

^1H -NMR-metabolomska analiza u dijagnostici infekcija urinarnog trakta

Maltarski, Matija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:652460>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Matija Maltarski

7065/BT

**^1H -NMR-METABOLOMSKA ANALIZA U DIJAGNOSTICI
INFEKCIJA URINARNOG TRAKTA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

¹H-NMR-metabolomska analiza u dijagnostici infekcija urinarnog trakta

Matija Maltarski, 7065/BT

Sažetak: Infekcije urinarnog trakta jedna su od najčešćih bolesti uzrokovanih bakterijama. Najčešće se dijagnosticiraju analizom urina test-trakicom, mikroskopskim pregledom sedimenta urina nakon centrifugiranja i urinokulturom. ¹H-NMR-metabolomska analiza urina ima brojne prednosti pred navedenim metodama. U ovom radu dan je pregled predloženih dijagnostičkih algoritama koji se temelje na spektroskopiji nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Sastav urina je izrazito varijabilan. Najpouzdaniji biomarkeri za dijagnostiku infekcija urinarnog trakta su trimetilamin i acetat te se mjerenjem njihovih koncentracija u nativnom urinu infekcije mogu dijagnosticirati s vrlo visokom osjetljivošću i specifičnošću. Neke vrste bakterija mogu se identificirati i kvantificirati snimanjem NMR-spektara urina nakon inkubacije uzoraka urina uz dodatak reagenasa za analizu. Snimanjem NMR-spektara nativnih uzoraka urina moguće je odrediti tip bakterije uzročnika infekcije. Najvažniji biomarkeri koji se koriste za razlikovanje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bacilima od onih uzrokovanih gram- pozitivnim kokcima su trimetilamin, sukcinat, acetat, laktat i etanol.

Ključne riječi: infekcije urinarnog trakta, metabolomika, spektroskopija NMR

Rad sadrži: 25 stranica, 15 slika, 1 tablicu, 14 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Datum obrane: 15. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

^1H NMR metabolomic analysis in the diagnosis of urinary tract infections

Matija Maltarski, 7065/BT

Abstract: Urinary tract infections are among the most common diseases caused by bacteria. They are most commonly diagnosed by urine swabs, microscopic examination of urine sediment after centrifugation, and bacteriological urine culture. ^1H NMR metabolomic analysis of urine has many advantages over listed methods. This thesis contains a review of proposed diagnostic algorithms based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The composition of urine is highly variable. The most reliable biomarkers for diagnosis of urinary tract infections are trimethylamine and acetate. Infections can be diagnosed with very high sensitivity and specificity by measuring their concentrations in native urine samples. Some bacterial species can be identified and quantified by NMR spectroscopy of urine after the urine samples have been incubated with reagents for analysis. NMR spectroscopy of native urine samples allows identification of bacterial species responsible for infection. The most important biomarkers for distinguishing infections caused by gram-negative bacilli and those caused by gram-positive cocci are trimethylamine, succinate, acetate, lactate and ethanol.

Keywords: metabolomics, NMR spectroscopy, urinary tract infections

Thesis contains: 25 pages, 15 figures, 1 table, 14 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Defence date: July 15th 2021.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Spektroskopija NMR u metabolomici.....	2
2.1 Spektroskopija NMR u analizi urina.....	4
3. Dijagnostika infekcija urinarnog trakta.....	6
3.1 ^1H -NMR-metabolomska analiza u dijagnostici infekcija urinarnog trakta.....	8
4. Zaključak.....	22
5. Popis literature.....	24

1. Uvod

Infekcije urinarnog trakta jedna su od najčešćih bolesti uzrokovanih bakterijama. Vrlo često ova bolest se krivo dijagnosticira zbog nespecifične kliničke slike. Najčešći uzročnici urinarnih infekcija su bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.* i *Staphylococcus saprophyticus*. Postojeći testovi koji se koriste za dijagnosticiranje infekcija urinarnog trakta su neprecizni, skupi ili zahtjevaju relativno puno vremena.

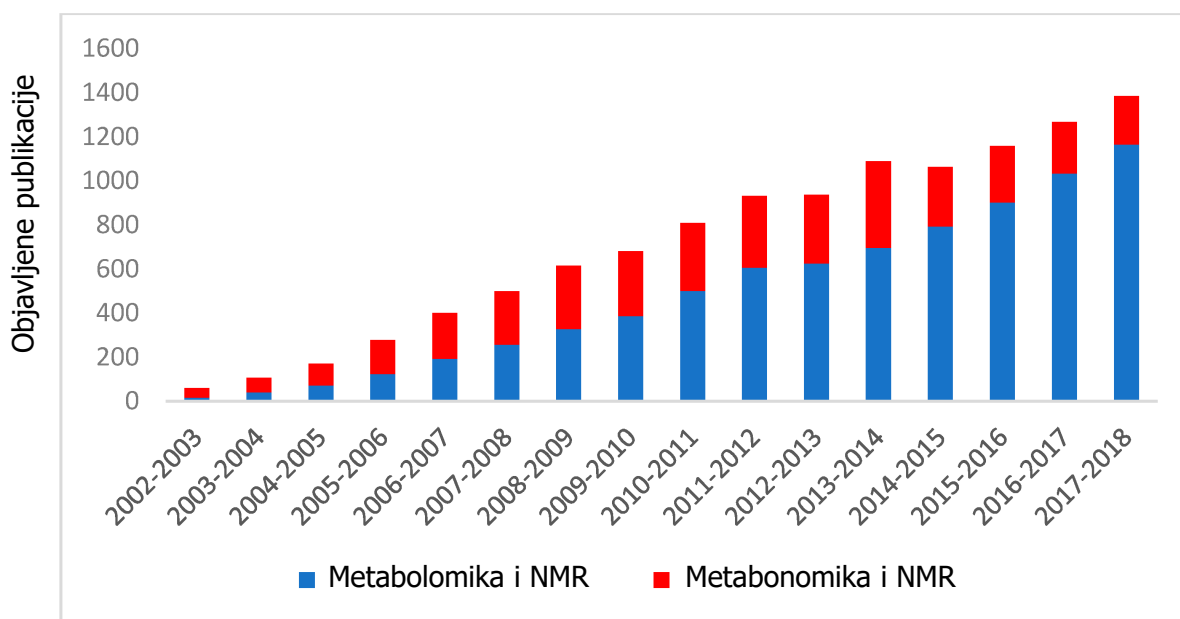
Jednostavna, brza i precizna metoda dijagnoze infekcija urinarnog trakta je $^1\text{H-NMR}$ -metabolomska analiza urina.

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) jedna je od najvažnijih analitičkih tehnika u metabolomici. Radi se o najmoćnijoj metodi za određivanje strukture kemijskih spojeva. Spektroskopija NMR koristi magnetska svojstva jezgara s neparnim masenim brojem. Takve jezgre imaju nuklearni spin koji generira magnetsko polje nalik polju malog šipkastog magneta. Umetanjem takve jezgre u vanjsko magnetsko polje magnetski moment jezgre usmjerava se paralelno u odnosu na vanjsko polje (α -spin) ili antiparalelno (β -spin). Kada se jezgra usmjerena u pravcu vanjskog magnetskog polja izloži djelovanju elektromagnetskog (radiofrekventnog) zračenja čija frekvencija odgovara maloj energetskej razlici između α - i β -spina, dolazi do izvrtanja jezgre iz stabilnijeg α -spina u nestabilniji β -spin. Potom dolazi do relaksacije i ponovnog usmjeravanja jezgre u pravcu vanjskog magnetskog polja (α -spin) pri čemu se emitira elektromagnetski signal kojeg bilježi NMR-spektrometar. Elektroni koji okružuju promatranu jezgru svojim gibanjem induciraju lokalno magnetsko polje koje se orijentira suprotno u odnosu na primijenjeno vanjsko polje zaklanjajući tako jezgru od njegovog utjecaja. Jezgre u različitom kemijskom okruženju različito su zaklonjene okolnim lokalnim magnetskim poljima te stoga rezoniraju pri različitim frekvencijama što omogućava razlikovanje kemijski neekvivalentnih jezgri.

Metabolomika je znanstvena disciplina koja se bavi analizom metabolita (kemijskih spojeva uključenih u metabolizam) u biološkom uzorku. NMR-analizom urina moguće je pratiti metabolomske promjene koje su posljedica infekcije, ali i drugih vanjskih i unutarnjih čimbenika.

2. Spektroskopija NMR u metabolomici

Metabolomika je znanost koja se bavi analizom metabolita. Prema Hrvatskoj enciklopediji (2021), definira se kao disciplina koja proučava metabolom, odnosno sve metabolite neke stanice ili organizma. Razvoj metabolomike ovisi o napretku analitičkih tehnika, instrumenata, softvera i statističkih metoda za analizu rezultata te računalnih tehnika za prikupljanje, analizu i interpretaciju rezultata korištenih pri analizi. Tri najvažnije metode koje se koriste u metabolomici posljednjih dvadesetak godina su spregnute metode GC-MS (sprega plinske kromatografije i masene spektrometrije), LC-MS (sprega tekućinske kromatografije i masene spektrometrije) te spektroskopija NMR. Pri tom se više od 80% radova objavljenih u području metabolomike zasniva na spregnutim metodama LC-MS i GC-MS (Emwas i sur., 2019). Unatoč tome, postoji i znatan interes za metode bazirane na spektroskopiji NMR uslijed čega se bilježi kontinuirani rast broja znanstvenih publikacija vezanih za područje metabolomike i metabonomike (slika 1). Metabonomika se odnosi na kvantitativno određivanje svih promjena unutar metaboloma uslijed patofizioloških promjena i genetskih modifikacija (Ramsden, 2004).



Slika 1. Dinamika publiciranja znanstvenih radova iz područja metabolomike/metabonomike baziranih na spektroskopiji NMR. Broj radova za pojedinu godinu dobiven je pretraživanjem stranice webofknowledge.com za ključne riječi metabolomika i NMR (plavo) te metabonomika i NMR (crveno) (Emwas i sur., 2019).

Spektroskopija NMR ima mnoge prednosti pred metodama kao što su GC-MS i LC-MS: metoda je brza i nedestruktivna, rezultati se lako kvantificiraju, a moguća je i rutinska identifikacija novih spojeva u uzorku. Nadalje, spektroskopija NMR lako se automatizira i vrlo je reproducibilna što je čini pogodnom za brzu analizu velikog broja uzoraka u kojima se kvantificiraju poznati metaboliti. Također je pogodna za detekciju, karakterizaciju i kvantifikaciju spojeva koji se teže analiziraju LC-MS metodom (šećeri, organske kiseline, alkoholi i drugi vrlo polarni spojevi). Velika prednost spektroskopije NMR je i mogućnost izravne analize krutih i polukrutih uzoraka (npr. tkiva i organa) metodama ssNMR (engl. solid-state NMR, spektroskopija NMR u čvrstom stanju) i MAS-NMR (engl. magic-angle sample spinning, vrtnja pri magičnom kutu). Spektroskopijom NMR moguća je zasebna ili simultana analiza različitih skupina metabolita (primjerice onih koji sadrže dušik, fosfor itd.) i to snimanjem NMR-spektara za više različitih jezgara kao što su ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P .

