TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Karbapeneemresistentsuse ennustustäpsuse võrdlus *Klebsiella pneumoniae* isolaatidel kolme bioinformaatilise tööriistaga: PhenotypeSeeker, ResFinder, Kleborate

Magistritöö

30 EAP

Karita Helde

Juhendajad: prof. Maido Remm

MSc Taavi Riit

TARTU 2025

INFOLEHT

Karbapeneemresistentsuse ennustusvõimekuse võrdlus *Klebsiella pneumoniae* isolaatidel kolme bioinformaatilise tööriistaga: PhenotypeSeeker, ResFinder, Kleborate

Antimikroobne resistentsus (AMR) on kasvav rahvatervise probleem, mida süvendab antibiootikumide liigne ja vale kasutamine. Tõhusaks raviks on vajalik resistentsuse kiire ja täpne tuvastamine. Üheks paljulubavaks lähenemiseks on bakteri isolaatide resistentsusprofiili määramine täisgenoomi sekveneerimise (WGS – *whole genome sequencing*) abil.

Magistritöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse AMR-i ja karbapeneemresistentsuse levikut *Klebsiella pneumoniae* isolaatide seas. Töö praktilises osas võrreldi kolme bioinformaatilise tarkvara – ResFinder, Kleborate ja PhenotypeSeeker – suutlikkust ennustada *CRKP* isolaatide resistentsust meropeneemile, ertapeneemile ja imipeneemile, kasutades WGS andmeid. Lisaks hinnati tööriistade täpsust Eesti haiglatest pärit *K. pneumoniae* isolaatidel.

Märksõnad: antimikroobne resistentsus, karbapeneemresistentsus, *Klebsiella pneumoniae*, ResFinder, Kleborate, PhenotypeSeeker

CERCS: B110 – Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika

Comparative assessment of carbapenem resistance prediction in *Klebsiella pneumoniae* isolates using three bioinformatics tools: PhenotypeSeeker, ResFinder, and Kleborate

Antimicrobial resistance (AMR) poses an increasing threat to public health, driven largely by the overuse and misuse of antibiotics. Effective treatment requires fast and accurate resistance detection. One promising method is the use of whole-genome sequencing (WGS) to determine bacterial resistance profiles.

This master's thesis provides an overview of AMR and the spread of carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates. The experimental part evaluates the performance of three bioinformatic tools – ResFinder, Kleborate, and PhenotypeSeeker – in predicting *CRKP* resistance to meropenem, ertapenem, and imipenem using WGS data. Additionally, the tools' predictive capabilities were assessed on *K. pneumoniae* isolates collected from hospitals in Estonia.

Keywords: antimicrobial resistance, carbapenem resistance, *Klebsiella pneumoniae*, ResFinder, Kleborate,PhenotypeSeeker

CERCS: B110 – Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics

SISUKORD

INFOLEHT 2
SISUKORD 3
KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1. Antimikroobne resistentsus 7
1.2. AMR määramise riiklik korraldus Euroopas ja Eestis 8
1.3. Karbapeneemresistentsus 9
1.4. *Klebsiella pneumoniae* 13
1.5. Tarkvarad antimikroobse resistentsuse määramiseks 15
1.5.1. ResFinder 16
1.5.2. PhenotypeSeeker 16
1.5.3. Kleborate 17
2. EKSPERIMENTAALOSA 19
2.1. Töö eesmärk 19
2.2. Materjalid ja meetodika 19
2.2.1. Andmebaasist andmete otsimine ja allalaadimine 19
2.2.2. Mudelite treenimine ja resistentsuse ennustamine PhenotypeSeeker'iga 20
2.2.3. Resistentsuse ennustamine ResFinder'iga 22
2.2.4. Resistentsuse ennustamine Kleborate'ga 22
2.3. Tulemused 24
2.3.1. Kolme tarkvara võrdlemise üldine plaan 24
2.3.2. Karbapeneemresistentsuse ennustamine assambleeritud isolaatidest 24
2.3.3. Karbapeneemresistentsuse ennustamine assambleerimata toorandmetest 26
2.3.4. Karbapeneemresistentsuse ennustamine Eestist pärit *K. pneumoniae* tüvedel 28
2.3.5. Uue PhenotypeSeeker'i mudeli treenimine ning meropeneemi resistentsuse analüüs Eesti andmetel 31
3. ARUTELU 35
KOKKUVÕTE 39
TÄNUSÕNAD 43
KASUTATUD KIRJANDUS 44
KASUTATUD VEEBIAADRESSID 49
LISAD 50
Lisa 1 50
Lisa 2 51
Lisa 3 52

Lisa 4 53
LIHTLITSENTS 63

KASUTATUD LÜHENDID

AMR – antimikroobne resistentsus

WHO – (ingl k – *World Health Organization*) – Maailma Terviseorganisatsioon

MIC – (ingl k – *minimum inhibitory concentration*) – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

PCR – (ingl k – *polymerase chain reactio*n) – polümeraasi ahelreaktsioon

WGS – (ingl k – *whole genome sequencing*) – täisgenoomi sekveneerimine

OMP – (ingl k– *outer membrane protein*) – välismembraani valgud

PBP – (ingl k – *penicillin–binding protein*) – penitsiliini siduvad valgud

KPC – Klebsiella pneumoniae karbapenemaas

CRKP – (ingl k – *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae*) – karbapeneemresistentne *Klebsisella pneumoniae*

EFSA – (ingl k – *European Food Safety Authority*) – Euroopa Toiduohutusamet

ECDC – (ingl k – *European Centre for Disease Prevention and Control*) – Euroopa Haiguste Ennetamise ja Tõrje Keskus

EARSS – (ingl k – *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) – Euroopa Antimikroobse Resistentsuse Seiresüsteem

ESBL – (ingl k – *extended-spectrum β-lactamase*) – laiendatud toimespektriga β–laktamaase

CGE – (ingl k – *Center for Genomic Epidemiology*) – Taani Genoomse Epidemioloogia Keskus

ST – (ingl k – *sequence type*) – viitab *multilocus sequence typing* (MLST) meetodil määratud bakteriliinile.

CARD – (ingl k – *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) – ulatuslik antibiootikumiresistentsuse andmebaas

SISSEJUHATUS

Antimikroobne resistentsus ehk AMR tähendab haigustekitajate võimet vältida antibiootikumide toimet ning see on üha enam levimas erinevate infektsioonitekitajate seas. AMR kujuneb välja mikroobide omandatud kaitsemehhanismide tõttu. Antibiootikumide liigne ja ebamäärane kasutamine soodustavad resistentsete bakterite kujunemist. See võib omakorda põhjustada tõsiseid infektsioone tervishoiuasutustes ning kujutada ohtu rahvatervisele (Humphries, 2020; Terviseamet, 2024). Karbapeneemresistentne *Klebsiella pneumoniae* (*CRKP*) on WHO (*World Health Organization*) poolt määratud kui kriitilise tähtsusega patogeen, kuna see suudab hõlpsasti omandada erinevaid antibiootikumiresistentsuse geene, sealhulgas karbapenemaase, muutes ravi keeruliseks (World Health Organization, 2024; Podschun & Ullmann, 1998). Seetõttu on oluline välja töötada meetodeid, mis võimaldavad mikroobide resistentsusprofiili kiiret ja täpset ennustamist. Praegu kasutatavad fenotüübilised meetodid on sageli aeganõudvad, keskenduvad piiratud arvule antibiootikumidele ning ei anna teavet resistentsuse tekkemehhanismide kohta (Bayot & Bragg, 2025). Üheks paljulubavaks lähenemiseks on resistentsusprofiili määramine täisgenoomi sekveneerimise ehk WGS (*whole genome sequencing*) andmete põhjal (Anjum et al., 2017).

Täisgenoomi sekveneerimist rakendatakse nii teadus- kui ka rahvatervise laborites üha enam, andmaks head ülevaadet seire raames. Antud meetod on küll kuluefektiivne ja kiire patogeenide ning AMR-tegurite jälgimiseks, kuid selle piiranguks on kliiniliselt oluliste tunnuste ebapiisav tuvastamine. AMR tuvastamiseks WGS-andmete põhjal kasutatakse mitmesuguseid bioinformaatilisi tööriistu, mis erinevad nii oma ülesehituse kui ka kasutatavate algoritmide poolest.

Antud magistritöö eesmärk oli hinnata ja võrrelda karbapeneemresistentsete *Klebsiella pneumoniae* isolaatide antimikroobse resistentsuse ennustamise täpsust kolme antibiootikumi suhtes: meropeneemi, ertapeneemi ja imipeneemi. Ennustusvõimekust analüüsiti nii assambleeritud (FASTA) kui ka assambleerimata toorandmete (FASTQ) põhjal, kasutades ResFinder, Kleborate ja PhenotypeSeeker tarkvara. Lisaks hinnati tööriistade efektiivsust Eesti isolaatide puhul, mis saadi Terviseametist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antimikroobne resistentsus

Antibiootikumid on üks tähtsamaid avastusi meditsiiniajaloos ning tänapäevani väga tõhusad ja asendamatud infektsioonhaiguste ravis (Andersson & Hughes, 2011). Antimikroobsete ravimite peamine eesmärk on ravida ja ennetada inimestel, loomadel ning taimedel esinevaid infektsioone, mida põhjustavad bakterid, viirused, seened või parasiidid. Antimikroobne resistentsus ehk AMR on nende haigustekitajate võime mitte alluda antimikroobsete ravimite toimele (Humphries, 2020; Sotsiaalministeerium, 2024). Resistentsuse tekkimine võib viia olukorrani, kus tavapärased ravimid enam ei toimi, põhjustades infektsioonhaiguste levikut (Sotsiaalministeerium, 2024).

Tervishoiuga seotud infektsioonid on üks levinumaid probleeme tervishoiuteenuste osutamisel, kujutades endast tõsist rahvatervise ohtu (World Health Organization, 2017). Üks viimaste aastate suurimaid murekohti on antibiootikumide väärkasutamine, mis soodustab resistentsete bakterite kujunemist. Selle tulemusena võib juhtuda, et nakatunud patsiente ei ole võimalik enam tõhusalt ravida, kuna nakkust põhjustav bakter on juba olemasolevate antibiootikumide suhtes resistentne ning ei allu ravile ehk on kujunenud antimikroobne resistentsus (Andersson & Hughes, 2011). Maailma Terviseorganisatsioon (WHO – *World Health Organization*) on toonud antimikroobse resistentsuse välja kui ühe kümnest suurimast globaalsest rahvatervise ohust (World Health Organization, 2019). 2019. aastal hinnati bakteriaalse AMR-ga seostatavaid surmajuhtumeid 204 riigis ning leiti, et ligikaudu 4,95 miljonit surma olid kaudselt seotud resistentsusega, sealhulgas 1,27 miljoni juhtumit, mis olid otseselt põhjustatud bakteriaalsest AMR–ist (Murray et al., 2022).

Antimikroobse tundlikkuse testimiseks kasutatakse kõige enam mikrobioloogilisi bakterikultuure. Saadud isolaatide antimikroobset resistentsust tuvastatakse erinevate meetoditega, mis jagunevad kaheks – fenotüübiliseks ning genotüübiliseks. Fenotüübiliste meetodite hulka kuuluvad näiteks ketta difusiooni meetod ja minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC – *minimum inhibitory concentration*) määramine (Bayot & Bragg, 2025). Kuigi need meetodid võimaldavad kvantitatiivselt hinnata bakterite tundlikkust erinevate antibiootikumide suhtes, on need sageli ajakulukad ning limiteeritud vaid testpaneelides olemasolevate antibiootikumidega. Lisaks ei selgita fenotüübilised testid täpseid resistentsuse mehhanisme ning erinevate mikroorganismide kasvunõudlikkus võib oluliselt pikendada diagnoosimise aega. Genotüübilisi meetodeid ehk molekulaarseid meetodeid

kasutatakse sageli koos fenotüübiliste meetoditega, kuna need võimaldavad kiiresti tuvastada resistentsuse geneetilisi aluseid – näiteks konkreetse geeni olemasolu või puudumist. Tüüpiliste meetodite hulka kuuluvad näiteks PCR (*polymerase chain reaction*) ja WGS (Anjum et al., 2017). Markeripõhised molekulaardiagnostika meetodid nagu PCR pakuvad küll kiiremat alternatiivi, kuid katavad vaid vähese arvu teadaolevaid lookuseid, mistõttu võivad nad anda valenegatiivseid tulemusi, kui resistentsus põhineb tundmatul või mitte testitud geenil. Seevastu täisgenoomi sekveneerimine võimaldab ligipääsu kogu bakterigenoomile, mis võib olla täpsem viis AMR fenotüübi määramiseks kui hetkel kasutatavad molekulaarsed meetodid. Koos metagenoomsete meetoditega võib see lähenemine olla isegi kiirem kui traditsiooniline kultuuripõhine testimine biomeditsiinilistes rakendustes (Hu et al., 2024). Olgugi, et genotüübilised meetodid on kiired ning piisavad seireks on neil ka kitsaskohti. Kuigi need meetodid tuvastavad resistentsusgeenide olemasolu, ei viita see alati geenide aktiivsele ekspressioonile – geenid võivad olla inaktiivsed või vaigistatud (Anjum et al., 2017). Samuti ei tähenda resistentsusgeeni puudumine alati tundlikkust, kuna antimikroobne resistentsus on sageli mitmest tegurist mõjutatud nähtus. Näiteks võivad resistentsust põhjustada geenide regulatsioonihäired, mutatsioonid sihtmärk ensüümides või membraani läbilaskvuse muutused – seega on resistentsuse teke ja avaldumine tihti multifaktoriaalne (Humphries, 2020). Arvestades erinevate mehhanismide ja geenide suurt mitmekesisust, ei ole praegu võimalik kõiki potentsiaalseid mehhanisme, geene või kombinatsioone algoritmidega tuvastada. Uusi resistentsusgeene ja mehhanisme avastatakse pidevalt (Anjum et al., 2017; Hu et al., 2024).

1.2. AMR määramise riiklik korraldus Euroopas ja Eestis

Täisgenoomi sekveneerimist rakendatakse üha enam nii teadus- kui ka rahvatervise laborites, kuna see võimaldab saada põhjalikku teavet patogeenide ja AMR tegurite kohta. WGS on eriti väärtuslik kohaliku, riikliku ja rahvusvahelise seire raames, pakkudes kuluefektiivset ning kiiret võimalust AMR tegurite jälgimiseks. Antimikroobse resistentsuse tuvastamine ja seire on Euroopas korraldatud kordineeritult rahvusvahelise koostöö kaudu. Euroopa Haiguste Ennetamise ja Tõrje Keskus (ECDC) juhib AMR-i seireprojekte, kuhu on kaasatud liikmesriikide rahvatervise asutused ja laborid. Antud projektid võimaldavad andmete kogumist, võrdlemist ja varajast reageerimist resistentsete bakterite levikule ning potentsiaalsetele puhangutele.

Eestis tegelevad antimikroobse resistentsuse (AMR) määramisega nii Terviseameti rahvatervise labor kui ka haiglad. AMR seiret korraldab aga keskse asutusena vaid Terviseameti

rahvatervise labor, mis täidab ka referentlabori rolli. Labor on rahvusvaheliselt tunnustatud ka WHO ning ECDC poolt ning osaleb Euroopa seirevõrgustikes nagu EURGen-Net (*European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance*). Näiteks on Eesti osalenud aastatel 2020-2024 EURGen-RefLabCap projektis, mille eesmärk oli eelkõige tugevdada referentslaborite võimekust määrata ja efektiivselt kontrollida *CRE* (*Carbapenem-resistant Enterobacterales*). Sellised projektid aitavad ühtlustada riikide laborivõimekust ja parandada reageerimiskiirust üle kogu Euroopa (Terviseamet, 2025).

Riiklikud referentlaborid koguvad andmeid invasiivsete bakteriaalsete patogeenide (nt *Escherichia coli*, *Klebisella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) kohta. Andmed esitatakse ECDC-le läbi *EpiPulse Cases* portaali kaudu. ECDC kontrollib esitatud andmed ja valideerib need. Seejärel analüüsitakse kogutud andmed, et jälgida AMR trende kogu Euroopas ning avaldatakse ECDC iga-aastastes aruannetes (European Centre for Disease Prevention and Control, 2025).

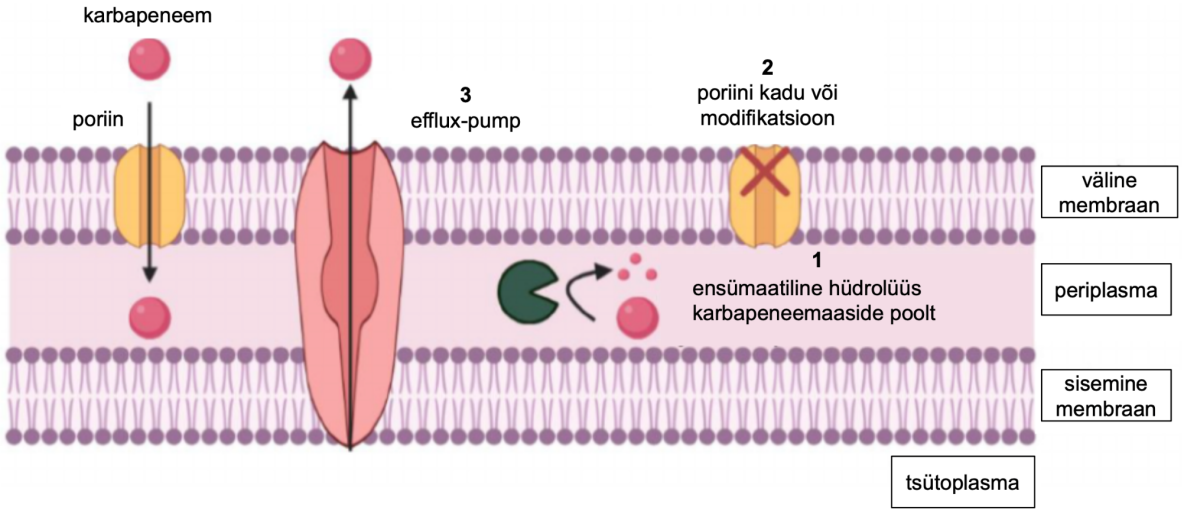
1.3. Karbapeneemresistentsus

Beetalaktaamid on seni ühed kõige laialdasemalt kasutatavad antibiootikumid maailmas tänu oma laiale toimespektrile. Nende hulka kuuluvad penitsiliinid, tsefalosporiinid, monobaktaamid ja karbapeneemid, mida kõiki iseloomustab ühine keemilise struktuuri element – beetalaktaamrõngas (Meletis, 2016; Papp-Wallace et al., 2011).

Karbapeneemid on laia toimespektriga antibiootikumid, mis on tõhusad paljude bakteriliikide vastu ja vastupidavad paljude resistentsusmehhanismide suhtes (Meletis, 2016). Nende keemilist struktuuri iseloomustab süsiniku aatomi olemasolu beetalaktaam rõngas väävli asemel, mis teeb nad stabiilseks ning vastupidavaks β–laktamaaside suhtes (Papp-Wallace et al., 2011). Karbapeneeme peetakse sageli viimaseks ravivalikuks raskesti ravitavate infektsioonide puhul (Meletis, 2016).

Karbapeneemiresistentsus võib bakterites kujuneda mitmete mehhanismide kaudu (Joonis 1):

1. Ensümaatiline hüdrolüüs – karbapeneemaasid inaktiveerivad karbapeneemi molekule, muutes need ebaefektiivseks;
2. Poriinide kadu või muutused – vähendavad karbapeneemide sisenemist rakku;
3. Efflux–pumpade üleekspressioon – viib karbapeneemide aktiivse väljatranspordini rakust, vähendades antibiootikumi kontsentratsiooni sihtkohas (Dixon et al., 2022).



