TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Bioinformaatiliste tööriistade ResFinder ja RGI võrdlus Eestis isoleeritud kliiniliste *Escherichia coli* tüvede antibiootikumiresistentsuse tuvastamisel

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sander Arna

Juhendaja PhD Age Brauer

TARTU 2025

Infoleht

„Bioinformaatiliste tööriistade ResFinder ja RGI võrdlus Eestis isoleeritud kliiniliste *Escherichia coli* tüvede antibiootikumiresistentsuse tuvastamisel“

Töös kasutati Eestis kogutud kliiniliselt isoleeritud antibiootikumi suhtes resistentseid ja tundlike *Escherichia coli* tüvede sekveneeritud genoome, MIK väärtuseid ja vastavate antibiootikumide EUCAST murdepunkte, et hinnata kahe levinud homoloogipõhise programmi ResFinderi ja RGI resistentsusfenotüübi määramise efektiivsust. Programmide võrdlemiseks arvutati mõlema programmi spetsiifilisus, sensitiivsus, täpsus ja F_1 skoori. Töö tulemusena tuvastati, et nii RGI kui ResFinderi ertapeneemi, amikatsiini ja norfloksatsiini resistentsuse ennustus võime on halb. ResFinder suudab hästi ennustada piperatsilliini, tseftasidiimi ja astreonaami resistentsust.

Märksõnad: ResFinder, RGI, antibiootikumiresistentsus, kliinilised isolaadid, *Escherichia coli*

CERCS: B110 Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika

„Comparison of the bioinformatic tools ResFinder and RGI in the detection of antibiotic resistance in clinical Escherichia coli strains isolated in Estonia“

The study used sequenced genomes of antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible Escherichia coli strains collected from clinical isolates in Estonia, MIC values, and EUCAST breakpoints of the corresponding antibiotics to assess the efficacy of two common homology-based programs, ResFinder and RGI, in determining resistance phenotypes. The specificity, sensitivity, accuracy, and F_1 score of both programs were calculated to compare the programs. As a result of the study, it was determined that the predictive ability of both RGI and ResFinder for ertapenem, amikacin, and norfloxacin resistance is poor. ResFinder is able to predict resistance to piperacillin, ceftazidime, and aztreonam well.

Keywords: ResFinder, RGI, antibiotic resistance, clinical isolates. *Escherichia coli*

CERS: B110 bioinformatics, medical infomatics, biomathematics, biometrics

Sisukord

Infoleht....2
Sisukord....3
Kasutatud lühendid....4
Sissejuhatus....5
1. Kirjanduse ülevaade....6
1.1. Ajalugu ja olulisus....6
1.2. Antibiootikumiresistentsuse molekulaarsed mehhanismid....7
1.3. Antibiootikumiresistentsuse tuvastamise meetodid....10
1.3.1. Laboratoorsed meetodid....11
1.3.2. *In silico* meetodid....13
1.3.3. ResFinder....15
1.3.4. CARD andmebaas ja RGI programm....16
1.4. *Eschericia coli* kui inimese patogeen....18
2. EKSPERIMENTAALOSA....22
2.1. Töö eesmärgid....22
2.2. Materjal ja metoodika....22
2.2.1. Andmed....22
2.2.2. Resistentsuse ennustamine genoomiandmetest....23
2.2.3 Statistiline analüüs....23
2.3. Tulemused....24
2.4. Arutelu....34
Kokkuvõte....36
Kirjanduse loetelu....39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID....46
Lisa....47
Litsents....49

Kasutatud lühendid

ARG – antibiootikumiresistentsuse geen (ingl. *Antibiotic Resistance Gene*)

AMR – antimikroobne resistentsus (ingl. *Antimicrobial Resistance*)

AST – Antimikroobse tundlikkuse testimine (ingl. *Antimicrobial Susceptibility Testing*)

CARD – terviklik antibiootikumiresistentsuse andmebaas (ingl. *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*)

ARDB – antibiootikumiresistentsuse geenide andmebaas (ingl. *Antibiotic Resistance Genes Database*)

EUCAST– Euroopa Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Komitee (ingl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)*

FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (ingl. *Food and drug administration*)

MALDI-TOF/MS - maatriks-assisteeritud laserdesorptsiooni-ionisatsiooni lennu ajaline massispektromeetria (ingl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight Mass Spectrometry*)

MDA – mitme antibiootikumi resistentsus (ingl. *Multi Drug Resistance*)

ME – tõsine viga (ingl. *major error*)

MIK– minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (ingl. *Minimum Inhibitory Concentration*)

MÕ – masin õpe (ingl. *Machine lerning*)

RAST - kiire antibiootikumi tundlikkuse testimine (ingl. *Rapid Antimicrobial Suseptibiliti Testing*)

RF – ResFinder

RGI – resistentsusgeeni identifitseerija (ingl. *Resistance Gene Identifier*)

TN – tõene negatiivne (ingl. *True negatiive*)

TP – tõene positiivne (ingl. *True positiive*)

VME – väga tõsine viga (ingl. *very major error*)

VN – valenegatiivne (ingl. *False negatiive*)

VP – valepositiivne (ingl. *False negatiive*)

YLD – puudega elatud aastad (ingl. *Years Lived with Disability*)

YLL – kaotatud eluaastad (ingl. *Years of Life Lost*)

Sissejuhatus

Antimikroobne resistentsus (AMR) on mikroobide, nagu bakterite, vähendatud reaktsioon antibiootikumide suhtes. See tähendab, et bakterid suudavad siiski kasvada ja paljuneda antibiootikumi juuresolekul. Üle kümnendite on kasvanud bakterite antibiootikumide resistentsus koos antibiootikumide kasutusega. Tänapäeval on antibiootikumiresistentsed bakterid muutunud kliiniliselt väga ohtlikuks – 2019. a tehtud uuringu järgi suri enam kui 4,95 miljonit inimest AMR-iga seotud põhjustel, millest 1,27 miljonit surma oli otseselt tingitud AMR-ist (Murray et al., 2022). On ennustatud, et aastaks 2050 sureks umbes 10 miljon inimest aastas, juhul kui AMR käsitluses muutusi ei tehta, muutes selle üheks suurimaks surma põhjuseks maailmas (O'Neill, 2016).

Kliinilistes uuringutes on määratud üheks kõige ohtlikumaks bakteriliigiks *Escherichia coli* nii Euroopas (Mestrovic et al., 2022), kui mujal maailmas (Murray et al., 2022). *E. coli'*l on nii loomupärane resistentsus kui ka võime omandada resistentsus keskkonnast (Nasrollahian et al., 2024). Resistentsuse tuvastamiseks on kliinilises kasutuses antimikroobse tundlikkuse testimine (AST) ja selle järgi seatud minimaalne inhibitoorne antibiootikumi kontsentratsioon (MIK). AST metoodika ja piirid määrab Euroopas organisatsioon EUCAST (https://www.eucast.org/). Lisaks on tulnud viimastel aastatel kasutusele arvutipõhised *in silico* meetodid. Levinud *in silico* meetodiks on homoloogiapõhised programmid nagu näiteks ResFinder (Bortolaia et al., 2020). ResFinder kasutab enda andmebaasi, kuhu on kogutud antibiootikumiresistentsust kodeerivate valkude geenid, et leida uuritavast genoomist kattuvaid alasid ning selle põhjal ennustada fenotüübilist resistentsust (Boolchandani et al., 2019). *In silico* tööriistade puhul on oluline hinnata, kas ja mil määral need suudaksid täiendada või asendada ressursimahukaid laboratoorseid praktikaid.

Käesolevas töös kasutatakse eelmainitud programmi ResFinder ja uuemat RGI-d (Alcock et al., 2023), et ennustada RITA programmist rahastatud uuringu „Mikroobide resistentsuse ohjamise ja vähendamise võimalused" (Tenson et al., 2024) raames Eestist kogutud kliiniliste *E. coli* tüvede fenotüübilist resistentsust. Programmide ennustusvõimekust võrreldakse kasutades sensitiivsust, spetsiifilisust, täpsust ja F_1 skoori. Töö käigus uuriti ka programmide juurde kuuluvaid andmebaase ja nende koostamise põhimõtteid.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Ajalugu ja olulisus

Antibiootikumid on keemilised ühendid, mis peatavad erinevate mikroobide regulaarset kasvu ja paljunemist. Antud ainetel on erinevad sihtmärgid, mida nad pärsivad, nagu rakukesta tootmine, valgu süntees, DNA replikatsioon ja foolhappe metabolism. Antibiootikumiresistentsust on dokumenteeritud alates antibiootikumide kasutuselevõtu algusest. Esimeseks resistentsusjuhtumiks loetakse 1940. aasta algul leitud *Escherichia coli* tüvi, mis oli resistentne penitsilliini suhtes (Dhingra et al., 2020).

Kliiniliselt ohtlikud tüved on multiresistentsed (MDR). Esimesed bakteritüved, mis olid MDR ja kliiniliselt ohtlikud, kuulusid *Staphylococcus aureus*'e liigi hulka. Aastaks 1960 oli Inglismaal tehtud kindlaks *S. aureus*'e tüvi, mis oli resistentne metitsilliinile, penitsilliinile, streptomütsiinile ja tetratsükliinile. Hiljem 2017. aastal tehtud genoomianalüüsi käigus leiti, et see *S. aureus*'e tüvi võis olla resistentne metitsilliinile juba mitu aastat enne, kui antud antibiootikum tuli kasutusele. Selle põhjuseks peetakse laialdast penitsilliini kasutust aastaid enne, mis näitab, kui kergesti antibiootikumide laialdane kasutamine võib mõjutada isegi uute antibiootikumide toimet (Harkins et al., 2017). Aastate jooksul on töötatud välja sadu uusi antibiootikume ja bakterid on nende suhtes samuti resistentsuse omandanud. Üheks näiteks on antibiootikum Cefiderocol, mis tuli turule Euroopas aastal 2020 ja esimesed resistentsed tüved seltsist Enterobacterales dokumenteeriti aastal 2021 (Yao et al., 2021).

Tänapäeval on muutunud AMR maailmas aina suuremaks mureks. Murry et al 2022 arvutasid statistiliste mudelite alusel välja, kui suur mõju oli AMR-il inimeste elule aastal 2019. Hinnati, et umbes 4,95 miljoni inimese surm oli seotud AMR-iga, millest umbes 1,27 miljonit surma oli otseselt põhjustatud AMR-ist. Kuid AMR infektsioon ei lõpe alati surmaga, seega uuriti ka puudega elatud aastaid (YLD) ja kaotatud eluaastaid (YLL). AMR-iga seotud YLD oli kokku 2,29 miljonit aastat ja YLL oli kokku 189 miljonit aastat. AMR-i poolt põhjustatud YLD oli kokku 275 000 aastat ning YLL oli kokku 47,6 miljonit aastat. Lisaks võrreldi erinevaid maailma piirkondi, et leida AMR mõju suurust ning leiti, et kõige suurema kahjuga oli Sahara tagune Aafrika ja teised arengumaad. Kolm kõige surmavamat patogeeni on *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Klebsiella pneumoniae* (Murray et al., 2022). Selle ja teiste uuringute järgi on määranud maailma tervise organisatsioon (WHO) AMR-i üheks suurimaks

terviseriskiks maailmas (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance).

Antibiootikumiresistentsus ei mõjuta ainult arengumaid. Euroopat puudutavates uuringutes leiti, et 2019. aastal oli 541 000 surma seotud bakteriaalse AMR-iga ja 133 000 nendest põhjustatud otse bakteriaalse AMR-i poolt. Sarnaselt eelneva tööga määrati kolmeks surmavamaks patogeeniks Euroopas *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Klebsiella pneumoniae* (Mestrovic et al., 2022). Hinnati ka majanduslikku kahju, mis kaasneb AMR-iga nagu rohkem intensiivravi, erilisi antibiootikume, laboriuuringuid ja patsiendi eraldust. Kokkuvõttes hinnatakse Euroopas antibiootikumiresistentsuse majanduslikuks kuluks tervishoiusüsteemidele ligi 1,1 miljardit eurot (OECD, 2019).

Eestis on samuti tehtud uuringuid AMR bakterite levikust. Eesti on võrreldes teiste Euroopa riikidega madala antibiootikumide kasutusega. Perioodil 2016-2020 läbiviidud teadusuuringutes on leitud, et kõikide uuritud bakterite seas on resistentsete tüvede osakaal madalam kui Euroopa keskmine (Tenson et al., 2024). Teiseks on näha selget trendi erinevate AMR bakterite osakaalu osas. Näiteks *E. coli* (kombineeritud AMR), *K. pneumoniae* (mitmed erinevad AMR) ja *E. faecalis* (kõrge gentamitsiini resistentsus) on langustrendis (European Centre for Disease Prevention and Control. et al., 2022).

1.2. Antibiootikumiresistentsuse molekulaarsed mehhanismid

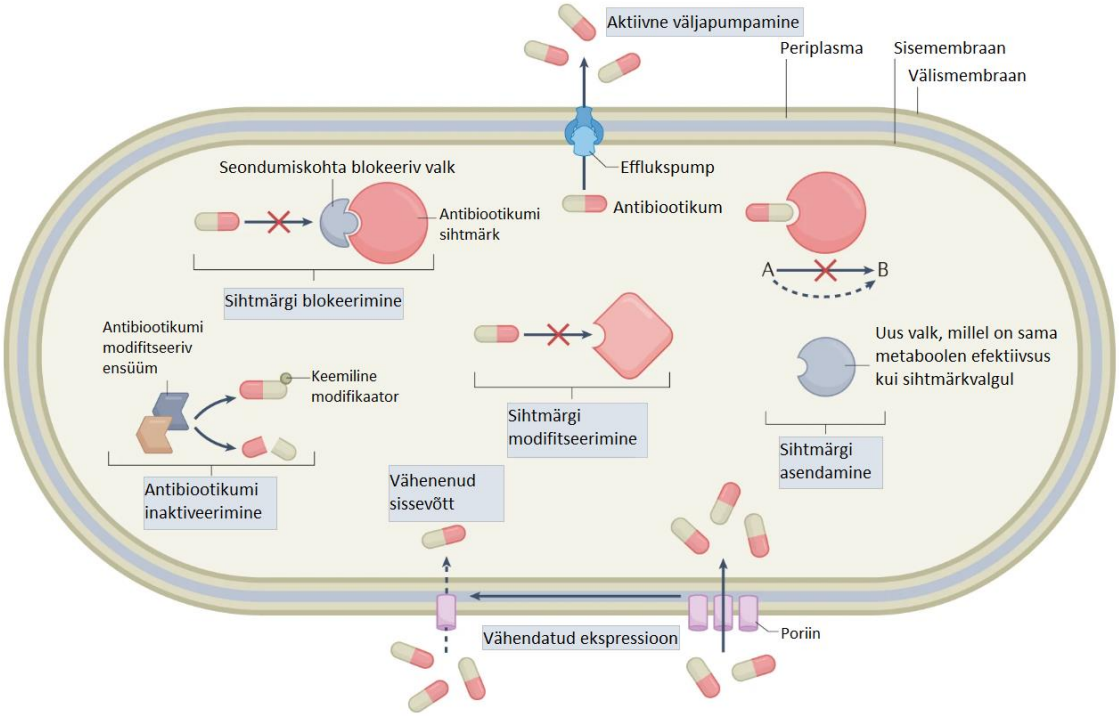
Antibiootikumiresistentsus bakterite seas jaotub omandatud ja loomupäraseks resistentsuseks. Looduslik resistentsus tuleneb bakterite iseloomulikest omadustest. Näiteks *Mycoplasma* liikidel puudub rakukest, seega nende puhul ei toimi β-laktaamid, mis mõjutavad rakukesta moodustamist (Chernova et al., 2016). Kuid on ka teist tüüpi loomupärast resistentsust, nimelt indutseeritud resistentsus. Selle aluseks on loomupäraselt bakterirakus esinevad geenid, mida hakatakse ekspresseerima alles siis, kui keskkonda lisatakse antibiootikume ning need hakkavad tootma antibiootikumiresistentsuse jaoks vajalikke

valgustruktuure. Üheks levinumaks indutseeritud antibiootikumiresistentsuse mehhanismiks on mitme antibiootikumi väljapumpamine (Reygaert, 2018).