Unatoč brojnim prednostima, NMR ima mnoge nedostatke u usporedbi s ostalim metodama. Najvažniji nedostatak je niska osjetljivost ove metode. Spektroskopija NMR je često i do 100 puta manje osjetljiva u usporedbi s GC-MS i LC-MS tehnikama, a posljedica niske osjetljivosti je manji broj detektiranih spojeva u uzorku. NMR-analizom većine bioloških uzoraka detektira se između 50 i 200 različitih spojeva čije koncentracije su više od 1 μM , dok je kod uobičajene LC-MS analize ta granica između 10 i 100 nM te se stoga većinom detektira više od 1000 različitih spojeva (tablica 1), (Emwas i sur., 2019).

Izbor analitičke metode ovisi o više čimbenika. Prvenstveno ovisi o spojevima koji se analiziraju i prirodi samog uzorka. Iako su to glavni kriteriji, potrebno je razmotriti i cijenu te dostupnost ne samo uređaja već i potrebnog stručnog osoblja. Za većinu uobičajenih bioloških uzoraka nije moguće provesti potpunu identifikaciju i kvantifikaciju svih metabolita koristeći samo jednu metodu. Najtočniji i najpotpuniji rezultati stoga se dobivaju korištenjem više različitih metoda analize.

Tablica 1. Sažetak najvažnijih prednosti i ograničenja spektroskopije NMR u usporedbi s masenom spektrometrijom (MS) u metabolomičkim analizama (Emwas i sur., 2019).

	Spektroskopija NMR	Masena spektrometrija
Reproducibilnost	Visoka reproducibilnost.	Smanjena reproducibilnost.
Osjetljivost	Niska osjetljivost (može se poboljšati višestrukim snimanjem, povećanjem jakosti magnetskog polja, kriogeno hlađenim i mikrosondama, te hiperpolarizacijskim metodama).	Visoka osjetljivost (lako se detektiraju metaboliti već pri nanomolarnim koncentracijama).
Selektivnost	Uobičajeno se koristi za neselektivne analize. Preklapanje pikova različitih detektiranih metabolita predstavlja veliki problem.	Selektivnost, iako moćniji alat za ciljane analize predstavlja sprega MS s kromatografijom (tekućinskom i plinskom).
Provođenje mjerenja	Relativno brza analiza pri čemu svi metaboliti dovoljno visokih koncentracija mogu biti detektirani u jednom mjerenju.	Različite metode ionizacije potrebne su za povećanje broja detektiranih metabolita.
Priprema uzorka	Uključuje minimalnu pripremu uzorka , najčešće samo prijenos uzorka u NMR-cijevčicu i dodatak deuteriranog otapala. Može se automatizirati.	Zahtjevna priprema [kromatografsko razdvajanje smjese na komponente; derivatizacija uzorka za plinsku kromatografiju (GC-MS)].
Destruktivnost	Nedestruktivna metoda te je stoga moguće provesti nekoliko različitih analiza istog uzorka. Nadalje, uzorak se nakon analize može spremiti na duže vrijeme.	Destruktivna metoda; uzorak nije moguće koristiti za daljnje analize. Međutim, potrebna je vrlo mala količina uzorka za analizu.
Kvantitativna analiza	Kvantitativna metoda jer je intenzitet signala izravno proporcionalan koncentraciji metabolita i broju jezgara u molekuli.	Intenzitet signala često nije u vezi s koncentracijom metabolita budući da je efikasnost ionizacije odlučujući faktor.

2.1 Spektroskopija NMR u analizi urina

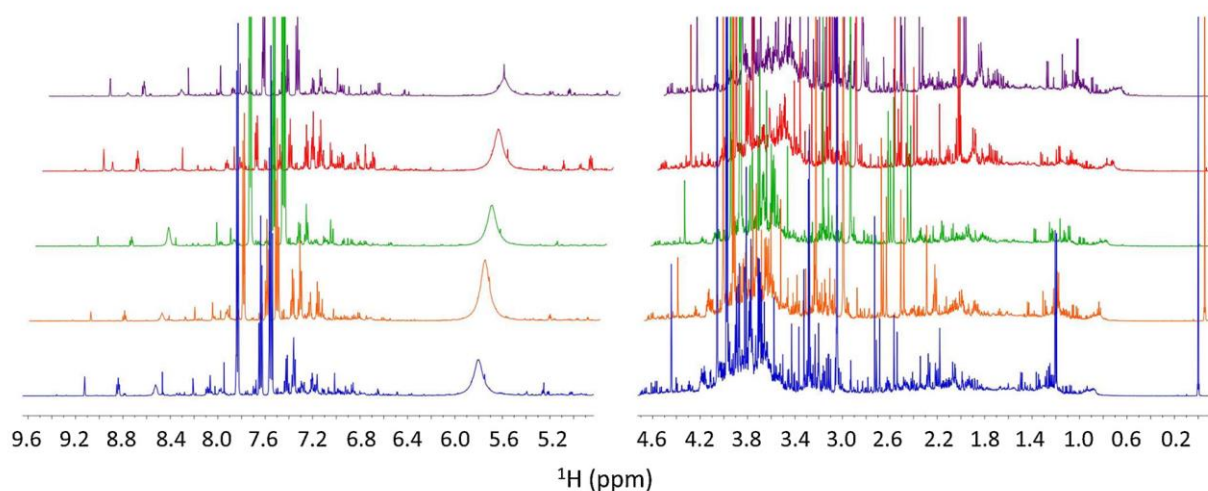
Metabolomičke studije biomedicinskog područja bave se analizom biofluida, tkiva te stanica ljudskog i animalnog podrijetla. Uzorci koji se najlakše pribavljaju su urin i krv te su stoga analize krvi i urina najvažnije i najčešće metode za dijagnozu i praćenje bolesti te praćenje metaboličkog odgovora na liječenje. Krv i urin imaju izrazito varijabilan kemijski sastav. Osnovni uvjet za provedbu visoko preciznih i reproducibilnih analiza je očuvanje originalnog kemijskog sastava uzorka tijekom pre-analitičke i analitičke faze provođenja analize. Pre-analitička faza uključuje prikupljanje, procesiranje, transport i skladištenje uzoraka. Analitička faza uključuje pripremu uzorka za mjerenje i samo instrumentalno mjerenje. Obje faze uključuju korake koji mogu utjecati na kemijski sastav uzorka. Da bi se taj utjecaj na analizirani metabolom što više smanjio i rezultati analize bili reproducibilni, potrebno je provesti niz potvrđenih, dogovorenih i detaljno opisanih postupaka. Zbog toga su razvijeni standardni operativni postupci (SOP, engl. *Standard Operating Procedures*) koji određuju pravilan način rukovanja najčešće korištenim uzorcima biofluida, a sastavljaju se na razini institucije koja vrši analizu.

Urin je iznimno pogodan za metabolomske analize jer sadrži niske koncentracije makromolekula (proteina i lipida) te ga je vrlo lako prikupiti u većim količinama. To je tekućina putem koje se iz organizma izlučuju štetne tvari i čijim izlučivanjem se organizam rješava viška tekućine. Svijetložute je boje kod zdravih ljudi, a sadrži metabolite nastale razgradnjom hrane, pića, lijekova i kozmetičkih preparata, endogene otpadne metabolite i proizvode metabolizma prisutnih mikroorganizama. Do sada je u ljudskom urinu identificirano oko 4200 metabolita (Bouatra i sur., 2013). Oko 2600 metabolita je endogeno, a oko 3300 egzogeno (mnogi spojevi pripadaju u obje skupine). Endogeni metaboliti proizvode se prirodnim putem u organizmu i sudjeluju u metaboličkim reakcijama, a najčešće se definiraju kao supstrati ili produkti metaboličkih enzima kodiranih u ljudskom genomu. Egzogeni metaboliti nastaju izvan organizma te se unose u organizam iz okoline.

Približno 400 metabolita detektirano je korištenjem spektroskopije $^1\text{H-NMR}$. Kemijski sastav urina ovisi prvenstveno o okolišnim uvjetima kao što su prehrana i uzimanje lijekova, te se stoga NMR-spektri urina zdravih osoba značajno razlikuju što se vidi na slici 2. Najizraženiji pikovi u $^1\text{H-NMR}$ -spektru urina vidljivi su pri 2-5 ppm (odgovaraju citratu, kreatininu, kreatinu, dimetilaminu, trimetilamin *N*-oksidu i glicinu) te 7-8 ppm (odgovaraju tirozinu, histidinu, imidazolu i hipuratu) (Bouatra i sur., 2013). NMR-spektar urina zdrave osobe vrlo je kompleksan te sadrži nekoliko tisuća signala koji najčešće dolaze od oko 200 različitih istovremeno detektiranih metabolita. Iako sastav urina varira tokom dana, postoje

jedinstveni metabolomički fenotipovi različiti za svaku osobu. Svaka osoba ima jedinstveni kemijski sastav urina i jedinstvene varijacije tog sastava koje su stabilne duži vremenski period (Ghini i sur.,2015). Zbog tih osobina, analiza urina je najpogodniji način za praćenje individualnih varijacija tijekom razvoja bolesti, praćenje metaboličkog odgovora na primjenu pojedinih lijekova ili promjenu načina života i prehrane. Posljednjih godina uočene su različite promjene u metabolomu urina karakteristične za pojedine bolesti te se stoga analiza urina sve više koristi u dijagnostici.

Ljudske i bakterijske stanice prisutne u urinu mogu promijeniti sastav urina i onemogućiti interpretaciju rezultata. Prisutne stanice mogu se lizirati prilikom smrzavanja uzorka zbog nastanka kristala leda ili prilikom centrifugiranja pri visokom broju okretaja. Centrifugiranje je potrebno da bi se uklonile čvrste nečistoće iz uzorka koje ometaju NMR-analizu. Standardni postupci obrade uzorka pri NMR-analizi urina stoga uključuju uklanjanje stanica iz svježeg urina primjenom blagog centrifugiranja i filtracije. Osim prisutnosti stanica, promjenu kemijskog sastava urina tijekom pre-analitičke faze mogu uzrokovati i kemijske te enzimske reakcije. Udio proteina u urinu zdravih osoba je izrazito nizak, no enzimska aktivnost prisutnih proteina nije zanemariva. Najvažnije promjene koje su posljedica enzimске aktivnosti su povećanje koncentracija acetata, sukcinata i kreatina te smanjenje koncentracija piruvata, kreatinina i 2-oksoglutarata. Premda se kemijske reakcije koje se događaju tijekom pre-analitičke i analitičke faze ne mogu potpuno izbjeći, mogu se ograničiti održavanjem niske temperature uzorka i smanjenjem izlaganja zraku. Uzorci urina nakon uklanjanja stanica mogu se skladištiti pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je pri tim uvjetima njihov sastav stabilan i nakon 5 godina. Uzorci koji sadrže stanice puno su nestabilniji, čak i pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ghini i sur., 2019).



Slika 2. ^1H -NMR spektri uzoraka urina prikupljenih od petero zdravih ljudi (Ghini i sur., 2019).