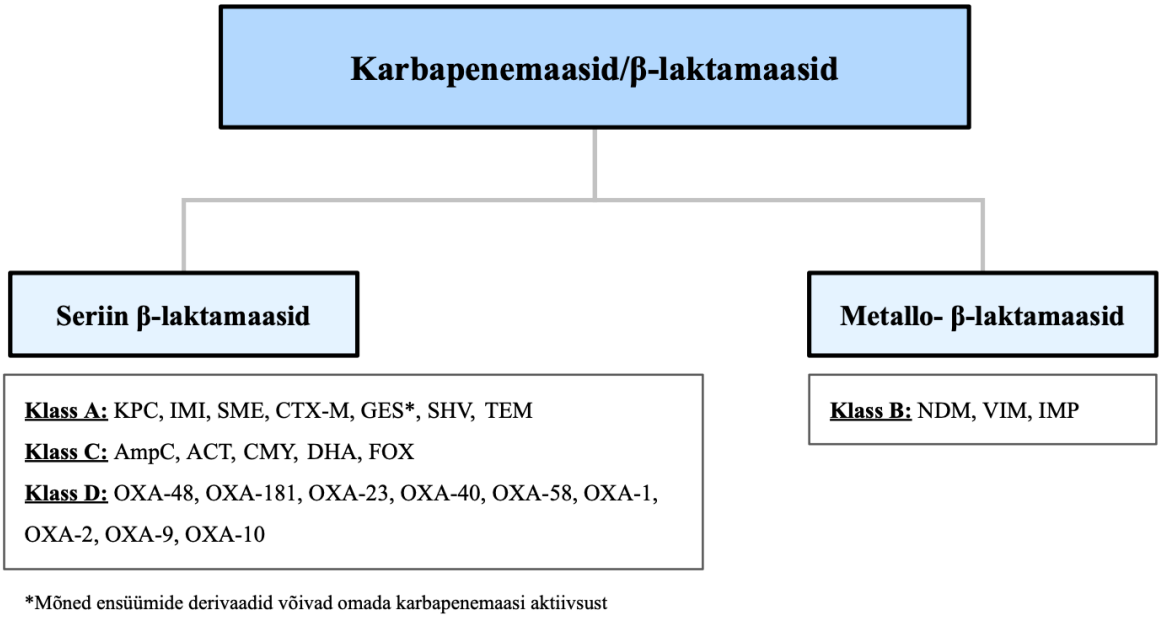
Joonis 1. Karbapeneemresistentsuse mehhanismid enterobakterites. 1. Ensümaatiline hüdrolüüs karbapeneemaas-ensüümide poolt, mille tulemuseks on karbapeneemi inaktivatsioon. 2. Mutatsioonid, mis viivad poriini kadu või modifikatsiooni, pärssides karbapeneemi molekulide sissevoolu. 3. Efflux-pumbad, mis hõlbustavad karbapeneemi molekuli aktiivset transporti rakust välja läbi mõlema membraani, vähendades raku kontsentratsioon. (Dixon et al., 2022)

Sagedaseks resistentsusmehhanismiks on poriinide kadu, mis tuleneb sageli nende geenide ekspressiooni langusest. Poriinid on gramnegatiivsete bakterite välismembraanis asuvad valgukanalid, mis vastutavad väikeste molekulide ja toitainete transpordi eest (Nordmann & Poirel, 2019). Kui bakter vähendab poriinide tootmist, ei pääse karbapeneemid penitsilliini siduvate valkudeni (PBP), mis takistab nende antimikroobset toimet (Meletis, 2016). Teine oluline mehhanism on efflux-pumpade ehk väljavoolu pumpade aktiivsus, mis vastutab ravimite ja muude ainete rakust välja transportimise eest (Nordmann & Poirel, 2019). Juhul, kui väljavoolu pumpade geene ekspresseeritakse tugevalt, suureneb nende hulk rakus, mille tulemusel karbapeneemid eemaldatakse rakust enne sihtmärgini jõudmist (Meletis, 2016; Meletis et al., 2014). Üks peamistest karbapeneemresistentsuse ensümaatiliseks mehhanismiks gramnegatiivstes bakterites on karbapeneemide hüdrolüüs, mida viivad läbi karbapenemaas ensüümid (Bush & Jacoby, 2010; Nordmann & Poirel, 2019). Karbapenemaase kodeeritakse enamasti plasmiididel, mis on väga kergesti levivad horisontaalse geenisiirde kaudu (Nordmann & Poirel, 2019).

β–laktamaasid klassifitseeritakse funktsionaalsuse ja struktuuri alusel Ambleri süsteemi järgi nelja klassi: A, B, C ja D (Joonis 2). Klasside A, C ja D β–laktamaaside aktiivtsentris on seriin, kuid need erinevad üksteisest nii struktuuri kui ka substraadi eelistuse poolest – ehk milliseid antibiootikume nad kõige tõhusamalt hüdrolüüsivad. Klass B β–laktamaaside aktiivtsentriks on tsink (metalloensüümid). Nende ensüümid lõhustavad antibiootikumi beetalaktaamrõnga, mis

muudab ravimi ebaefektiivseks ja võimaldab bakteril säilitada resistentsuse. (Bush & Jacoby, 2010; Nordmann et al., 2011; Nordmann & Poirel, 2019).

Klass A ensüümide hulka kuulub laialt levinud KPC (KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaas). KPC-d kirjeldati esmakordselt 2001. aastal Ameerika Ühendriikides *K. pneumoniae* isolaadis (Yigit et al., 2001). Kõik klass B ensüümid, nagu NDM, VIM ja IMP, hüdrolüüsivad β–laktaamantibiootikume, sealhulgas tsefalosporiine ja karbapeneeme (Kot & Witeska, 2024). Klass C ensüümid (nt Amp–C β–laktamaasid) hüdrolüüsivad peamiselt tsefalosporiine, kuid ei oma otsest tugevat aktiivsust karbapeneemide vastu. Siiski võivad need soodustada resistentsust kombinatsioonis teiste mehhanismidega, nagu poriinide kadumine või väljavoolupumpade aktivatsioon (Bush & Jacoby, 2010; Nordmann et al., 2011; Nordmann & Poirel, 2019). Klass D β–laktamaase nimetatakse OXA–ensüümideks (nt OXA–48 ja OXA–23), mis on saanud nime nende aktiivsuse järgi oksatsilliini vastu. OXA–48 tüüpi ensüümid on maailmas kõige levinumad karbapenemaasid *Enterobacteriaceae* hulgas ja põhjustavad üha sagedamini karbapeneemide ebaefektiivsust (Yigit et al., 2001). Kõiki neid β–laktamaase kodeerivad vastavad nimigeenid (nt *bla–KPC*, *bla–NDM*, *bla–OXA*), mis paiknevad sageli plasmiididel ning levivad horisontaalse geenisiirde teel.



Joonis 2. Karbapeneemaaside/β-laktamaaside klassifikatsioon sõltuvalt nende kesksest katalüütilisest domeenist. Lühendid: ACT, AmpC tüüpi β-laktamaas; AmpC, ampitsilliini kromosomaalne tsefalosporinaas; CMY, tsefamütsiine hüdrolüüsiv β-laktamaas; CTX-M, tsefotaksiimi hüdrolüüsiv β-laktamaas–München; FOX, plasmiididega vahendatud klassi C β-laktamaas; GES, Guajaana laiendatud toimespektriga β-laktamaas; IMI, imipeneemi hüdrolüüsiv β-laktamaas; IMP, imipeneemaas metallo-β-laktamaas; KPC, Klebsiella pneumoniae karbapeneemaas; NDM, New Delhi metallo-β-laktamaas; OXA, oksatsilliini karbapeneemaas/oksatsillinaas; SHV, TEM ensüümi sulfhüdroüülvariant; SME, Serratia marcescens'e ensüüm; TEM, Temoneira klassi A laiendatud toimespektriga β-laktamaas; VIM, Verona integron-kodeeritud metallo-β-laktamaas. (Nordmann & Poirel, 2019)

Karbapeneemresistentsed bakterid kujutavad endast rahvusvahelisel tasandil tõsist ohtu tervishoiuga seotud infektsioonide kontekstis. Aastal 2017 koostatud WHO ülemaailmse prioriteetsete patogeenide nimekirjas kuuluvad ning karbapeneemresistentsed enterobakterid, *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas aeruginosa* kõige kõrgema ohutasemega kategooriasse. Enterobakterite alla kuuluvad näiteks *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli*, mis on eriti raskesti ravitavad, kuna neil on suurenenud antimikroobne resistentsus ja sellega kaasneb suur suremus. Seetõttu on nende bakterite pidev tuvastamine ja jälgimine kriitilise tähtsusega (Nordmann & Poirel, 2019; World Health Organization, 2017).

Enterobacteriaceae perekonna karbapeneemaaside tüübid varieeruvad oluliselt sõltuvalt geograafilisest piirkonnast. Näiteks on KPC ensüüme tuvastatud üle kogu maailma, kuid nende levimus on kõrgem just Ameerika Ühendriikides, Kreekas, Lõuna–Ameerikas, Hiinas ja Taiwanis (Tzouvelekis et al., 2012). NDM ensüümide levik on tihedalt seotud Indiaga (Kumarasamy et al., 2010; Yong et al., 2009), kuid neid on laialdaselt leitud ka Balkani riikides (Dortet et al., 2014) ning Lähis-Ida piirkonnas (Al-Agamy et al., 2013; Dortet et al., 2014; El-

Herte et al., 2012; Liu et al., 2015; Zowawi et al., 2014). OXA–48 tootev *K. pneumoniae* on endeemiline eelkõige Türgis, Marokos, Liibüas, Egiptuses, Tuneesias (Nordmann & Poirel, 2014), kuid selle esinemist on dokumenteeritud ka Vahemere piirkonnas (Poirel et al., 2012), Lähis–Idas (Dortet et al., 2012; Matar et al., 2010; Shibl et al., 2013) ja Euroopa riikides (Cuzon et al., 2011; Pfeifer et al., 2012). Lisaks globaalsele varieeruvusele esineb resistentsuseensüümide jaotuses erinevusi ka lokaalsel kogukonnatasandil. Näiteks KPC–tüüpi ensüüme esineb sagedamini haiglakeskkonnas, samas kui OXA–48 ja NDM tootvaid tüvesid levib laialdasemalt kogukondades. Selline geograafiline varieeruvus rõhutab vajadust kohandada karbapeneemiresistentsuse seiret ja testimismetoodikat vastavalt piirkondlikele oludele.

1.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae on gramnegatiivne bakter ning kuulub perekonda *Enterobacteriaceae*. Inimestel esineb *K. pneumoniae* ninaneelus ja soolestikus, olles osa normaalsest mikrobiootast. Teatud tingimustel, eriti nõrgenenud immuunsüsteemiga patsientidel või haiglates, võib ta põhjustada mitmesuguseid infektsioone. Bakter on tuntud oma võime poolest omandada mitmesuguseid antibiootikumiresistentsus geene, sealhulgas karbapenemaase tootvaid geene, mis raskendavad ravi ja piiravad tõhusate ravivõimaluste valikut (Podschun & Ullmann, 1998).

Klebsiella pneumoniae on üks kuuest juhtivast patogeenist, kes on seotud antimikroobse resistentsuse poolt põhjustatud surmadega (Podschun & Ullmann, 1998). Karbapeneemresistentne *K. pneumoniae* (*CRKP*) on WHO poolt määratud kriitilise tähtsusega patogeeniks, mille vastu on kiiresti vaja uusi antibakteriaalseid ravimeid välja töötada. *CRKP* põhjustatud infektsioonid on seotud suure suremuse, pikema haiglaravi ja piiratud ravivõimalustega (World Health Organization, 2024).

Klebsiella pneumoniae on üks peamisi haiglas levivate infektsioonide põhjustajaid, olles seotud kuseteede infektsioonide, pneumoonia, sepsise ja kirurgiliste haavainfektsioonidega. Kuna bakterid võivad haiglakeskkonnas kiiresti levida, põhjustavad nad sageli haiglasiseseid puhanguid. *K. pneumoniae* kandluse määrad muutuvad oluliselt haiglakeskkonnas vastavalt haiglas viibimise aja pikkusele. Peamised leviku allikad on patsientide seedetrakt ja haiglatöötajate käed ning meditsiiniseadmed. Uuringud on näidanud, et haiglatöötajatel on kõrgem *Klebsiella* kandluse määr võrreldes üldrahvastikuga. Kõrget haiglasisest *Klebsiella* koloniseerumise määra seostatakse ka ulatusliku antibiootikumide kasutamisega, mis soodustab multiresistentsete *Klebsiella* tüvede teket ja levikut (Podschun & Ullmann, 1998).

K. pneumoniae infektsioonide esmaseks raviks kasutatakse sageli karbapeneeme, nagu meropeneem, imipeneem ja ertapeneem. Karbapeneemid on laia toimespektriga antibiootikumid, mida kasutatakse raskete ja resistentsete bakteriaalsete infektsioonide raviks, kui tavalised antibiootikumid enam ei toimi. Näiteks laiendatud toimespektriga β–laktamaase (ESBL – *extended-spectrum β-lactamase*) tootvate bakterite korral on karbapeneemid üks viimaseid ravivõimalusi. Karbapeneemide kasutamine on alates 1990. aastate keskpaigast suurenenud, millest tulenevalt on suurenenud karbapeneemresistentsuse levik. Tundlikkust karbapeneemide suhtes testitakse erinevate fenotüübiliste meetoditega. Juhul, kui bakter on tundlik saab antud antibiootikume kasutada efektiivseks raviks, vastasel juhul tuleb kaaluda muid ravimeetmeid (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

Uuringud on näidanud, et karbapaneemresistentset *K. pneumoniae* põhjustatud infektsioone on võimalik ravida kasutades näiteks karbapeneemide toimet pärssivaid β–laktamaasi inhibiitoreid. Kahjuks on nende efektiivsus piiratud metallo–β–laktamaaside ja teatud oksatsillinaaside vastase toimega (Lee & Burgess, 2012; Nordmann & Poirel, 2019). Üheks silmapaistvaks näiteks võiks tuua 2008. aastal toimunud KPC–positiivsete *Klebsiella* juhtumite puhangu Chicago piirkonnas, mis haaras 26 erinevat tervishoiuasutust. Puhangu järel algatatud kvaliteediparandusprojekt keskendus koloniseerumise ja nakkuste ennetamisele intensiivravi osakondades. Peamised meetmed, mida soovitati olid: patsientide regulaarne skriinimine KPC suhtes, KPC – positiivsete patsientide kontaktisolatsioon ja geograafiline eraldamine, kõigi patsientide igapäevane pesemine, tervishoiutöötajate koolitamine ja nende jälgimine, keskendudes kätehügieenile. Tulemustest selgus, et KPC koloniseerumise levimus langes 46%–lt 34%–le ning infektsioonide esinemissagedus vähenes 50%. Antud uuring näitas, et koordineeritud meetmed suudavad vähendada multiresistentsete patogeenide infektsioone kõrge riskiga tervishoiuasutustes (Hayden et al., 2015).

CRKP puhul on tundlikkuse testimine eriti oluline, kuna resistentsus nende antibiootikumide suhtes piirab oluliselt ravivõimalusi. Karbapeneemresistentse *K. pneumoniae* poolt põhjustatud infetksioonid on seotud kõrge suremuse, pikema haiglaravi ja sagedasemate tühistsutsega. Seetõttu on karbapeneemide tundlikkuse määramine *K. pneumoniae* ravis oluline mitte ainult individuaalse patsiendi raviks, vaid ka haiglasiseste puhangute ennetamiseks ja kontrollimiseks, võimaldades kiiret reageerimist resistentsete tüvede leviku korral (Chen et al., 2022; Zhang et al., 2024).

1.5. Tarkvarad antimikroobse resistentsuse määramiseks

Karbapenemaase tootvate isolaatide fenotüübiline tuvastamine on kliinilise mikrobioloogia laborites osutunud suureks väljakutseks. Karbapenemaasi olemasolu ei pruugi alati põhjustada kõrget karbapeneemresistentsust, vaid võib suurendada minimaalset inhibeerivat kontsentratsiooni, mis võib jääda tundlikkuse või vahepealse tundlikkuse piiridesse. Suurenenud MIC-väärtused võivad laboritöötajatel jääda märkamata, kui ei rakendata fenotüübilisi kinnitusteste. Tuvastamise täpsust võivad mõjutada näiteks ka inokulaadi ebapiisav kogus tundlikkuse testimisel. Karbapenemaaside ekslik tuvastamine võib viia sobimatu raviskeemi määramiseni, mis omakorda võib halvendada patsiendi ravi tulemusi (Hirsch & Tam, 2010).

AMR-fenotüüpide ennustamiseks genoomi järjestuste põhjal kasutatakse peamiselt kahte arvutuslikku lähenemisviisi: reeglipõhiseid ning masinõppel põhinevaid (ML) meetodeid. Reeglipõhises lähenemises määratakse AMR-fenotüübid, võrreldes proovi andmeid andmebaasi andmetega, et määrata resistentsusprofiil. Need andmebaasid sisaldavad teadaolevaid ühe nukleotiidi polümorfisme (SNP – *single nucleotide polymorphism*), indel'eid (st väikeseid DNA-järjestuse sisestusi või deletsioone) ja/või AMR-ga seotud geene (Zankari et al., 2012; Xavier et al., 2016). Kuigi see lähenemisviis võimaldab tuvastada AMR–mehhanisme, määrates kindlaks variandid ja geenid, on see olemuslikult piiratud kasutatud kataloogi või andmebaasi ulatuse, kvaliteedi ja tõlgenduse täpsusega. Reeglipõhisel lähenemisel on mitmeid piiranguid. Esiteks ei anna leitud geeni või mutatsiooni olemasolu kindlat teavet fenotüübilise resistentsuse kohta – geen võib olla inaktiivne, osaliselt esindatud või mõnevõrra erinev teadaolevast resistentsusgeenist. Lisaks on resistentsuse tekkeks vajalik mitme geeni või regulaatorpiirkondade, näiteks promootorite, koosmõju. Teiseks ei võimalda reeglipõhine lähenemine resistentsuse kvantitatiivset hindamist – tulemuseks on vaid kvalitatiivne (resistentne/mitte-resistentne) klassifikatsioon. Masinõppel põhinevad meetodid kasutavad erinevaid klassifitseerimisalgoritme, sealhulgas näiteks *k*–meeride, pan-genoomide, kogu genoomi hõlmavate või levinud mutatsioonide tuvastamist, vajaduseta mõista molekulaarset mehhanismi (Drouin et al., 2016; Hu et al., 2024). AMR genoomide järjestused pakuvad võimalust arendada masinõppel põhinevaid AMR-fenotüpiseerimise meetodeid, mis on potentsiaalselt paindlikumad ja pakuvad täpsemat strateegiat AMR ennustamiseks (Drouin et al., 2016; Hu et al., 2024).

1.5.1. ResFinder

ResFinder on tööriist, mille on välja töötanud Taani Genoomse Epidemioloogia Keskus (CGE – *Center for Genomic Epidemiology*) ning mis on väga laialdaselt kasutusel just resistentsusgeenide määramiseks. Antud tööriist on vabalt kättesaadav ning lihtsasti kasutatav nii veebis kui ka käsurealt. ResFinder kasutab käsitsi kureeritud andmebaasi, mida pidevalt hooldatakse ning uuendatakse. ResFinder on võimeline tuvastama antimikroobse resistentsuse fenotüüpe, otsides andmebaasis olevate antimikroobse resistentsuse geenide olemasolu või puudumist. Siiski on sellel teatud piirangud, eriti vähem uuritud või harva esinevate genotüüpide puhul, mille kohta puuduvad piisavad andmed. Kuna meie teadmised resistentsusmehhanismide ja nende geneetilise aluse kohta on endiselt ebatäielikud, sõltub ResFinderi usaldusväärsus suurel määral andmebaasi ulatusest ja ajakohasusest (Bortolaia et al., 2020).

Resfinder saab sisendina kasutada nii assambleeritud genoome (FASTA) kui ka toorlugemeid ehk assambleerimata genoome (FASTQ). Kasutades sisendina toorlugemeid kasutatakse assambleerimise asemel KMA-d. KMA (*k-mer alignment*) ülesanne on joondada toorjärjestuse andmed (lugemid) otse andmebaasis olevate AMR geenidega. Genotüübiliselt ennustatud ja fenotüübiliselt tuvastatud isolaatide vastavus kliiniliselt määratud fenotüüpidega oli võrdluskatsetes ResFinder'i autorite poolt läbi viidud analüüsis keskmiselt üle 95%. Enamikku neist lahknevustest peeti seotuks fenotüübiliste läviväärtuste probleemide ja/või NGS–andmete sekveneerimissügavusega (Bortolaia et al., 2020; Florensa et al., 2022). Teistes uuringutes on ResFinderi resistentsuse ennustustäpsuseks raporteeritud ka madalamaid väärtusi, näiteks 73% või isegi 50% (Madden et al., 2024; Mahfouz et al., 2020).