Bakterid omandavad antibiootikumiresistentsust põhjustavaid geene (ARG) läbi kahe kindla protsessi. Esimeseks protsessiks on bakteri enda genoomis esinev mutatsioon. Tavaliselt sellised resistentsusgeenid antakse edasi otse järgnevale generatsioonile. Teiseks peamiseks meetodiks on keskkonnast omandatud resistentsusgeenid ehk horisontaalne geeniülekanne. Horisontaalse geeniülekande meetodid on transformatsioon, transpositsioon ja konjugatsioon. Transformatsioon on erinevate bakterite võime omastada keskkonnast geneetilist materjali. Transpositsioon on geneetilise materjali ülekandumine ühelt bakterilt teisele bakteriofaagi vahendusel. Konjugatsioon on kahe bakteri vaheline geneetilise informatsiooni otsene ülekanne. Horisontaalse geeniülekande puhul on üldiselt tegemist bakteri plasmiidis oleva resistentsusgeeniga, samas kui mutatsiooni puhul on tegemist bakteri kromosoomis asuva geeniga (Mancuso et al., 2021). Horisontaalse geneetilise materjali ülekanne on üks kõige ohtlikumaid meetodeid, kuidas bakterid saavad anda edasi ARG, sest ülekanne võib toimuda ka erinevate bakteri liikide vahel. AMR kiire levik on võimalik just tänu sellele, et bakteritel on niivõrd mitmekesised meetodid selle tekkimiseks ja edasi kandumiseks.

Bakteritel on erinevaid meetodeid antibiootikumi vastu võitlemiseks, nagu antibiootikumi inaktiveerimine, bakterimembraani läbilaskvuse vähendamine, antibiootikumi seondumiskoha modifitseerimine, seondumiskoha blokeerimine, sihtmärgi asendamine ja antibiootikumi väljapumpamine efflukspumba abil (Darby et al., 2023) (Joonis 1). Antibiootikumi inaktiveerimine on vahendatud ensümaatilise valgu poolt, mis modifitseerib antibiootikumi või lagundab selle. Näiteks β-laktamaasid lagundavad β-laktaam antibiootikume hüdrolüüsides keemiliselt reaktiivse neljast aatomist koosneva laktaamrõnga. Tuntud valk, mis omab sellist funktsiooni on AmpC (De Pascale et al., 2010). Bakterimembraani läbilaskvuse vähendamine toimub membraansete struktuuride muutmise või transmembraansete valkude ekspressiooni vähendamise kaudu. Näiteks transmembraansete valkude poriinide madalam ekspressioon või membraani enda omaduste muutmine (Fernández et al., 2012). Antibiootikumi seondumiskoha muutmine sihtmärkvalgul viiakse läbi kahel erineval viisil. Esimene on mutatsioon sihtmärkvalgu geenis, mille tulemusena on valgu antibiootikumi seondumiskoht väiksema afiinsusega. Teine on sihtmärkvalgu ensümaatiline post-translatsiooniline modifitseerimine, mis samuti vähendab antibiootikumi seondumisafiinsust. Seondumiskoha blokeerimine toimib raku poolt toodetud valkudega, mis

konkureerivad antibiootikumidega antibiootikumi seondumiskohas. Alternatiivvalgu kasutusega saab bakter vahetada metaboolset rada, mille käigus jätab kasutamata antibiootikumi poolt inhibeeritud valgu. Antibiootikumi bakterirakust välja pumpamine on vahendatud aktiivse efflukspumbaga, mis kasutab väljapumpamiseks raku energiavarusid (Darby et al., 2023).



Joonis 1. Bakteri antibiootikumiresistentsuse mehhanismid. Peamisteks mehhanismideks on antibiootikumi väljapumpamine, seondumiskoha blokeerimine, antibiootikumi modifitseerimine, sihtmärgi vältimine alternatiivse raja kaudu, antibiootikumi inaktiveerimine ja vähendatud sissevõtt läbi madalama transmembraanse valgu ekspressiooni. (Kohandatud Darby et al., 2023)

Bakteriaalne antibiootikumiresistentsus ei pea tulenema üksikust bakterirakust. Bakterid saavad koostööd tehes moodustada biofilmi, millest on antibiootikumil keeruline läbi saada. Antibiootikum tungib biofilmi pealmisest kihist läbi, surmates pinnal olevad rakud, aga need surnud rakud moodustavad seina, millest sügavamale tungimine on võimatu. Sellist mehhanismi kasutavad näiteks *Acinetobacter baumannii* liiki kuuluvad tüved ning uuringud näitavad, et selle omadusega tüved on võrreldes üksikrakkudega 1000 korda resistentsemad (Gedefie et al., 2021). Bakterikoloonias võivad olla ka persistor-rakud, mis ei paljune koloonia sees, kuna nende metabolism on seisatatud. Need rakud annavad kolooniale resistentsuse, kuna enamus antibiootikume peatavad bakteri ainevahetuse, kuid ei saa midagi teha juba

inaktiivse bakteri puhul. Püsirakud taasaktiveeruvad kui teised bakterirakud nende ümber neile signaale enam ei anna. Sellist mehhanismi kasutavad näiteks *S. aureus* bakteritüved ja uuringus leiti, et nad kasutavad toksiin-antitoksiin süsteemi püsirakkude signaliseerimiseks (Kim et al., 2025). Isegi antibiootikumide suhtes tundlikud bakterid on võimelised neid meetodeid kasutades pärast antibiootikumikuuri ellu jääma.

1.3. Antibiootikumiresistentsuse tuvastamise meetodid

Nagu eelnevalt kirjeldatud, on AMR bakterid meditsiinis suur väljakutse. Seetõttu on täpse resistentsusprofiili määramine väga oluline nii eduka ravitulemuse kui ka AMR edasise leviku pidurdamise seisukohalt. Euroopas määrab resistentsuse murdepunkte Euroopa Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Komitee (EUCAST). EUCAST uuendab oma eesmärke igal aastal, et olla võimalikult ajakohased oma regulatsioonide ja uuringutega. Hetkel on nende üheks peamiseks ülesandeks ühtlustada ja optimeerida antibiootikumi tundlikkuse testimise (AST) meetodeid ning standardiseerida murdepunkte, et suunata tõhusat ravi ja võidelda AMR-i leviku vastu (https://www.eucast.org/eucaststatutes). Ameerikas on vastavaks organisatsiooniks CLSI (https://clsi.org/about/history-impact/).

EUCAST'i kliinilise resistentsuse murdepunktid esitatakse minimaalse inhibeeriva kontsentratsioonina (MIK). MIK ühikuks on milligramm antibiootikumi liitri kasvumeediumi kohta (mg/L). MIK väärtuste määramiseks tehakse AST, millega leitakse bakteri reaktsioon erinevatele antibiootikumidele. AST läbiviimine on muutunud aja jooksul tunduvalt kiiremaks ja lihtsamaks (Giske et al., 2022).

EUCAST'i kliinilise resistentsuse murdepunktid eristavad kolme kategooriat: tundlik (T), mittetundlik (MT), resistentne (R) (Giske et al., 2022). Murdepunktide määramise aluseks on farmakokineetilised, farmakodünaamilised ja muud mikrobioloogilised andmed nagu näiteks AMR geograafilised trendid. Farmakokineetika uurib, kuidas antibiootikum käitub inimese kehas. Farmakodünaamika kirjeldab, kuidas antibiootikum baktereid mõjutab (Mouton et al., 2012).

1.3.1. Laboratoorsed meetodid

Laboratoorsete meetodite all üldiselt mõeldakse erinevate bakteri fenotüübiliste omaduste mõõtmist ja analüüsimist. Fenotüübipõhiste meetodite eelis on kindel vastus resistentsuse ja tundlikkuse osas, sest genotüübi põhised meetodid võivad anda valepositiivseid tulemusi palju suurema tõenäosusega (Nielsen et al., 2022).

Tänapäeval levinud AMR tuvastamise laboratoorseid metoodikaid ehk erinevad AST-d saab jagada kaheks: manuaalsed ja automatiseeritud meetodid. Peamised manuaalsed meetodid on puljongi mikrolahjendus, agari lahjendus, diski difusioon ja Etest. Tuntud automatiseeritud meetodid on VITEK süsteem, Sensititre ja Micro-scan *walk away*. Antud meetodite puhul on tähtis arvestada, et proove ei saa otse patsiendilt võtta. Eelnevalt peab tegema puhtad bakteri isolaadid, laskma neil kasvada ja nende liik identifitseerida. Kogu AST-le eelnev protseduur võib võtta nädalaid olenevalt sellest, milline proov jõuab mikrobioloogia laborisse (Puttaswamy et al., 2018). Viimastel aastatel on hakatud välja töötama ka süsteeme, mis on võimelised otse infektsioonikoldest võetud proove automaatselt analüüsima nagu EUCAST-i kiire antibiootikumi tundlikkuse testimine (RAST). RAST iseenesest on laiem termin mitme erineva uuendusliku meetodi jaoks, aga vereproovi põhised meetodid võimaldavad otse nakkuskoldest proovi võtta, mis kiirendab märkimisväärselt antibiootikumi suhtes resistentsuse diagnoosimist (Cherkaoui et al., 2022).

EUCAST MIK määramiseks on vaja eelnevalt teada ka bakteri liiki. Pikalt kasutati selleks erinevaid erilisi söötmeid ja keemilisi katseid. Kuigi kliiniliselt on nüüdseks levinum kasutada MALDI-TOF/MS, kuna see on kiire, efektiivne ja korduvkasutatav süsteem (Cherkaoui et al., 2022). MALDI-TOF/MS funktsioneerimismetoodika algab bakteri puhaskultuuri tegemisest. Järgmisena lisatakse maatrikslahus, mis kristalliseerub bakteriraku ümber ja valmistab ette järgmiseks etapiks. Kristalliseeritud bakterikultuur paigutatakse laserkambrisse, kus ioniseeritakse kristallmaatriksis asuva bakteri valgud. Kristallmaatriks peatab valkude fragmenteerumise ning järgmisena läheb ioniseeritud valk elektrivälja, kus mõõdetakse ioonide liikumiskiirust detektorini. Detektor mõõdab iooni massi ja laengut ning annab selle tulemusena massispektri. Kogu protseduuri saab läbi viia minutitega, mis on kordades kiirem kui muud meetodid. Igal bakteril on olemas referentsandmebaasis enda kindel massispekter, millega võrreldes tuvastatakse parim vaste katse käigus saadud tulemusele (Patel, 2015).

Puljongi mikrolahjenduse meetodis kasutatakse mikrotiiterplaate. Üks aukudest jäetakse tavaliselt ilma antibiootikumita, et toimida kontrollina. Kui igas augus on saavutatud sobiv kontsentratsioon, lastakse plaadil inkubeerida 12-24h. Iga rida kasvab antibiootikumi kontsentratsiooniga kahekordselt ja esimene rida, millel puudub bakteri kasv, loetakse MIK-iks. Lisaks saab mikrotiiterplaadil kasutada mitu erinevat antibiootikumi, et määrata erinevaid resistentsuseid samaaegselt (Ferraro, 2000).

Automatiseeritud meetodid kasutavad üldiselt erinevaid variatsioone manuaalsetest meetoditest. Tavaliselt on eelistatud puljongi mikrolahjenduse meetod, sest selle puhul saab masinasse sisestada puhta proovi ning edasi toimib kõik automatiseeritult. Pärast inkubeerimise ajavahemikku mõõdetakse bakteriaalset kasvu või kasvu puudumist sensoriga. Osad automatiseeritud meetodeid kasutavad erinevaid fluorestseeruvaid aineid ning *in situ* hübridisatsiooni, et saada usaldusväärsemaid tulemusi. Enamikel süsteemidel on olemas ka tarkvara, mis interpreteerib ka sensorite poolt mõõdetud väärtuseid (Puttaswamy et al., 2018).

RAST on üks uutest süsteemidest, mis võimaldab AST teostada otse vereproovist. See võimaldab jätta vahele 1-3 päevase isolaadi tegemise sammu ja võimaldab saada vastuse bakteri resistentsuste osas 4-8 tunniga. Meetod algab patsiendilt vereproovi võtmisega ning bakteri olemasolu määramisega, järgmisena tsentrifuugitakse inimese rasked rakud välja, et saada kontsentreeritumat kogust baktereid. Võimalik on ka kasutada uriiniproovi, aga sellisel juhul peab olem bakteri piisav kogus. Järgmisena pannakse proov automatiseeritud süsteemi nagu kiirendatud PhenoTest BC süsteemi, mis kasutab fluorestseeruvate ainete *in situ* hübridisatsiooni koos automatiseeritud mikroskoopiaga. Fluorestseeruvad ained on liigispetsiifilised, mis võimaldab tuvastada proovis oleva bakteri. Automatiseeritud mikroskoopia kasutab morfokineetilist rakuanalüüsi, mis mõõdab bakteriraku suurust, kuju ja jagunemist, et määrata resistentsust kiiremini kui tavalised AST süsteemid (Pancholi et al., 2018). Haiglates kasutatakse ka teisi automatiseeritud süsteeme nagu läbivoolutsütomeetria, et mõõta elusaid ja surnuid rakke ning määratakse bakteri identiteet MALDI-TOF/MS meetodiga (Puttaswamy et al., 2018).

1.3.2. *In silico* meetodid

Kuigi AST on jäänud kuldstandardiks, on AMR uurimisel hakatud kasutama ka teisi meetodeid nagu arvutipõhised *in silico* meetodid, sest neil on mitmeid praktilisi eeliseid (Lee et al., 2021).

In silico meetodite peamiseks eeliseks on kiire ja soodne vastuse saamine, mis eemaldab fenotüübi testide materjali vajadused ja vähendab laboris manuaalse töö kogust (Lee et al., 2021). Sõltuvalt tööpõhimõttest võib bakteriaalse DNA järjestuse baasil resistentsuse tuvastamiseks kasutatavad *in silico* meetodid jagada kahte rühma: homoloogiaotsingutel põhinevad ja masinõppepõhised (MÕ) meetodid. Genoomijärjestustel põhinevate meetodite puhul võib esineda suuremas koguses valepositiivseid tulemusi kui fenotüübipõhiste meetodite puhul (Nielsen et al., 2022). Üheks põhjuseks on sekveneerimisest tulenevad vead, mis omakorda tähendab, et resistentsusgeenide andmebaasis võib olla väikeste vigadega järjestusi ja ka uuritavas järjestuses võib veel omakorda vigu esineda (Stoler et al., 2021). Teiseks põhjuseks on ARG ise, kuna erinevatesse ARG andmebaasidesse kogutakse tihti kõik geenid, mis on võimelised mõjutama bakteri reaktsiooni antibiootikumi suhtes. Osa neist geenidest kodeerivad valke, mille ekspresseerumisel tekib ainult väike muutus antibiootikumi suhtes ja bakteritüvi on MIK alusel siiski tundlik (Nielsen et al., 2022). Kolmandaks ebatäpsust tekitavaks asjaoluks on komplekssemad antibiootikumiresistentsuse mehhanismid. Näiteks efflukspumbad vajavad ko-ensüüme, et toimida efektiivse resistentsusmehhanismina. Efflukspumba puhul on üldiselt vaja seda ülekspresseerida, et tekiks resistentsus antibiootikumi suhtes. (Zack et al., 2024). Need muutujad on ka üksteist mõjutavad ning tulemusena võib esineda suhteliselt suur erinevus laboris tehtud katsel ja programmi poolt ennustatul. Seega efflukspumpa kodeeriva geeni tuvastamine bakterigenoomis ei tähenda veel resistensuse olemasolu.

Homoloogiapõhised AMR programmid on oma üldise funktsiooni poolest suhteliselt lihtsad. Nad kasutavad etteantud andmebaasi, kus on olemas teistes teadustöödes kindlaks tehtud ARG-d ning proovivad nende taolisi geenisegmente leida uuritavast genoomist/järjestusest. Seda nimetatakse joondamiseks ning selle jaoks oli esmalt väljatöötatud algoritm BLAST (Altschul et al., 1990). Vahel võib keeruliste või suure koguse järjestustega BLAST joondamine jääda aeglaseks ning siis kasutatakse uuemat algoritmi nagu DIAMOND (Buchfink et al., 2015), mis võimaldab joondamisprotsessi läbi viia kordades kiiremini. Leitud joondust saab hinnata erinevate parameetrite järgi nagu identsusprotsent, kattuvusprotsent, skoor ja E-väärtus, mida

saab kasutaja ise hinnata. Identsusparameetri aluseks on kattuvad nukleotiidid/aminohapped uuritava järjestuse ja andmebaasis oleva referentsjärjestuse vahel, jagatud kogu joondatud piirkonna nukleotiididega ning korrutatud sajaga. Skoori puhul liidetakse kokku kattuvate nukleotiidide/aminohapete eest saadud positiivsed punktid ja siis liidetakse negatiivsed punktid mitte kattuvate nukleotiidide/aminohapete eest. E-väärtus annab hinnangu sellele, kas vaste on juhuslik, võrreldes saadud skoori teiste sarnaste järestustega andmebaasis (Kaiv et al., 2016). Kattuvus on joonduses referentsjärjestuse osa, mis on kaetud uuritava järjestuse poolt, jagatud kogu referentsjärjestuse pikkusega ning korrutatud sajaga (Sims et al., 2014).

