Pseudomonas aeruginosa* - bolničkih pneumonija,
  - koagulaza-negativni stafilokok – sepsa
  - *Escherichia coli* – urinarne infekcije
- Resistencija na treću generaciju cefalosporina - 16% *E. coli*, 40% *Klebsiella* spp. i 34% *Enterobacter* spp.
- Resistencija na karbapeneme - 15% *Klebsiella* spp., 26% *P. aeruginosa*, 64% *Acinetobacter baumannii*

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.



**E** SCHERICHIA COLI

**S** TAPHYLOCOCCUS  
S. PSEUDOTYPHOSA S. SOLIDUS S. AUREUS

**K** LEBSTELLA PNEUMONIAE

**A** CINETOBACTER BAUMANNII

**P** SEUDOMONAS AERUGINOSA

**E** NTEROCOCCUS FAECALIS = FAECTUM

Do 75% bolničkih infekcija izazvano bakterijama koje su rezistentne na prvu terapijsku liniju

Infekcije izazvane multirezistentnim bakterijama su povezane sa povećanim morbiditetom, mortalitetom i troškovima lečenja

Detektovan značajan porast učestalosti infekcija izazvanih rezistentnim gram-negativnim bakterijama: ESBL-prodružujuće enterobakterije Karbapenem-resistantne enterobakterije MDR *Pseudomonas aeruginosa* MDR *Acinetobacter baumannii*

Lautenbach E, et al. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(4): 333-335.

---

---

---

---

---

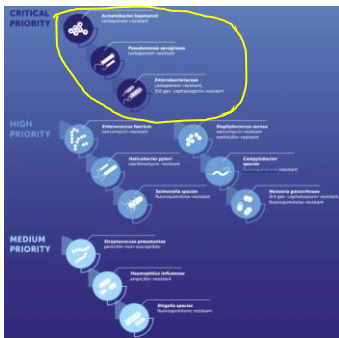
---

---

---

---

---



Svetska zdravstvena organizacije

Najznačajniji rezistotipovi

Kritični - nephodan urgentan rad na iznalaženju novih antibakterijskih agenasa

Asokan, G. V. Et al. (2019) WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medicine PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman medical journal*, 34(3), 184-193.

---

---

---

---

---

---

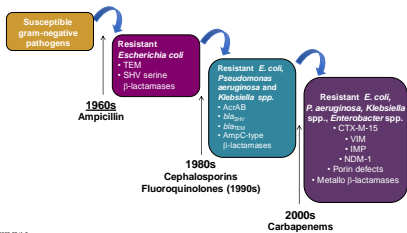
---

---

---

---

Evucija Gram negativnih patogena – globalno širenje rezistencije na antibiotike



1. Huxley, *Antimicrob Chemother*. 2008;62:11-9.  
2. Huxley, and Jones. *J Antimicrob Chemother*. 2002;64:15-16.  
3. Bahr, *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;54:692-95.  
4. Livernois. *Dis. Infect. Con*. 2002;34:63-65.  
5. O'Brien, et al. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:103.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Nadzor nad bolničkim infekcijama u jedinicama intenzivnog lečenja




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Molekularna epidemiologija

➔ Genomska epidemiologija




---

---

---

---

---

---

---

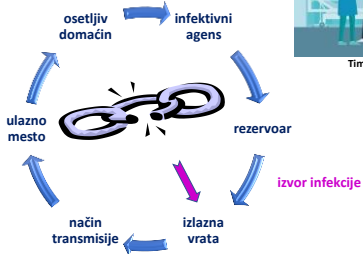
---

---

---

- Ispitivanje **epidemija** (bolničkih, vanbolničkih), **pandemija**
  - Ispitivanje **populacione strukture** patogenih mikroorganizama u njihovom prirodnom okruženju
  - Primena molekularnih metoda u pojašnjenju pojave, učestalosti i rasprostranjenosti bolesti u određenoj populaciji
- \* Ne znači isključivanje tradicionalnih mikrobioloških i epidemioloških metoda u proučavanju bolesti, već ih samo dopunjuje

Lanac infekcije




---

---

---

---

---

---

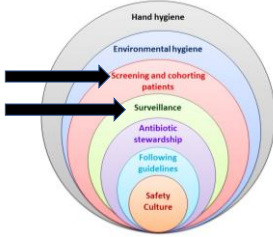
---

---

---

---

## Prevenција i kontrola infekcija




---

---

---

---

---

---

---

---

## Značaj primene metoda molekularne biologije u prevenciji i kontroli bolesti

- deo epidemiološkog nadzora
- rana detekcija invazivnih i neinvazivnih patogena
- detekcija nekultivabilnih organizama
- karakterizacija izolata
- ispitivanje povezanosti između slučajeva – genetičke srodnosti patogena
- identifikacija izvora infekcije
- prepoznavanje transmissionih obrazaca i transmisione dinamike
- identifikacija faktora rizika na molekularnom nivou
- analiza interakcije na relaciji domaćin-patogen
- praćenje evolucije patogena
- identifikacija novih patogena
- detekcija faktora virulencije i razumevanje patogeneze bolesti na molekularnom nivou
- omogućuje primenu ciljanih mera kontrole infekcije