1.5.2. PhenotypeSeeker

PhenotypeSeeker (PS) on Tartu Ülikooli Bioinformaatika õppetoolis on välja töötatud tarkvara, mis suudab ennustada AMR resistentsuse fenotüüpe, kasutades fenotüübi-spetsiifiliste järjestuse fragmentide (*k*–meer) tuvastamist (Aun et al., 2018). Ennustamiseks on vajalik eelnevalt treeningandmete põhjal luua statistiline mudel. Loodud mudeliga saab seejärel ennustada uuritava bakteriaalse isolaadi sekveneerimisandmetest fenotüüpi.

Alternatiivne lähenemisviis on keskenduda fenotüübi põhilistele geneetilistele tunnustele, näiteks *k*–meeridele. *K*–meerid on lühikesed fikseeritud pikkusega DNA järjestused, mis võimaldavad tuvastada nii üksikuid nukleotiidseid muutusi kui ka insertsioone ja deletsioone,

mis on seotud spetsiifilise fenotüübiga (Compeau et al., 2011). Genoomivariatsioonidele on iseloomulikud kindlad k-meeride mustrid neid ümbritsevates DNA-järjestustes. Genotüpiseerimiseks ehk teadaoleva variatsiooni määramiseks saab lugeda, kui palju ja kui tihti need ümbritsevad *k*–meerid esinevad sekveneerimislugemites. Esile võib tuua ka, et *k*–meeride põhjal saab tõhusalt kirjeldada ühe– ja mitmenukleotiidilisi muutusi, lühikesi insertsioone või deletsioone ning ka geenide lisandumist või puudumist (sh plasmiidides olevad geenid). Antud erinevuste uurimiseks oleks muul juhul vaja kasutada eri tüüpi tarkvara iga mutatsiooni tüübi tuvastamiseks. *K*–meeride kasutamine hoiab ära ka vajaduse genoome assambleerida, mis muidu lisaks andmete töötlemisse täiendava sammu (Aun et al., 2018).

Aun jt uuringus on välja toodud, et *Clostridioides difficile* puhul, kus resistentsus on seotud üksikute mutatsioonide või geeni sisestusega, saavutati väga kõrge ennustustäpsus – üle 96%. See viitab tööriista sobivusele lihtsamate resistentsusmehhanismide tuvastamiseks. Samas osutus *Pseudomonas aeruginosa* resistentsus raskemini ennustatavaks, kuna selle puhul on resistentsus sageli seotud mitme geeni ja regulatsioonivõrgustiku koostoimega, mistõttu jäi ennustustäpsus madalamaks (88%) (Aun et al., 2018).

1.5.3. Kleborate

Kleborate on tööriist, mis on mõeldud spetsiaalselt *K. pneumoniae* ja selle liigikompleksi genotüpiseerimiseks. Peamiselt tuvastab Kleborate põhilisi virulentsus– ja AMR–lookuseid, liiki, liini (ST – *sequence type*) ning K– ja O–antigeeni serotüüpe assambleeritud genoomidest, teostades homoloogia otsinguid CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) andmebaasi vastu. Antud tööriist keskendub üksnes nendele geneetilistele omadustele, millel on tõendatud kliiniline seos *K. pneumoniae* fenotüübiga ning omavad kinnitatud kliinilist tähtsust (Lam et al., 2021). Lisaks karbapeneemaasi geenide tuvastamisele on Kleborate võimeline tuvastama ka OmpK-valkudega seotud poriinide defekte, mis on teadaolevalt seotud karbapeneemresistentsuse fenotüübiga. See rõhutab, et resistentsust ei määra üksnes ensümaatilised mehhanismid, vaid ka struktuursed muutused bakteriraku välismembraanis, mis mõjutavad antibiootikumi ligipääsu sihtmärgile. (Fajardo-Lubián et al., 2019; Wong et al., 2019). Foster-Nyarko et al. on oma uuringus näidanud, et Kleborate tuvastustäpsus omandatud AMR-geenide ja resistentsusmutatsioonide puhul ulatub 88 – 100% erinevate ravimiklasside lõikes.

On teada, et genotüüpide ja fenotüüpide vahel on tavaliselt kõrge vastavus, tänu millele saab AMR geenide põhjal ennustada AMR fenotüüpi. Kleborate avaldab tulemustes vaid genotüübi,

kuid kliinilist antibiootikumiresistentsust või virulentsust ei ennusta. Kuigi selle üheks tugevuseks on spetsiifiline keskendumine *Klebsiella pneumoniae*'le, võib selline kitsas fookus osutuda ka piiranguks – eriti olukordades, kus soovitakse rakendada samu analüüsivõtteid mitmesuguste liikide puhul. Samas võimaldab liikidepõhine lähenemine täpsemalt tõlgendada AMR-geene WGS-andmetes, vältides segadust, mida võivad põhjustada üldised andmebaasid ja tööriistad (Lam et al., 2021).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Antibiootikumiresistentsus kujutab endast üha kasvavat ohtu rahvatervisele, mistõttu on kriitiliselt oluline välja töötada meetodid, mis võimaldaksid kiiresti ja täpselt tuvastada bakterite resistentsusprofiile. Praegu kasutusel olevad traditsioonilised laborimeetodid on sageli aeganõudvad, mis võivad viivitada raviotsuste tegemist ning piirata võimalusi varajaseks sekkumiseks resistentsete tüvede leviku korral. Seetõttu on vaja uusi, tõhusaid lahendusi, mis võimaldavad antibiootikumiresistentsuse varajast ja täpset prognoosimist. Üheks paljulubavaks lähenemiseks on täisgenoomi sekveneerimisel (WGS) põhinev resistentsusprofiili ennustamine, mis võib kiirendada diagnostikat ja täiendada olemasolevaid meetodeid.

Magistritöö eesmärk oli testida kolme erineva tarkvara (PhenotypeSeeker, ResFinder ning Kleborate) antimikroobse resistentsuse määramise võimekust.

Täpsemad eesmärgid olid:

1) kolme tarkvara spetsiifilisuse ja tundlikkuse võrdlus assambleeritud (FASTA) isolaatidel;
2) kolme tarkvara spetsiifilisuse ja tundlikkuse võrdlus assambleerimata (FASTQ) toorandmetes;
3) kolme tarkvara spetsiifilisuse ja tundlikkuse võrdlus Eesti päritolu tüvede resistentsuse määramiseks;
4) uue, potentsiaalselt Eesti andmeid paremini kirjeldava PhenotypeSeeker ennustusmudeli (OXA-mudel) koostamine ja selle spetsiifilisuse ja tundlikkuse testimine.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Andmebaasist andmete otsimine ja allalaadimine

Lähteandmeteks olid *K. pneumoniae* assambleeritud ning assambleerimata genoomid, mis saadi BV–BRC andmebaasist. Päring andmebaasist tehti 08.02.2024. Eesti *K. pneumoniae* isolaadid saadi Terviseametist 2024 aasta oktoobris.

Assambleeritud genoomide allalaadimisel BV–BRC andmebaasist kasutati filtreid täpsemate andmete leidmiseks. Antibiootikumideks valiti – meropeneem, imipeneem ning ertapeneem; fenotüübiks valiti – resistentne, tundlik; laboratoorseks meetodiks valiti: disk difusioon,

puljongi lahjendamine; tõendusmeetodiks valiti: laboratoorne meetod; public (*true*), genoomi kvaliteet - hea; peremees organism – inimene, peremees grupp – inimene.

Toorandmed laaditi alla *Sequence Read Archive* (SRA – *Sequence Read Archive*) andmebaasist test–andmestikku kaasatud isolaatidel, millel oli lisatud SRA kood.

Terviseameti andmed on kogutud Eesti haiglatelt seire raames aastatel 2023–2024. Isolaatide fenotüübid on määratud haiglate poolt kasutades MIC testi. Haiglate poolt määratud tundlikkuse määramisel on aluseks EUCAST (*European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing*) poolt välja antud murdepunktid (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019).

Korduv analüüsi etapis laaditi BV–BRC andmebaasist alla assambleeritud meropeneemi genoomid. Fenotüübiks valiti andmebaasis sorteerimisel – resistentne, tundlik; laboratoorseks meetodiks valiti: Computational Prediction; tõendusmeetodiks valiti public (*true*), genoomi kvaliteet – hea; peremees organism – inimene, peremees grupp – inimene. Antud valikute puhul puudusid laboratoorse tõendusmeetodiga isolaadid. Päring andmebaasist tehti 5.04.2025.

Kõikide isolaatide koodidega saab tuvtuda Lisa 4.

2.2.2. Mudelite treenimine ja resistentsuse ennustamine PhenotypeSeeker'iga

Kõik kolm tarkvara vajavad ennustamiseks mingeid eelnevaid teadmisi resistentsusest. ResFinder ja Kleborate kasutavad selleks olemasolevaid AMR geenide andmebaase. PhenotypeSeeker vajab ennustamiseks k-meeridel põhinevat statistilist mudelit, mis tuleb iga antibiootikumi jaoks eraldi treenida resistentsete ja mitte-resistentsete isolaatide pealt. PhenotypeSeeker'i mudeli treenimiseks laaditi alla BV–BRC andmebaasist nii resistentsed kui ka tundlikud isolaadid. Kuna treenimiseks kasutatud isolaadid ja testimiseks kasutatud isolaadid ei tohi kattuda, siis jagati andmed test- ja treeningandmestikeks, mis tagab ja täpsema mudeli treenimise. Iga antibiootikumi kohta saadi treenimisandmestikuks 100 resistentset ning 100 tundlikku isolaati. Välja arvatud ertapeneemi puhul, kus saadi 100 resistentset ning 50 tundlikku isolaati. Assambleeritud genoomide põhjal loodi kolm ennustusmudelit, kus igale antibiootikumile vastas üks mudel (meropeneem, imipeneem ja ertapeneem). Selleks laaditi alla PhenotypeSeeker versiooniga 1.0.2 PhenotypeSeeker on avatud tarkvara ja saadaval GitHubis – *https://github.com/bioinfo-ut/PhenotypeSeeker*.

Esimeses etapis loodi fail nimega "*data.pheno*", mis sisaldas järgmiseid andmeid: isolaatide koodid, failide assukot asukoht arvutis ning resistentsusfenotüüpi. Resistentsusfenotüüp oli tähistatud numbriliselt ühega ning tundlikkus nulliga (Joonis 3). Seejärel aktiveeriti PhenotypeSeeker'i tööriist, kasutades käsurida joonisel 4, mis koostas "*data.pheno*" faili põhjal ennustusmudeli.

ID	Addresses	Meropenem
VL_0464	PS_modeling_example_files/VL_0464.fasta	0
VL_0456	PS_modeling_example_files/VL_0456.fasta	1
VL_0453	PS_modeling_example_files/VL_0453.fasta	1
VL_0442	PS_modeling_example_files/VL_0442.fasta	0

Joonis 3. Näidis failist data.pheno.

```
phenotypeseeker modeling data.pheno
```

Joonis 4. PhenotypeSeeker'i ennustusmudeli jaoks kasutatud käsurida, mis vajab sisendina mudeli loomiseks data.pheno faili (Joonis 3).

Käsu väljundiks on 6 faili:

1) "*chi-squared_test_results.txt*", mis sisaldab kõikide isolaatidest leitud *k*–meeride sagedusi resistentsete ja mitte-resistentsete isolaatide genoomides ning nende *k*–meeride seose statistilist olulisust χ^2–testi põhjal (p–väärtused). Lisaks on failis väja toodud *k*–meeride järjestused ning isolaatide arv ja nimed, milles *k*-mer esineb.

2) "*k-mers_filtered_by_pvalue.txt*" sisaldab *k*–meeride alamhulka, mille χ^2–testi p–väärtus on väiksem kui 0,05.

3) Regressioonimudel väljastatakse binaarse failina "*log_reg_model.pkl*".

4) "*summary_of_log_reg_analysis.txt*" sisaldab teavet läbi viidud regressioonanalüüsi kohta.

5) "*k-mers_and_coefficients_in_log_reg_model.txt*" sisaldab iga mudelis parameetrina kasutatud *k*–meeri regressioonimudeli koefitsiente.

6) "*Log.txt*" on PhenotypeSeeker'i logifail, mis salvestab käsu jooksutamisega seotud infot.

Seejärel kasutatakse "*PhenotypeSeekeri prediction*", mis ennustab sisendproovide fenotüüpe, kasutades mudelit, mis on loodud eelnevalt „*PhenotypeSeeker modeling*". Luua tuleb eelnevalt

kaks faili "*inputfile1*" ning "*inputfile2*". Esimene fail sisaldab tabeldusmärkidega eraldatud loendeid (1) proovi koodidest ja (2) proovi FASTA/FASTQ failiaadressidest. Teine fail on tekstifail, mis sisaldab tabeldusmärkidega eraldatud loendit (1) ennustatava fenotüübi nimest ja (2) vastava mudeli aadressist ("*log_reg_model_Azithromycin.pkl*"). Ennustuse käivitamiseks tuleb sisestada käsk, mis on välja toodud joonisel 5.

```
phenotypeseeker prediction inputfile1 inputfile2
```

Joonis 5. PhenotypeSeeker'i ennustuse jaoks kasutatud käsurida, mis vajab ennustuse läbiviimiseks sisendina kahte faili.

Pärast käivitamist loeb antud programm sisend proovidest *k*–meere, millele järgneb mudeli spetsiifiliste *k*-meeride olemasolu või puudumise tuvastamine igas proovis. Ennustuse tulemused salvestatakse faili "*predictions_Azithromycin.txt*".

2.2.3. Resistentsuse ennustamine ResFinder'iga

Järgnevalt viidi läbi AMR fenotüübi ennustus kasutades ResFinder tööriista. Algfailideks olid FASTA failid. Analüüsis kasutati ResFinderi versiooni on 4.4.2. AMR analüüs teostati ResFinder tööriistaga ka toorlugemitel.

ResFinder'i tööriistaga ennustamiseks, kasutati käsurida, mis on välja toodud joonisel 6.

```
python -m resfinder -ifa "$file" -l 0.9 -t 0.9 -acq -c
   -db_res db_resfinder
   -db_point db_pointfinder
   --species klebsiella
   -o "$output_file"
```

Joonis 6. ResFinder tööriistaga ennustuse jaoks kasutatud käsurida.

2.2.4. Resistentsuse ennustamine Kleborate'ga

Lisaks teostati AMR analüüs assambleeritud genoomidel kasutades Kleborate tööriista. Analüüsis kasutati Kleborate v3.1.0 versiooni. Kleborate tööriistaga AMR ennustamiseks kasutati käsurida, mis on välja toodud joonisel 7.

```
kleborate
   -a "$filepath"
   -o "$result_folder"
   -m klebsiella_pneumo_complex__amr
```

Joonis 7. Kleborate tööriistaga ennustuse jaoks kasutatud käsurida.

2.3. Tulemused

2.3.1. Kolme tarkvara võrdlemise üldine plaan

Magistritöö üldiseks eesmärgiks oli võrrelda kolme bioinformaatilise tööriista ennustustäpsust, olenevalt algandmete tüübist ja isolaatide päritolust. Võrdluseks valiti kolm AMR–ennustustarkvara (ResFinder, Kleborate ja PhenotypeSeeker), mille valik põhines nende algoritmilisel mitmekesisusel: reeglipõhised lähenemised, liigispetsiifiline analüüs ning masinõppel põhinev ennustus. Kuna erinevad bioinformaatilised tööriistad kasutavad eri algoritmilisi lähenemisi, on oluline mõista nende tugevusi ja piiranguid, et teha teadlikke valikuid vastavalt analüüsi eesmärkidele ning praktilistele vajadustele.

Tarkvarade võrdlemiseks hinnati nende ennustuste tundlikkust ja spetsiifilisust erinevatest andmebaasidest alla laetud *K. pneumoniae* isolaatide peal. Tulemused antakse kõikidel joonistel edasi tundlikkuse ning spetsiifilisusena. Tundlikkus näitab, kui suure osa uuritava omaduse (antud juhul AMR) esinemisest uuritav tarkvara õigesti ennustab. Spetsiifilisus näitab, kui suure osa uuritava omaduse mitte-esinemisest (antud juhul isolaadi mitte-resistentsusest) kasutatud mudel õigesti ennustab. Ideaalne tarkvara peaks ennustama 100% tundlikkuse ja 100% spetsiifilisusega, kuid enamasti tuleb leppida kompromissidega. Paljude tarkvarade puhul esineb olukord, et ennustustel saavutatakse kõrge tundlikkus, kuid madal spetsiifilisus või vastupidi.

Järgnevalt analüüsitakse iga tarkvara tulemusi, keskendudes nende võimekusele ennustada resistentsust kolme olulise karbapeneemi suhtes – meropeneem, ertapeneem ja imipeneem.

2.3.2. Karbapeneemresistentsuse ennustamine assambleeritud isolaatidest

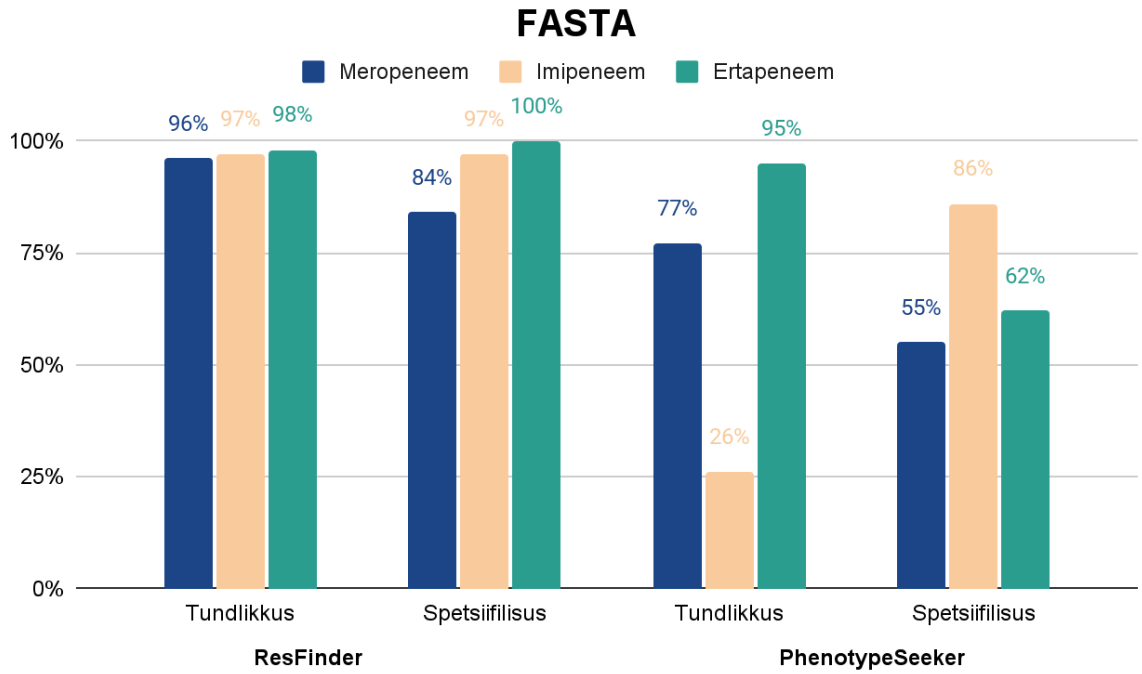
Töö esimeses etapis viidi läbi karbapeneemresistentsuse ennustamine assambleeritud (FASTA) andmebaasi andmetel, et võrrelda AMR ennustamise täpsust kolme bioinformaatilise tööriistaga. Kasutatud tööriistad olid ResFinder, Kleborate ja PhenotypeSeeker. PhenotypeSeeker'i puhul kasutati andmebaasi andmetel treenitud mudelit. Tarkvarade testimiseks laaditi alla BV–BRC andmebaasist iga antibiootikumi kohta 200 *K. pneumoniae* genoomi, ideaalis mõlema fenotüüpi sama arv ehk 100 resistentset ning 100 mitte-resistentset. Andmevalikul eelistati genoome, mis olid sekveneeritud Illumina tehnoloogiaga. Mõnel juhul ei olnud võimalik leida piisaval hulgal resistentseid isolaate, mistõttu kasutati väiksemaid andmekogumeid. Näiteks ertapeneemi resistentsuse testimiseks õnnestus koguda vaid 100 resistentset ning 52 mitte-resistentset genoomi.