3. Dijagnostika infekcija urinarnog trakta

Infekcije urinarnog trakta predstavljaju najčešće bakterijske infekcije, s tim da se puno češće javljaju kod žena. Najugroženija skupina su mlade, spolno aktivne žene. Nešto rjeđe oboljevaju trudnice i starije žene, a najrjeđe muškarci zbog drukčije građe mokraćno-spolnog sustava (žene imaju kraću mokraćnu cijev i smještena je bliže otvoru debelog crijeva). Većina takvih infekcija relativno je bezazlena, a najčešći uzročnik je bakterija *E. coli*. Čak 75-95% slučajeva cistitisa (upala mokraćnog mjehura) i pijelonefritisa (upala bubrega) uzrokovano je bakterijom *E. coli* (Tandogdu, Wagenlehner, 2016). Prvi simptomi javljaju se u vidu učestalog, bolnog i otežanog mokrenja te se obično izlučuju male količine urina i javlja se osjećaj neispražnjenog mjehura. Javlja se i potreba za mokrenjem noću, a urin je često замуćen, promijenjene boje i neugodna mirisa. Rjeđi simptomi su pojava krvi u urinu, bol u donjem dijelu leđa i donjem dijelu trbuha te povišena temperatura. Moguća je i asimptomatska infekcija urinarnog trakta kod koje su bakterije prisutne u urinu, ali se kod pacijenta ne javljaju nikakvi simptomi bolesti.

Dijagnoza infekcija urinarnog trakta je općenito klinička dijagnoza temeljena na simptomima te urinokultura najčešće nije potrebna. Najčešće se provodi analiza urina test-trakicom. Kod pacijenata sa simptomima i negativnim rezultatom analize test-trakicom, preporuča se urinokultura i/ili druge analize urina, npr. mikroskopski pregled sedimenta urina nakon centrifugiranja. Test-trakica je vrlo jednostavna i jeftina metoda analize. Njome se provjerava prisutnost nitrita i leukocitne esteraze u urinu. Leukocitna esteraza je nespecifični upalni marker te je stoga često prisutna u urinu osoba koje ne boluju od infekcije urinarnog trakta. Nitriti su prisutni u samo 72% uzoraka oboljelih pacijenata (Lussu i sur., 2017) te je stoga riječ o vrlo nepouzdanom metodi analize. Urinokultura se rutinski provodi u većini kliničkih laboratorija. To je dugotrajna analiza koja zahtijeva angažman većeg broja stručnog osoblja. Vrijeme potrebno za dobivanje rezultata urinokulture često je duže od vremena u kojem bi se trebalo započeti s terapijom antibioticima kako bi ona bila uspješna. Nadalje, interpretacija rezultata je složena jer broj bakterija koji je dovoljan za izazivanje bolesti ovisi o kliničkoj slici pacijenta, korištenju lijekova i sastavu samog urina. Na broj poraslih kolonija može utjecati faza infekcije, učestalost pražnjenja mjehura, brzina rasta pojedinih sojeva bakterija i drugi faktori. Značajna prisutnost bakterija najčešće se definira pri minimalno 10^5 CFU/mL [CFU (engl. Colony Forming Unit) je jedinica koja formira jednu koloniju na hranjivoj podlozi]. Ako se ova vrijednost koristi kao granična za potvrdu bolesti, infekcija urinarnog trakta se ovom metodom potvrđuje samo kod polovice žena sa simptomima (Lussu i sur., 2017). Broj CFU u jedinici volumena približno odgovara koncentraciji živih mikroorganizama u

uzorku. Ako mikroorganizmi rastu povezani u agregate, rezultat dobiven brojanjem kolonija može biti značajno manji od stvarnog broja živih mikroorganizama.

Infekcije urinarnog trakta uzrokuju mnogi sojevi bakterija s različitim metaboličkim karakteristikama te navedenim metodama nije moguće predvidjeti kliničke posljedice pojedinih načina liječenja u većine pacijenata. Zbog nemogućnosti metaboličke karakterizacije uzročnika, visoke cijene i potrebnog vremena, ne preporuča se urinokultura pri dijagnostici nekomplikiranih infekcija urinarnog trakta. Korištenje antibiotika za tretiranje infekcija urinarnog trakta ima značajan utjecaj na ukupnu potrošnju antibiotika, a time i na razvoj antibiotičke rezistencije u patogena kao i na povećanje ukupnih troškova u zdravstvu. Stoga je potreban razvoj jednostavnijih, bržih i jeftinijih dijagnostičkih metoda. Jedna od najvažnijih metoda je spektroskopija NMR kojom je, uz korištenje specijaliziranih softvera, moguće odrediti uzročnike infekcija urinarnog trakta preciznošću i do 99,5% (Lussu i sur., 2017).

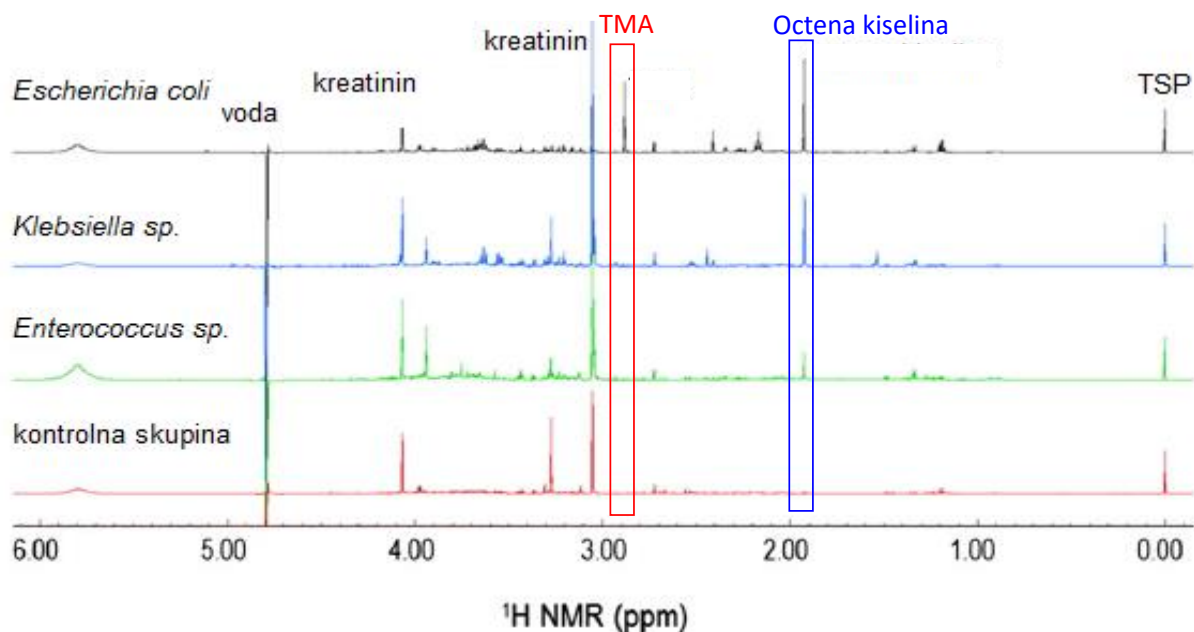
3.1 ¹H-NMR-metabolomska analiza u dijagnostici infekcija urinarnog trakta

¹H-NMR-analiza urina može se koristiti za dijagnosticiranje i identifikaciju infekcija urinarnog trakta. Za preciznu dijagnozu potrebno je razviti složene statističke modele za pojedine uređaje i skupine pacijenata te je potrebno odrediti granične vrijednosti promatranih biomarkera. Nadalje, potrebno je normalizirati metabolite urina koristeći ukupni intenzitet spektra ili stavljajući dobivene koncentracije u omjer s koncentracijom urinarnog kreatinina.

Lam i sur. (2014) predložili su dijagnostički algoritam temeljen na samo jednom biomarkeru, octenoj kiselini. Budući da se ne radi o složenom statističkom modelu, lako se može prilagoditi za druge analitičke platforme. Za dobivanje modela analizirano je 88 uzoraka urina osoba kojima je dijagnosticirana infekcija urinarnog trakta i 61 uzorak urina zdravih osoba. Nakon statističke analize rezultata i minimiziranja utjecaja razine glukoze u urinu, uočeno je nekoliko biomarkera čije se koncentracije razlikuju u ove dvije skupine uzoraka, a riječ je o octenoj kiselini i trimetilaminu (TMA) (slika 3). TMA je kometabolit sisavaca i bakterija, a nastaje redukcijom trimetilamin-*N*-oksida (TMAO, metabolit sisavaca) u prisutnosti bakterijskog enzima trimetilamin-*N*-oksid-reduktaze. To je vrlo pogodan biomarker za potvrđivanje infekcije jer zbog svojeg porijekla nije moguć njegov nastanak kao rezultat kontaminacije uzorka. Nakon što su iz podataka za statističku analizu izuzeti uzorci pacijenata inficiranih bakterijom *E. coli*, jedini značajni biomarker za razlikovanje zdravih i oboljelih pacijenata bila je octena kiselina. TMA je marker specifičan za infekcije uzrokovane

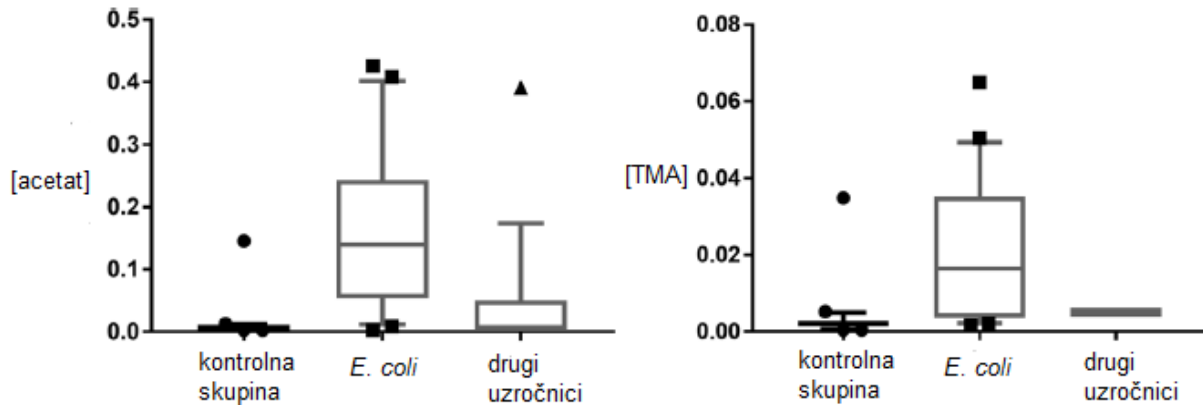
s *E. coli*, dok je octena kiselina marker za infekcije uzrokovane svim analiziranim bakterijama (*E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter sp.*, *Morganella morganii*, *Proteus sp.*, *Streptococcus agalactiae*). Obradom rezultata određena je optimalna granična vrijednost koncentracije urinarne octene kiseline od 0,03 mmol/mmol (kreatinin). Ova vrijednost omogućila je dijagnozu s osjetljivošću 90,5% i specifičnošću 94,6% za promatrani uzorak pacijenata, što su vrijednosti više od onih za analizu kvantifikacijom leukocitne esteraze, nitrita ili leukocita u urinu. Množina octene kiseline po množini kreatinina bila je prosječno 36 puta viša kod oboljelih pacijenata nego kod kontrolne skupine.