---

---

---

---

---

---

---

---

## Molekularna/genomska epidemiologija u nadzoru nad bolničkim infekcijama

### 1. Praćenje učestalosti značajnih bolničkih patogena

Gram negativne bakterije rezistentne na karbapeneme (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. i dr.)  
 meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* - MRSA  
 vankomicin rezistentan enterokok – VRE

### 2. Molekularna tipizacija

- Nalaz identičnih tipova predstavlja alarm za pokretanje mera kontrole infekcije !
- Glavni cilj tipizacije - prevencija infekcije, ponekad i prevencija kolonizacije i njenog širenja
- Rezultati tipizacije moraju biti gotovi u što kraćem vremenskom periodu

---

---

---

---

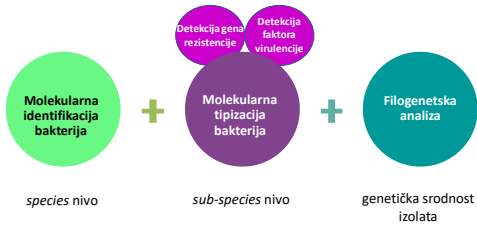
---

---

---

---

Molekularna / genomska epidemiologija




---

---

---

---

---

---

---

---

Prednosti molekularne identifikacije bakterija u odnosu na konvencionalnu dijagnostiku

- Rana identifikacija - skraćeno vreme rada
- Identifikacija bakterija koje se ne mogu kultivisati
- Identifikacija bakterija koje su prisutne u malom broju u uzorku
- Identifikacija bakterija i nakon primenjene antibiotske terapije
- Mogućnost preciznije identifikacije (*subspecies* nivo)

---

---

---

---

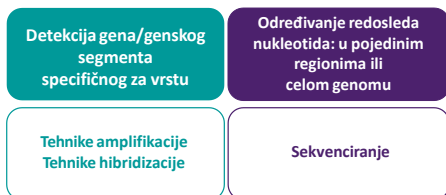
---

---

---

---

Molekularna identifikacija bakterija




---

---

---

---

---

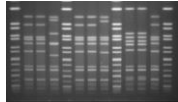
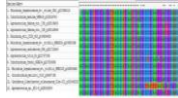
---

---

---

## Genotipizacija bakterija

- Metode zasnovane na sekvenciranju
  - SLST (Single Locus Sequence Typing) - sekvenciranje jednog lokusa,
  - MLST (Multilocus Sequence Typing) - sekvenciranje više lokusa,
  - CRISPR tipizacija (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats),
  - Sekvenciranje celog genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS) itd.
- Metode bazirane na analizi genetičkih profila u elektroforetskom gelu
  - PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis),
  - RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) itd.




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Odabir metode genotipizacije

- Vrsta analize
  - Analiza izolata poreklom iz jedne epidemije ili iz više njih koje se javljaju u istom ili kratkom vremenskom periodu (npr. bolničke epidemije) – primeniti metode koje detektuju “sveže” promene: plazmidski profil, ribotipizacija, PFGE, WGS
  - Analiza izolata u dužem vremenskom periodu i za praćenje geografskog širenja sojeva, može se primeniti MLST
- Neke metode su prilagođene samo za određene vrste
- Ostalo: dostupnost neophodnih aparata, obučenosť kadrova, cena, mogućnosť međulaboratorijskog prenošenja i upoređivanja rezultata, interpretacija rezultata

PFGE pulsed-field gel electrophoresis  
WGS whole genome sequencing  
MLST multilocus sequence typing

---

---

---

---

---

---

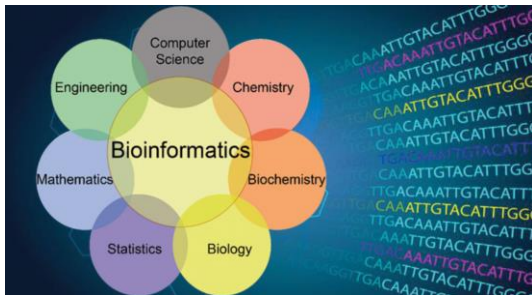
---

---

---

---

## Bioinformatika – multidisciplinarna oblast




---

---

---

---

---

---

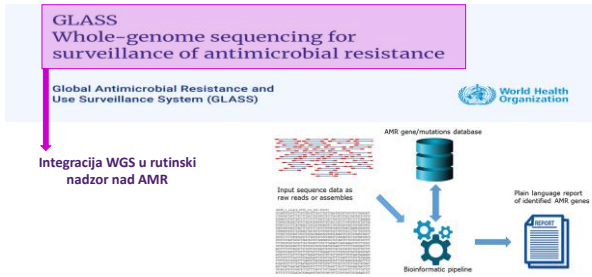
---

---

---

---

Primena bioinformatike u molekularnoj mikrobiologiji




---

---

---

---

---

---

---

---

Molekularna identifikacija Gram negativnih nefermentativnih bacila

1. Detekcija *species* specifičnih gena  
(*oprL* - *P. aeruginosa*, *bla<sub>OXA51</sub>* - *A. baumannii*)
2. Sekvenciranje visoko konzerviranih regiona  
(16S rRNK)
3. Sekvenciranje celokupnog genoma

Identifikacija GNNB do nivoa vrste je izazov i za većinu rodova nije deo rutinske laboratorijske dijagnostike!