Homoloogiapõhised AMR programmid kasutavad eelnimetatud parameetreid, et automaatselt hinnata saadud tulemuste usaldusväärsust, annavad vastuse kiiresti ja on lihtsad kasutada. See lihtsustab töövoogu erinevate programmide kasutamisel. Üheks eelduseks iga seda meetodit kasutaval programmil on andmebaas, kuhu on kogutud ARG-d. Iga ARG andmebaas koosneb erinevate kriteeriumite põhjal kogutud geenidest, mis on leitud erinevatest allikatest. Levinud programmid, millel on oma spetsiifiline ARG andmebaas on ResFinder (Bortolaia et al., 2020), RGI (Alcock et al., 2023) ja AMRFinderPlus (Feldgarden et al., 2021). ResFinder-i ja RGI ning nende poolt kasutatavate andmebaaside täpsem kirjeldus on vastavalt peatükkides 1.3.3. ja 1.3.4. AMRFinderPlus programmi arendas välja NCBI (ingl. *National Center for Biotechnology Information*) organisatsioon eesmärgil tuvastada AMR geene (25.03.2025 seisuga 7586 geeni), stressivastuse regulaatorgeene (257), virulentsusgeene (976) ja punkmutatsioone antibiootikumi sihtmärkgeenides (1429). AMRFinderPlus kasutab *Reference Gene Catalog* andmebaasi (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/). Programm võtab sisendina assambleeritud nukleotiidseid ja valgulisi järjestusi ning kasutab joondamiseks BLAST algoritmi. Andmebaasi uuendatakse perioodiliselt ning punktmutatsioonide informatsioon kogutakse CARD ja ResFinder andmebaasidest (Feldgarden et al., 2021).

Homoloogiapõhiste meetodite vead jaotuvad valepositiivseteks ning valenegatiivseteks, ehk vastavalt ülehinnatud resistentsus ja alahinnatud resistentsus vastava antibiootikumi suhtes. Valepositiivsed tulemused tulenevad juba eelpool mainitud kahest asjaolust. Valenegatiivse tulemuse põhjuseks on enamasti asjaolu, et andmebaasis puudub konkreetne ARG või punktmutatsioon, mis on uuritavas bakteris tegelikuks resistentsuse põhjustajaks. ARG andmebaasist puudumisel võib olla mitu põhjust: uus mutatsioon eelnevalt tuntud ARG-le, siiani avastamata ARG ja siiani tundmatu punktmutatsioon sihtmärkvalgu geenis (Lund et al.,

2023). Nii valepositiivsed kui valenegatiivsed on probleemiks, kuna AMR ei tohi ülehinnata ega alahinnata optimaalse ravikuuri määramisel.

Kohati puudulikult dokumenteeritud ARG-de tulemusena on viimastel aastatel muutunud AMR tuvastamisel populaarseks just masinõppel (MÕ) põhinevate programmide arendamine, mis ei sõltu ARG järjestuste andmebaasidest kas üldse (näiteks Kover (Drouin et al., 2019), PhenotypeSeeker (Aun et al., 2018)) või kombineerivad homoloogiaotsinguid MÕ-ga, mis võimaldab leida ARG-de kaugemaid homolooge (näiteks programm DeepARG (Arango-Argoty et al., 2018)). MÕ meetodite aluseks on mustrite tuvastamine. Selleks kasutatakse mitmeid erinevaid algoritme nagu näiteks k-meeride klasterdamine, logistiline regressioon, otsustuspuu, otsustusmets jne. On mitmeid erinevaid AMR tuvastamise programme, mis on loodud MÕ algoritmide baasil ja neid saab jaotada omakorda kaheks: üldised AMR tuvastajad ja liigispetsiifilised AMR tuvastajad. Liigispetsiifilised programmid on kasutusel teadustöödes, kus uuritakse kindlat liiki bakteri omadusi. Samas üldised MÕ AMR tuvastamisprogrammid on kasulikumad kliinilises kontekstis juhul, kui puudub eelteadmine, milline patogeen infektsiooni tekitas (Hu et al., 2024).

Hetkel on leitud, et MÕ põhised programmid ei ole AMR tuvastamisel siiski väga palju efektiivsemad kui homoloogiapõhised programmid. MÕ põhised programmid on ka palju suurema ajakuluga ja palju suurema arvutusliku koormusega kui homoloogiapõhised meetodid, sest mudeli treenimine on pikk ja keeruline protsess. Kokkuvõttes on vaja rohkem arvutusressursi. Veel üheks nõrkuseks on MÕ põhistel programmidel suur sõltuvus mudeldamiseks valitud genoomide mitmekesisusest (Hu et al., 2024). Lisaks, kui mudel on treenitud, siis selle poolt ennustatud resistentsust või tundlikust ei saa viia kokku seda tekitava geeni ja/või mehhanismiga, sest programmid väljastavad tüüiliselt vaid ennustatud fenotüübi (de la Lastra et al., 2024).

1.3.3. ResFinder

ResFinder on AMR tuvastamise programmide seas üks enim kastutatuid, kuna neil on hästi kureeritud andmebaas ning programmi on lihtne ja kiire kasutada. ResFinder programmile on loodud ka veebipõhine platvorm (Florensa et al., 2022). ResFinder kasutas varem ainsa algoritmina BLASTi (Kaiv et al., 2016), kuid nüüd on võimalus analüüsida ka

sekvneerimislugemeid ning selleks rakendatakse KMA algoritmi (Clausen et al., 2018) ehk k-meeride joondamist referentsjärjestusele. Alates ResFinder 4.0 versioonist on programmiga liidetud ka PointFinder, mis otsib resistentsusega seotud teadaolevaid liigispetsiifilisi punktmutatsioone. Väljundina annab programm uuritavast järjestusest tuvastatud ARG-ide nimekirja koos identsus- ja kattuvusprotsendiga ning leitud punktmutatsioonid. Hetkeseisuga on võimalik otsida punktmutatsioone vaid 11 erinevast bakteriliigist, sh *Escherichia coli*'st. Programmi kasutaja saab programmi jooksutamisel valida nii identsuse kui ka katvuse lävendid. Näiteks saab väljastada ka sellised ARG-d, millest suudeti tuvastada vaid 50% andmebaasis oleva järjestuse kogupikkusest, mis on kasulik haruldaste ja vähe uuritud resistentsusgeenide tuvastamiseks. Üheks probleemiks sarnaselt teiste homoloogiapõhiste AMR ennustusprogrammidega on ka ResFinderi puhul ARG mõju tugevus, mida on genoomsete andmete põhjal väga keeruline ennustada. Tulemuseks võib-olla, et programm tuvastab küll ARG, kuid see ei ekspresseeru piisavalt tugevalt, et bakter osutuks vastavalt MIK lävenditele resistentseks.

ResFinder andmebaas koosneb Lahey kliinikumi β-laktamaaside kollektsioonist (Bradford et al., 2022), alates 2009. a enam mitte uuendatavast ARDB (ingl. *Antibiotic Resistance Genes Database*) andmebaasist pärit resistentsusgeenidest (Liu et al., 2009) ja regulaarselt teaduslike ülevaadete põhjal lisatavatest ARG-de järjestustest (Bortolaia et al., 2020). Hiljem ühendati Resfinderiga resistentsust põhjustavate punktmutatsioonide tuvastamiseks loodud PointFinder. Resfinder ja PointFinder andmebaase uuendatakse käsitsi ekspertide poolt regulaarselt ja andmete jaoks on määratud kindel kriteerium, et geen või mutatsioon peab olema kliiniliselt valideeritud resistentsusfenotüübiga seotud. 16. mai 2025 seisuga on ResFinder andmebaasis 3213 ARG-d (versioon 2.6.0) ja PointFinder andmebaasis (versioon 4.1.1) on 1332 punktmutatsiooni (Florensa et al., 2022).

1.3.4. CARD andmebaas ja RGI programm

CARD andmebaas (ingl. *Comprehensive antibiotic resistance database,* (Alcock et al., 2023)) on märkimisväärselt mahukam kui ResFinder ja PointFinder andmebaasid kokku. Selle põhjuseks on erinevad kriteeriumid, mille alusel ARG-d on kogutud. CARD andmebaasi puhul kogutakse kõiki resistentsust seotud geene, mis on publitseeritud eelretsenseeritud teadusajakirjas, samas kui ResFinder kogub ainult kliiniliselt tähtsaid ning valideeritud resistentsusgeene ja

PointFinder kliiniliselt tähtsaid ning valideeritud mutatsioone (Florensa et al., 2022). CARD andmebaasi on ARG-d lisatud lähtuvalt kolmest kindlast kriteeriumist: ARG järjestus peab olema GenBank andmebaasis, suurendama MIK väärtust ning olema publitseeritud eelretsenseeritud teadusajakirjas, aga erandiks on β-laktamaasid, mida nimetatakse kiiremini, kui neid valideerida suudetakse. 16. mai 2025 seisuga on CARD andmebaasis 8526 ARG-d, neist 6442 referentsjärjestust, 4542 SNP-d, 3328 teadusartikli publikatsiooni ja 6490 AMR tuvastamise mudelit. Andmebaasi uuendatakse üldiselt umbes 1 kord kuus (https://github.com/arpcard/FAQ)

CARD andmebaasi juurde loodud programm RGI suudab erinevalt ResFinderist analüüsida nii nukleotiidseid järjestusi (geenid, genoomid, metagenoomid) kui ka valgujärjestusi. Teise erinevusena ResFinderist ennustab RGI nukleotiidsete järjestuste analüüsimisel esmalt avatud lugemisraamid programmiga Prodigal (Hyatt et al., 2010). RGI kasutab homoloogiaotsinguks DIAMOND (valgujärjestuste puhul) või BLAST algoritmi (nukleotiidsete järjestuste puhul). Eraldiseisva programmiga rgi-bwt saab analüüsida ka sekveneerimislugemeid (https://github.com/arpcard/rgi/blob/master/docs/rgi_main.rst) RGI väljastab tulemused vastavalt kasutatud mudelitele kolmes vastavuskategoorias: *Perfect, Strict* ja *Loose.* Need kategooriad olenevad joonduse kattuvusest ja identsusprotsendist ning võimaldavad hinnata, kui usaldusväärselt võib leitud vastet pidada tõeliseks ARG-iks.

Perfect ehk täpne vaste tähendab, et leitud järjestus vastab 100% identsuse ja kattuvusega teadaolevale resistentsusgeenile. Identsuse ja kattuvuse baasil arvutatakse lisaks *bit*-skoor, mille alusel määratakse vaste sobivus vastavalt *Strict* või *Loose* mudeliga. *Strict* ehk range vaste puhul peab identsus ja kattuvus olema ≥95% ning see loetakse samuti kõrge usaldusväärsusega vasteks. *Strict* mudeli bit-skoori piiride sisse proovitakse leida usaldusväärseid uusi variatsioone tuntud ARG-dele. *Loose* mudel väljastab vasted, mille bit-skoor on madalam kui *Strict* mudeli oma. Mudeli vasted võivad olla potentsiaalselt uued ARG-d, kuid sisaldavad samas suurel hulgal valepositiivseid tulemusi. RGI võimaldab tuvastada ka teadaolevaid resistentsusega seotud punktmutatsioone kasutades nn. SNP mudelit (https://github.com/arpcard/rgi/blob/master/docs/rgi_main.rst).

CARD andmebaas kasutab geenide puhul ontoloogiat, mille alusel grupeeritakse erinevad geenid kokku ja nende grupeeringute puhul tehakse lisaseoseid resistentsuse osas, mida pole laboratoorselt dokumenteeritud (Alcock et al., 2023). Sellest tuleneb omakorda CARD andmebaasi kasutava RGI programmi probleem, milleks on resistentsuse fenotüübi

ülehindamine. Programmi loojad siiski väidavad, et RGI on võimeline filtreerima välja üleliigsed valepositiivsed vastused karmimate mudelite (*Perfect* ja *Strict*) abil (Papp et al., 2022). Programmi väljundis kuvatakse ARG nimi, asukoht uuritavas järjestuses, identsusprotsent võrreldes vastava CARD andmebaasi järjestusega, resistensusmehhanismi lühikirjeldus, antibiootikumi klass ja üldiselt ka antibiootikumide nimekiri, mille resistentsusega teaduskirjanduse põhjal vastav geen seotud on. Lisaks saab käsurea programmiga visualiseerida tulemusi kuumuskaardina, et saada ülevaadet geenide resistentsuste kattuvuse osas. RGI programmist on olemas ka veebiversioon, aga suurema võimekusega on käsureapõhine programm (Alcock et al., 2023).

RGI ja ResFinderi genotüübist fenotüübi ennustamise osas on tehtud eelnevalt võrdlevaid uuringuid. Uuringus, mille oli teostas Mahfouz et al. 2020, võrdles avalikest andmebaasidest saadud bakteri 2587 isoleeritud genoomi, millel oli teostatud AST. Uuringus kasutati 5 erinevat bakteriliiki, millest üks oli *E. coli*. Määrati programmide üldine tasakaalustatud täpsuste keskmine, kuna andmestikud olid resistentsete ja tundlike tüvede osas tasakaalust väljas. *E. coli* kohta saadi ResFinderi tulemuseks 0,73 ja CARD/RGI tulemuseks 0,50. Lisaks kasutati mõõdikuid VME (ingl. *very major error*) ja ME (ingl. *major error*), kus VME oli valenegatiivsete tulemuste osakaal resistentsetest tulemustest ja ME oli valepositiivsete tulemuste osakaal tünlikest tulemustest. Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (FDA) kasutab neid mõõdikuid, et otsustada uute diagnostiliste testide kasutusele võtmist. VME peab olema <1,5% ja ME peab olema <3%. ResFinderi tulemustes oli keskmiselt VME 3,99% ja ME 29,76%. RGI tulemused olid keskmiselt ME 65,4% ja VME polnud. Nad leidsid, et ResFinderi tulemused olid üldiselt paremad välja arvatud fluorokinoloonide puhul (Mahfouz et al., 2020).

1.4. *Eschericia coli* kui inimese patogeen

Eschericia coli on gram-negatiivne, fakultatiivselt anaeroobne bakter, keda leidub tavaliselt püsisoojaste loomade jämesooles. Kuigi enamus *E. coli* liigist on inimese suhtes kommensaalid, elades jämesooles ning konkureerides teiste ohtlikumate bakteritega, leidub ka patogeenseid *E. coli* tüvesid, mis on inimesele kahjulikud. Taolised patogeensed tüved tekitavad inimeses infektsioone nagu gastroenteriit, kuseteede infektsioonid, sepsis ja meningiit. Selle alusel saab patogeenseid *E. coli* tüvesid jaotada seedeelundkonna patogeenideks ja seedeelundkonna

välisteks patogeenideks. Seedeelundkonnas elavad patogeensed *E. coli*'d võivad toota Shiga toksiini või enterotoksiini (Nasrollahian et al., 2024). Shiga toksiini tootev *E. coli* loetakse üheks kõige levinumaks ja ohtlikumaks patogeenseks tüveks, mille nakkuse sümptomiteks on verine kõhulahtisus, palavik ja oksendamine. Enamasti inimene paraneb sellest, kuid osadel juhtudel võib tekkida hemolüütilise ureemia sündroom, kus tekib akuutne neerufunktsiooni peatumine, hemolüütiline aneemia ja vereliistakute aneemia, millesse patsient võib surra (*E. coli*, n.d.). Seedeelukonna väliste patogeensete *E. coli*'de hulka kuuluvad uropatogeensed ja neonataalsed meningiitsed *E. coli*'d (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli).