Meropeneemi resistentsuse ennustustäpsus oli ResFinder puhul kõrge. Resistentsuse ehk tundlikkuse ennustus protsent oli 96% ning spetsiifilisuse protsent 84%. Analüüsides isolaate PhenotypeSeeker'ga erinesid tulemused eelnevatest ennutustest. Ennustusprotsendid jäid alla 80%–i, meropeneemi tundlikkus 77% ning spetsiifilisus 55% (Joonis 8). Selgus, et ResFinder ja Kleborate tarkvaraga läbiviidud analüüside tulemused on identsed ning seetõttu on lihtsuse mõttes edaspidi välja toodud vaid ResFinder'i tulemused.

Imipeneemi puhul saavutas ResFinder samuti kõrge ennustustäpsuse – tundlikkus ja spetsiifilisus mõlemad 97%. PhenotypeSeeker'i, olid nii tundlikkus kui ka spetsiifilisus märkimisväärselt madalamad. Imipeneemi tundlikkus 26% ning spetsiifilisus 86%. Tulemused viitavad kallutatusele tundlike isolaadide klassifitseerimisel resistentseteks, mistõttu mudeli üldine täpsus väheneb (Joonis 8).

Ertapeneemi puhul suutis ResFinder anda kõige täpseimaid tulemusi. Tundlikkus oli 98% ning spetsiifilisus 100%. PhenotypeSeeker suutis kolmest antibiootikumist ennustada kõige paremini just ertapeneemi resistentsust – tundlikkus 95% ning spetsiifilisus 62%. Ertapeneemi puhul tuleb arvesse võtta, et andmebaasis oli ligipääs vaid 52–le mitte-resistentsele isolaadile, mis võib mõjutada tulemuste üldistatavust (Joonis 8).

Assambleeritud andmetel läbiviidud AMR ennustus näitas, et ResFinder (ja sellega identselt ennustav Kleborate) andis kõigi kolme antibiootikumi puhul kõige täpsemaid tulemusi. PhenotypeSeeker'i ennustusmudel jäi neile täpsuselt alla.



Joonis 8. Assambleeritud (FASTA) andmebaasi andmetel läbiviidud AMR ennustamise tulemused, mis on määratud tundlikkuse ning spetsiifilisusega. ResFinder ning Kleborate tööriista tulemused olid identsed, seega pole Kleborate joonisel välja toodud.

2.3.3. Karbapeneemresistentsuse ennustamine assambleerimata toorandmetest

Selleks, et hinnata algandmete tüübi mõju resistentsuse ennustustäpsusele, korrati analüüsi toorandmetega (FASTQ). Esialgse hüpoteesi kohaselt võiks toorlugemitel põhinev analüüs anda suurema täpsuse, kuna need andmed sisaldavad rohkem informatsiooni kogu genoomi kohta, sh ka piirkondi, mis võivad jääda assambleeritud andmetes välja. Toorandmed laaditi alla SRA andmebaasist isolaatide puhul, kus oli lisatud vastav SRA kood. Meropeneemi kohta laaditi alla 85 resistentset/98 mitte-resistentset isolaati, ertapeneemi puhul 88 resistentset/60 mitte-resistentset ning imipeneemi isolaate saadi sama palju andmeid kui varasemas etapis ehk 100 resistentset/52 mitte-resistentset.

Assambleerimata genoomide ehk toorandmete (FASTQ) põhjal viidi AMR ennustamine läbi kasutati kahte tarkvara: ResFinder ning PhenotypeSeeker. Kleborate ei võimalda toorlugemite analüüsi ja seetõttu seda antud etapis ei kasutatud. PhenotypeSeeker'i analüüsi puhul kasutati eelnevalt andmebaasipõhiselt loodud ennustusmudelit.

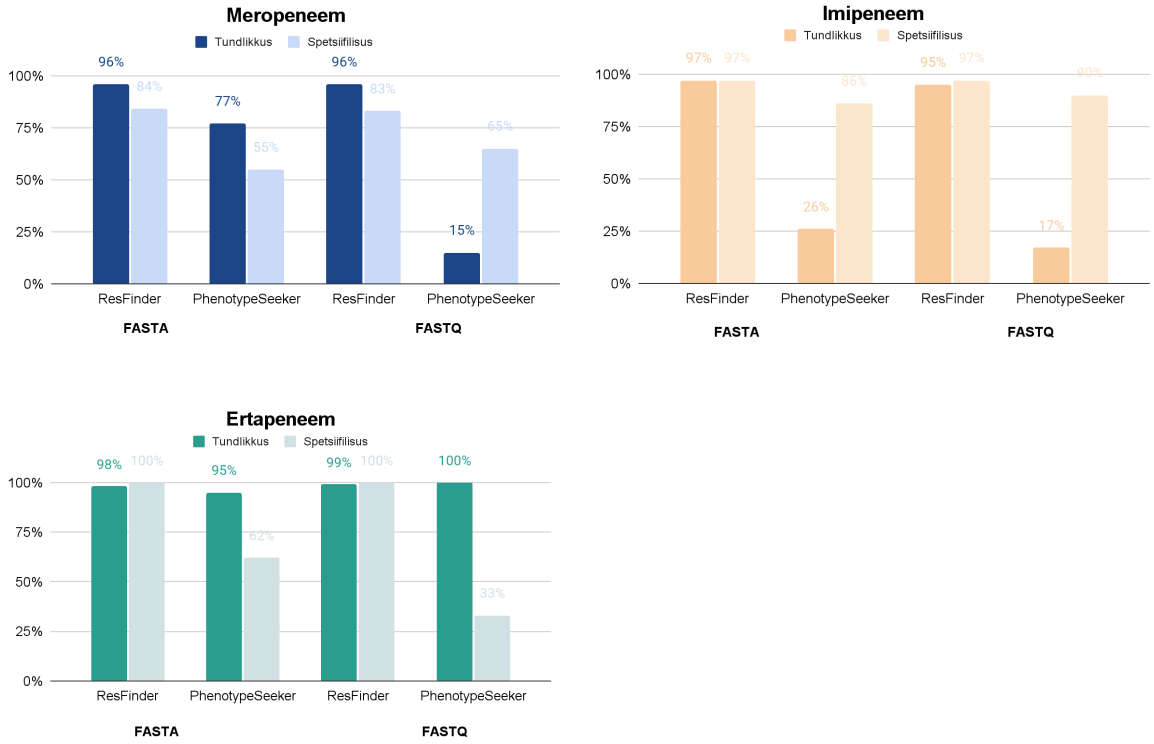
Meropeneemi puhul olid ResFinder'i ennustustäpsused praktiliselt identsed assambleeritud andmetel saadud tulemustega (tundlikkus 96%, spetsiifilisus 83%), vaid spetsiifilisus on langenud ühe protsendi võrra. PhenotypeSeeker'i tulemused olid oluliselt madalamad.

Tundlikkust suutis PS ennustada vaid 15% täpsusega ning spetsiifilisust 65% täpsusega (Joonis 9).

Võrreldes omavahel imipeneemiga läbiviidud analüüsi tulemusi olid ResFinder'i tulemused jällegi mõlema andmetüübi puhul sarnased. Toorlugemitega analüüsil langes tundlikkuse ennustusprotsent kahe protsendi võrra (95%) ning spetsiifilisuse ennustustäpsus jäi samaks (97%). PhenotypeSeeker'ga imipeneemi ennustustäpsus tundlikkuse puhul on vaid 17%, samal ajal kui spetsiifilisuse protsent on tõusnud 90%–le. Tulemustes ilmnes sama kallutatus, mis varem (peatükk 2.2.2) – mudel kipub klassifitseerima tundlikke isolaate valesti (Joonis 9).

Samuti jäid tulemused sarnaseks ka ertapeneemi ennustamisel ResFinder'ga, kus ennustustäpsus tundlikkuse puhul oli 99% ning spetsiifilisus 100%. PhenotypeSeeker'i puhul oli tundlikkus 100%, kuid spetsiifilisus vaid 33%, mis viitab tugevale kallutatusele resistentsete isolaadide suunas. Siiski tuleb arvestada, et isolaatide arv on FASTQ analüüsi puhul väiksem, mis võib mõjutada ennustuste täpsust (Joonis 9).

ResFinder'i ennustustulemused olid stabiilsed ning kattusid enamasti assambleeritud genoomidel (FASTA) läbiviidud ennustustulemustega. PhenotypeSeeker'i puhul esines ennustustulemuste erinevusi ning ennustus oli sageli kallutatud ühe fenotüübilise klassi (resistentne või mitte-resistentne) suunas. FASTQ andmete analüüsi tulemused näitasid, et ResFinder ennustab fenotüüpi täpsemalt kui PhenotypeSeeker. Lisaks on võimalik tutvuda üldise graafikuga Lisa 2.



Joonis 9. Assambleeritud (FASTA) genoomide ja assambleerimata (FASTQ) toorandmete ennustustäpsuse võrdlused kolme antibiootikumi puhul – meropeneem, imipeneem, ertapeneem. Resistentsuse ennustamisel kasutati kolme bioinformaatilist tööriista – ResFinder, Kleborate ning PhenotypSeeker. Toorlugemitelt ennustamiseks kasutati neist vaid kahte – ResFinder ning Kleborate.

Analüüsi põhjal võib järeldada, et assambleerimata toorandmete (FASTQ) kasutamine ei andnud analüüsil olulist täiendavat täpsust võrreldes assambleeritud genoomidega. Seetõttu on edasistes tulemustes keskendatud vaid assambleeritud (FASTA) genoomidel põhinevatele analüüsidele.

2.3.4. Karbapeneemresistentsuse ennustamine Eestist pärit *K. pneumoniae* tüvedel

Lisaks andmebaasi põhjal tehtud analüüsile viidi läbi ka Eesti päritolu *K. pneumoniae* isolaatide karbapeneemresistentsuse ennustus, et hinnata tarkvarade täpsust kohalike tüvede puhul. See võimaldas hinnata, kui täpne on olemasolevate tööriistade ennustustäpsus kontekstis, kus tüvede geneetiline taust võib erineda globaalsest andmestikust. Kokku analüüsiti 60 meropeneem resistentset ja 27 mitte-resistentset isolaati, neli imipeneem resistentset ja neli mitte-resistentset imipeneemi isolaati ning 96 ertapeneem resistentset ja üks mitte-resistentne. Kõik need tüved olid assambleeritud genoomidega (FASTA formaadis).

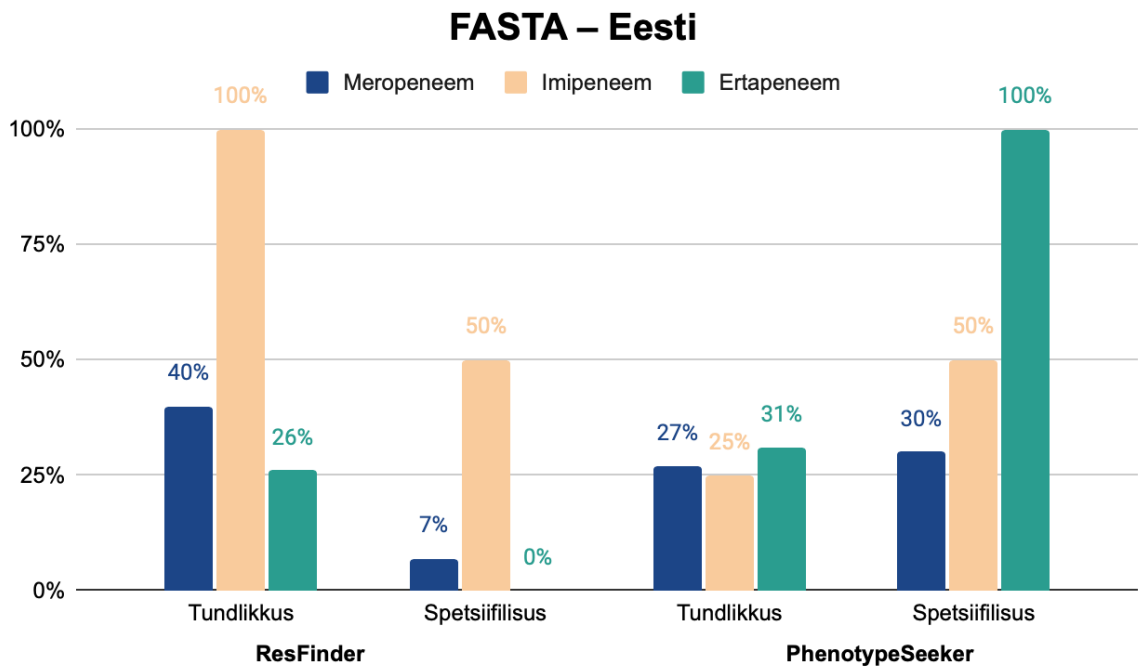
Meropeneemi resistentsuse ennustuse täpsus Eesti päritolu isolaatide genoomidel on väiksem kui BV-BRC andmebaasist saadud isolaatide genoomidel. Resfinder andis tulemuseks 40%

tundlikkuse ning 7% spetsiifilisuse. PhenotypeSeeker'i puhul oli tundlikkuse ennustustäpsus 27% ning spetsiifilisuse ennustustäpsus 30% (joonis 10).

Imipeneemi puhul oli tundlikkuse ennustus ResFinder'i puhul 100%, kuid spetsiifilisuse tulemus jäi tagasihoidlikuks - 50%. PhenotypeSeeker'i tulemused olid oluliselt nõrgemad - tundlikkus 25%, spetsiifilisus 50%. Arvesse tuleb võtta imipeneemi puhul vähene isolaatide arv (joonis 10).

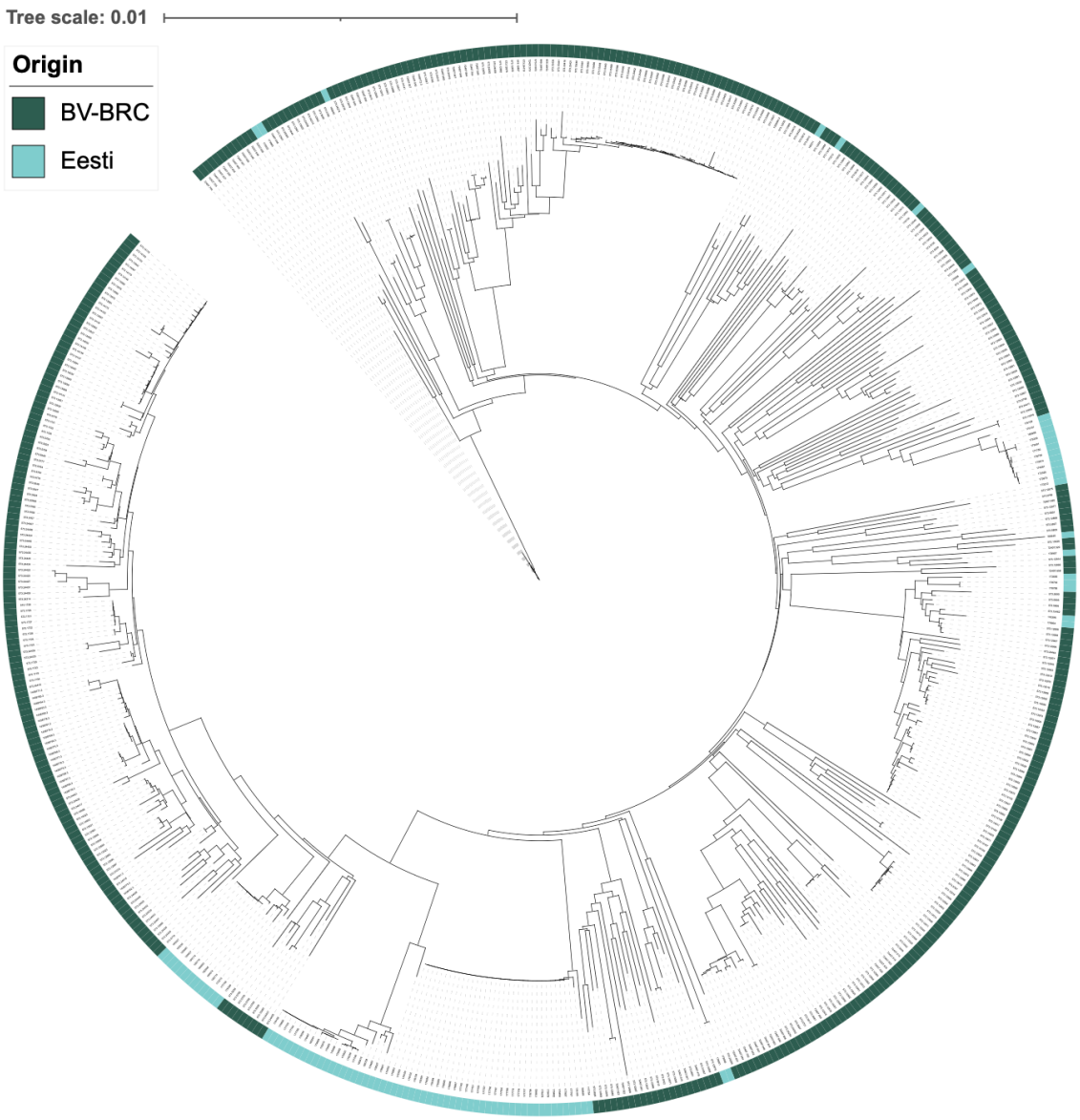
Ertapeneemi ennustamisel assambleeritud genoomidelt oli tundlikkus 26% ning spetsiifilisus null protsenti, kuna ühtegi mitte-resistentset isolaati ei tuvastatud õigesti. Nii ResFinder'i kui ka Kleborate'i puhul ei suudeta ennustada ertapeneemi spetsiifilisust. PhenotypeSeeker suutis ennustada tundlikkust 31% ulatuses ning spetsiifilisust 100%, kuid oluline on märkida, et mitte-resistentseid isolaate oli vaid üks (joonis 10).

Jooniselt 10 näha, et kuigi ResFinder ja Kleborate saavutasid andmebaasi andmetel kõrge ennustustäpsuse (nt meropeneemi puhul tundlikkus 96% ja spetsiifilisus 84%), siis langes täpsus Eesti isolaate analüüsides märgatavalt (vastavalt 40% ja 7%). Samasugust märgatavat vahet on näha ka ertapeneemi puhul. Imipeneemi analüüsis ilmnes kallutatus, kus tööriistad eelistavad resistentsuse tuvastamist isegi tundlike isolaadi korral.



Joonis 10. Assambleeritud (FASTA) Eesti andmetel läbiviidud AMR ennustamise.

Selleks, et selgitada Eesti päritolu isolaatide madalamat määramise täpsust viidi läbi fülogeeetiline analüüs. Joonisel 11 kujutatud fülogeneetiline puu näitab, et Eesti isolaadid (helesinine) paiknevad küll mõningal määral eraldi harudes võrreldes PhenotypeSeeker'i mudeli treenimiseks kasutatud isolaatidega (tumeroheline), kuid nad ei moodusta selgelt eristuvat klastrit ega ole evolutsiooniliselt kauged. Sellest võib järeldada, et madalam tundlikkus ja spetsiifilisus Eesti tüvede osas ei tulenenud sellest, et need oleksid olnud treeningandmetest selgelt erinevad. Pigem viitab analüüs sellele, et treeningandmestik hõlmas piisavalt evolutsiooniliselt lähedasi tüvesid ning mudeli jõudluse piirangud tulenevad teistest teguritest, nagu näiteks metoodikast, algandmete kvaliteedist või tehnilistest parameetritest.