---

---

---

---

---

---

---

---

Tipizacija *Pseudomonas aeruginosa*

- Za globalno praćenje tipova najznačajnije metode su:
  - WGS - whole genome sequencing (sekvenciranje celog genoma)
  - MLST - multilocus sequence typing - distribucija tipova sekvenci (engl. *sequence type, ST*)
  - Detekcija gena koji kodiraju rezistenciju na antibiotike – najčešće gena koji kodiraju β-laktamaze

---

---

---

---

---

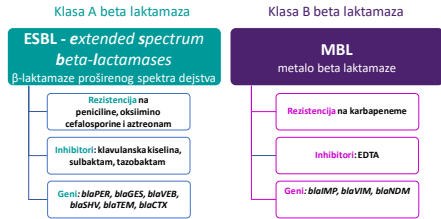
---

---

---



Najčešće beta laktamaze koje proizvodi *Pseudomonas aeruginosa*




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

*Pseudomonas aeruginosa* - globalna rasprostranjenost klona ST235

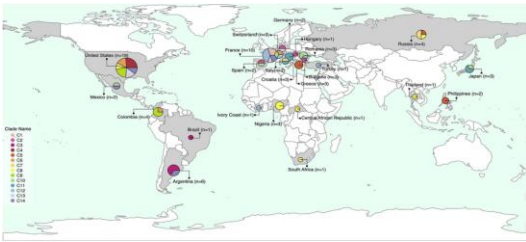


Fig. 1. Worldwide distribution of the 70 ST235 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* which genomes were used in this study. The countries of origin of the isolates are shaded. The chart diameters are proportional to the number of isolates collected from each country. The area of each slice is proportional to the quantity of isolates of each clade.

---

---

---

---

---

---

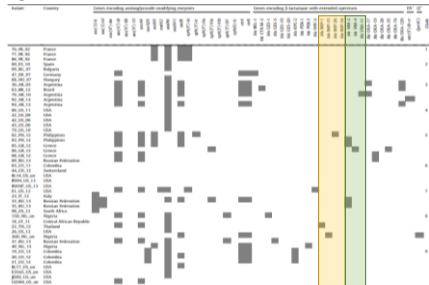
---

---

---

---

*P. aeruginosa* ST235 – geni koji kodiraju rezistenciju na antibiotike




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Tipizacija *A. baumannii* i populaciona struktura

Najznačajnije metode genotipizacije:

- WGS - whole genome sequencing (sekvenciranje celog genoma)
- MLST (engl. *multilocus sequence typing*)
- PFGE (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*)
- Profilisanje na osnovu gena koji kodiraju rezistenciju – PCR

Tri dominantne internacionalne klonске linije (eng. *international clonal lineages, ICLs*): ICL-1, ICL-2 i ICL-3 detektovane su u bolnicama širom Evrope i sveta

---

---

---

---

---

---

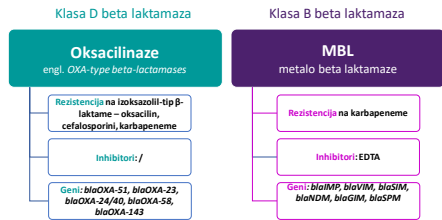
---

---

---

---

Najčešće beta laktamaze koje produkuje *Acinetobacter baumannii*




---

---

---

---

---

---

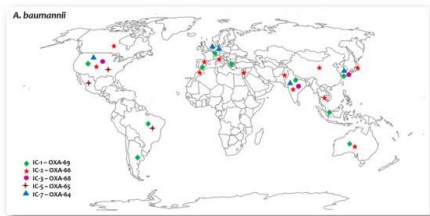
---

---

---

---

Globalna distribucija internacionalnih linija *Acinetobacter baumannii*



Podtipovi gena blaOXA-51: blaOXA-69, blaOXA-66, blaOXA-68, blaOXA-65, blaOXA-64

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Izazovi u daljem razvoju molekularne/genomske epidemiologije i primeni bioinformatičkih alata

- Intenzivnija **kolaboracija** i umrežavanje epidemiologa, mikrobiologa, biostatističara, infektologa i drugih lekara kliničara
- Kontinuirana **obuka** kadra (molekularne metode, bioinformatika, biostatistika)
- **Opremljenost** laboratorija (aparati, računarski programi)
- Izmena/dopuna postojećih **protokola** u laboratorijskoj dijagnostici infektivnih bolesti (uvođenje i povećanje obima molekularne dijagnostike)
- Povezivanje sa nadležnim telima/organima, osobama koje donose odluke (uvođenje obaveznih procedura, **harmonizacija** rada sa međunarodnim standardima)
- Dostupnost aktuelnih **baza podataka**, dopuna
- Kreiranje novih **bioinformatičkih alata** i unapređivanje postojećih

---

---

---

---

---

---

---

---