Selliste tõsiste bakteriaalsete infektsioonide puhul on tavaprotseduuriks antibiootiline ravi, kuid nendel samadel patogeensetel *E. coli* tüvedel on tekkinud vahel AMR, mis takistab antibiootikumide toimimist. Peamisteks AMR mehhanismideks *E. coli* tüvedel on antibiootikumi ensümaatiline lagundamine, sihtmärkvalgu modifikatsioon, efflukspumbad antibiootikumi rakust aktiivseks väljapumpamiseks ja membraani läbilaskvuse vähendamine (Nasrollahian et al., 2024). Erinevate antibiootikumide klasside suhtes on *E. coli* AMR tüvedel välja kujunenud erinevad resistentsusmehhanismid, mis on Urban-Chmiel et al 2022 põhjal kokkuvõtlikult välja toodud tabelis 1. Osade geenid kodeerivad multiresistentsusega seotud valke. Näiteks *tet* geenide poolt kodeeritavad efflukspumbad on võimelised pumpama välja enamus tetratsükliini klassi kuuluvaid antibiootikume.

Tabel 1. *E. coli* antibiootikumiresistentsusmehhanismid sõltuvalt antibiootikumiklassist ja nendega seotud geenid. Osade geenide puhul on kirjeldatud mitme erineva antibiootikumi klassi suhtes resistentsuse tekitamise võime. Näiteks mõned efflukspumbad on võimelised mitmeid erinevaid antibiootikume välja pumpama. Antibiootikumi klassid on esitatud alustades nn. esimese liini antibiootikumidest ja lõpetades viimase valiku antibiootikumidega. Samas näiteks β-laktaamide alla kuuluvad nii penitsilliinid, mis on esimese liini antibiootikumid, kui ka karbapeneemid, mis on viimane valik MDR nakkuste puhul (Urban-Chmiel et al., 2022).

Antibiootikumi klass	**Resistentsus-mehhanism**	**Osalevad valgud**	**Näiteid levinuimatest *E. coli* geenidest/valkudest**

Sulfonamiidid	Sihtmärgi asendamine	Dihüdropteroaat süntetaas (sul)	*sul1, sul2, sul3, sul4*
Trimetopriim	Sihtmärgi asendamine	Dihüdrofolaat reduktaas (dfr)	*dfrA, dfrD*
Fenikoolid	Antibiootikumi inaktiveerimine	Kloramfenikooli atsetüültransferaas (CAT)	*catI, catB2, catB3*
	Aktiivne väljapumpamine	Effluxpumbad	*cmlA, floR*
	Sihtmärgi modifitseerimine	rRNA metülaas	*cfr*
Tetratsükliinid	Aktiivne väljapumpamine	Effluxpumbad	*tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(J), tet(L), tet(Y)*
	Sihtmärgi blokeerimine	Ribosoomi seondumiskohta blokeerivad valgud	*tet(M), tet(W)*
	Antibiootikumi inaktiveerimine	Oksidoreduktaasid	*tet(X)*
β-laktaamid	Antibiootikumi hüdrolüüsimine	β-laktamaasid (ESBL)	CTX-M, SHV, TEM, OXA, PER, VEB, BES, GES, SFO, TLA, IBC
		Karbanemaasid	NDM, OXA
		Kromosomaalsed mutatsioonid	AmpC β-laktamaasid
Fluorokinoloonid	Sihtmärkvalgu modifitseerimine	Mutatsioonid topoisomeraas II (Gyr) ja topoisomeraas IV (Par)	GyrA, GyrB, ParC
		Plasmiidiga ülekanduvad valgud	Qnr, AAC(6')-ib-cr
	Aktiivne väljapumpamine	Effluxpump	QepA, OqxAB, AcrAB-TolC, EmrAB, MdfA, TehA, EmrE, AcrE, EmrD
Aminoglükosiidid	Sihtmärgi modifitseerimine	Ribosomaalne (16S-RMTase) metülatsioon - metüültransferaas	*amrA*, *rmtB*, *rmtD*, *rmtE*, *npmA*
		Atsetüültransferaasid (AAC), fosfotransferaasid (APH), nukleotidüültransferaasid (ANT)	AAC(3)-II/IV, AAC(6)-Ib, *strA* (APH(6)-la), *strB* (APH(6)-ld), *aadB* (ANT(2')), *aadA* (ANT(3'))
Polümüksiinid	Membraani läbilaskvuse muutmine	Plasmiidiseoselised geenid	*mcr1-mcr10*
		Kromosomaalsed mutatsioonid, mille tulemusena tekivad modifikatsioonid lipopolüsahhariidides	*pmrA, pmrB, phoP, phoQ*

Antibiootikumi ensümaatilist degradatsiooni viivad läbi β-laktamaasid, sh laiendatud toimespektriga β-laktamaasid (ESBL) (nt. CTX-M, TEM, SHV), mis hüdrolüüsivad penitsilliinide ja tsefalosporiinide klassi kuuluvaid antibiootikume. Teised levinud β-laktamaasid on karbapenemaasid nagu NDM ja KPC, mis tekitavad resistentsust karbapeneemidele, mida kasutatakse ravis tihti viimase lahendusena. Efflukspumpasid kodeerivad geenid *acr*AB-*tol*C peavad olema üleekspresseeritud selleks, et pumbata bakterirakust välja fluorokinoloone ja tetratsükliine. Membraani läbilaskvust muutvad geenid *omp*F/C mõjutavad membraani poriine ja põhjustavad resistentsust karbapeneemide suhtes. Ohtlikuteks plasmiidis kodeeritud ARG-deks on *mcr-1* ja *mcr-10*, mis põhjustavad resistentsust kolistiinide suhtes. Kolistiini resistentsus on levinud mure veterinaarses ravis (Nasrollahian et al., 2024). Kliiniliselt eriti ohtlikeks ARG-deks loetakse ESBL-ide puhul CTX-M (levinum on CTX-M-15), TEM, OXA (Jain et al., 2021). Karbapenemaaside resistentsuse puhul on levinud NDM (levinud Lõuna-Aasias (Jain et al., 2021)) KPC ja OXA-48 (Nasrollahian et al., 2024). Fluorokinoloonide resistentsust annavad plasmiidis paiknev *qnr* geen ja *gyrA-s* ning *parC* geenides esinevad mutatsioonid, geenid kodeerivad DNA güraasi (topoisomeraas II) ja topoisomeraas IV. Tihti koos leitud geenid multiresistentsetel (MDR) tüvedel on *tet*, *sul* ja *aac(6')-Ib*. Taolised tüved on resistentsed tetratsükliinide, sulfonamiidide ja aminoglükosiidide suhtes (Nasrollahian et al., 2024).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

1. Tuvastada antibiootikumiresistentsuse geenid Eestis kogutud kliinilistes *Escherichia coli* tüvedes, kasutades tööriistu ResFinder ja RGI ning määrata nende põhjal tüvede resistentsusfenotüübid.
2. Võrrelda ResFinderi ja RGI poolt ennustatud fenotüübilist resistentsust laboratoorsete antibiogrammidega ning arvutada tööriistade sensitiivsuse, spetsiifilisus, täpsus ja F_1 skoor.
3. Hinnata ResFinderi ja RGI üldist täpsust ning sobivust Eestis isoleeritud kliiniliste *E. coli* tüvede antibiootikumiresistentsuse määramiseks.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Andmed

Töös kasutasin RITA projekti "Antibiootikumiresistentsuse levikuteed ja resistentsuse ohjamise võimalused" raames aastatel 2019-2022 kogutud *E.coli* tüvede sekveneeritud ja assambleeritud genoomijärjestusi. Uuringusse oli kaasatud kaheksast Eesti tervishoiuasutusest hospitaliseeritud ja ambulatoorsed patsiendid, kellelt isoleeriti nii resistentseid kui tundlikke bakteritüvesid erinevatest liikidest, sh *E.coli* tüved. Iga resistentse tüvega patsiendi kohta lisati samast raviasutusest tundliku mikroobitüvega patsient. Hospitaliseeritud patsientide enterobakterid isoleeriti verest ja ambulatoorsete patsientide puhul uriinist. Minu töös kastutasin kogutud tüvedest 214 tüve assambleeritud genoome.

Tüvedele oli teostatud laboratoorne AST test. Laboris kontrolliti resistentsust järgnevate antibiootikumide suhtes: amikatsiin, amoksitsilliin, ampitsilliin, astreonaam, tsefepiim, tsefiksiim, tseftasidiim, tseftriaksoon, tsefuroksiim, tsefaleksiin, tsiprofloksatsiin, ertapeneem, fosfomütsiin, gentamitsiin, imipeneem, levofloksatsiin, metsillinaam, meropeneem, nitrofurantoiin, norfloksatsiin, piperatsilliin, piperatsilliin + tasobaktaam, tigetsükliin, tobramütsiin, trimetoprim, trimetoprim + sulfametoksasool. Antud antibiootikumide AST

väärtused iga *E. coli* tüve kohta on toodud välja Lisas 1 ja Lisas 2. AST tulemustele määrasin MIK murdepunktide alusel resistentsusfenotüübid, kasutades EUCAST murdepunktide tabelit versioon 15.0 (seisuga 01.01.2025). Analüüsist eemaldasin fosfomütsiini, sest EUCAST juhend viitab teatud diagnooside ja manustamisviiside puhul ebapiisavale kliinilisele infole murdepunktide täpseks määrmiseks. MIK murdepunktide alusel puudusid andmestikus resistentsed tüved järgmistel antibiootikumidel: ampitsilliin, tsefuroksiim, tsefaleksiin, imipeneem, metsillinaam, meropeneem, nitrofurantoiin, trimetoprim ja trimetoprim + sulfametoksasool.

2.2.2. Resistentsuse ennustamine genoomiandmetest

Installeerisin Linuxi serveris ResFinder programmi käsureaversiooni (versioon 4.6.0) koos selle eeldusprogrammidega. Järgmisena laadisin alla ResFinderi andmebaasi (versioon 2.4.0) ja PointFinderi andmebaasi (versioon 4.1.1). Programmide käivitamisel määrasin nii identsuse kui kattuvuse lävendiks 0,5, et tulemused oleksid võrreldavad RGI *Loose* mudeli tulemustega. Lisaks täpsustasin PointFinder'i puhul bakteriliigina *Escherichia coli*.

Installeerisin Linuxi serveris RGI programmi käsureaversiooni (versioon 6.0.3) koos selle eeldusprogrammidega. Programmi installatsiooniga kaasnes ka CARD andmebaas, mille versiooniks oli 3.3.0. RGI programmi käivitades lisasin parameetrid *--include_loose* ja *--low_quality*, et saada tulemustesse vastavalt ka *Loose* mudeli tulemusi ja poolikuid geene.

2.2.3 Statistiline analüüs

Mõlema programmi poolt ennustatud tulemusi kõrvutasin AST abil määratud resistentsusfenotüüpidega ning tuvastasin nii ResFinderi kui RGI puhul

- tõesed positiivsed (TP) - MIK põhjal resistentne tüvi ennustati ka programmi poolt resistentseks (tuvastati resistentsusgeen)
- tõesed negatiivsed (TN) - MIK põhjal tundlik/vahepealne tüvi ennustati ka programmi poolt tundlikuks (resistentsusgeene ei tuvastatud)

- valepositiivsed (VP) – MIK põhjal resistentne tüvi ennustati programmi poolt tundlikuks (resistentsusgeene ei tuvastatud)
- valenegatiivsed (VN) - MIK põhjal tundlik/vahepealne tüvi ennustati programmi poolt resistentseks (tuvastati resistentsusgeen)

Seejärel arvutasin iga antibiootikumi puhul programmidele täpsuse, F_1 skoori, sensitiivsuse ja spetsiifilisuse järgnevate valemitega:

$$Täpsus = \frac{TP + TN}{TP + TN + VP + VN}$$

$$Sensitiivsus = \frac{TP}{TP + VN}$$

$$Spetsiifilisus = \frac{TN}{TN + VP}$$

$$F_1\ skoor = \frac{2 \times TP}{2 \times TP + FP + FN} = \frac{2 \times sensitiivsus \times positiivne\ prognoosiväärtus}{sensitiivus + positiivne\ prognoosiväärtus}$$

Positiivne prognoosiväärtus näitab, kui suur osa programmi poolt ennustatud tüvesid olid tõesed positiivsed. Lisaks teise eelnevalt teostatud uuringu tulemustega võrdlemiseks kasutasin tasakaalustatud täpsust, mille valem on:

$$Tasakaalustatud\ täpsus = \frac{sensitiivus + spetsiifilisus}{2}$$

Antud valemiga arvutasin mõlemale programmile keskmise tulemuse, jättes välja antibiootikumid, mille puhul ei olnud resistentseid tüvesid.

2.3. Tulemused

Tulemuste esialgsel võrdlusel kliiniliste AST tulemustega nägin, et valitud lävendite puhul programmid ülehindasid resistentsust. Eriti RGI, mis andis hinnangu, et kõikides analüüsitud genoomides esineb resistentsusgeene. Seetõttu otsustasin lävendeid kitsendada ning jätsin välja nii ResFinderi/PointFinderi <95% identsusega tulemused kui ka RGI *Loose* mudeli tulemused. ResFinderi osas vähendas valepositiivsete kogust, aga RGI osas oli resistentsus endiselt ulatuslikult ülehinnatud. Kuna RGI puhul selgus, et VP suurde arvu panustasid

peamiselt efflukspumpasid kodeerivad geenid, siis eemaldasin ka need. Lisaks eemaldasin RGI väljundist punktmutatsioonide kaudu resistentsusega seotud geenid, millel puhul identsus vastava järjestusega oli <100%, sest ei saanud olla kindel, et just resistentsusega seotud mutatsioon selles geenis siiski olemas oli.

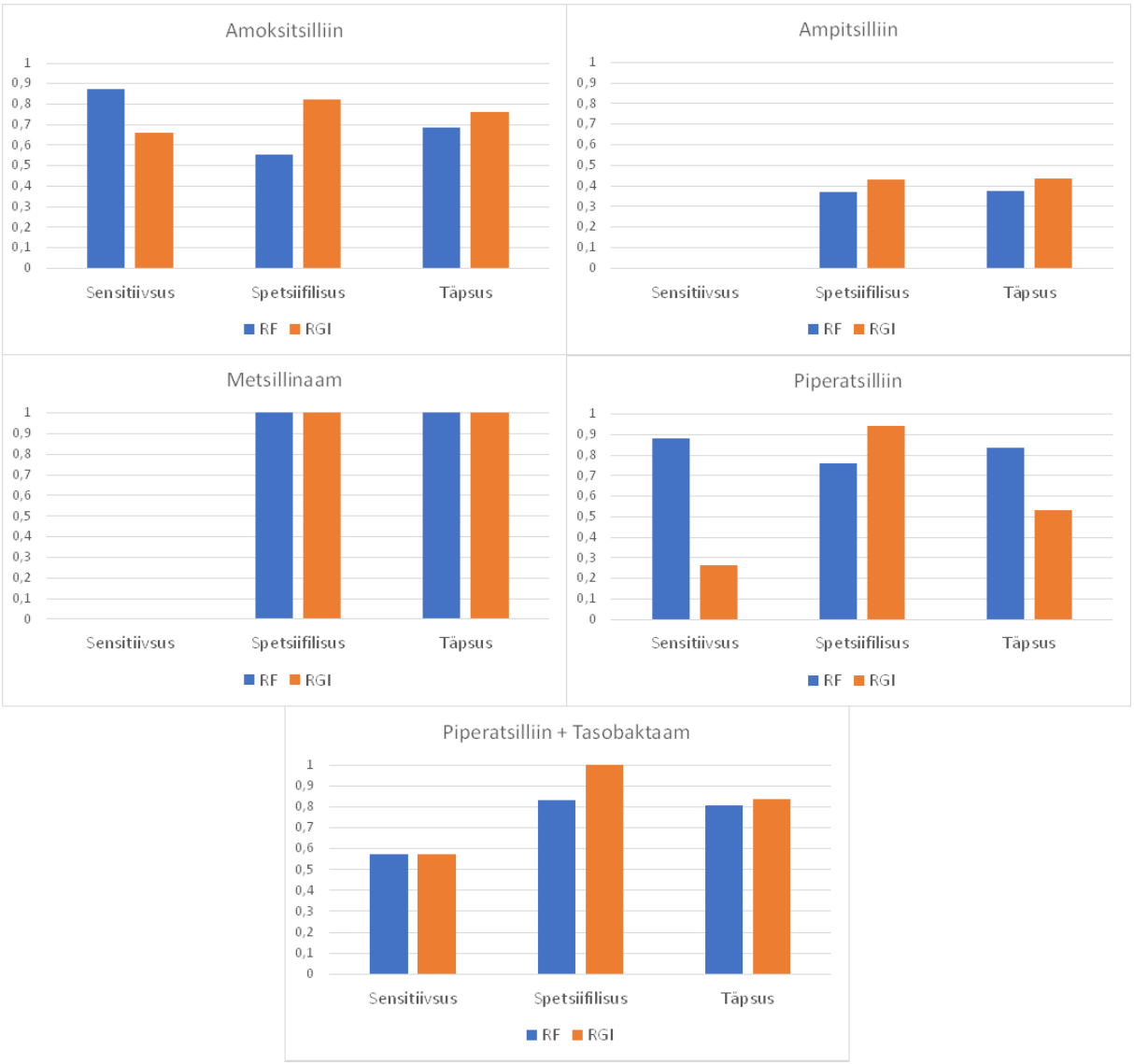
Statistilise analüüsi käigus selgus, et RGI ei suutnud tuvastada ühtegi astreonaami ega tsefepiimi resistentset tüve, kuid ResFinder tuvastas. Vastupidine olukord esines samuti, kus ResFinder ei tuvastanud resistentseid tüvesid ertapeneemi ega norfloksatsiini puhul, kuid RGI tuvastas. Leitud geenide nimekirja uurides leidsin, et mõlemad programmid tuvastasid sama resistentsusgeeni, kuid geeniga seotud antibiootikumid andmebaasides erinesid. Näiteks CTX-M-27, mis RGI andmetel annab resistentsuse tseftasoliini, tseftasidiimi, ertapeneemi, ampitsilliini ja tsefoksitiini suhtes. ResFinder andmebaasis on see geen aga seotud amoksitsilliini, ampitsilliini, astreonaami, piperatsilliini, tsefepiimi, tsefotaksiimi, tseftasidiimi, tseftriaksooni ja tikartsilliini resistentsusega. Nende vahel kattuvad ainult ampitsilliini ja tseftasidiimi resistentsus. Sarnaseid juhtumeid esines veel mitmeid.