Normalizacija pojedinih metabolita urina pomoću kreatinina je složena zato što izlučivanje kreatinina ovisi o mišićnoj masi i bolestima (bolesti bubrega, rabdomioliza). Normalizacija metabolita urina korištenjem apsolutne koncentracije je neprikladna jer koncentracije ovise o volumenu i protoku urina. Opisana metoda je mnogo brža i preciznija od rutinskih metoda koje se trenutno koriste, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredile granične vrijednosti octene kiseline za specifične skupine pacijenata (npr. pacijenti s netipičnom koncentracijom urinarnog kreatinina). Nedostatak ove metode je i nemogućnost identifikacije uropatogena ako nije riječ o *E. coli*.



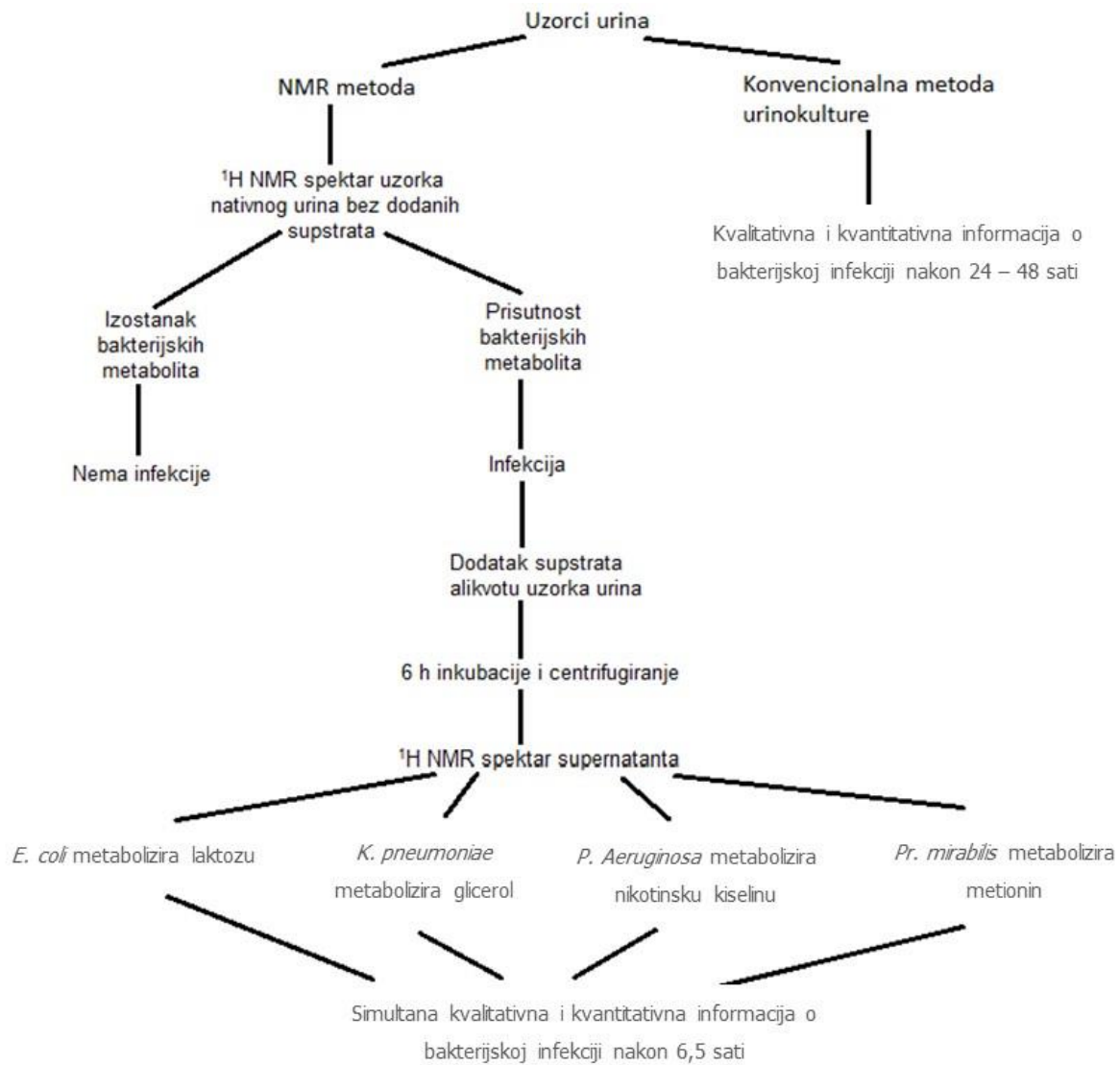
Slika 3. Primjeri ^1H -NMR-spektara uzoraka urina prikupljenih od pacijenata koji boluju od infekcije urinarnog trakta uzrokovane bakterijama *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.* te uzorka urina zdrave osobe (Lam i sur.,2014).

Ovi rezultati potvrđeni su i kasnijim istraživanjima. Lussu i sur. (2017) također su zaključili da su najprikladniji markeri za dijagnozu bakterijske urinarne infekcije acetat i TMA (slika 4). Korištenjem složenih statističkih modela koji uključuju koncentracije i acetata i TMA (izražene po kreatininu) sa skoro 100 %-tnom osjetljivošću i 100 %-tnom specifičnošću dijagnosticirali su bakterijske infekcije na uzorku od 40 pacijenata.



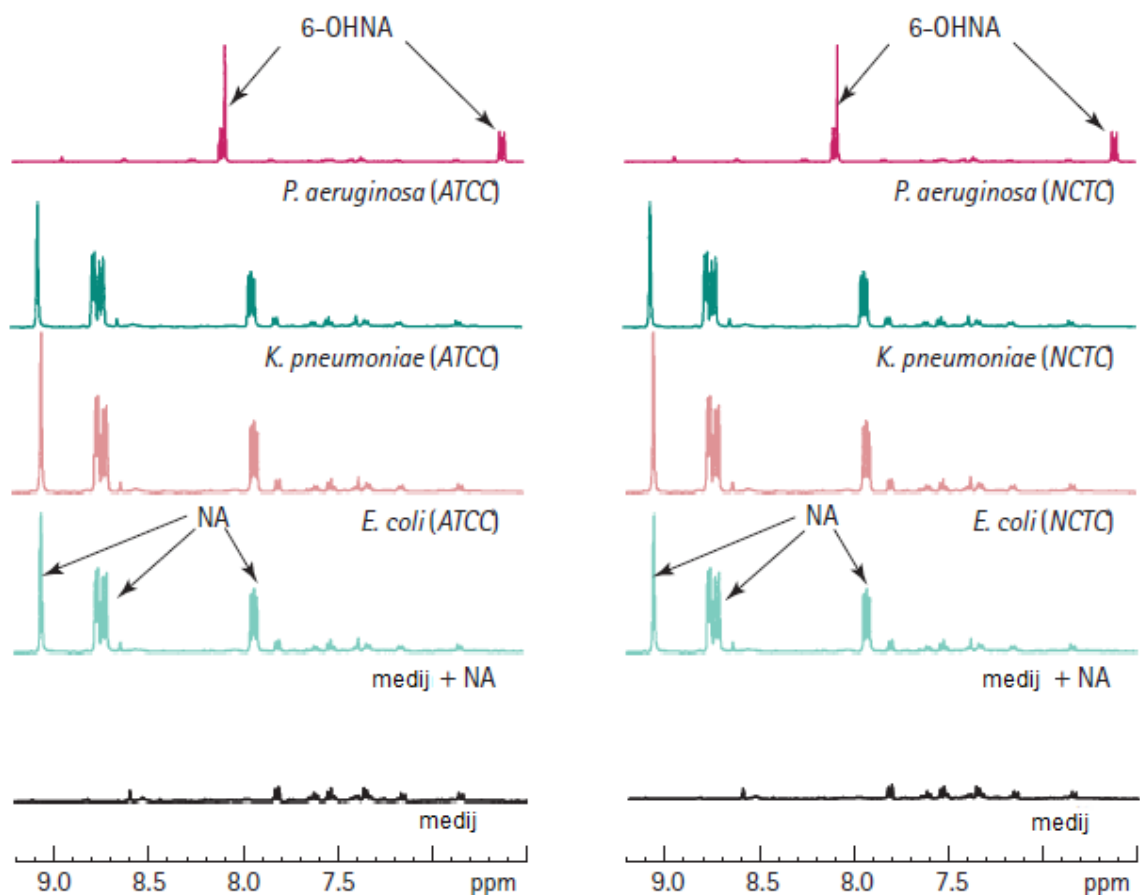
Slika 4. Graf relativnih koncentracija acetata i TMA u uzorcima urina kontrolne skupine, pacijenata inficiranih s *E. coli* i pacijenata inficiranih drugim bakterijama (Lussu i sur., 2017).

Gupta i sur. (2009) predložili su dijagnostički algoritam koji zahtijeva više vremena, rada i utrošenih kemikalija, ali je njime moguće preciznije identificirati uzročnika infekcije. Slika 5. prikazuje shemu predloženog algoritma. Model je konstruiran provođenjem *in vitro* i *ex vivo* studije. *In vitro* studija provedena je tako da su uzorci urina zdravih osoba sterilizirani i inficirani komercijalno dostupnim standardnim sojevima bakterija uzročnika urinarnih infekcija nabavljenih iz različitih izvora: ATCC (American Type Culture Collection) i NCTC (National Culture Type Collection). Alikvotima uzoraka dodani su standardni supstrati za analizu (glicerol, laktoza, nikotinska kiselina i metionin). Dio uzorka je upotrijebljen za određivanje CFU, a dio za inkubaciju. Nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 6 h, bakterije su uklonjene centrifugiranjem i supernatant je analiziran spektroskopijom NMR. Kvantitativno određivanje bakterije *P. aeruginosa* provedeno je tako da su priređeni mediji s 10^3 – 10^7 CFU/mL s dodanom nikotinskom kiselinom (NA). Ista metoda korištena je za određivanje bakterija *K. pneumoniae*, *E. coli* i *Pr. mirabilis*. Priređeni su mediji s 10^3 – 10^7 CFU/mL te su im dodane kemikalije za analizu, ovisno o bakteriji (glicerol, laktoza i metionin). Mediji su nakon inkubacije i centrifugiranja analizirani spektroskopijom NMR. *Ex vivo* studija provedena je s uzorcima inficiranih pacijenata.



Slika 5. Shema analize uzoraka urina (Gupta i sur., 2009).

6-Hidroksinikotinska kiselina (6-OHNA) nastaje iz nikotinske kiseline reakcijom koju katalizira specifična hidroksilaza karakteristična za bakteriju *P. aeruginosa*. Uspoređujući rezultate urinokulture i količinu nastale 6-OHNA (signal H^5 iz 6-OHNA, slika 10.) razvijen je statistički model kojim je na temelju rezultata spektroskopije NMR moguće predvidjeti broj bakterija u urinu. Slika 6. prikazuje 1H -NMR-spektre urina s dodanom NA i sojevima bakterija, nakon inkubacije. NMR-spektar urina inficiranog s *P. aeruginosa* sadrži signale koji odgovaraju protonima iz 6-OHNA, a ne sadrži signale koji odgovaraju protonima iz NA. Kod ostalih ispitivanih bakterija nisu prisutni signali protona iz 6-OHNA, a prisutni su signali protona iz NA.