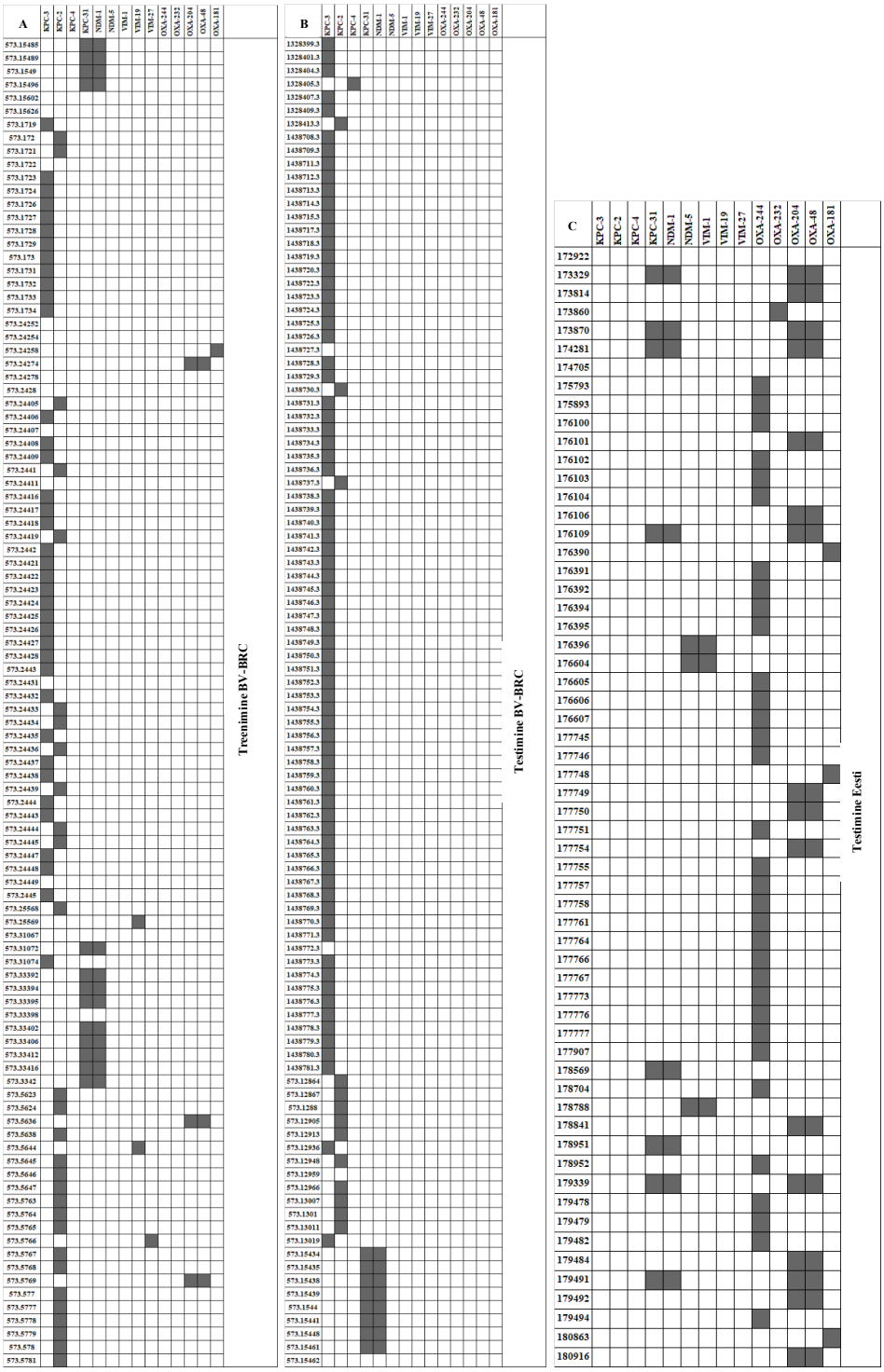
Joonis 11. Fülogeneesipuu, kus on kuvatud treenimisel kasutatud isolaadid koos Eesti isolaatidega. Helesinine värv kujutab Eesti andmeid ning tumeroheline värv andmebaasist saadud andmeid (BV-BRC). Visualiseerimise eesmärgil on välja jäetud viis kõige kaugemat isolaati. Välja jäetud isolaatide koodid: 180754, 573.2427, 573.5698, 573.580, 573.5811.

2.3.5. Uue PhenotypeSeeker'i mudeli treenimine ning meropeneemi resistentsuse analüüs Eesti andmetel

Fülogeneetiline analüüs ei näidanud märkimisväärseid erinevusi treeningandmestiku ja Eesti isolaatide päritolu vahel, mistõttu analüüsiti ka nende resistentsusgeenide profiile (Joonis 12). Analüüsides lähemalt PhenotypeSeeker'i mudeli treenimiseks kasutatud andmeid, selgus, et treenimiseks kasutatud isolaatidel domineerisid pigem KPC tüüpi resistentsusgeenid (klass A). Eesti päritolu testimiseks kasutatud isolaatidel on genoomis peamiselt OXA geenid (klass D),

kuid KPC geenid neil puuduvad. Selleks, et vaadata, kas PhenotypeSeeker'i tulemuste täpsus paraneb kui treeningandmestikus kasutada ainult OXA geenidega isolaate (OXA-48, OXA-181, OXA-204), koostati uus mudel, mis põhines OXA geenidel (Lisa 3).

Isolaatide hulgas esines nii ainult OXA-geene sisaldavaid kui ka OXA–geene koos teiste resistentsusgeenidega sisaldavaid isolaate. Uus mudel loodi vaid ühele, kolmest antibiootikumist – meropeneem. Antud antibiootikumi puhul olid Eesti andmete puhul olemas nii resistentseid kui mitte-resistentseid. Samuti oli antud antibiootikumi kohta kõige rohkem isolaate BV–BRC andmebaasis, peale rakendatud filtreid (peatükk 2.2.1.). Kõikidest BV–BRC andmebaasis olevatest andmetest sorteeriti ResFinder analüüsi järgselt välja 46 resistentset ning 100 tundlikku assambleeritud genoomijärjestust. Ennustusmudel loodi peatükis 2.2.2. välja toodud juhiste põhjal. Eeldati, et vaid OXA-geene sisaldava mudeliga PhenotypeSeeker'i ennustuse täpsus Eesti isolaatide puhul paraneb.

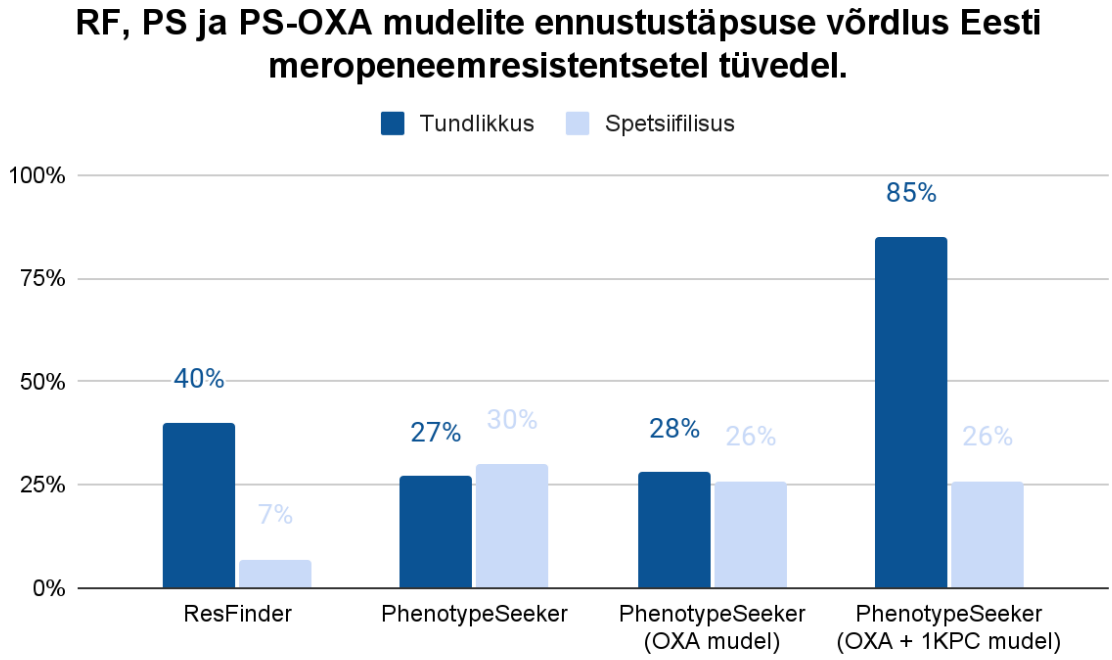


Joonis 12. AMR geenide esinemismuster a) PS mudeli treenimisel kasutatud tüvedes; b) PS testimisel kasutatud tüvedes; c) testimisel kasutatud Eesti Terviseameti tüvedes. Iga rida esindab ühte isolaati, tulpades on detekteeritud resistentsusgeenid.

Assambleeritud OXA geene sisaldavatel isolaatidel treenitud mudelite kasutamisel jäi PhenotypeSeeker'i ennustustulemuste täpsused sarnaseks võrreldes esialgse mudeliga. Tundlikkus tõusis vaid ühe protsendi võrra samas kui spetsiifilisus langes ühe protsendi võrra. Tulemused viitavad sellele, et treenimiseks kasutatud andmed ei mõjuta oluliselt ennustuse

täpsust, eriti kui treening- ning testandmed pärinevad erinevatest geograafilisest piirkondadest (Joonis 13).

Juhuse tahtel treeniti PhenotypeSeeker'i mudel, mis sisaldas lisaks eelnevalt välja toodud OXA geene sisaldavale treeningandmestikule ka ühte ainult KPC geeni sisaldavat isolaati. Selle mudeliga läbi viidud analüüs näitas ootamatut ja märkimisväärset paranemist, kus tundlikkuse ennustustäpsus tõusis märkimisväärselt 85%-ni (Joonis 13). Spetsiifilisus jäi identseks OXA mudeliga (26%). Selle nähtuse põhjus ei ole käesoleva analüüsi põhjal üheselt selgitatav, kuid tulemused viitavad võimalusele, et mudelisse lisatud üksikud geneetiliselt erinevad isolaadid võivad mõjutada üldistennustustulemust.



Joonis 13. Graafikul on visualiseeritud, kui palju parandas PhenotypeSeeker'i OXA geenidel loodud mudel analüüsi tulemusi võrreldes esialgse PhenotypeSeeker'i mudeliga. Lisaks on graafikul kujutatud OXA + KPC geenil loodud ennustusmudeli täpsused. Võrdluseks on kõrvale lisatud varasemas etapis assambleeritud genoomidel (FASTA) läbiviidud analüüside tulemused, kasutades ResFinder tööriista.

3.ARUTELU

Antibiootikumid on laialt kasutusel bakteriaalsete infektsioonide raviks, kuid nende liigne ja vale on soodustanud antimikroobse resistentsuse (AMR) levikut. AMR soodustab infektsioonide teket ja ravi allumatust ning kujutab endast järjest tõsisemat ohtu rahvatervisele nii Eestis kui kogu maailmas. Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) on nimetanud AMR-i üheks kümnest suurimast ülemaailmsest terviseohust (*Ten Health Issues WHO Will Tackle This Year*, s.a.). Probleemi ulatust näitab ka asjaolu, et 2019. aastal leiti, et umbes 1,27 miljonit surma olid otseselt põhjustatud resistentsetest bakteritest („Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019“, 2022). Seetõttu on hädavajalik arendada meetodeid, mis võimaldaks kiiresti ja võimalikult täpselt ennustada mikroobide resistentsusprofiile. Üheks paljulubavaks lähenemiseks on bakteri isolaatide resistentsusprofiili määramine täisgenoomi sekveneerimise (WGS) abil, mis võrreldes traditsiooniliste meetoditega võib kiirendada diagnostikat ja vähendada vajadust pikaajalise mikroobide kasvatamise järele.

AMR määramiseks *K. pneumoniae* isolaadi WGS andmetest on loodud mitmeid bioinformaatilisi tööriistu. Ühed kõige levinumad on ResFinder ning Kleborate. Lisaks on Tartu Ülikooli Bioinformaatika õppetoolis on välja töötatud PhenotypeSeeker tarkvara. Kõik kolm tarkvara vajavad ennustamiseks mingeid eelnevaid teadmisi resistentsusest. ResFinder ja Kleborate kasutavad selleks olemasolevaid AMR geenide andmebaase. PhenotypeSeeker vajab ennustamiseks k-meeridel põhinevat statistilist mudelit, mis tuleb iga antibiootikumi jaoks eraldi treenida resistentsete ja mitte-resistentsete isolaatide pealt. Antud töö keskendus eelpool välja toodud kolme tarkvara võimekust ennustada karbapeneemresistentsust *Klebsiella pneumoniae* isolaatidest saadud andmetel. Täpsemalt keskenduti töös karbapeneemresistentsusele ning kolmele antibiootikumile – meropeneem, imipeneem ja ertapeneem, mida kasutatakse sageli karbapeneemresistentsete *K. pneumoniae*'te raviks.

Saadud tulemused näitasid, et nii assambleeritud (FASTA) genoome kui ka toorlugemeid (FASTQ), et nii FASTA- ja FASTQ-andmetel põhinevate analüüside tulemused olid tarkvarade lõikes sarnased ning erinesid vaid paari protsendi võrra. See näitab tööriistade stabiilsust ja täpsust sõltumata sisendandmete tüübist. Nende võime ennustada ertapeneemi ning imipeneemi tundlikkust spetsiifilisust ületas 95%'i. Ka meropeneemi puhul jäi täpsus üle 80%, mis viitab tööriistade kõrgele usaldusväärsusele kliiniliselt oluliste antibiootikumide osas. PhenotypeSeeker'i (PS) analüüsitud andmete ennustuse täpsus oli madalad, ebatäpsed ning ennustus oli sageli kallutatud ühe fenotüübilise klassi (resistentne või mitte-resistentne) suunas.

See võib viidata andmete vähesusele, mida kasutati mudeli treenimiseks. Samuti võib see viidata tundlikkusele sisendandmete kvaliteedi suhtes – näiteks andmete täpsus ja täielikkus. Nii FASTA kui ka FASTQ andmete analüüsi tulemused näitasid, et ResFinder ja Kleborate ennustavad fenotüüpi täpsemalt kui PhenotypeSeeker. Eeldati, et toorandmetel (FASTQ) põhinev analüüs võib pakkuda suuremat täpsust, kuna need sisaldavad täielikku genoomset teavet, sealhulgas piirkondi, mis võivad genoomi assambleerimisel kaduma minna. Toorlugemite (FASTQ) kasutamine ei andnud analüüsil olulist täiendavat täpsust võrreldes assambleeritud genoomidega. Seetõttu on keskenduti edasistes tulemustes vaid assambleeritud (FASTA) genoomidel põhinevatele analüüsidele.

Kindlasti on suureks mõjuteguriks andmehulkade erinevus ning andmete kättesaadavus. Antibiootikumid, mille puhul on kättesaadavaid isolaate vähem ei ole võimalik treenida head ennustus mudelit, näiteks antud töös ertapeneem. Ka teiste antibiootikumide puhul oli mudeli treenimiseks kasutatav arv minimaalne. Väikesed andmehulgad võivad mõjutada mudelite ennustus täpsust. Samuti suurendavad need vea riski ning sellisel juhul tehtud järeldustele ei saa olla nii kindel. Selleks, et saavutada stabiilsem ja üldistatud mudel, on soovitatav kasutada vähemalt 100 isolaati klassi kohta, sõltuvalt mudeli keerukusest ja andmete tasakaalust.

Selleks, et hinnata erinevate bioinformaatiliste tööriistade ennustusvõimekust ka Eesti päritolu *Klebsiella pneumoniae*isolaatidel, korrati analüüse spetsiaalselt nende tüvede isolaatidega. Tulemustest selgus, et mitte ükski kasutatud tarkvara ei andnud Eesti isolaatide puhul kõrge täpsusega ennustusi. ResFinder leiab geene liiga kergelt üles ning seetõttu on ka tundlikkus suurem. Samas on PhenotypeSeeker kallutatud jälle spetsiifilisuse ennustamisele. Tulemuste vastandumise tõttu oleks kõige täpsema tulemuse saamiseks hea kasutada mõlemat tööriista. Üldiselt ennustuse täpsus halvenesid Eesti andmetel, mis viitab võimalikele piirkondlikele erinevustele resistentsusgeenide ja mehhanismide levimuses, mida standardne andmebaasipõhine ennustamine ei pruugi arvesse võtta. Kohalikud isolaadid võivad omada mutatsioone või lookusi, mis pole rahvusvahelistes andmebaasides esindatud või piisavalt iseloomustatud.

Geograafiliste erinevustega arvestamine AMR ennustamisel muutub üha olulisemaks. Kohandatud mudelid, mis on treenitud lokaalselt kogutud andmestikel, võivad eelduste kohaselt pakkuda täpsemaid tulemusi. PhenotypeSeeker'i jaoks loodud uus mudel, mis oli treenitud assambleeritud OXA-geene sisaldavatel isolaatidel, ei parandanud oluliselt resistentsuse ennustamise täpsust võrreldes esialgse mudeliga. Tundlikkus suurenes vaid ühe

protsendi võrra ning sellega kaasnes spetsiifisuse sama suur langus. Selline muutus jääb praktilises mõttes ebaoluliseks ning viitab sellele, et pelgalt resistentsusgeenidega arvestamine treeningandmestikus ei pruugi märkimisväärselt parandada mudeli sooritust. Eriti ilmneb see olukordades, kus treening- ja testandmed pärinevad erinevatest geograafilistest piirkondadest ning võivad esineda regionaalsed geneetilised erinevused. Tulemused rõhutavad vajadust vaadelda lisaks resistentsust määravatele geenidele ka teisi mehhanisme, nagu poriinkanali muutused või väljavoolupumbad. Märkimisväärne oli see, mudel, kuhu juhuslikult lisandus üks KPC-geeni sisaldav isolaat koos OXA-geenidega tüvedega, andis märkimisväärselt parema ennustustulemuse. Tundlikkus tõusis oluliselt, ulatudes 85%-ni. Kuigi selle nähtuse täpne mehhanism jääb käesoleva analüüsi põhjal ebaselgeks, viitavad tulemused sellele, et isegi üksikud geneetiliselt erinevad isolaadid treeningandmestikus võivad mõjutada mudeli ennustustäpsust märkimisväärselt. See tõstatab küsimuse mudelite koostamise strateegiast ning andmestike mitmekesisuse tähtsusest resistentsuse prognoosimisel.

Antud magistritöö piiranguteks osutusid andmestike ebaühtlused ning isolaadiarvude erinevused, eriti vähem levinud antibiootikumide puhul. Samuti võisid tulemusi mõjutada nii fenotüübiliste testide täpsused kui ka erinevates laborites käsitletavad kvaliteediparameetrid bioinformaatiliste andmete puhul, mille järgi laaditakse need andmebaasidesse. Kindlasti põhjustab tulemuste erinevusi tarkvarade erinev lähenemine, eriti kui mutatsioon ei too kaasa fenotüübis olulist muutust või kui see jääb näiteks väljapoole andmebaasis kirjeldatud lookuseid. Ühe piiranguna võib välja tuua veel PhenotypeSeeker'i ennustamise ja treenimise, kus ei võeta arvesse *k*–meere, mille sagedus ühe isolaadi andmetes on alla viie. Peale PhenotypeSeeker'i mudeli treenimise ja ennustamise parandamist, peaks kordama kõiki katseid.

Edaspidisteks sammudeks võiks olla mudelite treenimine suuremate andmebaaside peal, mis võiks muuta treenitud mudelid täpsemaks. Samuti võib võrdluseks treenida mudeleid FASTQ andmete peal ning vaadelda erinevusi, mis võivad esineda *k*–meeride arvukuse varieeruvuse tõttu erinevates andmetüüpides. Kindlasti peaks andmete saadavuse korral treenima geograafilise piirkonna põhised mudelid, et analüüsida AMR ennustuste täpsust ka teiste antibitootikumide suhtes ning korrata seda erinevate bakteri liikide puhul.