Probleemi lahendamiseks tõlgendasin sellistel juhtudel mõlema programmi tulemust resistentse fenotüübina, kui vähemalt ühe programmi andmebaasis oli geen seotud vastava antibiootikumiga ning kirjandus toetas seda. Lahendus ühtlustas tulemusi märkimisväärselt ja RGI ennustustäpsus paranes tunduvalt. TP, TN, VP, VN väärtuseid kokku lugedes leidsin, et tihti ennustasid programmid samad tüved resistentseteks. Sellest saan järeldada, et resistentsusgeenide tuvastamisel on mõlemad programmid sarnase võimekusega, kuid kohati pärsitud kasutatavate andmebaaside sisu tõttu.

Lõplike tulemusnäitajate baasil koostasin joonised, kus tõin välja iga antibiootikumi kohta mõlema programmi sensitiivsuse, spetsiifilisuse ja täpsuse. Joonistel on antibiootikumid grupeeritud klassidesse (Joonised 2-7). Selgus, et programmide ennustusvõimekus on pigem seotud konkreetse antibiootikumiga mitte funktsionaalse klassiga.

Näiteks penitsilliinide klassis oli piperatsilliini puhul ResFinderi sensitiivsus ülekaalukalt parem, kui RGI-l. Samuti edestas ResFinder RGI-d sensitiivsuse poolest ka amoksitsilliini resistentsuse ennustamisel. Kombinatsiooni piperatsilliin + tasobaktaam suhtes resistentsuse tuvastamisel oli mõlema programmi sensitiivsus kasin (<0,6). Metsillinaami ja ampitsilliini puhul puudusid andmestikus MIK murdepunktide järgi resistentsed tüved, seega ei saanud nendele sensitiivsust arvutada. Valdavalt oli penitsilliinide puhul parema spetsiifilisusega RGI,

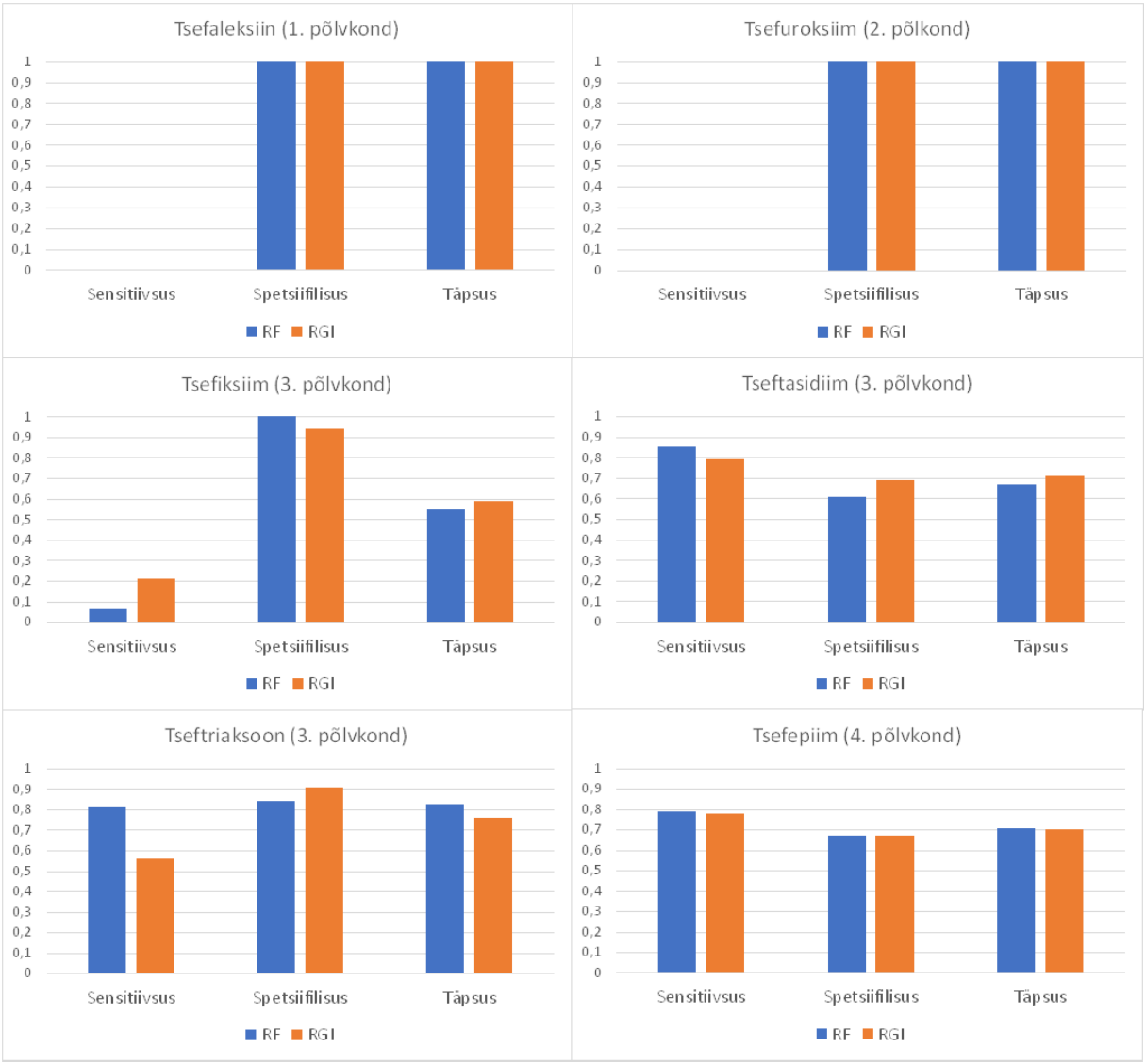
ennustades vähem valepositiivseid kui ResFinder. Mõlemad programmid määrasid valesti resistentseks suurel määral ampitsilliini tundlikke tüvesid (Joonis 2).



Joonis 2. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad penitsilliinide klassi antibiootikumide resistentsuse ennustamisel. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder. Ampitsilliini ja metsillinaami puhul ei olnud võimalik sensitiivsust arvutada, sest valimis puudusid resistentsed tüved.

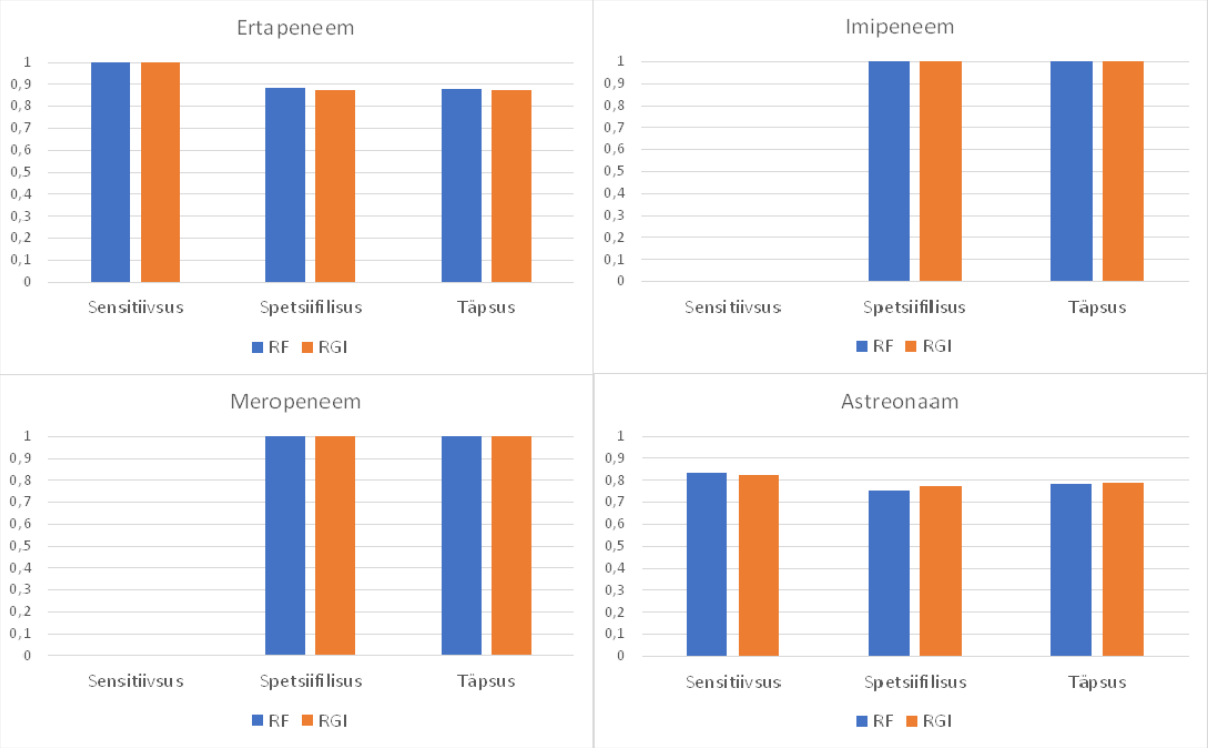
Tsefalosporiinide puhul esines varieeruvust ka põlvkondade siseselt. Näiteks 3. põlvkonda kuuluva tsefiksiimi puhul jäi nii ResFinderil kui ka RGI-l märkimisväärne hulk tegelikke resistentseid tüvesid tuvastamata, kuigi RGI tundlikus oli ResFinderist veidi kõrgem. Samasse põlvkonda kuuluvate tseftasidiimi ja tseftriaksooni resistentsuse tuvastamisel olid aga

mõlemad programmid tulemuslikumad. Tseftriaksooni resistentsust tuvastas edukalt ResFinder, saavutades nii väga hea sensitiivsuse, spetsiifilisuse kui ka täpsuse (>0,8). Tsefaleksiini (1. põlvkond) ja tsefuroksiimi (2. põlvkond) puhul polnud andmestikus resistentseid tüvesid ning mõlemad programmid ennustasid kõik tüved ka õigesti tundlikuks (Joonis 3).



Joonis 3. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad tsefalosporiinide klassi antibiootikumide resistentsuse ennustamisel. Joonisel on märgitud täpsustusena tsefalosporiinide kuuluvus erinevatesse põlvkondadesse. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder. Tsefaleksiini ja tsefuroksiimi puhul ei olnud võimalik sensitiivsust arvutada, sest valimis puudusid resistentsed tüved.

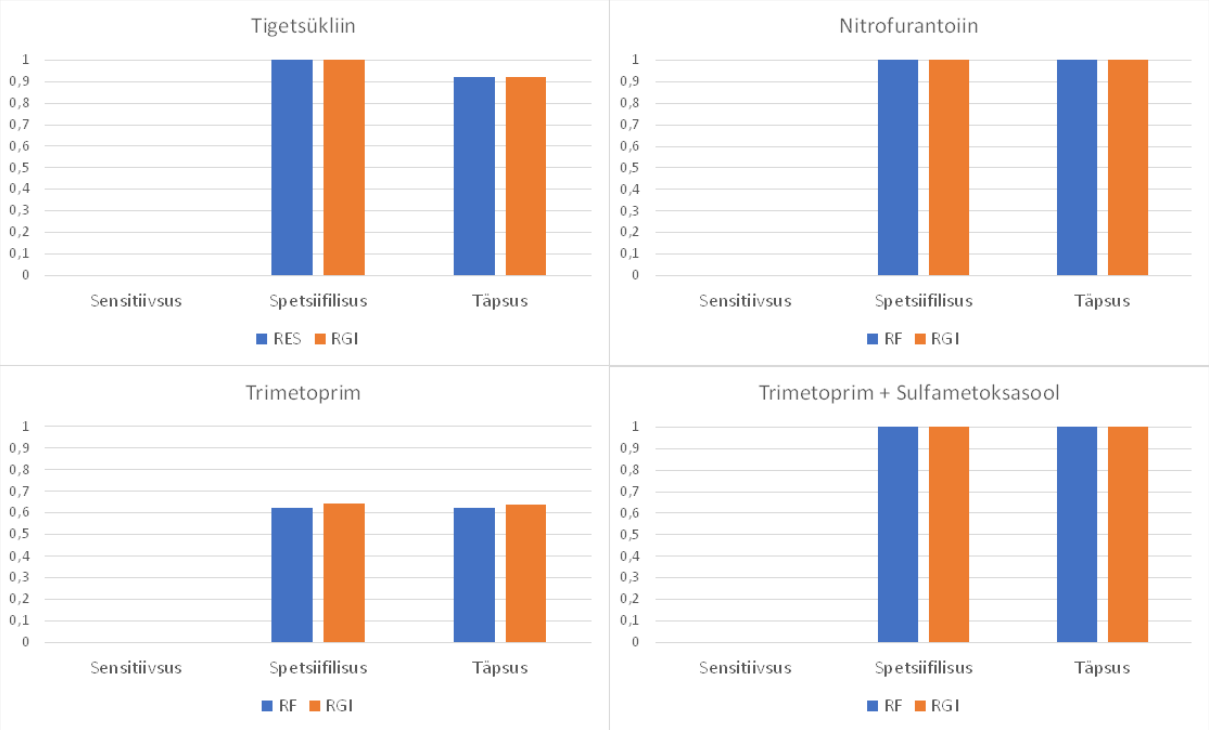
Karbapeneemide resistentsuse puhul sain sensitiivsuse arvutada vaid ertapeneemile, sest teiste karbapeneemide suhtes resistentseid tüvesid andmestikus ei olnud. Ertapeneemi puhul saavutasid mõlemad programmid maksimaalse tundlikkuse. Kõikide karbapeneemide resistentsuse ennustamise spetsiifilisus oli samuti nii ResFinderil kui ka RGI-l väga hea (Joonis 4). Monobaktaamide hulka kuuluva astreonaami resistentsuse tuvastamise tulemusnäitajad olid programmidel küll madalamad kui karbapeneemide puhul, kuid siiski heade ja aktsepteeritavate väärtustega (Joonis 4). Nii karbapeneemide kui monobaktaamide puhul ei olnud ResFinderi ja RGI tulemusnäitajate vahel olulisi erinevusi (Joonis 4).