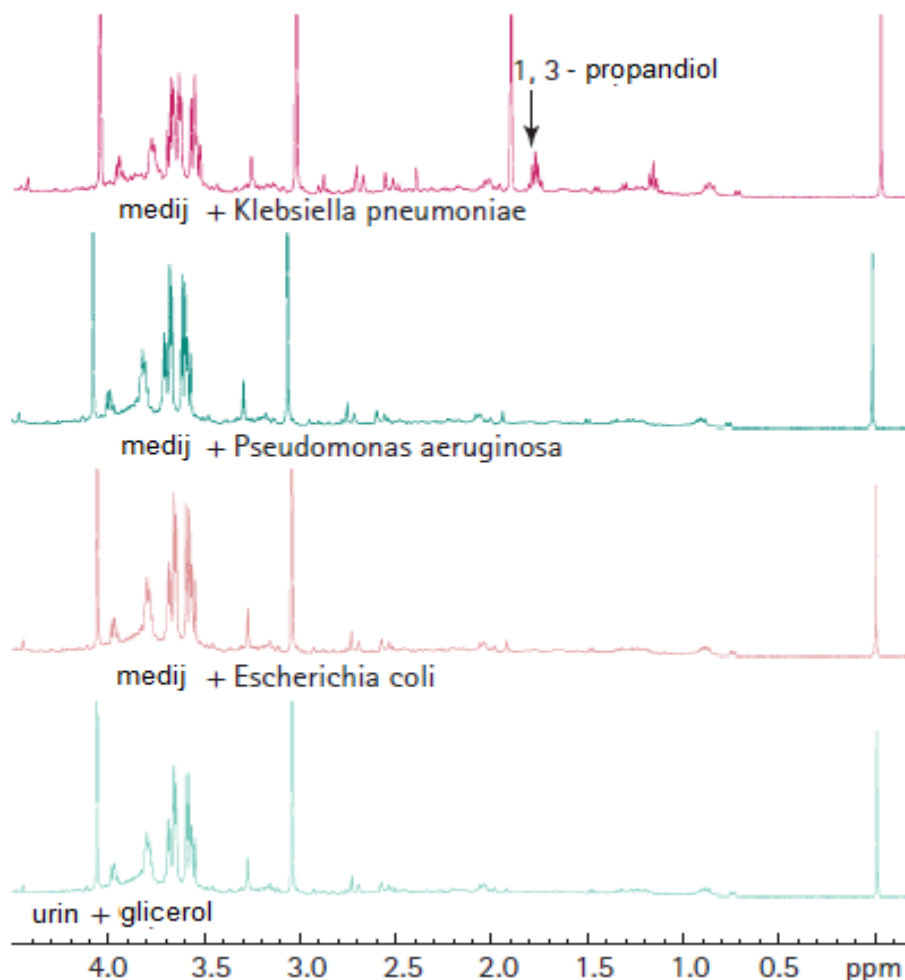
Slika 6. ^1H -NMR-spektri metabolita nikotinske kiseline (NA) u urinu; *P. aeruginosa* specifično metabolizira NA, dok je ostali ispitivani uropatogeni ne metaboliziraju (Gupta i sur., 2009).

Slika 7. prikazuje ^1H -NMR-spektre uzoraka urina kojima je dodan glicerol. 1,3-Propandiol nastaje iz glicerola djelovanjem enzima glicerol-dehidrataze i 1,3-propandiol-dehidrogenaze. Njegovom detekcijom u uzorku moguće je isključiti *P. aeruginosa*, *E. coli* i *Pr. mirabilis* kao uzročnike infekcije, no nije moguće sa sigurnošću utvrditi da je uzročnik *K. pneumoniae* jer se isti NMR-spektar dobiva i kod infekcije bakterijom *Citrobacter freundii* (Gupta i sur., 2009). Ovi uzročnici mogu se lako razlikovati mikroskopskim pregledom urina jer su bakterije *C. freundii* pokretne, dok *K. pneumoniae* nisu. Za ovaj slučaj također je razvijen statistički model kojim je kvantifikacijom 1,3-propandiola (signala metilenske skupine, slika 10.) iz NMR-spektra moguća procjena broja bakterija u uzorku.

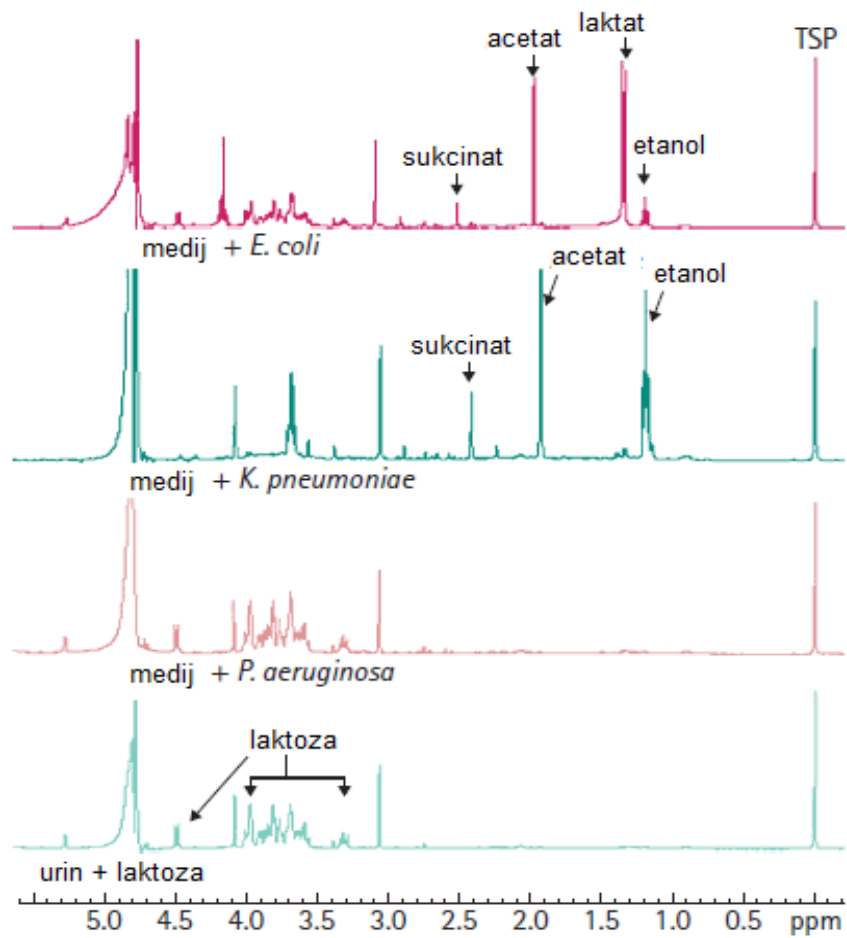
Iz slike 8. vidljivo je da i *K. pneumoniae* i *E. coli* metaboliziraju laktozu, no samo kod *E. coli* jedan od produkata je laktat. Procjena broja bakterija *E. coli* u uzorku urina moguća je kvantifikacijom laktata (signala H^3 iz laktata, slika 10.). 4-Metiltio-2-oksobutanska kiselina (MOBA) nastaje iz metionina oksidativnom deaminacijom. Od ispitivanih uzročnika, ovu reakciju provodi samo bakterija *Pr. mirabilis*. Statistički model za procjenu broja ove bakterije

u urinu razvijen je korištenjem signala H² iz MOBA (slika 10). Slika 9. prikazuje ¹H-NMR-spektre urina kojima je prije inkubacije dodan metionin. Signali protona iz MOBA prisutni su samo u spektru uzorka inficiranog bakterijom *Pr. mirabilis*.

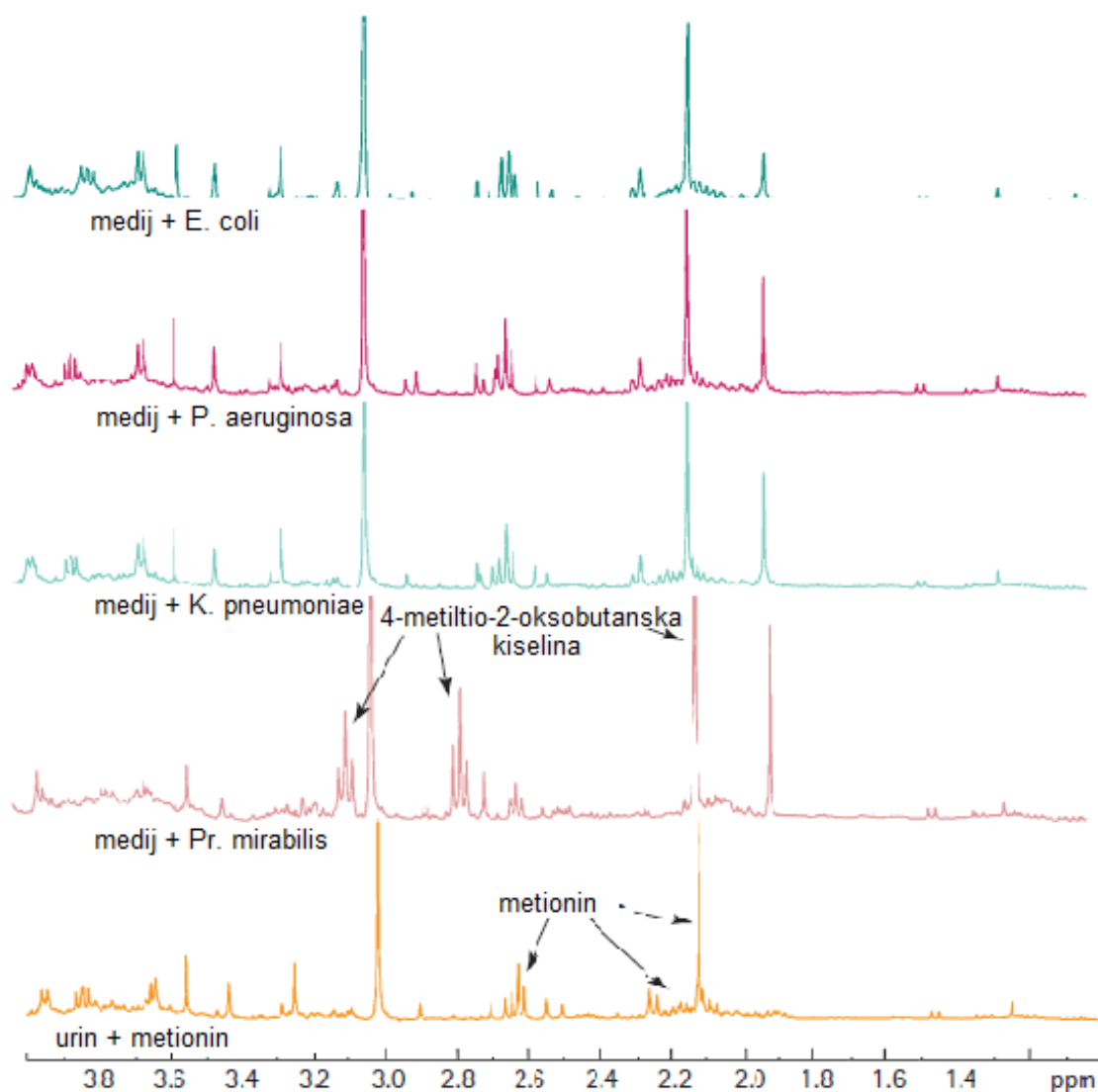
Određivanje uzročnika infekcije ovom metodom obavljeno je s 93,7%-tnom osjetljivošću i 96,9%-tnom specifičnošću za *E. coli*, 92%-tnom osjetljivošću i 98%-tnom specifičnošću za *K. pneumoniae*, 93%-tnom osjetljivošću i 99,4%-tnom specifičnošću za *P. aeruginosa* i 80%-tnom osjetljivošću i specifičnošću za *Pr. mirabilis* na uzorku od 519 pacijenata. Lažno negativni rezultati dobiveni su samo kod manje od 10³ CFU/mL te kod tih slučajeva značajna bakteriurija (pojava bakterija u urinu) ne bi bila potvrđena ni urinokulturom.