Võttes arvesse erinevate bioinformaatiliste tööriistade ennustustulemusi rõhuvad antud magistritöö tulemused vajadusele kombineerida erinevaid analüüsivahendeid ning arvestada

andmestiku konteksti ja päritolu. Selline lähenemine võimaldab anda hetkel kõige usaldusväärsema aluse nii kliiniliste otsuste tegemiseks kui ka rahvatervise seireks.

KOKKUVÕTE

Antibiootikumid on meditsiinis üks enim kasutatud vahend bakteriaalsete infektsioonide raviks. Antimikroobsete ravimite ehk antibiootikumide eesmärk on eelkõige pidurdada haigustekitajate paljunemist või hävitada need. Üha enam infektsiooni tekitajate seas levimas antimikroobne resistentsus ehk AMR, mis on haigustekitajate võime mitte alluda antibiootikumide toimele, omandatud resistentsuse tõttu. Antibiootikumide kergekäeline kasutamine ning valesti või ebamääraselt manustatud ravimid soodustavad resistentsete bakterite kujunemist. Tervishoiuasutustes tekkinud infektsioonide korral kujutavad resistentsust omavad bakterid tõsist rahvatervise ohtu. Seega on oluline välja töötada meetodid, mis oleks võimelised kiirelt ja täpselt ennustama levivate mikroobide resistenstsusprofiili. See aitaks valida iga patsiendi jaoks sobivaima ja tõhusaima ravimi ning vältida ebavajalike või ebaefektiivsete antibiootikumide kasutamist. Üheks meetodiks on AMR profiili määramine täisgenoomi sekveneerimise (WGS) andmetelt, mis ei eelda mikroobide kultuuris kasvatamist ning kiirendaks ravi alustamise aega. WGS andmetelt resistentsuse määramisel kasutatakse mitmeid bioinformaatilisi tööriistu, mille ülesehitused ja algoritmid erinevad.

Magistritöö eesmärk oli testida ja võrrelda karbapeneemresistentse *K. pneumoniae* isolaatide antimikroobse resistentsuse ennustamise võimekust kolme antibiootikumi puhul - meropeneem, ertapeneem ning imipeneem. Ennustusvõimekust hinnati nii assambleeritud (FASTA) kui ka assambleerimata toorandmetel (FASTQ), kasutades ResFinder, Kleborate ja PhenotypeSeeker tarkvara. Samuti hinnati tööriistade AMR ennustusvõimekust Eesti isolaatidel, mis saadi Terviseametist.

Antud töö tulemustest saab järeldada, et ResFinder ja Kleborate on usaldusväärsed ja stabiilsed tööriistad *K. pneumoniae* karbapeneemresistentsuse ennustamiseks nii FASTA- kui ka FASTQ-formaadis andmetel, kus tundlikkuse ja spetsiifilisuse näitajad ületasid 80%. PhenotypeSeeker'i puhul ilmnes aga ennustustulemuste ebatäpsust ja kallutatust, mis sõltus kasutatud antibiootikumist. Eesti päritolu isolaatide puhul täheldati kõikidel tööriistadel täpsuse langust, eriti PhenotypeSeeker'i mudelil, mille ennustused jäid ebatäpseks ka pärast lokaalse mudeli treenimist ainult OXA-geene kandvatel andmetel. Täpsuse paranemine ühe KPC-geeni sisaldava isolaadi lisamisel viitab, et treeningandmete geneetiline mitmekesisus võib oluliselt mõjutada mudeli sooritust.

Magistritöös läbiviidud analüüsid kinnitavad WGS-põhiste tööriistade potentsiaali resistentsuse ennustamisel, ent rõhutavad ka vajadust arendada edasi lokaalselt kohandatud mudeleid ning

kaaluda mitme ennustus tööriista kombineerimist. See võimaldaks saavutada suuremat usaldusväärsust nii kliiniliste otsuste langetamisel kui ka rahvatervise seireks vajalike andmete kogumisel.

Comparative assessment of carbapenem resistance prediction in *Klebsiella pneumoniae* isolates using three bioinformatics tools: PhenotypeSeeker, ResFinder, and Kleborate

Karita Helde

SUMMARY

Antibiotics are one of the most widely used tools in medicine for treating bacterial infections. The primary goal of antimicrobial drugs, or antibiotics, is to inhibit the reproduction of pathogens or destroy them altogether. However, antimicrobial resistance (AMR), which is the ability of pathogens to resist the effects of antibiotics due to acquired resistance, is increasingly spreading among infectious agents. The indiscriminate use of antibiotics and incorrect or vague administration of treatments promote the development of resistant bacteria. Infections acquired in healthcare settings pose a serious public health threat when caused by resistant bacteria.

Therefore, it is crucial to develop methods capable of quickly and accurately predicting the resistance profile of spreading microbes. This would help select the most appropriate and effective drug for each patient and avoid the use of unnecessary or ineffective antibiotics. One such method is determining the AMR profile using whole genome sequencing (WGS) data, which does not require culturing microbes and could accelerate the initiation of treatment. Several bioinformatics tools are used for resistance prediction from WGS data, each with different structures and algorithms.

The aim of this Master's thesis was to test and compare the antimicrobial resistance prediction capability of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates for three antibiotics – meropenem, ertapenem, and imipenem. Predictive performance was evaluated on both assembled (FASTA) and unassembled raw data (FASTQ) using the software tools ResFinder, Kleborate, and PhenotypeSeeker. The AMR prediction performance of the tools was also assessed on Estonian isolates obtained from the Health Board.

The results of this study indicate that ResFinder and Kleborate are reliable and stable tools for predicting carbapenem resistance in *K. pneumoniae* using both FASTA and FASTQ data, with sensitivity and specificity values exceeding 80%. However, PhenotypeSeeker showed inaccuracies and bias in its predictions, which depended on the antibiotic used. All tools demonstrated reduced accuracy on Estonian isolates, particularly PhenotypeSeeker, whose predictions remained inaccurate even after training a local model using only data containing

OXA genes. The improvement in accuracy upon adding a single isolate containing a KPC gene suggests that genetic diversity in the training data can significantly influence model performance.

The analyses conducted in this thesis confirm the potential of WGS-based tools for resistance prediction but also emphasize the need to further develop locally adapted models and consider combining multiple prediction tools. This would help achieve greater reliability both in clinical decision-making and in collecting data necessary for public health surveillance.

TÄNUSÕNAD

Soovin siiralt tänada oma juhendajat prof. Maido Remmi, kes andis mulle võimaluse sooritada töö just bioinformaatika õppetoolis. Tema professionaalsus ja pühendumus olid minu jaoks hindamatuks toeks. Samuti soovin tänada oma kaasjuhendajat Taavi Riita, kes mind oma töö tegemisel suunas ning toetas.

KASUTATUD KIRJANDUS

Al-Agamy, M. H., Shibl, A. M., Elkhizzi, N. A., Meunier, D., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2013). Persistence of Klebsiella pneumoniae clones with OXA-48 or NDM carbapenemases causing bacteraemias in a Riyadh hospital. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 76(2), 214–216. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.006

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. FEMS Microbiology Reviews, 35(5), 901–911. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x

Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. Microbiology Spectrum, 5(6), 5.6.02. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0011-2017

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. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006434

Bayot, M. L., & Bragg, B. N. (2025). Antimicrobial Susceptibility Testing. StatPearls. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/

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. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(3), 969–976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09

Chen, J., Ma, H., Huang, X., Cui, Y., Peng, W., Zhu, F., Ma, S., Rao, M., Zhang, P., Yang, H., Su, L., Niu, R., & Pan, P. (2022). Risk factors and mortality of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bloodstream infection in a tertiary-care hospital in China: An eight-year retrospective study. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 11(1), 161. https://doi.org/10.1186/s13756-022-01204-w

Compeau, P. E. C., Pevzner, P. A., & Tesler, G. (2011). How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. Nature Biotechnology, 29(11), 987–991. https://doi.org/10.1038/nbt.2023

Cuzon, G., Ouanich, J., Gondret, R., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(5), 2420–2423. https://doi.org/10.1128/aac.01452-10

Dixon, B., Ahmed, W. M., Felton, T., & Fowler, S. J. (2022). Molecular phenotyping approaches for the detection and monitoring of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae by

mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab, 26, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.09.001

Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. BioMed Research International, 2014, 249856. https://doi.org/10.1155/2014/249856

Dortet, L., Poirel, L., Yaqoubi, F. A., & Nordmann, P. (2012). NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. Clinical Microbiology and Infection, 18(5), E144–E148. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03796.x

Drouin, A., Giguère, S., Déraspe, M., Marchand, M., Tyers, M., Loo, V. G., Bourgault, A.-M., Laviolette, F., & Corbeil, J. (2016). Predictive computational phenotyping and biomarker discovery using reference-free genome comparisons. BMC Genomics, 17, 754. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2889-6

El-Herte, R. I., Araj, G. F., Matar, G. M., Baroud, M., Kanafani, Z. A., & Kanj, S. S. (2012). Detection of carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing NDM-1 in Lebanon. The Journal of Infection in Developing Countries, 6(05), Article 05. https://doi.org/10.3855/jidc.2340

Fajardo-Lubián, A., Zakour, N. L. B., Agyekum, A., Qi, Q., & Iredell, J. R. (2019). Host adaptation and convergent evolution increases antibiotic resistance without loss of virulence in a major human pathogen. PLOS Pathogens, 15(3), e1007218. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007218

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. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748

Foster-Nyarko, E., Cottingham, H., Wick, R. R., Judd, L. M., Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Stanton, T. D., Tsang, K. K., David, S., Aanensen, D. M., Brisse, S., & Holt, K. E. (2023). Nanopore-only assemblies for genomic surveillance of the global priority drug-resistant pathogen, Klebsiella pneumoniae. Microbial Genomics, 9(2), mgen000936. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000936

Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. (2022). Lancet (London, England), 399(10325), 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Hayden, M. K., Lin, M. Y., Lolans, K., Weiner, S., Blom, D., Moore, N. M., Fogg, L., Henry, D., Lyles, R., Thurlow, C., Sikka, M., Hines, D., & Weinstein, R. A. (2015). Prevention of Colonization and Infection by Klebsiella pneumoniae Carbapenemase–Producing Enterobacteriaceae in Long-term Acute-Care Hospitals. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 60(8), 1153–1161. https://doi.org/10.1093/cid/ciu1173

Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(6), 1119–1125. https://doi.org/10.1093/jac/dkq108

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). https://doi.org/10.1093/bib/bbae206

Humphries, R. M. (2020). Update on Susceptibility Testing: Genotypic and Phenotypic Methods. Clinics in Laboratory Medicine, 40(4), 433–446. https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.08.002

Kot, B., & Witeska, M. (2024). Review: Antimicrobial resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from poultry, cattle and pigs. animal, 18(11), 101345. https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101345

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., … Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet. Infectious Diseases, 10(9), 597–602. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2

Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021). A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex. Nature Communications, 12(1), 4188. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3

Lee, G. C., & Burgess, D. S. (2012). Treatment of Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase (KPC) infections: A review of published case series and case reports. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 11(1), 32. https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-32

Liu, C., Qin, S., Xu, H., Xu, L., Zhao, D., Liu, X., Lang, S., Feng, X., & Liu, H.-M. (2015). New Delhi Metallo-β-Lactamase 1(NDM-1), the Dominant Carbapenemase Detected in Carbapenem-Resistant Enterobacter cloacae from Henan Province, China. PLoS ONE, 10(8), e0135044. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135044

Madden, D. E., Baird, T., Bell, S. C., McCarthy, K. L., Price, E. P., & Sarovich, D. S. (2024). Keeping up with the pathogens: Improved antimicrobial resistance detection and prediction from Pseudomonas aeruginosa genomes. Genome Medicine, 16(1), 78. https://doi.org/10.1186/s13073-024-01346-z

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. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa257

Matar, G. M., Dandache, I., Carrër, A., Khairallah, M.-T., Nordmann, P., Sabra, A., & Araj, G. F. (2010). Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli that produce extended spectrum beta-lactamase. Annals of

Tropical Medicine and Parasitology, 104(3), 271–274. https://doi.org/10.1179/136485910X12647085215651

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: Overview of the problem and future perspectives. Therapeutic Advances in Infectious Disease, 3(1), 15–21. https://doi.org/10.1177/2049936115621709

Meletis, G., Oustas, E., & Bagkeri, M. (2014). Carbapenemase reports from the Balkans: A systematic review. Le Infezioni in Medicina, 22(2), 85–106.

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., 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., Kashef Hamadani, B. H., 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. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging Infectious Diseases, 17(10), 1791–1798. https://doi.org/10.3201/eid1710.110655

Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. Clinical Microbiology and Infection, 20(9), 821–830. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719

Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 69(Suppl 7), S521–S528. https://doi.org/10.1093/cid/ciz824

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(11), 4943–4960. https://doi.org/10.1128/aac.00296-11

Pfeifer, Y., Schlatterer, K., Engelmann, E., Schiller, R. A., Frangenberg, H. R., Stiewe, D., Holfelder, M., Witte, W., Nordmann, P., & Poirel, L. (2012). Emergence of OXA-48-Type Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in German Hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(4), 2125–2128. https://doi.org/10.1128/AAC.05315-11

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589–603. https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589

Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(7), 1597–1606. https://doi.org/10.1093/jac/dks121

Shibl, A., Al-Agamy, M., Memish, Z., Senok, A., Khader, S. A., & Assiri, A. (2013). The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive Klebsiella pneumoniae in Riyadh, Saudi Arabia.

International Journal of Infectious Diseases, 17(12), e1130–e1133. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.06.016

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(11), 2640–2644. https://doi.org/10.1093/jac/dks261

Zhang, F., Li, Z., Li, Z., Liu, X., Lei, Z., Zhuo, X., Yang, X., Zhao, J., Zhang, Y., & Lu, B. (2024). Two outbreak cases involving ST65-KL2 and ST11-KL64 hypervirulent carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: Similarity and diversity analysis. Communications Biology, 7(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s42003-024-07310-

Zowawi, H. M., Sartor, A. L., Balkhy, H. H., Walsh, T. R., Al Johani, S. M., AlJindan, R. Y., Alfaresi, M., Ibrahim, E., Al-Jardani, A., Al-Abri, S., Al Salman, J., Dashti, A. A., Kutbi, A. H., Schlebusch, S., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2014). Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in the Countries of the Gulf Cooperation Council: Dominance of OXA-48 and NDM Producers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(6), 3085–3090. https://doi.org/10.1128/AAC.02050-13

Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psichogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and Other Enterobacteriaceae: An Evolving Crisis of Global Dimensions. Clinical Microbiology Reviews, 25(4), 682–707. https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11

Wong, J. L. C., Romano, M., Kerry, L. E., Kwong, H.-S., Low, W.-W., Brett, S. J., Clements, A., Beis, K., & Frankel, G. (2019). OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 Klebsiella pneumoniae in vivo. Nature Communications, 10, 3957. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11756-y

Xavier, B. B., Das, A. J., Cochrane, G., De Ganck, S., Kumar-Singh, S., Aarestrup, F. M., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Consolidating and Exploring Antibiotic Resistance Gene Data Resources. Journal of Clinical Microbiology, 54(4), 851–859. https://doi.org/10.1128/JCM.02717-15

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(4), 1151–1161. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in Klebsiella pneumoniae Sequence Type 14 from India. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(12), 5046–5054. https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Expert consensus protocol on carbapenem resistance detection and characterisation for the survey of carbapenem- and/or colistin-resistant Enterobacteriaceae. https://data.europa.eu/doi/10.2900/52645 (vaadatud 12.03.2025)

European Centre for Disease Prevention and Control. (2025). European Antimicrobial Resistance SurveillanceNetwork (EARS-Net) surveillance data for 2024. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EARS-Net-reporting-protocol.pdf

European Centre for Disease Prevention and Control. (2025). Reporting protocol for antimicrobial resistance (AMR) https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/reporting-protocol-antimicrobial-resistance-amr (vaadatud 04.04.2025)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). Clinical breakpoints - breakpoints and guidance. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (vaadatud 04.04.2025)

Sotsiaalministeerium. (2024). Eesti antimikroobse resistentsuse ohjamise strateegia 2025-2030. https://www.sm.ee/amr (vaadatud 11.03.2025)

Terviseamet. Rahvatervise labor. https://www.terviseamet.ee/labor/rahvatervise-labor (vaadatud 04.04.2025)

World Health Organization. (2017). Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. https://iris.who.int/handle/10665/259462 (vaadatud 01.05.2025)

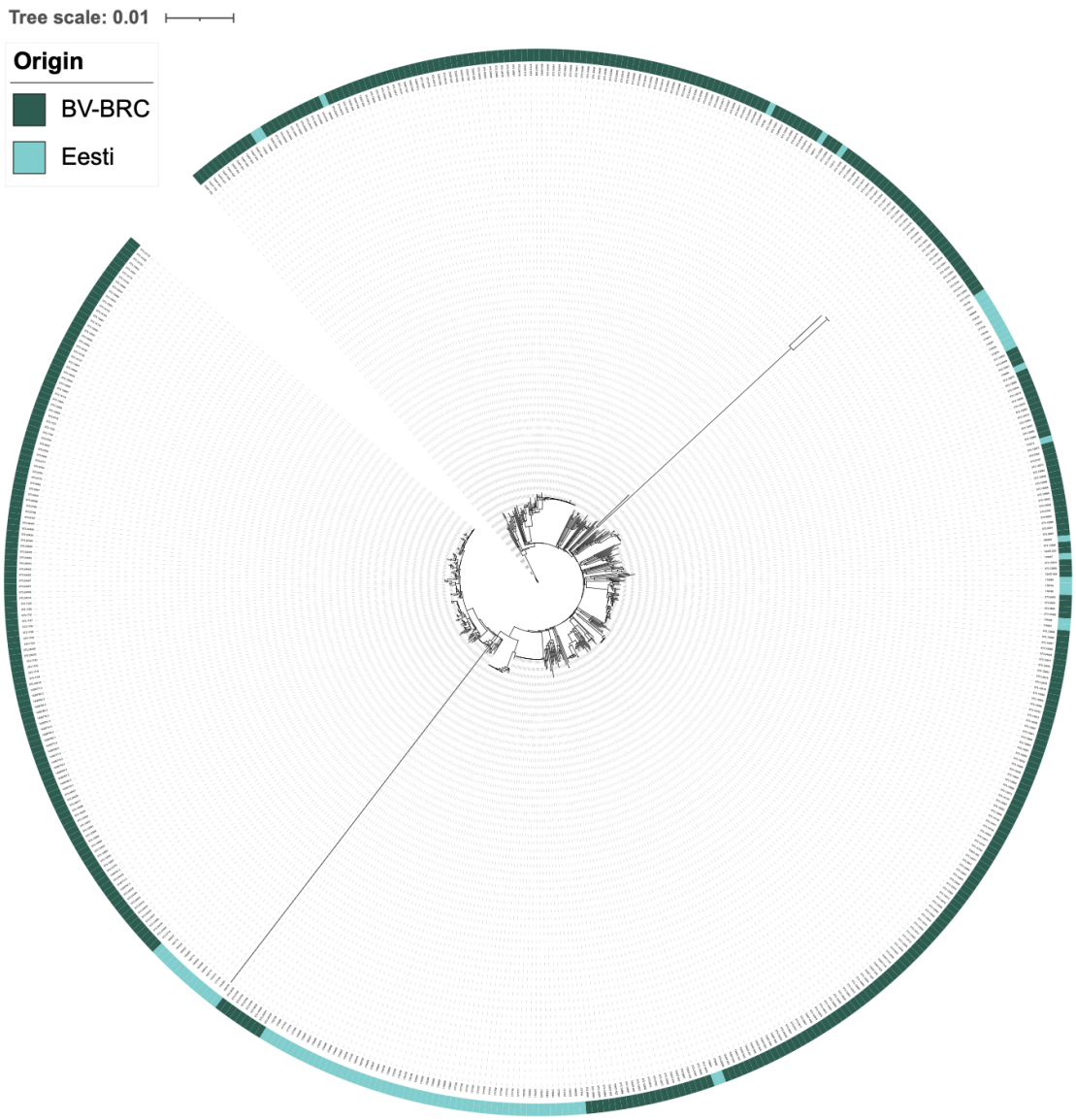
World Health Organization. (2019). Ten threats to global health in 2019. https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019 (vaadatud 11.03.2025)