Joonis 4. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad karbapeneemide ja monobaktaamide resistentsuse ennustamisel. Ertapeneem, imipeneem, meropeneem kuuluvad karbapeneemide hulka ja astreonaam kuulub monobaktaamide hulka. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder. Imipeneemi ja meropeneemi puhul ei olnud võimalik sensitiivsust arvutada, sest valimis puudusid resistentsed tüved.

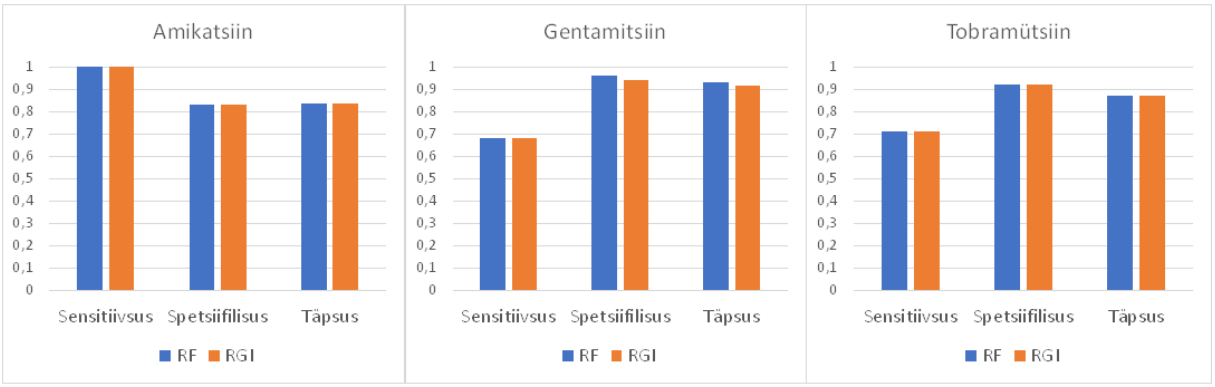
Antibiootikumide nitrofurantoiin, trimetoprim ja trimetoprim + sulfametoksasool kombinatsiooni puhul polnud paraku võimalik sensitiivsust arvutada, kuna andmetest puudusid resistentsed tüved. Tigetsükliini puhul olid andmestikus küll resistentsed tüved

esindatud, kuid kumbki programm ei suutnud seda tuvastada (sensitiivsus = 0). Hoolimata maksimaalsest spetsiifilisusest jäi tigetsükliini ennustamise täpsus seetõttu nii ResFinderi kui RGI puhul alla 1. Nitrofurantoiini ja trimetoprim + sulfametoksasooli puhul hindasid resistentsete tüvede puudumist õigesti mõlemad programmid, aga trimetoprim puhul väitsid mõlemad programmid siiski ka resistentsete tüvede olemasolu, mis viis madalamate spetsiifilisuse ja täpsuse näitajateni. Programmide omavahelises võrdluses polnud märkimisväärseid erinevusi (Joonis 5).



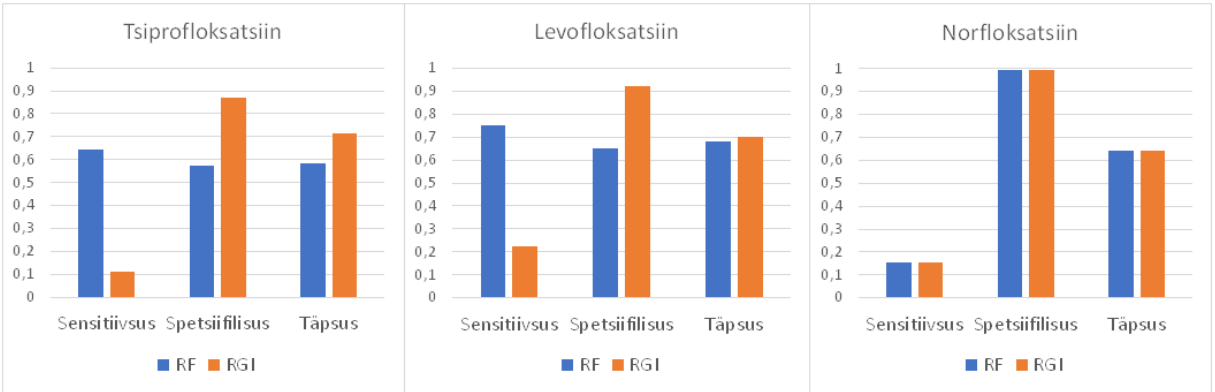
Joonis 5. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad antibiootikumide tigetsükliin, nitrofurantoiin, trimetoprim ja trimetoprim + sulfametoksasool resistentsuse ennustamisel. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder. Tigetsükliini sensitiivsus oli 0. Teiste joonisel olevate antibiootikumide puhul ei olnud võimalik sensitiivsust arvutada, sest valimis puudusid resistentsed tüved.

Aminoglükosiidide klassi kuuluvate antibiootikumide puhul tuvastasid nii ResFinder kui RGI gentamitsiini ja tobramütsiini resistentseid tüvesid väga hästi (täpsus > 0,9), kuid amikatsiini puhul esines valepositiivseid määranguid. Seetõttu jäi amikatsiini resistentsuse ennustamise spetsiifilisus ja täpsus alla 0,9, kuid oli siiski samuti hea (>0,8) (Joonis 6).



Joonis 6. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad aminoglükosiidide resistentsuse ennustamisel. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder.

Erinevalt eelnevalt kirjeldatud antibiootikumidest esines fluorokinoloonide resistentsuse hindamisel programmide vahel suuri erinevusi. Nii tsiprofloksatsiini kui levofloksatsiini resistentsuse ennustamisel oli ResFinder tunduvalt sensitiivsem. Samas RGI oli ResFinderist spetsiifilisem, sest hindas väiksemas koguses tüvesid valesti resistentseteks. Levofloksatsiini resistentsuse hindamisel sai ResFinder samuti kõrgema sensitiivuse, aga RGI sai kõrgema spetsiifilisuse ja natuke kõrgema täpsuse, kuna määras kokkuvõttes vähem tüvesid resistentseks kui ResFinder (Joonis 7).



Joonis 7. Programmide ResFinder ja RGI tulemusnäitajad fluorokinoloonide resistentsuse ennustamisel. Sinisega on toodud ResFinderi tulemused ja oranžiga RGI tulemused. RF – ResFinder.

Kuna mitmete antibiootikumide puhul oli analüüsitavas andmestikus resistentsete ja tundlike tüvede osakaal väga erinev, mille tõttu täpsuse mõõdik annab liiga optimistliku hinnangu, otsustasin arvutada ka F_1 skoori. Näiteks ertapeneemi puhul on ResFinderi täpsus 0,88, sensitiivsus 1,00 ja spetsiifilisus 0,88 (Tabel 2, Joonis 4). Laboris tuvastati ainult üks resistentne tüvi ja mõlemad programmid hindasid resistentsust üle, kuna tuvastasid enam kui 20 resistentset tüve. Sellisel juhul annab F_1 skoor täpsema hinnangu, kui palju ennustustest on tegelikult õiged, jättes välja TN.

ResFinder saavutas kõrgema F_1 tulemuse amoksitsilliini, piperatsilliini, tseftriaksooni, tsefepiimi, gentamitsiini, tsiprofloksatsiini ja levofloksatsiini puhul (Tabel 2 ja Tabel 3). RGI F_1 skoor oli kõrgem piperatsilliin + tasobaktaami, tsefiksiimi ja tseftasidiimi puhul (Tabel 2). Ertapeneemi, astreonaami, amikatsiini, tobramütsiini ja norfloksatsiini puhul olid ResFinderi ja RGI F_1 skoorid sarnased (Tabel 2 ja Tabel 3). Suurimad erinevused esinesid programmide vahel piperatsilliini, tseftriaksooni, tsiprofloksatsiini ja levofloksatsiini puhul (Tabel 2 ja Tabel 3), kus ResFinder edestas alati F_1 skoori põhjal RGI-d. RGI tuvastas seevastu F_1 skoori põhjal täpsemalt tsefiksiimi resistentsust kui ResFinder (Tabel 2)

Tabel 2. Programmide ResFinder ja RGI beeta-laktaamide resistentsuse ennustamise tulemusnäitajad koos lisatud F_1 skooriga. Juhud, kus üks programm edestas teist, on markeeritud rasvases kirjas. RF – ResFinder. N/A märgistab väärtuseid, mida ei olnud võimalik arvutada, sest andmestikus puudusid resistentsed tüved.

Antibiootikumi klass	Antibiootikum	Programm	Sensitiivsus	Spetsiifilisus	Täpsus	F1-skoor
Penitsilliinid	Amoksitsilliin	RF	**0,87**	0,55	0,68	**0,70**
		RGI	0,66	**0,82**	**0,76**	0,69
	Ampitsilliin	RF	N/A	0,37	0,37	N/A
		RGI	N/A	**0,43**	**0,43**	N/A
	Metsillinaam	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
	Piperatsilliin	RF	**0,88**	0,76	**0,83**	**0,86**
		RGI	0,26	**0,94**	0,53	0,40
	Piperatsilliin + Tasobaktaam	RF	0,57	0,83	0,80	0,38
		RGI	0,57	**1,00**	**0,84**	**0,43**
Tsefalosporiinid	Tsefaleksiin	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
	Tsefuroksiim	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
	Tsefiksiim	RF	0,06	**1,00**	0,55	0,11
		RGI	**0,21**	0,94	**0,59**	**0,33**
	Tseftasidiim	RF	**0,85**	0,61	0,67	0,54
		RGI	0,79	**0,69**	**0,71**	**0,55**
	Tseftriaksoon	RF	**0,81**	0,84	**0,83**	**0,80**
		RGI	0,56	**0,91**	0,76	0,67
	Tsefepiim	RF	**0,79**	0,67	**0,71**	**0,59**
		RGI	0,78	0,67	0,70	0,58
Karbapeneemid	Ertapeneem	RF	1,00	**0,88**	**0,88**	0,07
		RGI	1,00	0,87	0,87	0,07
	Imipeneem	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
	Meropeneem	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
Monobaktaamid	Astreonaam	RF	**0,83**	0,75	0,78	0,72
		RGI	0,82	**0,77**	**0,79**	0,72

Tabel 3. Programmide ResFinder ja RGI resistentsuse ennustamise tulemusnäitajad koos lisatud F_1 skooriga mitte-beeta-laktaamide hulka kuuluvate antibiootikumide puhul. Juhud, kus üks programm edestas teist, on markeeritud rasvases kirjas. RF – ResFinder. N/A märgistab väärtuseid, mida ei olnud võimalik arvutada, sest andmestikus puudusid resistentsed tüved. Rohelise joonega on piiritletud valgusünteesi inhibeerivad antibiootikumid, oranži joonega DNA sünteesi inhibeerivad antibiootikumid ja sinise joonega foolhappe rada inhibeerivad antibiootikumid.

Antibiootikumi klass	Antibiootikum	Programm	Sensitiivsus	Spetsiifilisus	Täpsus	F1-skoor
Aminoglükosiidid	Amikatsiin	RF	1,00	0,83	0,83	0,10
		RGI	1,00	0,83	0,83	0,10
	Gentamitsiin	RF	0,68	**0,96**	**0,93**	**0,67**
		RGI	0,68	0,94	0,91	0,63
	Tobramütsiin	RF	0,71	0,92	0,87	0,71
		RGI	0,71	0,92	0,87	0,71
Tetratsükliinid	Tigetsükliin	RES	N/A	1,00	0,92	N/A
		RGI	N/A	1,00	0,92	N/A
Fluorokinoloonid	Tsiprofloksatsiin	RF	**0,76**	0,66	0,70	**0,62**
		RGI	0,24	**0,93**	0,70	0,35
	Levofloksatsiin	RF	**0,75**	0,65	0,68	**0,59**
		RGI	0,22	**0,92**	**0,70**	0,32
	Norfloksatsiin	RF	0,15	0,99	0,64	0,25
		RGI	0,15	0,99	0,64	0,25
Nitrofuraanid	Nitrofurantoiin	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A
Diaminopürimidiin	Trimetoprim	RF	N/A	0,62	0,62	N/A
		RGI	N/A	**0,64**	**0,64**	N/A
	Trimetoprim + Sulfametoksasool	RF	N/A	1,00	1,00	N/A
		RGI	N/A	1,00	1,00	N/A

Täpsuse väärtused on tähelepandavalt kõrgemad kui F_1 väärtused, kuna enamus antibiootikumide puhul oli resistentseid tüvesid väga vähe. Kuna soovisin anda kokkuvõtlikku hinnangut, kumb programm on kokkuvõttes parem, arvutasin mõlema programmi jaoks lisaks keskmise tasakaalustatud täpsuse väärtuse. Tasakaalustatud täpsuse puhul polnud võimalik sisse arvestada tulemusi, kus polnud andmestikus resistentseid tüvesid. Keskmised tasakaalustatud täpsused olid ResFinderil 0,753 ja RGI-l 0,726. Lisaks arvutasin mõlema programmi jaoks sensitiivsuse, spetsiifilisuse ja F_1 skoori keskmised väärtused. ResFinder sai

keskmisteks tulemusteks vastavalt 0,71; 0,84; 0,51. RGI sai keskmisteks tulemusteks vastavalt 0,58; 0,89; 0,45.

2.4. Arutelu

Programmide võime ennustada resistentseid tüvesid varieerus suurel määral sõltuvalt antibiootikumist. Osade antibiootikumide resistentsuse ennustamise puhul oli programmide sensitiivsus väga madal. See tähendab, et programm ei suutnud ennustada andmestikus leiduvaid resistentseid tüvesid resistentseteks, nagu näiteks tsefiksiimi või norfloksatsiini puhul. Kohati said programmid väga kõrge sensitiivsuse, mis tähendab, et ennustasid kõik resistentsed tüved õigesti resistentseteks, aga samas said väga madala F_1 skoori. Põhjuseks on, et F_1 skoor kasutab sensitiivsust kui ühte osa oma valemist, mida ta kaalub võrdselt positiivsete prognoosiväärtusega. Positiivne prognoosiväärtus iseloomustab, kui suur osa programmi poolt resistentseks ennustatud tüvesid on ka tegelikult resistentsed. Kõrge sensitiivsuse, aga madala F_1 skoori puhul on tavaliselt programm ennustanud suures koguse resistentseid tüvesid ning saanud pihta nendele, mis olid tegelikult resistentsed, kuid sellega kaasneb positiivse prognoosväärtuse suur langus.

Analüüsitud andmestikus leidus antibiootikume, millele ei tuvastatud ühtegi resistentset tüve nagu näiteks ampitsilliin, metsillinaam, tsefaleksiin jne. Nende antibiootikumide puhul sai hinnata tulemusi vaid spetsiifilisust ja täpsust kasutades. Spetsiifilisus näitab kui suur osa resistentseks ennustamata jäänud tüvedest olid tõepoolest tundlikud. Kui spetsiifilisuse väärtus oli madal, siis see tähendab, et programm ennustas suures koguses resistentseks tüvesid, mis tegelikult polnud resistentsed. Samas täpsus olid üldisem hinnang, mis näitas, kui suur oli õigesti ennustatud tulemuste osakaal kõikidest ennustustest. Täpsuse puhul esines ülehindamist, kuna paljude antibiootikumide puhul polnud resistentseid tüvesid või neid oli vähe. Kui andmestik oleks olnud tasakaalustatum, oleks täpsus sobinud tulemuste tõlgendamiseks paremini. Lahendusena hindasin programme F_1 skoori ja tasakaalustatud täpsuse keskmise järgi. F_1 skoori keskmine tulemus oli ResFinderil parem ja tasakaalustatud täpsuse keskmine tulemus oli samuti ResFinderil parem.

Optimaalse ravikuuri määramiseks peavad programmid andma tulemuse, kus on võimalikult vähe valepositiivseid ja valenegatiivseid vastuseid. Valepositiivse vastuse puhul võidakse võtta kasutusele järgmise liini ja laiema toimespektriga antibiootikumid, millel võivad olla raskemad kõrvalmõjud ning kaasneb oht resistentsuse leviku suurendamiseks. Valenegatiivsete puhul ei saa patsient efektiivset ravi, kuna kasutatav antibiootikum ei ole efektiivne. Lisaks pikeneb sobiva ravi leidmise aeg, omakorda ka paranemisaeg ja haiglas viibimise aeg või suureneb suremus.