Slika 7. ¹H-NMR-spektre metabolita glicerola u urinu; *K. pneumoniae* specifično metabolizira glicerol u 1,3–propandiol, dok ga ostali ispitivani uropatogeni ne metaboliziraju (Gupta i sur., 2009).

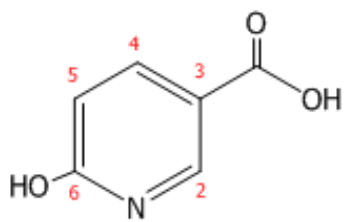


Slika 8. ^1H -NMR-spektri metabolita laktoze u urinu; laktat je specifični produkt *E. coli*, a ostali ispitivani uropatogeni ga ne proizvode (Gupta i sur., 2009).

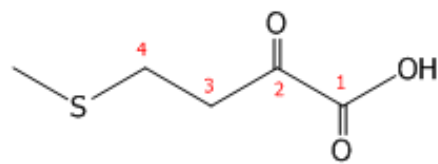


Slika 9. ^1H -NMR-spektri metabolita metionina u urinu; *Pr. mirabilis* metabolizira metionin u 4-metiltio-2-oksobutansku kiselinu, dok ga ostali ispitivani uropatogeni ne metaboliziraju (Gupta i sur., 2009).

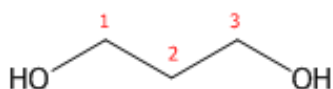
Nedostaci ove metode su nemogućnost identifikacije rjeđih uropatogena te utrošak kemikalija za analizu. Gupta i sur. (2012) stoga su predložili novi dijagnostički algoritam s većim potencijalom za kliničku primjenu. Shema algoritma prikazana je na slici 11., a njime je moguće odrediti tip bakterije uzročnika za desetak minuta, bez utroška kemikalija. Zbog različitih metaboličkih puteva, NMR-spektri urina inficiranog gram-negativnim bacilima (GNB) razlikuju se od spektara urina inficiranog gram-pozitivnim kokima (GPC).



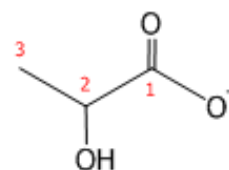
6-hidroksinikotinska kiselina



4-metiltio-2-oksobutanska kiselina



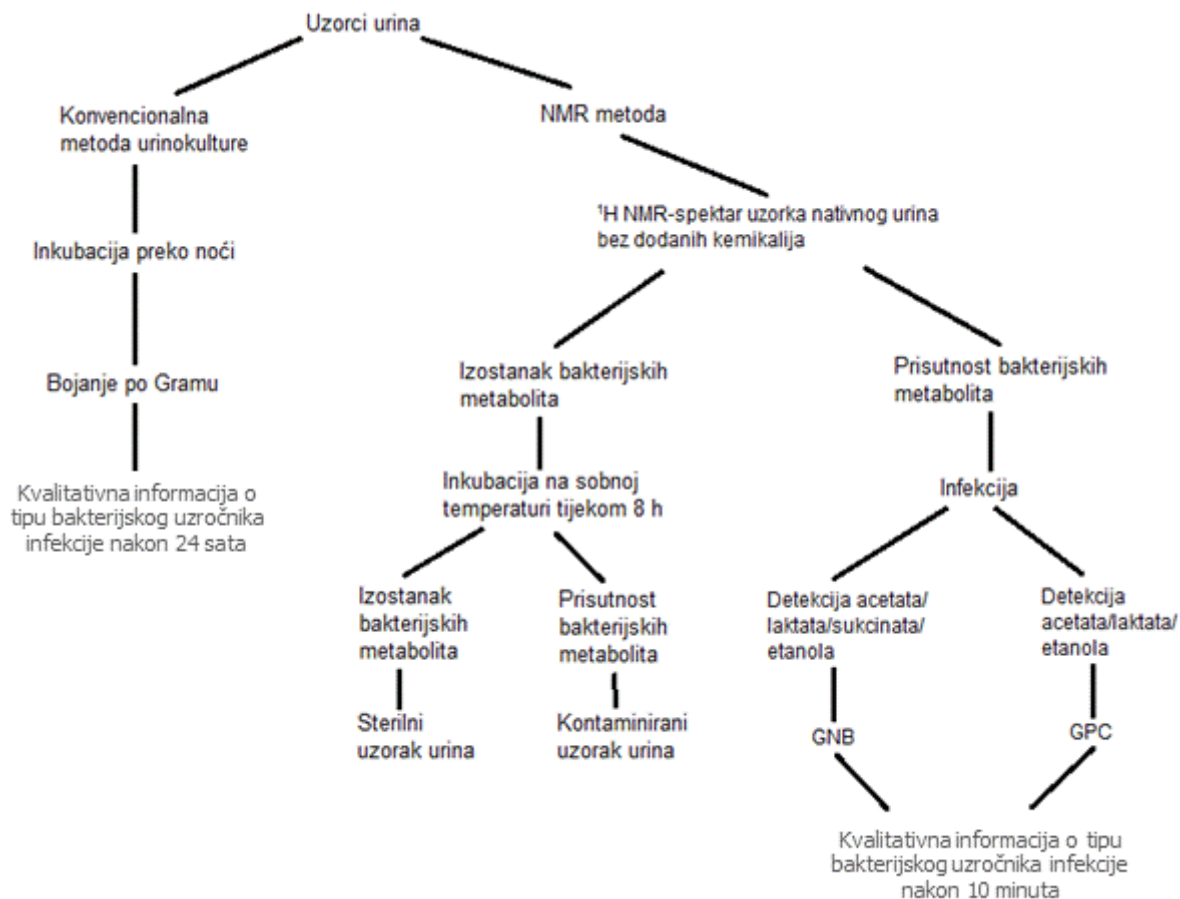
1,3-propandiol



laktat

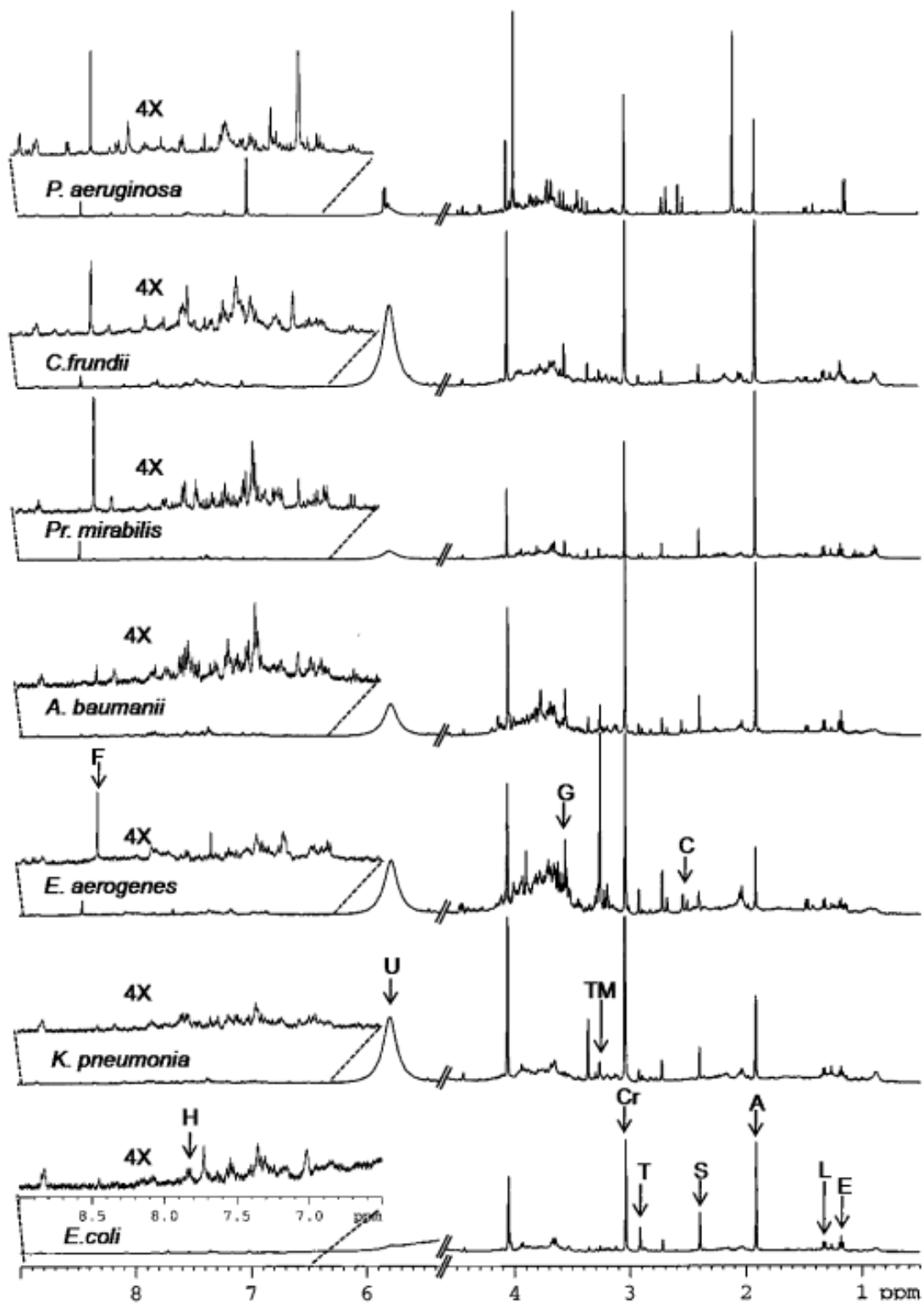
Slika 10. Kemijske strukture spojeva koji se koriste pri dijagnostici infekcija urinarnog trakta. Numerirani su atomi ugljika glavnog lanca, a vodikovi atomi numeriraju se prema atomu ugljika na koji su vezani.

Ovaj model analize također je konstruiran provođenjem *ex vivo* i *in vitro* studije. *Ex vivo* studija provedena je analizom uzoraka urina inficiranih i zdravih osoba spektroskopijom NMR i urinokulturom. *In vitro* studija provedena je korištenjem uzoraka urina zdravih osoba. Mediji za rast komercijalno dostupnih uropatogena priređeni su sterilizacijom uzoraka urina i dodatkom glukoze u koncentraciji 2 mg/mL. Medij (urin) je naciepljen različitim sojevima bakterija GNB i GPC tako da je početni broj živih stanica iznosio približno 3×10^7 CFU/mL. Korišteni GNB uključuju sojeve bakterija *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pr. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii* i *C. freundii*, a GPC sojeve bakterija *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus gp B* i *Staphylococcus saprophyticus*. Uzorci su inkubirani pri 37 °C tijekom 6 h. Nakon inkubacije i centrifugiranja, uzorci su analizirani spektroskopijom NMR te su NMR-spektri uspoređeni sa spektrima prije naciepljivanja bakterija. Analiza je provedena na 682 uzorka urina inficiranih pacijenata i 50 uzoraka urina zdravih ljudi.