World Health Organization. (2024). Antimicrobial Resistance, Hypervirulent Klebsiella pneumoniae - Global situation. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON527

LISAD

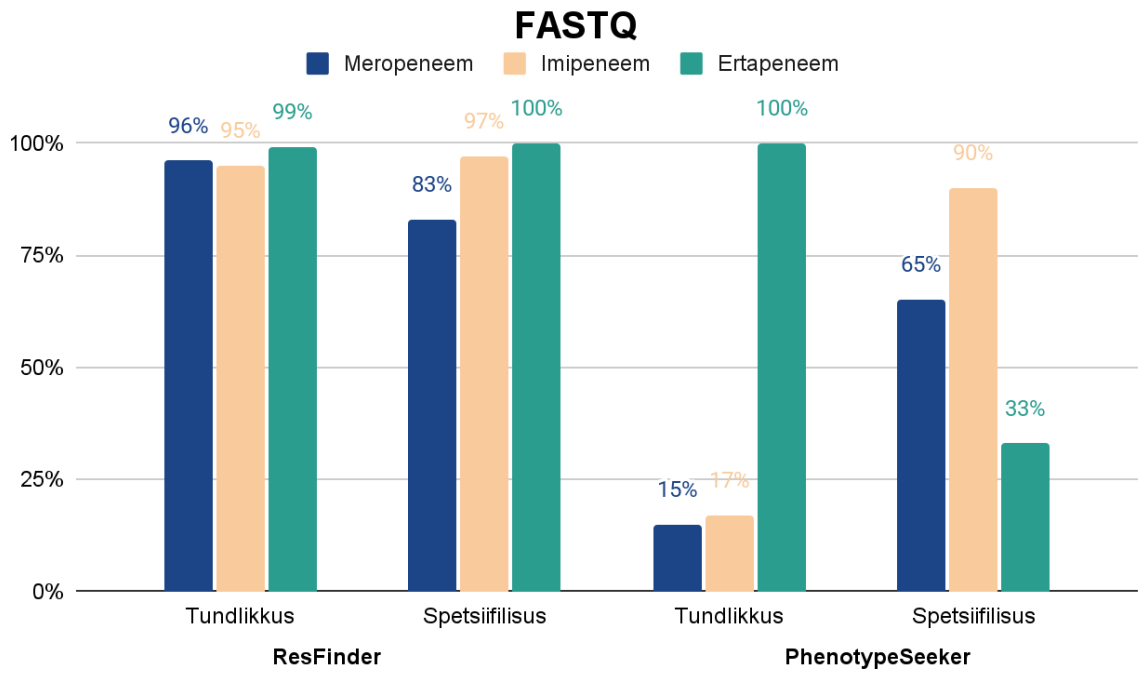
Lisa 1

Fülogeneesipuu, kus on kuvatud kõik treenimisel kasutatud isolaadid koos Eesti isolaatidega. Helesinine värv kujutab Eesti andmeid ning tumeroheline värv andmebaasist saadud andmeid (BV-BRC).



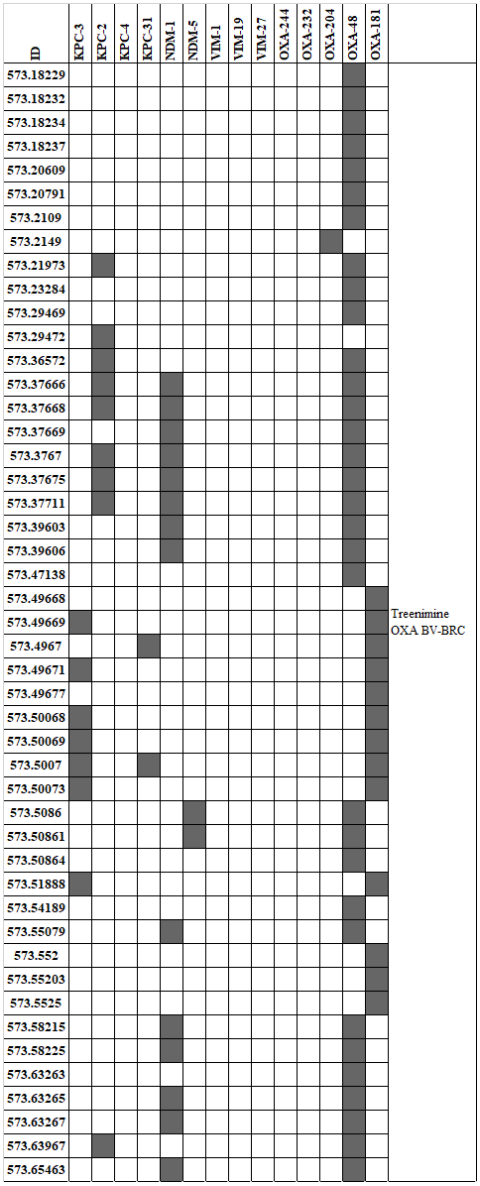
Lisa 2

Assambleerimata (FASTQ) andmebaasi andmetel läbiviidud AMR ennustamise tulemused.



Lisa 3

AMR-geenide esinemismuster tüvedes, mida kasutati uue OXA-geenidel põhineva PhenotypeSeekeri mudeli treenimiseks. Iga rida esindab ühte isolaati, tulpades on detekteeritud resistentsusgeenid. Joonisel on toodud ka hilisemas etapis kasutatud isolaat 573.29472.



Lisa 4

Meropeneem resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

573.15485.fna,573.15489.fna,573.15490.fna,573.15496.fna,573.15602.fna,573.15626.fna,573.1719.fna,573.1720.fna,573.1721.fna,573.1722.fna,573.1723.fna,573.1724.fna,573.1726.fna,573.1727.fna,573.1728.fna,573.1729.fna,573.1730.fna,573.1731.fna,573.1732.fna,573.1733.fna,573.1734.fna,573.24252.fna,573.24254.fna,573.24258.fna,573.24274.fna,573.24278.fna,573.24280.fna,573.24405.fna,573.24406.fna,573.24407.fna,573.24408.fna,573.24409.fna,573.24410.fna,573.24411.fna,573.24416.fna,573.24417.fna,573.24418.fna,573.24419.fna,573.24420.fna,573.24421.fna,573.24422.fna,573.24423.fna,573.24424.fna,573.24425.fna,573.24426.fna,573.24427.fna,573.24428.fna,573.24430.fna,573.24431.fna,573.24432.fna,573.24433.fna,573.24434.fna,573.24435.fna,573.24436.fna,573.24437.fna,573.24438.fna,573.24439.fna,573.24440.fna,573.24443.fna,573.24444.fna,573.24445.fna,573.24447.fna,573.24448.fna,573.24449.fna,573.24450.fna,573.25568.fna,573.25569.fna,573.31067.fna,573.31072.fna,573.31074.fna,573.33392.fna,573.33394.fna,573.33395.fna,573.33398.fna,573.33402.fna,573.33406.fna,573.33412.fna,573.33416.fna,573.33420.fna,573.5623.fna,573.5624.fna,573.5636.fna,573.5638.fna,573.5644.fna,573.5645.fna,573.5646.fna,573.5647.fna,573.5763.fna,573.5764.fna,573.5765.fna,573.5766.fna,573.5767.fna,573.5768.fna,573.5769.fna,573.5770.fna,573.5777.fna,573.5778.fna,573.5779.fna,573.5780.fna,573.5781.fna

Meropeneem mitte-resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

573.12909.fna,573.12911.fna,573.12912.fna,573.12914.fna,573.12915.fna,573.12916.fna,573.12917.fna,573.12918.fna,573.12919.fna,573.12920.fna,573.12921.fna,573.12923.fna,573.12924.fna,573.12925.fna,573.12926.fna,573.12927.fna,573.12928.fna,573.12930.fna,573.12931.fna,573.12932.fna,573.12934.fna,573.12935.fna,573.12937.fna,573.12938.fna,573.12939.fna,573.12940.fna,573.12941.fna,573.12942.fna,573.12943.fna,573.12944.fna,573.12945.fna,573.12947.fna,573.12949.fna,573.12950.fna,573.12952.fna,573.12953.fna,573.12954.fna,573.12955.fna,573.12956.fna,573.12958.fna,573.12960.fna,573.12961.fna,573.12962.fna,573.12963.fna,573.12964.fna,573.12965.fna,573.12967.fna,573.12968.fna,573.12969.fna,573.12970.fna,573.12971.fna,573.12972.fna,573.12974.fna,573.12975.fna,573.12976.fna,573.12977.fna,573.12978.fna,573.12979.fna,573.12980.fna,573.12981.fna,573.12982.fna,573.12983.fna,573.12984.fna,573.12985.fna,573.12986.fna,573.12988.fna,573.12989.fna,573.12990.fna,573.12991.fna,573.12992.fna,573.12993.fna,573.12994.fna,573.12995.fna,573.12996.fna,573.12997.fna,573.12998.fna,573.12999.fna,573.13000.fna,573.13001.fna,573.13002.fna,573.13004.fna,

573.13005.fna,573.13006.fna,573.13008.fna,573.13009.fna,573.13012.fna,573.13013.fna,573.13014.fna,573.13015.fna,573.13016.fna,573.13017.fna,573.13018.fna,573.13020.fna,573.13021.fna,573.13022.fna,573.13023.fna,573.13025.fna,573.13026.fna,573.13027.fna,573.13028.fna

Ertapeneem resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

1438759.3.fna,1438760.3.fna,1438761.3.fna,1438762.3.fna,1438763.3.fna,1438764.3.fna,1438765.3.fna,1438766.3.fna,1438767.3.fna,1438768.3.fna,1438769.3.fna,1438770.3.fna,1438771.3.fna,1438772.3.fna,1438773.3.fna,1438774.3.fna,1438775.3.fna,1438776.3.fna,1438777.3.fna,1438778.3.fna,1438779.3.fna,1438780.3.fna,1438781.3.fna,573.24252.fna,573.24254.fna,573.24258.fna,573.24263.fna,573.24272.fna,573.24274.fna,573.24278.fna,573.24280.fna,573.24313.fna,573.24314.fna,573.24315.fna,573.24316.fna,573.33391.fna,573.33392.fna,573.33393.fna,573.33394.fna,573.33395.fna,573.33396.fna,573.33397.fna,573.33399.fna,573.33400.fna,573.33401.fna,573.33402.fna,573.33403.fna,573.33404.fna,573.33405.fna,573.33406.fna,573.33407.fna,573.33408.fna,573.33409.fna,573.33410.fna,573.33411.fna,573.33412.fna,573.33413.fna,573.33415.fna,573.33416.fna,573.33417.fna,573.33418.fna,573.33420.fna,573.33421.fna,573.33422.fna,573.5698.fna,573.5811.fna,72407.637.fna,72407.638.fna,72407.639.fna,72407.640.fna,72407.641.fna,72407.642.fna,72407.643.fna,72407.644.fna,72407.645.fna,72407.646.fna,72407.647.fna,72407.648.fna,72407.649.fna,72407.650.fna,72407.651.fna,72407.653.fna,72407.654.fna,72407.655.fna,72407.656.fna,72407.657.fna,72407.658.fna,72407.660.fna,72407.661.fna,72407.662.fna,72407.664.fna,72407.665.fna,72407.666.fna,72407.667.fna,72407.684.fna,72407.695.fna,72407.703.fna,72407.704.fna,72407.705.fna,72407.706.fna

Ertapeneem mitte-resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

1328384.3.fna,573.5687.fna,573.5690.fna,573.5691.fna,573.5692.fna,573.5695.fna,573.5697.fna,573.5700.fna,573.5701.fna,573.5702.fna,573.5705.fna,573.5793.fna,573.5795.fna,573.5796.fna,573.5797.fna,573.5798.fna,573.5799.fna,573.5800.fna,573.5801.fna,573.5802.fna,573.5803.fna,573.5806.fna,573.5807.fna,573.5808.fna,573.5809.fna,573.5810.fna,573.5813.fna,573.5814.fna,573.5815.fna,573.5817.fna,573.5818.fna,573.5828.fna,72407.479.fna,72407.490.fna,72407.506.fna,72407.507.fna,72407.515.fna,72407.516.fna,72407.518.fna,72407.519.fna,72407.520.fna,72407.522.fna,72407.523.fna,72407.525.fna,72407.526.fna,72407.527.fna,72407.528.fna,72407.529.fna,72407.530.fna,72407.539.fna

Imipeneem resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

573.13073.fna,573.13937.fna,573.13938.fna,573.13939.fna,573.13940.fna,573.13941.fna,573.13942.fna,573.13944.fna,573.13947.fna,573.13951.fna,573.13952.fna,573.13954.fna,573.13955.fna,573.13956.fna,573.13957.fna,573.13958.fna,573.13960.fna,573.13961.fna,573.13965.fna,573.13971.fna,573.13973.fna,573.13975.fna,573.13978.fna,573.13981.fna,573.13986.fna,573.13989.fna,573.13990.fna,573.13991.fna,573.13997.fna,573.14001.fna,573.14005.fna,573.14009.fna,573.14011.fna,573.14022.fna,573.14023.fna,573.14033.fna,573.14040.fna,573.14050.fna,573.14052.fna,573.14096.fna,573.14097.fna,573.14098.fna,573.14105.fna,573.14109.fna,573.14114.fna,573.14115.fna,573.14118.fna,573.14133.fna,573.14136.fna,573.14137.fna,573.14138.fna,573.14141.fna,573.14146.fna,573.14148.fna,573.14153.fna,573.14158.fna,573.14163.fna,573.14167.fna,573.14168.fna,573.14175.fna,573.14178.fna,573.15434.fna,573.15438.fna,573.15440.fna,573.15441.fna,573.15448.fna,573.15461.fna,573.15462.fna,573.15485.fna,573.24252.fna,573.24258.fna,573.24274.fna,573.24278.fna,573.24313.fna,573.24314.fna,573.24315.fna,573.24316.fna,573.25568.fna,573.25569.fna,573.5623.fna,573.5624.fna,573.5636.fna,573.5638.fna,573.5644.fna,573.5645.fna,573.5646.fna,573.5647.fna,573.5763.fna,573.5764.fna,573.5765.fna,573.5766.fna,573.5767.fna,573.5768.fna,573.5769.fna,573.5770.fna,573.5777.fna,573.5778.fna,573.5779.fna,573.5780.fna,573.5781.fna

Imipeneem mitte-resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA:

573.12860.fna,573.12861.fna,573.12862.fna,573.12868.fna,573.12869.fna,573.12870.fna,573.12871.fna,573.12872.fna,573.12873.fna,573.12874.fna,573.12875.fna,573.12876.fna,573.12877.fna,573.12878.fna,573.12879.fna,573.12881.fna,573.12882.fna,573.12883.fna,573.12884.fna,573.12885.fna,573.12886.fna,573.12887.fna,573.12888.fna,573.12889.fna,573.12890.fna,573.12891.fna,573.12892.fna,573.12893.fna,573.12894.fna,573.12895.fna,573.12896.fna,573.12897.fna,573.12898.fna,573.12899.fna,573.12900.fna,573.12901.fna,573.12902.fna,573.12903.fna,573.12904.fna,573.12906.fna,573.12907.fna,573.12908.fna,573.12909.fna,573.12910.fna,573.12911.fna,573.12912.fna,573.12914.fna,573.12915.fna,573.12916.fna,573.12917.fna,573.12918.fna,573.12919.fna,573.12920.fna,573.12921.fna,573.12923.fna,573.12924.fna,573.12925.fna,573.12926.fna,573.12927.fna,573.12928.fna,573.12930.fna,573.12931.fna,573.12932.fna,573.12934.fna,573.12935.fna,573.12937.fna,573.12938.fna,573.12939.fna,573.12940.fna,573.12942.fna,573.12943.fna,573.12944.fna,573.12945.fna,573.12947.fna,573.12949.fna,573.12950.fna,573.12952.fna,573.12953.fna,573.12954.fna,573.12955.fna,573.12956.fna,573.12958.fna,573.12960.fna,573.12961.fna,573.12962.fna,573.12963.fna,573.12964.fna,573

.12965.fna,573.12967.fna,573.12968.fna,573.12969.fna,573.12970.fna,573.12971.fna,573.12972.fna,573.12974.fna,573.12976.fna,573.12977.fna,573.12978.fna,573.12979.fna,573.12980.fna

Meropeneem resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA (OXA - mudel):

573.18229.fna,573.18232.fna,573.18234.fna,573.18237.fna,573.20609.fna,573.20791.fna,573.21090.fna,573.21490.fna,573.21973.fna,573.23284.fna,573.29469.fna,573.29472.fna,573.36572.fna,573.37666.fna,573.37668.fna,573.37669.fna,573.37670.fna,573.37675.fna,573.37711.fna,573.39603.fna,573.39606.fna,573.47138.fna,573.49668.fna,573.49669.fna,573.49670.fna,573.49671.fna,573.49677.fna,573.50068.fna,573.50069.fna,573.50070.fna,573.50073.fna,573.50860.fna,573.50861.fna,573.50864.fna,573.51888.fna,573.54189.fna,573.55079.fna,573.55200.fna,573.55203.fna,573.55250.fna,573.58215.fna,573.58225.fna,573.63263.fna,573.63265.fna,573.63267.fna,573.63967.fna,573.65463.fna

Meropeneem mitte-resistentsed isolaadid treenimiseks FASTA (OXA - mudel):

573.48125.fna,573.48126.fna,573.48127.fna,573.48128.fna,573.48129.fna,573.48130.fna,573.48131.fna,573.48132.fna,573.48145.fna,573.48167.fna,573.48168.fna,573.48170.fna,573.48172.fna,573.48173.fna,573.48174.fna,573.48179.fna,573.48180.fna,573.48182.fna,573.48183.fna,573.48184.fna,573.48185.fna,573.48186.fna,573.48187.fna,573.48188.fna,573.48189.fna,573.48191.fna,573.48192.fna,573.48194.fna,573.48195.fna,573.48196.fna,573.48197.fna,573.48199.fna,573.48200.fna,573.48201.fna,573.48202.fna,573.48205.fna,573.48206.fna,573.48207.fna,573.48208.fna,573.48209.fna,573.48210.fna,573.48211.fna,573.48212.fna,573.48213.fna,573.48214.fna,573.48215.fna,573.48216.fna,573.48217.fna,573.48219.fna,573.48220.fna,573.48222.fna,573.48223.fna,573.48225.fna,573.48226.fna,573.48228.fna,573.48229.fna,573.48230.fna,573.48231.fna,573.48233.fna,573.48236.fna,573.48238.fna,573.48239.fna,573.48240.fna,573.48241.fna,573.48242.fna,573.48243.fna,573.48247.fna,573.48248.fna,573.48249.fna,573.48251.fna,573.48252.fna,573.48253.fna,573.48255.fna,573.48256.fna,573.48948.fna,573.48986.fna,573.49030.fna,573.49031.fna,573.49032.fna,573.49034.fna,573.49035.fna,573.49048.fna,573.49145.fna,573.49146.fna,573.49147.fna,573.49148.fna,573.49149.fna,573.49150.fna,573.49151.fna,573.49152.fna,573.49153.fna,573.49154.fna,573.49155.fna,573.49156.fna,573.49157.fna,573.49158.fna,573.49159.fna,573.49160.fna,573.49161.fna,573.49162.fna

Meropeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

1328399.3.fna,1328401.3.fna,1328404.3.fna,1328405.3.fna,1328407.3.fna,1328409.3.fna,132
8413.3.fna,1438708.3.fna,1438709.3.fna,1438711.3.fna,1438712.3.fna,1438713.3.fna,143871
4.3.fna,1438715.3.fna,1438717.3.fna,1438718.3.fna,1438719.3.fna,1438720.3.fna,1438722.3.
fna,1438723.3.fna,1438724.3.fna,1438725.3.fna,1438726.3.fna,1438727.3.fna,1438728.3.fna,
1438729.3.fna,1438730.3.fna,1438731.3.fna,1438732.3.fna,1438733.3.fna,1438734.3.fna,143
8735.3.fna,1438736.3.fna,1438737.3.fna,1438738.3.fna,1438739.3.fna,1438740.3.fna,143874
1.3.fna,1438742.3.fna,1438743.3.fna,1438744.3.fna,1438745.3.fna,1438746.3.fna,1438747.3.
fna,1438748.3.fna,1438749.3.fna,1438750.3.fna,1438751.3.fna,1438752.3.fna,1438753.3.fna,
1438754.3.fna,1438755.3.fna,1438756.3.fna,1438757.3.fna,1438758.3.fna,1438759.3.fna,143
8760.3.fna,1438761.3.fna,1438762.3.fna,1438763.3.fna,1438764.3.fna,1438765.3.fna,143876
6.3.fna,1438767.3.fna,1438768.3.fna,1438769.3.fna,1438770.3.fna,1438771.3.fna,1438772.3.
fna,1438773.3.fna,1438774.3.fna,1438775.3.fna,1438776.3.fna,1438777.3.fna,1438778.3.fna,
1438779.3.fna,1438780.3.fna,1438781.3.fna,573.12864.fna,573.12867.fna,573.12880.fna,573
.12905.fna,573.12913.fna,573.12936.fna,573.12948.fna,573.12959.fna,573.12966.fna,573.13
007.fna,573.13010.fna,573.13011.fna,573.13019.fna,573.15434.fna,573.15435.fna,573.15438
.fna,573.15439.fna,573.15440.fna,573.15441.fna,573.15448.fna,573.15461.fna,573.15462.fna

Meropeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

573.13029.fna,573.15432.fna,573.15433.fna,573.15436.fna,573.15442.fna,573.15443.fna,573
.15444.fna,573.15445.fna,573.15446.fna,573.15447.fna,573.15449.fna,573.15451.fna,573.15
452.fna,573.15455.fna,573.15456.fna,573.15458.fna,573.15459.fna,573.15460.fna,573.15463
.fna,573.15465.fna,573.15466.fna,573.15467.fna,573.15468.fna,573.15469.fna,573.15470.fna
,573.15471.fna,573.15472.fna,573.15473.fna,573.15474.fna,573.15475.fna,573.15476.fna,57
3.15477.fna,573.15478.fna,573.15479.fna,573.15480.fna,573.15481.fna,573.15482.fna,573.1
5483.fna,573.15484.fna,573.15486.fna,573.15487.fna,573.15488.fna,573.15491.fna,573.1549
3.fna,573.15495.fna,573.15497.fna,573.15498.fna,573.15499.fna,573.15500.fna,573.15501.fn
a,573.15502.fna,573.15503.fna,573.15504.fna,573.15505.fna,573.15506.fna,573.15507.fna,5
73.15508.fna,573.15509.fna,573.15510.fna,573.15580.fna,573.15595.fna,573.15610.fna,573.
24263.fna,573.24290.fna,573.31059.fna,573.31060.fna,573.31061.fna,573.31062.fna,573.310
63.fna,573.31064.fna,573.31065.fna,573.31066.fna,573.31068.fna,573.31069.fna,573.31070.f
na,573.31071.fna,573.31073.fna,573.31075.fna,573.31076.fna,573.31077.fna,573.31078.fna,
573.31079.fna,573.31081.fna,573.31082.fna,573.31083.fna,573.31084.fna,573.33391.fna,573
.33393.fna,573.33396.fna,573.33397.fna,573.33399.fna,573.33401.fna,573.33407.fna,573.33

409.fna,573.33413.fna,573.33415.fna,573.33418.fna,573.33419.fna,573.33421.fna,573.33422.fna

Ertapeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

1284787.3.fna,1284788.3.fna,1284789.4.fna,1284790.3.fna,1284791.4.fna,1284792.4.fna,1284793.4.fna,1284794.4.fna,1284795.4.fna,1284796.3.fna,1284797.4.fna,1284799.4.fna,1284800.4.fna,1284801.3.fna,1284803.4.fna,1284805.4.fna,1284806.4.fna,1284807.4.fna,1284808.4.fna,1284809.4.fna,1284810.3.fna,1284811.3.fna,1284812.3.fna,1284813.3.fna,1284815.3.fna,1284816.3.fna,1284817.3.fna,1284819.3.fna,1284820.3.fna,1284821.3.fna,1284822.3.fna,1284823.3.fna,1284824.3.fna,1284825.3.fna,1284826.3.fna,1284827.3.fna,1284828.3.fna,1284829.3.fna,1284830.3.fna,1284831.3.fna,1284832.3.fna,1284833.4.fna,1284834.3.fna,1304916.4.fna,1304917.4.fna,1304918.4.fna,1304919.4.fna,1304920.3.fna,1304921.4.fna,1304923.3.fna,1304924.3.fna,1328383.3.fna,1438708.3.fna,1438709.3.fna,1438711.3.fna,1438712.3.fna,1438713.3.fna,1438714.3.fna,1438715.3.fna,1438717.3.fna,1438718.3.fna,1438719.3.fna,1438720.3.fna,1438722.3.fna,1438723.3.fna,1438724.3.fna,1438725.3.fna,1438726.3.fna,1438727.3.fna,1438728.3.fna,1438729.3.fna,1438730.3.fna,1438731.3.fna,1438732.3.fna,1438733.3.fna,1438734.3.fna,1438735.3.fna,1438736.3.fna,1438737.3.fna,1438738.3.fna,1438739.3.fna,1438740.3.fna,1438741.3.fna,1438742.3.fna,1438743.3.fna,1438744.3.fna,1438745.3.fna,1438746.3.fna,1438747.3.fna,1438748.3.fna,1438749.3.fna,1438750.3.fna,1438751.3.fna,1438752.3.fna,1438753.3.fna,1438754.3.fna,1438755.3.fna,1438756.3.fna,1438757.3.fna,1438758.3.fna

Ertapeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

1284818.4.fna,1328385.3.fna,573.24250.fna,573.24255.fna,573.24257.fna,573.24259.fna,573.24266.fna,573.24268.fna,573.24270.fna,573.24273.fna,573.24275.fna,573.24279.fna,573.24281.fna,573.24282.fna,573.24283.fna,573.24284.fna,573.24285.fna,573.24287.fna,573.24290.fna,573.24292.fna,573.24293.fna,573.24294.fna,573.24295.fna,573.24296.fna,573.24298.fna,573.24299.fna,573.24300.fna,573.24301.fna,573.24302.fna,573.24380.fna,573.24381.fna,573.24383.fna,573.24384.fna,573.24386.fna,573.24388.fna,573.24400.fna,573.33414.fna,573.33419.fna,573.5658.fna,573.5661.fna,573.5663.fna,573.5665.fna,573.5672.fna,573.5673.fna,573.5677.fna,573.5678.fna,573.5679.fna,573.5681.fna,573.5682.fna,573.5684.fna,72407.540.fna,72407.544.fna

Imipeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

1328383.3.fna,1328386.3.fna,1400178.3.fna,1438708.3.fna,1438709.3.fna,1438711.3.fna,143
8712.3.fna,1438713.3.fna,1438714.3.fna,1438715.3.fna,1438717.3.fna,1438718.3.fna,143871
9.3.fna,1438720.3.fna,1438722.3.fna,1438723.3.fna,1438724.3.fna,1438725.3.fna,1438726.3.
fna,1438727.3.fna,1438728.3.fna,1438729.3.fna,1438730.3.fna,1438731.3.fna,1438732.3.fna,
1438733.3.fna,1438734.3.fna,1438735.3.fna,1438736.3.fna,1438737.3.fna,1438738.3.fna,143
8739.3.fna,1438740.3.fna,1438741.3.fna,1438742.3.fna,1438743.3.fna,1438744.3.fna,143874
5.3.fna,1438746.3.fna,1438747.3.fna,1438748.3.fna,1438749.3.fna,1438750.3.fna,1438751.3.
fna,1438752.3.fna,1438753.3.fna,1438754.3.fna,1438755.3.fna,1438756.3.fna,1438757.3.fna,
1438758.3.fna,1438759.3.fna,1438760.3.fna,1438761.3.fna,1438762.3.fna,1438763.3.fna,143
8764.3.fna,1438765.3.fna,1438766.3.fna,1438767.3.fna,1438768.3.fna,1438769.3.fna,143877
0.3.fna,1438771.3.fna,1438772.3.fna,1438773.3.fna,1438774.3.fna,1438775.3.fna,1438776.3.
fna,1438777.3.fna,1438778.3.fna,1438779.3.fna,1438780.3.fna,1438781.3.fna,573.12864.fna,
573.12867.fna,573.12880.fna,573.12905.fna,573.12913.fna,573.12936.fna,573.12948.fna,573
.12966.fna,573.13007.fna,573.13010.fna,573.13011.fna,573.13019.fna,573.13034.fna,573.13
037.fna,573.13039.fna,573.13042.fna,573.13046.fna,573.13048.fna,573.13049.fna,573.13052
.fna,573.13053.fna,573.13062.fna,573.13063.fna,573.13065.fna,573.13067.fna,573.13068.fna

Imipeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTA:

573.12981.fna,573.12982.fna,573.12983.fna,573.12984.fna,573.12985.fna,573.12986.fna,573
.12988.fna,573.12989.fna,573.12990.fna,573.12991.fna,573.12992.fna,573.12993.fna,573.12
994.fna,573.12995.fna,573.12996.fna,573.12997.fna,573.12998.fna,573.12999.fna,573.13000
.fna,573.13001.fna,573.13002.fna,573.13003.fna,573.13004.fna,573.13005.fna,573.13006.fna
,573.13008.fna,573.13009.fna,573.13012.fna,573.13013.fna,573.13014.fna,573.13015.fna,57
3.13016.fna,573.13017.fna,573.13018.fna,573.13020.fna,573.13021.fna,573.13023.fna,573.1
3027.fna,573.13028.fna,573.13029.fna,573.15432.fna,573.15433.fna,573.15436.fna,573.1544
2.fna,573.15443.fna,573.15444.fna,573.15445.fna,573.15446.fna,573.15447.fna,573.15449.fn
a,573.15451.fna,573.15452.fna,573.15455.fna,573.15456.fna,573.15458.fna,573.15459.fna,5
73.15460.fna,573.15463.fna,573.15465.fna,573.15466.fna,573.15467.fna,573.15468.fna,573.
15469.fna,573.15470.fna,573.15471.fna,573.15472.fna,573.15473.fna,573.15474.fna,573.154
75.fna,573.15476.fna,573.15477.fna,573.15478.fna,573.15479.fna,573.15480.fna,573.15481.f
na,573.15482.fna,573.15483.fna,573.15484.fna,573.15486.fna,573.15487.fna,573.15488.fna,
573.15491.fna,573.15493.fna,573.15495.fna,573.15497.fna,573.15498.fna,573.15499.fna,573

.15500.fna,573.15501.fna,573.15502.fna,573.15503.fna,573.15504.fna,573.15505.fna,573.15506.fna,573.15507.fna,573.15508.fna,573.15509.fna,573.15510.fna,573.24280.fna,573.24290.fna

Meropeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

ERR349748,ERR349749,ERR349751,ERR349757,ERR349763,ERR349764,ERR349765,ERR349766,ERR349797,SRR1159063,SRR1159123,SRR1159182,SRR1159216,SRR1159223,SRR1159345,SRR1180688,SRR1180695,SRR1180706,SRR1180769,SRR1180783,SRR1180798,SRR1180844,SRR1180863,SRR1180897,SRR1196664,SRR1196665,SRR1196672,SRR1196673,SRR1196679,SRR1196680,SRR1196688,SRR1196695,SRR1196696,SRR1196703,SRR1196704,SRR1196705,SRR1196710,SRR1196711,SRR1196718,SRR1196719,SRR119672,
SRR1196726,SRR1196734,SRR1196735,SRR1196742,SRR1196743,SRR1196748,SRR1196749,SRR1196755,SRR1196756,SRR1196771,SRR1196772,SRR1196779,SRR1196796,SRR1196797,SRR1196805,SRR1196806,SRR1196812,SRR1196813,SRR1196814,SRR1196821,SRR1196822,SRR1196829,SRR1196830,SRR1196837,SRR1196838,SRR1196839,SRR1196845,SRR1196846,SRR1196854,SRR1196855,SRR1196863,SRR1196870,SRR1196871,SRR1196877,SRR1196878,SRR1196886,SRR1196887,SRR1196888,SRR1196894,SRR850867,SRR850869,SRR850873,SRR850920,SRR850953

Meropeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

ERR1023692,ERR349747,ERR349752,ERR349753,ERR349756,ERR349759,ERR349768,ERR349769,ERR349770,ERR349773,ERR349774,ERR349775,ERR349777,ERR349780,ERR349784,ERR349787,ERR349788,ERR349789,ERR349790,ERR349795,ERR349798,ERR349800,ERR349803,ERR349804,ERR349805,ERR349807,ERR349808,ERR349811,ERR349812,ERR349813,ERR349814,ERR349815,ERR349816,ERR349817,ERR349818,ERR349819,ERR349820,ERR349821,ERR349823,ERR349824,ERR349825,ERR349828,ERR349833,ERR349835,ERR349838,ERR349839,ERR349841,ERR349842,ERR349843,ERR349844,ERR349845,ERR349846,ERR349847,ERR349848,ERR349849,ERR349852,ERR349853,ERR349854,SRR1508821,SRR1508822,SRR1508825,SRR1508826,SRR1508827,SRR1508830,SRR1508832,SRR1508834,SRR1508837,SRR1508838,SRR1508841,SRR1508842,SRR1508848,SRR1508849,SRR1610074,SRR1610075,SRR1610078,SRR1610079,SRR1610080,SRR1610081,SRR1610082,SRR1610083,SRR1610084,SRR1610085,SRR1610086,SRR1610088,SRR1610089,SRR1610090,SRR1610092,SRR1610093,SRR1610096,SRR1610099,SRR1610100,

SRR1610101,SRR1610102,SRR1610103,SRR2134680,SRR3222198,SRR5082446,SRR5082463

Ertapeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

SRR1159063,SRR1159123,SRR1159182,SRR1159223,SRR1159345,SRR1180688,SRR1180695,SRR1180706,SRR1180769,SRR1180783,SRR1180798,SRR1180844,SRR1180863,SRR1180897,SRR1196672,SRR1196673,SRR1196679,SRR1196688,SRR1196695,SRR1196703,SRR1196704,SRR1196710,SRR1196711,SRR1196718,SRR1196719,SRR1196725,SRR1196734,SRR1196742,SRR1196748,SRR1196755,SRR1196756,SRR1196771,SRR1196772,SRR1196796,SRR1196797,SRR1196805,SRR1196812,SRR1196813,SRR1196821,SRR1196822,SRR1196829,SRR1196837,SRR1196838,SRR1196845,SRR1196854,SRR1196870,SRR1196877,SRR1196886,SRR848923,SRR849527,SRR849528,SRR849529,SRR849530,SRR849531,SRR849532,SRR849534,SRR849536,SRR849537,SRR849538,SRR849539,SRR849540,SRR849541,SRR849543,SRR849544,SRR849545,SRR849546,SRR849547,SRR849548,SRR849549,SRR849550,SRR849551,SRR849552,SRR849553,SRR849555,SRR849556,SRR849557,SRR849597,SRR849598,SRR849602,SRR849650,SRR849679,SRR849681,SRR849782,SRR849784,SRR849786,SRR849787,SRR849802,SRR849803,SRR849804,SRR849805,SRR849806,SRR849807,SRR849808,SRR849809,SRR849826,SRR849827,SRR849840,SRR849841,SRR849872,SRR850961

Ertapeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

ERR1218565,ERR1218566,ERR1218572,ERR1218573,ERR1218724,ERR1218725,ERR1218727,ERR1218731,ERR1218749,ERR1218752,ERR1218755,ERR1218759,ERR775522,ERR775615,SRR1508826,SRR1508843,SRR2134680,SRR3057130,SRR3168635,SRR3168637,SRR3982100,SRR3996262,SRR4017846,SRR4017887,SRR4017923,SRR4019406,SRR4035114,SRR4065664,SRR4245474,SRR4294843,SRR4294848,SRR5120227,SRR5120229,SRR5237403,SRR5341978,SRR5420062,SRR5420063,SRR5420073,SRR5445912,SRR5445913,SRR5445915,SRR5806868,SRR5806869,SRR5806870,SRR5806871,SRR5810501,SRR5810502,SRR5810503,SRR5810506,SRR5810509,SRR849535,SRR850969

Imipeneem resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

SRR1010932,SRR1159063,SRR1159123,SRR1159182,SRR1159216,SRR1159223,SRR1159345,SRR1180688,SRR1180695,SRR1180706,SRR1180769,SRR1180783,SRR1180798,SRR1180844,SRR1180863,SRR1180897,SRR1196664,SRR1196665,SRR1196672,SRR1196673,

SRR1196679,SRR1196680,SRR1196688,SRR1196695,SRR1196696,SRR1196703,SRR1196704,SRR1196705,SRR1196710,SRR1196711,SRR1196718,SRR1196719,SRR1196725,SRR1196726,SRR1196734,SRR1196735,SRR1196742,SRR1196743,SRR1196748,SRR1196749,SRR1196755,SRR1196756,SRR1196771,SRR1196772,SRR1196779,SRR1196796,SRR119679,SRR1196805,SRR1196806,SRR1196812,SRR1196813,SRR1196814,SRR1196821,SRR1196822,SRR1196829,SRR1196830,SRR1196837,SRR1196838,SRR1196839,SRR1196845,SRR1196846,SRR1196854,SRR1196855,SRR1196863,SRR1196870,SRR1196871,SRR1196877,SRR1196878,SRR1196886,SRR1196887,SRR1196888,SRR1196894,SRR5385783,SRR5385784,SRR5385786,SRR5385788,SRR5385789,SRR5385799,SRR5385800,SRR5385803,SRR5385804,SRR5385806,SRR5385810,SRR5385813,SRR5385815,SRR5385819,SRR850961,SRR850973

Imipeneem mitte-resistentsed isolaadid testimiseks FASTQ:

ERR349747,ERR349752,ERR349753,ERR349756,ERR349759,ERR349768,ERR349769,ERR349770,ERR349773,ERR349774,ERR349775,ERR349777,ERR349780,ERR349784,ERR349787,ERR349788,ERR349789,ERR349790,ERR349795,ERR349798,ERR349800,ERR349803,ERR349804,ERR349805,ERR349806,ERR349807,ERR349808,ERR349811,ERR34982,ERR349813,ERR349814,ERR349815,ERR349816,ERR349817,ERR349818,ERR349819,ERR349820,ERR349821,ERR349823,ERR349824,ERR349825,ERR349828,ERR349833,ERR349835,ERR349838,ERR349839,ERR349841,ERR349842,ERR349843,ERR349844,ERR349845,ERR349846,ERR349847,ERR349848,ERR349849,ERR349852,ERR349853,ERR349854,SRR2134680,SRR3222415

Eesti isolaatide koodid, mis saadi Terviseametist:

172922,173212,173213,173215,173329,173695,173814,173860,173870,174281,174705,175793,175893,175895,175922,176100,176101,176102,176103,176104,176106,176108,176109,176390,176391,176392,176394,176395,176396,176604,176605,176606,176607,177743,177744,177745,177746,177748,177749,177750,177751,177754,177755,177757,177758,177760,177761,177764,177766,177767,177773,177776,177777,177907,178546,178547,178569,178702,178704,178706,178788,178841,178951,178952,178957,179338,179339,179475,179478,179479,179482,179483,179484,179485,179486,179487,179488,179491,179492,179494,180011,180174,180201,180240,180255,180607,180629,180640,180657,180674,180680,180708,180710,180714,180754,180808,180863,180908,180916

LIHTLITSENTS

Mina, Karita Helde,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Karbapeneemresistentsuse ennustustäpsuse võrdlus *Klebsiella pneumoniae* isolaatidel kolme bioinformaatilise tööriistaga: PhenotypeSeeker, ResFinder, Kleborate

mille juhendajad on prof. Maido Remm ja Taavi Riit,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace 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.

Karita Helde

26.05.2025