Kui lähtuda kliinilisest vaatest, siis peaksid olema sensitiivsuse väärtus üle 0,985 ja spetsiifilisuse väärtus üle 0,95, et olla kasutatav FDA kriteeriumite järgi. Ühegi antibiootikumi puhul, millele oli võimalik mõlemad väärtused arvutada, ei saavutatud nii kõrgeid tulemusi. Tulemusena olid keskmiselt nii ResFinderi kui RGI sensitiivsuse ja spetsiifilisuse tulemused madalamad kui FDA lävend.

Võrreldes eelnevalt tehtud uuringutega on näha, et ResFinderi tasakaalustatud täpsuse keskmine on käesolevas töös umbes sama, aga RGI tasakaalustatud täpsuse keskmine on käesolevas töös parem. See võib tuleneda sellest, et eelnevates töödes pole arvestatud välja efflukspumpasid. Samuti võis mõjutada asjaolu, et ResFinder ja CARD andmebaasides on geenide ja antibiootikumide seosed erinevad. Kuid tasakaalustatud täpsuse keskmise puhul sai ResFinder ikka parema tulemuse kui RGI, aga ainult 2,7 protsendipunkti võrra.

Nii siin töös, kui ka eelnevalt teostatud uuringutes, on järeldatud, et hetkel ei sobi kasutada ResFinderit/PointFinder ja CARD/RGI kliinilistes keskkonnas ainsa AMR tuvastamise meetodina. Lisaks, siin töös ja eelmainitud uuringutes oli kasutatud assambleeritud genoome. Tulevikus tasub uurida ka programmide otse toorlugemitest resistentsuse ennustamise võimet, sest see võib madala kvaliteediga kokku pandud genoomijärjestustest tulenevat valenegatiivsete osakaalu vähendada.

Kokkuvõte

Töös kasutasin bioinformaatilisi tööriistu ResFinder/PointFinder ja RGI käsurea versiooni, et tuvastada Eestis isoleeritud kliiniliste *E. coli* tüvede genoomidest antibiootikumiresistentsusgeenid ning nende ennustatud resistentsusfenotüübid. Tüvedel oli eelnevalt tehtud AST erinevate antibiootikumide suhtes ning siin töös määrasin neile vastavad resistentsused EUCAST MIK murdepunktide alusel. Avastasin, et ResFinderi ja CARD andmebaasid on teatud resistentsusgeenidega seotud erinev nimekiri antibiootikume. Olukorra lahendamiseks ühendasin andmebaaside fenotüübiinfo ja täpsustasin sellele vastavalt programmide määratud fenotüübid.

ResFinderi ja RGI ennustusvõime hindamiseks kõrvutasin programmide poolt ennustatud fenotüüpe laboratoorsete fenotüüpidega ning arvutasin mõlema programmi jaoks sensitiivsuse, spetsiifilisuse, täpsuse ja F_1 skoori. ResFinder ennustas hea spetsiifilisuse ja sensitiivsusega piperatsilliini ja tseftriaksooni. Nii ResFinder kui RGI olid hea sensitiivsuse ja spetsiifilisuse väärtusega ka astreonaami puhul. Ertapeneemi ja amikatsiini puhul said mõlemad programmid küll kõrged sensitiivsuse ja spetsiifilisuse väärtused, kuid väga madala F_1 skoori ehk ülehindasid resistentsust suurel määral.

Keskmine tasakaalustatud täpsus oli ResFinderil 0,753 ja RGI-l 0,726. ResFinderi keskmine sensitiivsus oli 0,71, keskmine spetsiifilisus 0,84 ja keskmine F_1 skoor 0,51. RGI keskmine sensitiivsus oli 0,58, keskmine spetsiifilisus 0,89 ja keskmine F_1 skoor 0,45. ResFinder edestas enamus antibiootikumide puhul RGI-d. Kumbki programm ei saavutanud piisavalt kõrget täpsust, et sobida ainsa meetodina kliinilises kontekstis kasutamiseks.

Comparison of the bioinformatic tools ResFinder and RGI in the detection of antibiotic resistance in clinical Escherichia coli strains isolated in Estonia

Sander Arna

Summary

Antimicrobial resistance (AMR) has become an ever-bigger problem year after year. According to studies done the estimated the death toll form AMR related instances in 2019 was 4.95 million deaths. Estimates say that it will rise to 50 million deaths per year by the year 2050 if nothing is done. This worrying fact has brought the problem to the attention many international agencies like the World Health Organisation. By their estimates one of the deadliest AMR bacteria are strains of *Escherichia coli*. This was determined to be the case for both developing countries and also developed regions like Europe.

E. coli has many mechanisms for conferring resistance such as innate resistance, resistance through mutation and resistance through horizontal gene transfer. The main way that resistance is detected and determined in a clinical environment is through antimicrobial susceptibility testing (AST). Different agencies set the specific limits for what bacteria is considered resistant to what antibiotic. The most common limit system is minimal inhibitory concentration (MIC) and the agency that regulates this in Europe is EUCAST. They up date their MIC table regularly according to emerging microbial and geographic data.

In recent years new methods have been emerging for the use of determining AMR microbes. Some of the most wide spread methods are computer based *In silico* methods. One of the most common and tested types are alignment-based tools like ResFinde and RGI. Each tool comes with their own database, which consist of a collection of different resistance conferring genes or mutations. Which work by analysing the given genome to their database and giving out the best matches.

In this paper different clinical *E. coli* isolates from Estonia are used to determine ResFinders and RGI's effectiveness at predicting resistance phenotypes based on their assembled genomes. The results are calculated into sensitiveti, specificity, accuracy and F_1 score, so that the two programs can be compared. During testing the two programs databases were also compared.

The results are that both ResFinder and RGI are insufficient to be used in a clinical environment for resistance phenotype determination/prediction. Using clinical sensitivity and specificity as metrics, the FDA states that they should not be below 98.5% and 97% respectively. In none of the antibiotic classes did either program achieve those results. In some cases coming close like with Piperacillin, Ceftriaxone, Ertapenem, Amikacin and Aztreonam. Though in the case of Ertapenem and Amikacin the F_1 score was 0.07 and 0.10 respectively, showing a high false positive rate. Also an average balanced accuracy was also calculated, so the results of this study could be compared to previously done studies. ResFinder achieved an average balanced accuracy of 0.753 and RGI achieved an average balanced accuracy of 0.726. When compared to a previous study ResFinder preformed similarly while RGI preformed better. This could be thanks to corrections made to genes made in this study or updates to the program and database.

It was concluded that the current *in silico* tools aren't yet reliable enough to be used in clinical resistance determining as the sole method. This was in concordance with studies that were done previously. Yet out of the two ResFinder would be more suitable for the use case, thanks to its high sensitivity and high specificity. While RGI is a more useful tool in environmental studies, where discovering novel ARG is more important than exact phenotype prediction since its Loose model is capable of predicting a wide variety of mutations or alternate version for ARG-s.

Tänusõnad:

Tänan oma juhendajat Age Brauer'it, kes oli suureks abiks töö koostamisel ja parandamisel ning ääretult kannatlik minu töögraafikuga.

Kirjanduse loetelu

Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., … McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D690–D699. doi: 10.1093/nar/gkac920

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L. S., Vikesland, P., & Zhang, L. (2018). DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, *6*(1), 23. doi: 10.1186/s40168-018-0401-z

Aun, E., Brauer, A., Kisand, V., Tenson, T., & Remm, M. (2018). A k-mer-based method for the identification of phenotype-associated genomic biomarkers and predicting phenotypes of sequenced bacteria. *PLOS Computational Biology*, *14*(10), e1006434. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006434

Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*, *20*(6), 356–370. doi: 10.1038/s41576-019-0108-4

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., … Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, *75*(12), 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345

Bradford, P. A., Bonomo, R. A., Bush, K., Carattoli, A., Feldgarden, M., Haft, D. H., Ishii, Y., Jacoby, G. A., Klimke, W., Palzkill, T., Poirel, L., Rossolini, G. M., Tamma, P. D., & Arias, C. A. (2022). Consensus on β-Lactamase Nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *66*(4), e00333-22. doi: 10.1128/aac.00333-22

Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, *12*(1), 59–60. doi: 10.1038/nmeth.3176

Cherkaoui, A., Schorderet, D., Azam, N., Crudeli, L., Fernandez, J., Renzi, G., Fischer, A., & Schrenzel, J. (2022). Fully Automated EUCAST Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST) from Positive Blood Cultures: Diagnostic Accuracy and Implementation. *Journal of Clinical Microbiology*, *60*(10), e00898-22. doi: 10.1128/jcm.00898-22

Chernova, O. A., Medvedeva, E. S., Mouzykantov, A. A., Baranova, N. B., & Chernov, V. M. (2016). Mycoplasmas and Their Antibiotic Resistance: The Problems and Prospects in Controlling Infections. *Acta Naturae*, *8*(2), 24–34.

Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, *19*(1), 307. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(5), 280–295. doi: 10.1038/s41579-022-00820-y

de la Lastra, J. M. P., Wardell, S. J. T., Pal, T., de la Fuente-Nunez, C., & Pletzer, D. (2024). From Data to Decisions: Leveraging Artificial Intelligence and Machine Learning in Combating Antimicrobial Resistance – a Comprehensive Review. *Journal of Medical Systems*, *48*(1), 71. doi: 10.1007/s10916-024-02089-5

De Pascale, G., & Wright, G. D. (2010). Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem*, *11*(10), 1325–1334. doi: 10.1002/cbic.201000067

Dhingra, S., Rahman, N. A. A., Peile, E., Rahman, M., Sartelli, M., Hassali, M. A., Islam, T., Islam, S., & Haque, M. (2020). Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Frontiers in Public Health*, *8*. doi: 10.3389/fpubh.2020.535668

Drouin, A., Letarte, G., Raymond, F., Marchand, M., Corbeil, J., & Laviolette, F. (2019). Interpretable genotype-to-phenotype classifiers with performance guarantees. *Scientific Reports*, *9*(1), 4071. doi: 10.1038/s41598-019-40561-2

E. coli. (n.d.). Retrieved from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli

European Centre for Disease Prevention and Control. & World Health Organization. (2022). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022: 2020 data.* LU: Publications Office. Retrieved from https://data.europa.eu/doi/10.2900/112339

Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., & Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, *11*(1), 12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0

Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661–681. doi: 10.1128/cmr.00043-12

Ferraro, M. (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *NCCLS*, *14*, 13–19.

Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, *8*(1), 000748. doi: 10.1099/mgen.0.000748

Gedefie, A., Demsis ,Wondmagegn, Ashagrie ,Melaku, Kassa ,Yeshimebet, Tesfaye ,Melkam, Tilahun ,Mihret, Bisetegn ,Habtye, & and Sahle, Z. (2021). Acinetobacter baumannii Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 3711–3719. doi: 10.2147/IDR.S332051

Giske, C. G., Turnidge, J., Cantón, R., Kahlmeter, G., & on behalf of the EUCAST Steering Committee. (2022). Update from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Journal of Clinical Microbiology*, *60*(3), e00276-21. doi: 10.1128/jcm.00276-21

Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., de Lencastre, H., Bentley, S. D., Kearns, A. M., & Holden, M. T. G. (2017). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biology*, *18*(1), 130. doi: 10.1186/s13059-017-1252-9

Hu, K., Meyer, F., Deng, Z.-L., Asgari, E., Kuo, T.-H., Münch, P. C., & McHardy, A. C. (2024). Assessing computational predictions of antimicrobial resistance phenotypes from microbial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, *25*(3), bbae206. doi: 10.1093/bib/bbae206

Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 119. doi: 10.1186/1471-2105-11-119

Jain, P., Bepari, A. K., Sen, P. K., Rafe, T., Imtiaz, R., Hossain, M., & Reza, H. M. (2021). High prevalence of multiple antibiotic resistance in clinical E. coli isolates from Bangladesh

and prediction of molecular resistance determinants using WGS of an XDR isolate. *Scientific Reports*, *11*(1), 22859. doi: 10.1038/s41598-021-02251-w

Kaiv, R., & Abarenkov, K. (2016). *NCBI BLAST ja BLAST+ pakettide programmide blastn ja megablast ülevaade, versioonide võrdlus ja analüüs.*

Kim, D.-Y., & Kim, T.-J. (2025). Metabolic Stress Induced by Quercetin Enhances Dormancy and Persistence in Staphylococcus aureus. *Antibiotics*, *14*(5), 424. doi: 10.3390/antibiotics14050424

Lee, K., Kim, D.-W., & Cha, C.-J. (2021). Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data. *Journal of Microbiology*, *59*(3), 270–280. doi: 10.1007/s12275-021-0652-4

Liu, B., & Pop, M. (2009). ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl_1), D443–D447. doi: 10.1093/nar/gkn656

Lund, D., Coertze, R. D., Parras-Moltó, M., Berglund, F., Flach, C.-F., Johnning, A., Larsson, D. G. J., & Kristiansson, E. (2023). Extensive screening reveals previously undiscovered aminoglycoside resistance genes in human pathogens. *Communications Biology*, *6*(1), 1–10. doi: 10.1038/s42003-023-05174-6

Mahfouz, N., Ferreira, I., Beisken, S., von Haeseler, A., & Posch, A. E. (2020). Large-scale assessment of antimicrobial resistance marker databases for genetic phenotype prediction: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(11), 3099–3108. doi: 10.1093/jac/dkaa257

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, *10*(10), 1310. doi: 10.3390/pathogens10101310

Mestrovic, T., Aguilar, G. R., Swetschinski, L. R., Ikuta, K. S., Gray, A. P., Weaver, N. D., Han, C., Wool, E. E., Hayoon, A. G., Hay, S. I., Dolecek, C., Sartorius, B., Murray, C. J. L., Addo, I. Y., Ahinkorah, B. O., Ahmed, A., Aldeyab, M. A., Allel, K., Ancuceanu, R., … Naghavi, M.

(2022). The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. *The Lancet Public Health*, *7*(11), e897–e913. doi: 10.1016/S2468-2667(22)00225-0

Mouton, J. W., Brown, D. F. J., Apfalter, P., Cantón, R., Giske, C. G., Ivanova, M., MacGowan, A. P., Rodloff, A., Soussy, C.-J., Steinbakk, M., & Kahlmeter, G. (2012). The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), E37–E45. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03752.x

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., … Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*. doi: 10.3389/fcimb.2024.1387497

Nielsen, T. K., Browne, P. D., & Hansen, L. H. (2022). Antibiotic resistance genes are differentially mobilized according to resistance mechanism. *GigaScience*, *11*, giac072. doi: 10.1093/gigascience/giac072

OECD, E. (2019). Antimicrobial resistance—tackling the burden in the European Union—briefing note for EU/EEA countries. *Paris, France*.

O'Neill, J. (2016). *Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.*

Pancholi, P., Carroll, K. C., Buchan, B. W., Chan, R. C., Dhiman, N., Ford, B., Granato, P. A., Harrington, A. T., Hernandez, D. R., Humphries, R. M., Jindra, M. R., Ledeboer, N. A., Miller, S. A., Mochon, A. B., Morgan, M. A., Patel, R., Schreckenberger, P. C., Stamper, P. D., Simner, P. J., … Wolk, D. M. (2018). Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(4), 10.1128/jcm.01329-17. doi: 10.1128/jcm.01329-17

Papp, M., & Solymosi, N. (2022). Review and Comparison of Antimicrobial Resistance Gene Databases. *Antibiotics*, *11*(3), 339. doi: 10.3390/antibiotics11030339

Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*, *61*(1), 100–111. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770

Puttaswamy, S., Gupta, S. K., Regunath, H., Smith, L. P., & Sengupta, S. (2018). A Comprehensive Review of the Present and Future Antibiotic Susceptibility Testing (AST) Systems. *Archives of Clinical Microbiology*, *09*(03). doi: 10.4172/1989-8436.100083

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482–501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482

Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, *15*(2), 121–132. doi: 10.1038/nrg3642

Stoler, N., & Nekrutenko, A. (2021). Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. *NAR Genomics and Bioinformatics*, *3*(1), lqab019. doi: 10.1093/nargab/lqab019

Tenson, T., Telling, K., Mitt, P., Sepp, E., Naaber, P., Lass, J., Lutsar, I., Kalmus, P., Moks, E., Häkkinen, L., Kisand, V., Herodes, K., Brauer, A., Remm, M., & Allas, Ü. (2024).