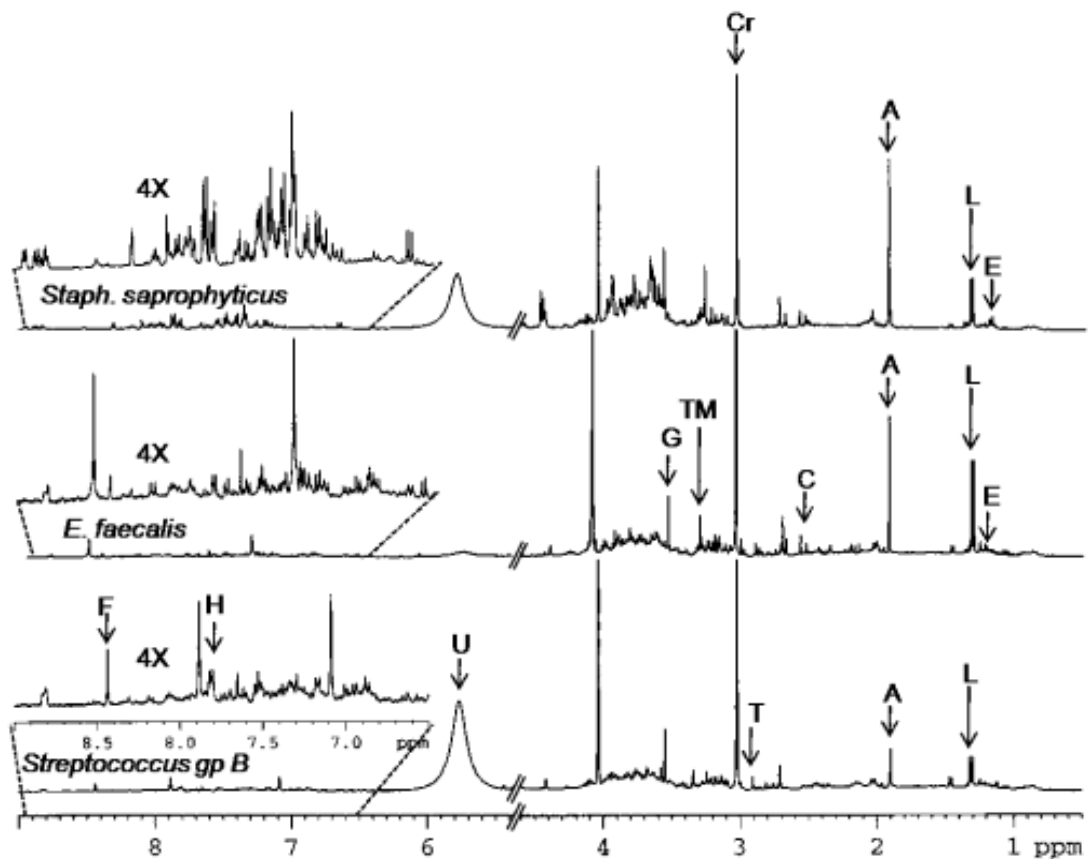


Slika 11. Shema analize uzoraka urina (Gupta i sur., 2012).

Cilj *ex vivo* studije bio je pronaći biomarkere koji su najučinkovitiji pri dijagnostici infekcija urinarnog trakta te razlikovanju tipova bakterija uzročnika. Statistički model koji je najučinkovitiji pri razlikovanju kontrolne skupine od svih inficiranih uzoraka (GNB+GPC) uključuje koncentracije acetata, laktata, sukcinata i formijata. Infekcije urinarnog trakta su korištenjem ovog modela dijagnosticirane s 99,3%-tnom osjetljivošću i 99,5%-tnom specifičnošću. Za razlikovanje kontrolne skupine od uzoraka inficiranih s GNB najučinkovitiji biomarkeri su acetat, laktat, etanol, sukcinat i formijat (99,5%-tna osjetljivost i 98%-tna specifičnost), a za razlikovanje kontrolne skupine od uzoraka inficiranih s GPC acetat, laktat i formijat (99,5%-tna osjetljivost i 92%-tna specifičnost). Za razlikovanje uzoraka inficiranih s GNB od onih inficiranih s GPC najučinkovitiji statistički model uključuje koncentracije sukcinata, laktata i etanola te je njime moguće razlikovati ove dvije skupine uzoraka s 96%-tnom osjetljivošću i 96%-tnom specifičnošću. Koncentracije navedenih biomarkera određene su iz NMR-spektara, a tipični NMR-spektri uzoraka urina inficiranih pacijenata prikazani su na slikama 12 i 13.



Slika 12. ^1H -NMR-spektri uzoraka urina prikupljenih od pacijenata inficiranih s gram-negativnim bacilima (GNB). Dio NMR-spektra u području 6,5-9,0 ppm povećan je 4 \times . Signali protona najvažnijih metabolita označeni su oznakama E (etanol), L (laktat), A (acetat), S (sukcinat), T (trimetilamin), Cr (kreatinin), TM (trimetilamin *N*-oksid), U (urea), C (citrat), G (glicin), F (formijat), H (hipurat) (Gupta i sur., 2012).

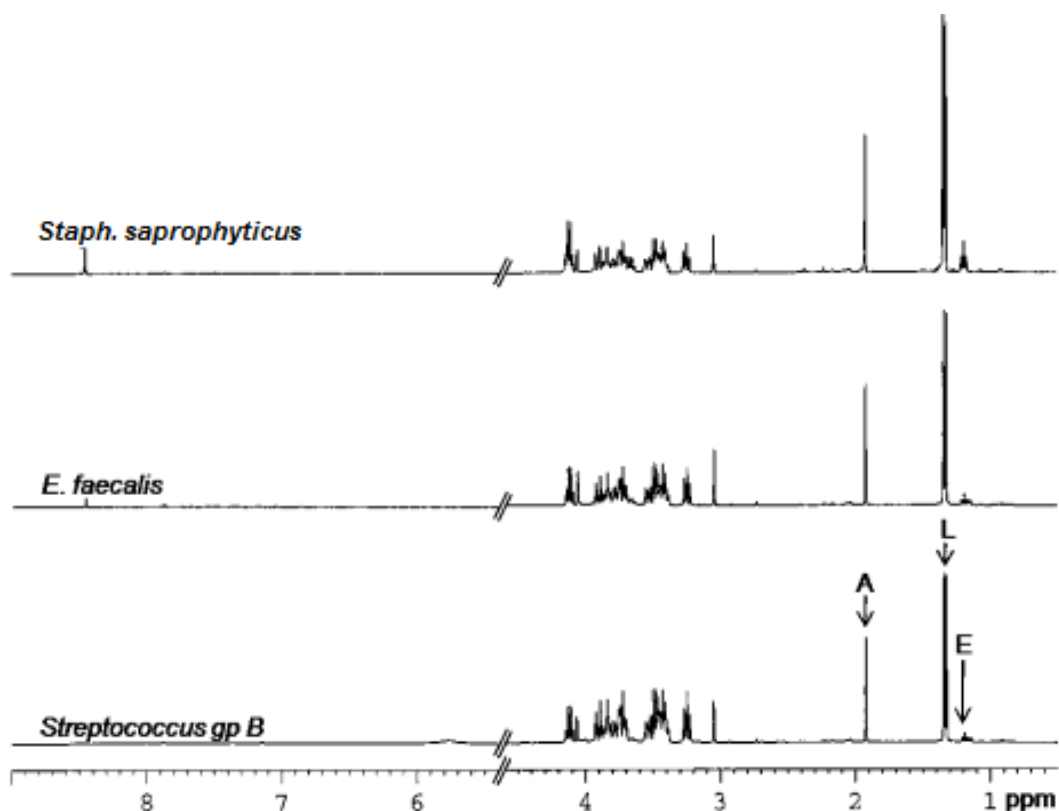


Slika 13. ^1H -NMR-spektri uzoraka urina prikupljenih od pacijenata inficiranih s gram-pozitivnim kokima (GPC). Dio NMR-spektra u području 6,5-9,0 ppm povećan je 4 \times . Signali protona najvažnijih metabolita označeni su oznakama E (etanol), L (laktat), A (acetat), T (trimetilamin), Cr (kreatinin), TM (trimetilamin *N*-oksid), U (urea), C (citrat), G (glicin), F (formijat), H (hipurat) (Gupta i sur., 2012).

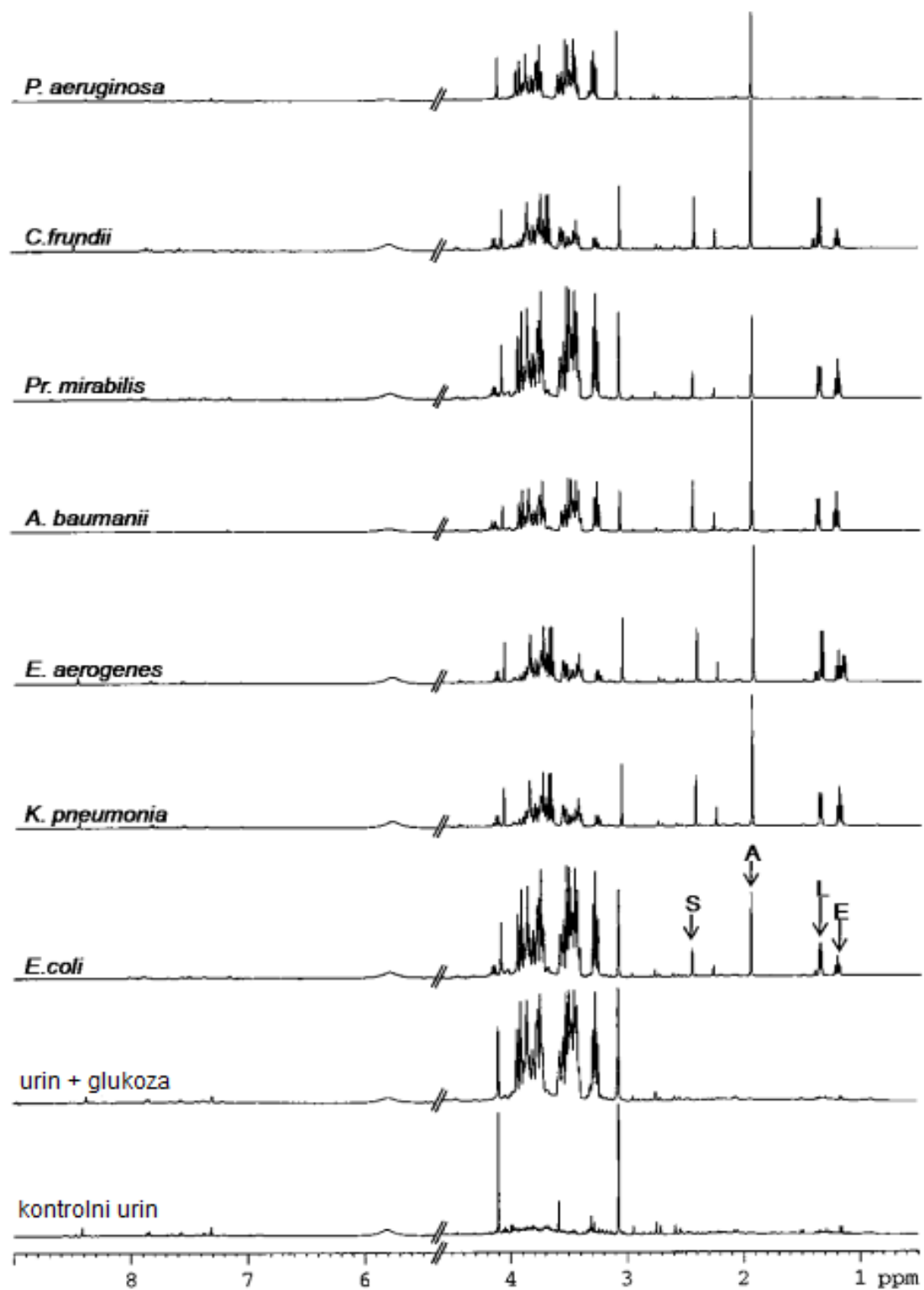
In vitro studija provedena je s komercijalno dostupnim sojevima bakterija GNB i GPC kako bi se potvrdili rezultati *ex vivo* studije. Rezultati obje studije se poklapaju i NMR-spektri bakterija iste vrste pokazuju slične obrasce pikova. Ovi rezultati pokazuju da bakterije uzročnici infekcija urinarnog trakta koriste iste metaboličke puteve u *in vivo* i *in vitro* okruženju. Najizraženiji pikovi u NMR-spektrima urina nakon inkubacije odgovaraju protonima acetata, laktata, etanola, sukcinata i formijata što se vidi na slikama 14. i 15. Acetat i laktat detektirani su kod svih ispitivanih uropatogena, a kod većine je detektiran i etanol. Sukcinat je detektiran u svim medijima u kojima su kultivirani GNB, osim onog u kojem je kultiviran *P. aeruginosa*, a nije detektiran kod nijednog medija u kojem su kultivirani GPC.