Antibiotic Resistance Spread and Resistance Control Options. Estonian Experience (p. 2024.04.02.24304316). medRxiv. doi: 10.1101/2024.04.02.24304316

Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics*, *11*(8), 1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079

Yao, J., Wang, J., Chen, M., & Cai, Y. (2021). Cefiderocol: An Overview of Its in-vitro and in-vivo Activity and Underlying Resistant Mechanisms. *Frontiers in Medicine*, *8*. doi: 10.3389/fmed.2021.741940

Zack, K. M., Sorenson, T., & Joshi, S. G. (2024). Types and Mechanisms of Efflux Pump Systems and the Potential of Efflux Pump Inhibitors in the Restoration of Antimicrobial Susceptibility, with a Special Reference to Acinetobacter baumannii. *Pathogens*, *13*(3), 197. doi: 10.3390/pathogens13030197

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Antimicrobial resistance. (2025). Kasutatud 18.04.2025, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

E. coli. (2025). Kasutatud 09.05.2025, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli

eucast: EUCAST. (2025). Kasutatud 18.05.2025, https://www.eucast.org/

eucast: EUCAST statutes. (2025). Kasutatud 30.04.2025, https://www.eucast.org/eucaststatutes

Reference Gene Catalog - Pathogen Detection – NCBI. (2025). Kasutatud 15.05.2025, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/

rgi/docs/rgi_main.rst at master · arpcard/rgi · GitHub. (2025). Kasutatud 09.05.2025, https://github.com/arpcard/rgi/blob/master/docs/rgi_main.rst

History & Impact. (2025). Kasutatud 20.05.2025, https://clsi.org/about/history-impact/

RGI/CARD FAQ. Kasutatud: 9.05.2025, https://github.com/arpcard/FAQ

Lisa

E. coli genoomid	AMI	AMOC	AMPI	ASTR	CEFE	CEFIX	CAZ	CRO	CMX	CEFA	CIP	ETP	FOS	GEN	IMP	LEVO	MEC	MERC	FURA	NOR	PIP	PIPTA	TIG	TOB	TRIM	STX
HECRIB001	4	32	8	1	1	2	2	1	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRIB013	4	32	8	1	1	1	1	1	4	8	0,5	0,25	16	2	0,5	1	8	0,125	32	1	64	4	0,5	2	4	4
HECRIB015	4	8	8	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	2	0,5	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECRIB017	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	64	0,5	2	4	1
HECRIB019	4	32	8	2	1	2	2	1	8	16	0,25	0,25	16	2	0,5	1	2	0,125	16	0,5	8	4	0,5	1	1	1
HECRIB021	4	8	8	8	16	2	1	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECRIB023	4	32	8	4	1	2	8	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	1	64	4	0,5	2	4	4
HECRIB025	4	4	2	1	1	1	1	1	8	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRLB001	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	32	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECRLB004	4	16	8	16	16	2	4	4	8	16	0,25	0,25	16	4	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	4	1	1
HECRLB006	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	8	0,5	4	1	1
HECRLB009	4	32	8	16	1	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	64	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRLB017	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	64	2	64	4	0,5	4	4	4
HECRLB019	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	4	4	4
HECRLB021	4	32	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	4	1	1
HECRLB025	4	8	8	16	16	2	2	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECRLB031	8	32	8	2	2	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	0,5	4	4	4
HECRLB035	4	8	4	1	1	1	1	1	8	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRNB801	4	8	8	8	4	2	8	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	[redacted]	1	4	4
HECRPB001	8	32	8	2	2	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	0,5	4	4	4
HECRPB003	4	32	8	16	4	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	1	4	4	4
HECRPB005	4	8	4	1	1	1	1	1	8	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	1	2	1	1
HECRPB007	4	4	2	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	32	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRPB009	4	4	4	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRPB017	4	8	8	8	4	2	8	4	8	16	1	0,25	16	2	0,5	2	2	0,125	16	2	64	4	1	1	4	4
HECRPB019	16	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	32	0,5	4	1	1
HECRPB021	4	32	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	8	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	4	4
HECRPB023	4	8	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECRPB025	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRPB027	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRPB029	4	4	2	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRPB031	4	32	8	2	1	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	32	4	0,5	1	4	1
HECRPB033	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	32	0,5	4	4	4
HECRPB035	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	16	0,5	4	1	1
HECRPB037	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRPB043	4	16	8	1	1	1	1	1	4	4	0,5	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	1	64	4	0,5	1	1	1
HECRPB064	4	16	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECRPB066	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRPB073	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,5	16	1	0,5	2	[redacted]	0,125	[redacted]	2	64	8	[redacted]	4	4	4
HECRPB077	4	2	8	1	1	1	1	1	4	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	[redacted]	0,5	8	4	[redacted]	1	1	1
HECRPD047	4	2	2	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECRRB001	8	32	8	2	2	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	[redacted]	4	4	4
HECRRB014	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	4	0,125	16	2	64	8	[redacted]	4	1	1
HECRRB020	4	16	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	4	0,125	16	2	64	4	[redacted]	1	1	1
HECRRB025	8	32	8	2	1	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	[redacted]	4	4	4
HECRRB027	8	32	8	2	1	2	1	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	[redacted]	4	4	4
HECRRB028	8	32	8	2	1	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	[redacted]	4	4	4
HECRSU001	4	32	8	4	1	2	4	1	8	16	0,25	0,25	16	4	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	4	1	1
HECRSU005	4	32	8	4	1	2	8	4	8	16	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	16	4	0,5	2	1	1
HECRSU009	4	4	8	8	2	2	4	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU015	4	4	8	8	4	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	64	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU017	8	32	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	4	1
HECRSU019	4	8	8	4	4	2	1	4	8	16	0,25	0,25	16	2	1	0,5	8	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECRSU021	4	4	8	8	4	2	2	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	1	64	4	0,5	1	1	1
HECRSU023	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	0,25	0,25	16	4	0,25	0,5	8	0,125	32	1	64	4	0,5	4	4	4
HECRSU025	8	32	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	4	1
HECRSU027	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	8	0,5	4	1	1
HECRSU029	16	32	8	2	1	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	4	4
HECRSU033	4	8	8	8	4	2	4	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	1	1
HECRSU037	4	8	8	16	8	2	8	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU038	4	32	8	4	1	2	2	0,5	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	8	4	0,5	1	1	1
HECRSU040	4	8	8	8	4	2	8	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU042	4	8	8	8	4	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	2	1	1
HECRSU044	4	32	8	8	4	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	1	8	0,125	16	2	64	4	0,5	2	4	4
HECRSU048	8	32	8	8	2	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	0,5	4	4	4
HECRSU050	4	32	8	4	1	2	8	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	16	4	0,5	1	1	1
HECRSU054	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	2
HECRSU058	4	4	8	8	2	2	2	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	1	1
HECRSU060	4	32	8	2	1	2	2	0,5	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	8	4	0,5	1	1	1
HECRSU062	4	32	8	1	1	2	1	0,5	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRSU066	4	32	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	4	1	1
HECRSU068	4	8	8	16	8	2	8	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU070	4	32	8	1	1	2	0,5	0,5	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECRSU072	4	32	8	16	8	2	8	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	1	1
HECRSU074	4	32	8	8	8	2	4	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	64	2	64	4	1	1	4	4
HECRSU076	8	32	8	8	16	2	4	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	64	0,5	4	4	4
HECRSU078	4	16	8	16	8	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	4	0,25	0,5	4	0,125	16	1	64	4	0,5	4	1	1
HECRSU080	8	32	8	1	1	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	4	4
HECRSU082	4	4	8	8	4	2	2	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU084	4	32	8	16	8	2	8	4	8	16	0,25	1	16	1	1	0,5	8	0,5	64	0,5	64	64	0,5	1	4	4
HECRSU086	4	16	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	4	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU088	4	16	8	8	16	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	4	0,25	0,5	2	0,125	16	1	64	4	0,5	4	1	1
HECRSU090	4	32	8	8	2	2	4	4	8	16	0,25	0,25	64	1	0,25	0,5	4	0,125	16	1	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU092	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	0,5	4	4	4
HECRSU094	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	8	0,5	4	4	4
HECRSU096	4	4	8	16	16	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	1	64	4	0,5	1	1	1
HECRSU098	4	32	8	8	8	2	4	4	8	16	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECRSU100	4	8	8	16	16	2	16	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU102	8	32	8	2	2	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	32	1	4	4	4
HECRSU104	4	4	8	16	16	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	4	0,25	1	2	0,125	32	1	64	4	1	4	1	1
HECRSU108	4	4	8	16	4	2	4	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	1	1
HECRSU110	4	8	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	64	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU112	4	4	8	16	16	2	8	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU114	4	4	8	[redacted]	16	2	4	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECRSU116	4	16	8	8	8	2	4	4	8	16	0,5	0,25	16	4	0,25	0,5	4	0,125	16	1	64	4	0,5	4	4	4
HECRSU118	4	8	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	4	0,5	2	4	4
HECRSU120	4	4	8	1	1	2	0,5	4	8	16	1	0,25	16	2	0,5	2	8	0,125	16	2	64	4	0,5	2	1	1
HECRTB011	4	4	8	4	16	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	[redacted]	2	4	4
HECRTB013	4	32	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	8	0,125	16	0,5	64	64	[redacted]	2	1	1
HECRVB001	4	16	8	8	16	2	4	4	8	16	0,25	0,25	16	4	0,25	1	8	0,125	16	1	64	4	[redacted]	4	1	1
HECRVB002	4	32	8	2	1	2	16	1	8	16	0,25	0,25	16	1	2	1	2	0,125	16	0,5	32	4	[redacted]	1	4	1
HECRVB005	4	4	8	16	16	2	8	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	[redacted]	1	1	1
HECRVB007	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	[redacted]	4	1	1
HECRVB015	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	[redacted]	4	4	4
HECRVB016	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	4	0,125	16	2	64	4	[redacted]	1	1	1
HECRVB020	4	4	8	4	8	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	[redacted]	2	1	1
HECRVB021	4	8	8	4	1	2	2	4	8	16	0,5	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	1	64	4	[redacted]	1	4	4

Lisa 1. 1-107 E. coli tüve. Punasega on märgitud R, rohelisega T ja valgega MT. Mustaga puuduvad andmed.

E. coli genoomid	AMI	AMOC	AMPI	ASTR	CEFE	CEFIX	CAZ	CRO	CMX	CEFA	CIP	ETP	FOS	GEN	IMP	LEVO	MEC	MERC	FURA	NOR	PIP	PIPTA	TIG	TOB	TRIM	STX
HECSIB002	4	16	8	16	16	2	4	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	4	4	4
HECSIB014	4	4	8	8	8	2	2	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECSIB016	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSIB018	4	4	2	1	1	1	1	1	8	16	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSIB020	4	2	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSIB022	4	8	4	1	1	1	1	1	8	8	0,25	0,25	16	2	1	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSIB024	4	8	8	2	4	2	1	4	8	16	1	0,25	16	1	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	1	4	4
HECSLB002	4	32	8	1	1	1	1	1	4	16	0,25	0,25	16	2	0,25	1	8	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECSLB005	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSLB007	4	32	8	1	1	1	1	1	8	8	0,5	0,25	16	1	0,25	1	8	0,125	16	1	64	4	0,5	1	1	1
HECSLB010	4	32	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	8	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSLB018	8	32	8	1	1	1	1	1	8	8	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	32	16	1	4	4	4
HECSLB020	4	16	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSLB022	4	16	8	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSLB026	4	8	8	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECSLB032	4	4	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	2	0,5	1	4	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECSLB036	8	32	8	2	2	2	1	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	32	0,5	4	4	4
HECSPB002	4	8	8	1	1	1	1	1	4	8	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	2	4	4
HECSPB004	4	8	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	2	1	1
HECSPB006	4	32	8	1	1	2	1	1	8	16	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSPB008	4	16	8	4	8	2	2	4	8	16	1	0,25	16	4	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	4	1	1
HECSPB010	8	32	8	4	2	2	2	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	32	0,5	4	4	4
HECSPB018	4	8	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSPB020	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSPB022	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	8	0,5	4	1	1
HECSPB024	8	32	8	1	1	1	1	1	8	8	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	1	4	4	4
HECSPB026	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	16	0,5	4	1	1
HECSPB028	4	8	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	4	1	2	4	4
HECSPB030	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,5	1	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSPB032	4	16	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECSPB034	4	4	2	1	1	1	1	1	8	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	1	1	1	1
HECSPB036	4	4	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSPB038	8	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	32	2	64	64	0,5	4	1	1
HECSPB041	4	4	8	16	8	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	2	4	4
HECSPB044	4	4	8	16	16	2	4	4	8	16	1	0,25	16	2	0,25	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	2	4	4
HECSPB048	4	8	8	8	4	2	8	4	8	16	1	0,25	16	2	0,5	2	2	0,125	16	2	64	4	0,5	2	1	1
HECSPB067	4	4	8	1	1	1	1	1	8	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	[redacted]	0,125	[redacted]	0,5	8	4	[redacted]	1	4	4
HECSPB079	4	32	8	16	16	2	16	4	8	16	1	0,25	16	4	1	2	[redacted]	0,125	[redacted]	2	64	16	[redacted]	4	4	1
HECSRB002	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSRB015	4	4	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSRB022	4	8	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	[redacted]	1	1	1
HECSRB026	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSRB029	4	8	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	[redacted]	1	4	4
HECSRB030	4	8	4	1	1	1	1	1	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSSU002	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU006	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU010	4	32	8	1	1	1	0,5	0,5	8	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	64	16	0,5	1	1	1
HECSSU012	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU016	4	16	8	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	64	4	1	1	4	4
HECSSU018	4	2	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU020	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	4
HECSSU022	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU024	4	4	4	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU026	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU028	4	8	4	1	1	1	0,5	0,5	8	8	0,25	0,25	16	2	0,5	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSSU030	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU034	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU038	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU039	4	4	4	1	1	1	0,5	0,5	8	16	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	1	1	1	1
HECSSU041	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	1
HECSSU043	4	2	2	1	1	1	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU045	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU049	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	8	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU051	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	1	1	1	1
HECSSU055	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU059	4	4	2	1	1	1	0,5	0,5	2	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU061	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	2	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU063	4	16	8	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	4	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	4	4
HECSSU067	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU069	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	2
HECSSU071	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU073	4	8	8	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECSSU075	4	32	8	1	1	1	1	0,5	8	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	8	0,125	16	0,5	64	4	1	1	1	1
HECSSU077	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	1
HECSSU079	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU081	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSSU083	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU085	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU087	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU089	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	4
HECSSU091	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU093	4	4	4	1	1	0,5	0,5	0,5	8	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU095	4	16	8	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	8	0,125	16	0,5	64	4	0,5	1	1	1
HECSSU097	4	2	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU099	4	2	2	1	1	0,5	0,5	0,5	2	4	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSSU101	4	8	4	1	1	1	0,5	0,5	8	8	0,25	0,25	16	2	0,5	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU103	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	2	0,5	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSSU105	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU109	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU111	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU113	4	4	4	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU115	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSSU117	4	4	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	1	4	2
HECSSU119	4	8	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	0,5	2	0,125	16	0,5	4	4	0,5	2	1	1
HECSSU121	4	2	2	1	1	0,5	0,5	0,5	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	0,5	2	0,125	32	0,5	4	4	0,5	1	1	1
HECSTB010	4	16	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	1	64	4	[redacted]	1	1	1
HECSTB012	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	2	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSTB014	4	2	2	1	1	1	1	1	4	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSTB016	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	2	1	1
HECSVB003	4	16	8	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	[redacted]	1	1	1
HECSVB004	4	4	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSVB006	4	8	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	64	4	[redacted]	1	1	1
HECSVB008	4	4	2	1	1	1	1	1	4	8	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	2	1	1
HECSVB014	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	2	1	1
HECSVB017	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1
HECSVB019	4	32	8	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	8	0,125	16	0,5	64	4	[redacted]	1	1	1
HECSVB022	4	2	2	1	1	1	1	1	2	4	0,25	0,25	16	1	0,25	1	2	0,125	16	0,5	4	4	[redacted]	1	1	1

Lisa 2. 107-214 E. coli tüve. Punasega on märgitud R, rohelisega T ja valgega MT. Mustaga puuduvad andmed.

Litsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sander Arna,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Bioinformaatiliste tööriistade ResFinder ja RGI võrdlus Eestis isoleeritud kliiniliste *Escherichia coli* tüvede antibiootikumiresistentsuse tuvastamisel“, mille juhendaja on Age Brauer reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sander Arna

26.05.2025