Uspoređujući rezultate spektroskopije NMR s rezultatima urinokulture uočeno je da su kod uzoraka s više od 10^3 CFU/mL uvijek prisutni acetat i laktat u visokim koncentracijama,

dok je etanol prisutan u 60% uzoraka. Sukcinat je prisutan samo u uzorcima inficiranim s GNB (osim *P. aeruginosa*) te je stoga najznačajniji biomarker za razlikovanje GNB i GPC. Dobiveni rezultati posljedica su različitih metaboličkih puteva koje koriste različite bakterije. Bakterije koje uzrokuju infekcije urinarnog trakta su većinom anaerobi; *P. aeruginosa* je jedini obligativni aerob među ispitivanim uropatogenima. Piruvat koji nastaje glikolizom može biti supstrat u različitim reakcijama, ovisno o tipu bakterije i okolišnim uvjetima. Kod GNB, dio piruvata se konvertira u sukcinat preko oksaloacetata, malata i fumarata, a drugi dio konvertira se u laktat, etanol i acetat (Schlegel, 1995). Kod GPC, piruvat prvo ulazi u ciklus limunske kiseline te se konvertira u acetat, laktat, formijat, etanol i ugljični dioksid (Platt, Foster, 1958). Sukcinat ne nastaje zbog smanjene aktivnosti određenih enzima. Kod stafilokoka je uočena smanjena aktivnost sukcinat- i izocitrat-dehidrogenaze i povećana aktivnost laktat-dehidrogenaze (Collins, Lascelles, 1962), a kod nekih streptokoka uočeno je da im nedostaje aktivnost fumarat-reduktaze i sukcinat-dehidrogenaze (Deibel, 1964).



Slika 14. $^1\text{H-NMR}$ -spektari uzoraka urina nakon dodatka glukoze i kultivacije komercijalno dostupnih sojeva bakterija GPC. Signali protona najvažnijih metabolita označeni su oznakama E (etanol), L (laktat) i A (acetat) (Gupta i sur., 2012).



Slika 15. $^1\text{H-NMR}$ -spektri uzoraka urina nakon dodatka glukoze i kultivacije komercijalno dostupnih sojeva bakterija GNB. Signali protona najvažnijih metabolita označeni su oznakama E (etanol), L (laktat), A (acetat) i S (sukcinat) (Gupta i sur., 2012).

4. Zaključak

- Metabolomika je znanost koja ima potencijal primjene u mnogim disciplinama te se stoga vrlo brzo razvija posljednjih nekoliko godina, a najznačajnija praktična primjena metabolomike je u dijagnostici. Razlog tome je taj što metaboliti kao krajnje točke biokemijskih procesa daju najprecizniji uvid u fiziološko stanje stanice ili organizma u određenim uvjetima.
- Dijagnoza infekcija urinarnog trakta postavlja se na temelju kliničkih simptoma i laboratorijskih nalaza. Laboratorijske analize koje se najčešće provode su analiza urina test-trakicom, mikroskopski pregled sedimenta urina nakon centrifugiranja i urinokultura. ¹H-NMR-metabolomska analiza urina ima mnoge prednosti pred navedenim metodama dijagnoze. U ovom radu dan je kratak pregled dijagnostičkih algoritama koji se temelje na spektroskopiji NMR, a kojima je moguće dijagnosticirati urinarne infekcije u kraćem roku i s višom preciznošću i specifičnošću u usporedbi s prethodno navedenim metodama. Prednost metabolomičkog pristupa je i mogućnost dijagnoze infekcija u slučajevima kada se bakterije ne nalaze u urinu te ih nije moguće otkriti urinokulturom (npr. bakterije koje mogu živjeti unutar epitelnih stanica mjehura).
- Potvrda bakterijske infekcije može se provesti spektroskopijom NMR nativnih uzoraka urina, a najznačajniji biomarkeri su acetat i TMA. Određivanje tipa bakterije uzročnika također se može vršiti spektroskopijom NMR nativnih uzoraka urina. Najvažniji biomarkeri su acetat, TMA, sukcinat, laktat i etanol. Najznačajniji biomarker je sukcinat jer njega ne proizvode gram-pozitivni koki, a proizvode ga gram-negativni bacili (osim *P. aeruginosa*). Koncentracije laktata u pravilu su više kod uzoraka inficiranih gram-pozitivnim kokima. Ove razlike u sastavu urina rezultat su različitih metaboličkih puteva koje koriste različiti tipovi bakterija.
- Spektroskopijom NMR moguće je precizno identificirati i kvantificirati najčešće bakterije uzročnike. Nativnim uzorcima urina dodaju se supstrati koje specifično metaboliziraju pojedini uropatogeni (nikotinska kiselina, glicerol, laktoza, metionin), a nakon inkubacije se na temelju kemijskih pomaka njihovih metabolita može odrediti vrsta bakterijskog uzročnika infekcije. 6-Hidroksinikotinska kiselina nastaje iz nikotinske kiseline samo u prisutnosti *P. aeruginosa*, 1,3-propandiol nastaje iz glicerola u prisutnosti bakterija *K. pneumoniae* i *C. freundii*, laktat nastaje iz laktoze samo u prisutnosti *E. coli*, a 4-metiltio-2-oksobutanska kiselina nastaje iz metionina u prisutnosti *Pr. mirabilis*. Vrijeme potrebno za provođenje ove metode iznosi oko 6,5

sati (uključuje izvođenje spektroskopije NMR uzoraka prije inkubacije, inkubaciju uzoraka tijekom 6 sati te spektroskopiju nakon inkubacije).

- Kvantifikacija bakterija u uzorku vrši se kvantifikacijom njihovih specifičnih metabolita. Nedostaci ove metode su utrošak kemikalija te nemogućnost identifikacije i kvantifikacije rjeđih uzročnika urinarnih infekcija.
- Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se normalizirale koncentracije pojedinih metabolita urina za specifične skupine pacijenata, pronašli biomarkeri kojima je moguće odrediti i kvantificirati pojedine uzročnike te razvili statistički modeli što više osjetljivosti i specifičnosti. Spektroskopija NMR trenutno se koristi prvenstveno u istraživačke svrhe i nema raširenu kliničku primjenu. Za širu kliničku primjenu potreban je daljnji razvoj tehnologije (smanjenje veličine spektrometra, smanjenje cijene, ugrađeni softveri s dijagnostičkim statističkim modelima, pojednostavljenje analize). Razvoj tehnologije omogućio je znatno smanjenje veličine NMR-spektrometara te se trenutno intenzivno radi na razvoju prijenosnih NMR-spektrometara. S obzirom na navedene prednosti, spektroskopija NMR će u bližoj budućnosti vrlo vjerojatno postati jedan od najvažnijih dijagnostičkih alata.

5. Popis literature

Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A. C., Wilson M. R., Knox C., Bjorndahl T. C., Krishnamurthy R., Saleem F., Liu P., Dame Z. T., Poelzer J., Huynh J., Yallou F. S., Psychogios N., Dong E., Bogumil R., Roehring C., Wishart D. S. (2013) The human urine metabolome. *PLoS ONE* **8(9)**:e73076.

Collins F. M., Lascelles J. (1962) The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* **29**:531-535.

Deibel R. H. (1964) The Group D Streptococci. *Bacteriological Reviews* **28**:330-366

Emwas A. H., Roy R., McKay R. T., Tenori L., Saccenti E., Nagana Gowda G. A., Raftery D., Alahmari F., Jaremko L., Jaremko M., Wishart D. S. (2019) NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **9**:123.

Ghini V., Quaglio D., Luchinat C., Turano P. (2019) NMR for sample quality assessment in metabolomics. *New BIOTECHNOLOGY* **52**:25-34.

Gupta A., Dwivedi M., Mahdi A. A., Nagana Gowda G. A., Khetrapal C. L., Bhandari M. (2009) ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy for identifying and quantifying common uropathogens: a metabolic approach to the urinary tract infection. *BJU Int.* **104**:236-244.

Gupta A., Dwivedi M., Mahdi A. A., Khetrapal C. L., Bhandari M. (2012) Broad identification of bacterial type in urinary tract infection using ¹H NMR spectroscopy. *Journal of proteome research* **11**:1844-1854.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=40336>> Pristupljeno 15. travnja 2021.

Lam C. W., Law C. Y., To K. K. W., Cheung S. K. K., Lee K. C., Sze K. H., Leung K. F., Yuen K. Y. (2014) NMR-based metabolomic urinalysis: A rapid screening test for urinary tract infection. *Clinica Chimica Acta* **436**:217-223.

Lussu M., Camboni T., Piras C., Serra C., Del Carratore F., Griffin J., Atzori L., Manzin A. (2017) ^1H NMR spectroscopy-based metabolomics analysis for the diagnosis of symptomatic *E. coli*-associated urinary tract infection (UTI). *BMC Microbiology* **17**:201.

Platt T. B., Foster E. M. (1958) Products of glucose metabolism by homofermentative streptococci under anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **75**:453-459.


Ramsden J. J. (2004) Metabolomics and metabonomics. U: Bioinformatics: An Introduction. Computational Biology, 3. izd., Springer, Dordrecht, str. 221-226.

Schlegel H. G. (1995) Electron transport under anaerobic conditions. U: General Microbiology, 7. izd., Cambridge University Press, str. 333-356.

Tandogdu Z., Wagenlehner F. M. E. (2016) Global epidemiology of urinary tract infections. *Current opinion in infectious diseases* **29(1)**:73-79.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


ime i prezime studenta