Detekce superantigenů u izolátů *Streptococcus pyogenes* na základě dat celogenomové sekvenace

Veselá R.[1], Vohrnová S.[1, 2], Kozáková J.[1]

[1]Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy
[2]3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

SOUHRN

Streptococcus pyogenes způsobuje rozličná lidská onemocnění od nekomplikovaných infekcí dýchacích cest a kůže až po vážná invazivní onemocnění, která mohou být doprovázena syndromem toxického šoku. Významnými faktory virulence vedle M proteinu kódovaného genem *emm* jsou pyrogenní exotoxiny, které se považují za superantigeny. V Národní referenční laboratoři pro streptokokové nákazy byly nově zavedeny bioinformatické nástroje pro zpracování dat z celogenomové sekvenace *S. pyogenes*. Použitím programu SRST2 a platformy BV-BRC byla analyzována WGS data 10 kmenů *S. pyogenes* izolovaných od pacientů s invazivním onemocněním a byly stanoveny *emm* typy, sekvenční typy a profily genů kódujících superantigeny. K sestavení sekvencí genomů z krátkých čtení byla zvolena assembly pipeline Unicycler s *de novo* assemblerem SPAdes.

KLÍČOVÁ SLOVA

Streptococcus pyogenes – GAS – superantigen – celogenomová sekvenace

ABSTRACT

Veselá R., Vohrnová S., Kozáková J.: Detection of superantigens in *Streptococcus pyogenes* isolates based on whole genome sequencing data

Streptococcus pyogenes causes a variety of human diseases ranging from uncomplicated respiratory tract and skin infections to severe invasive diseases possibly involving toxic shock syndrome. Besides the *emm* gene-encoded M protein, important virulence factors are pyrogenic exotoxins, referred to as superantigens. The National Reference Laboratory for Streptococcal Infections has newly introduced bioinformatics tools for processing *S. pyogenes* whole genome sequencing data. Using the SRST2 software and BV-BRC platform, WGS data of 10 *S. pyogenes* isolates from patients with invasive disease were analysed, and *emm* type, sequence type, and superantigen encoding gene profiles were determined. The Unicycler assembly pipeline with the SPAdes de novo assembler was used to assemble genome sequences from short reads.

KEYWORDS

Streptococcus pyogenes – GAS – superantigen – whole genome sequencing

Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2023;72(3):191–194

ÚVOD

Streptococcus pyogenes (streptokok skupiny A, Group A Streptococcus, GAS) způsobuje rozličná lidská onemocnění od nekomplikovaných infekcí dýchacích cest a kůže až po vážná invazivní onemocnění spojená s vysokou nemocností a smrtností. Od 80. let 20. století se do popředí zájmu v USA i v Evropě dostaly případy streptokokového syndromu toxického šoku (Streptococcal Toxic Shock Syndrome, STSS), invazivní GAS infekce kůže a měkkých tkání, bakteriémie a sepse [1].

Genom GAS obsahuje geny pro produkci faktorů virulence. Typování GAS je založeno na N-koncové hypervariabilní sekvenci genu *emm* kódujícího povrchový M protein (anti-phagocytic M protein). Nejčastěji zastoupené *emm* typy invazivních GAS jsou *emm1*, *emm28* a *emm89* [2]. Vedle genu *emm* některé GAS vykazují v genomu až dva *emm*-like geny, také známé jako *mrp* (M-related protein), *enn* a *sic* (streptococcal inhibitor of complement). Transkripci těchto genů řídí regulon *mga* (M-protein trans-acting positive regulator).

Kmeny GAS spojené s invazivním onemocněním produkují také exotoxiny a specifické superantigeny (SAg), které vyvolávají systémovou zánětlivou odezvu. Superantigeny se váží na molekuly MHC II (major histocompatibility complex class II) na povrchu antigen prezentujících buněk a současně na variabilní oblast β řetězce receptoru T lymfocytů. Tato interakce vede k aktivaci velkého množství T lymfocytů produkujících prozánětlivé cytokiny a k potlačení produkce imunoglobulinů [3]. V současné době je známo 13 SAg. Klasickými biochemickými metodami byly identifikovány

proLékaře.cz | 31.10.2026

Tabulka 1. Charakterizace invazivních izolátů *S. pyogenes*
Table 1. Characterization of invasive *S. pyogenes* isolates

Kmen	*emm* typ	ST	Věk	Pohlaví	Materiál	Klinická prezentace
39-18	*emm*1	28	67	M	hemokultura	sepse, srdeční zástava
86-18	*emm*1	28	49	Ž	hemokultura	sepse, septický šok
93-18	*emm*1	28	64	M	hemokultura	sepse
213-18	*emm*1	28	51	M	stěr z pravé hýždě sekční materiál	flegmóna
62-19	*emm*1	28	21	Ž	tkáň podkoží	septický šok s multiorgánovým selháním
45-19	*emm*28	52	64	M	hemokultura	erysipel, septický šok
88-19*	*emm*28	52	60	M	tracheální aspirát	sepse
95-19*	*emm*28	52			stěr z kloubu, sekce	
96-19*	*emm*28	52			stěr z krku	
385-19	emm28	52	43	M	stěr z rány	flegmóna, renální selhání

**kmeny izolované od jednoho pacienta; ST – sekvenční typ; M – muž; Ž – žena*
**isolates from one patient; ST – sequence type, M – male, F – female*

superantigeny SpeA *(streptococcal pyrogenic exotoxin)*, SpeC, SSA *(streptococcal superantigen)* a smeZ *(streptococcal mitogenic exotoxin Z)*. Pomocí počítačové analýzy genomů byly dále identifikovány další SAg – SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, SpeQ a SpeR. Geny *speG*, *speJ a smeZ* leží na chromozomu. Ostatní geny jsou neseny na profázích nebo na jiných mobilních elementech, jejichž integrace do genomu bakterie silně přispívá ke genomové diverzifikaci GAS a k výskytu vysoce virulentních kmenů.

Metoda celogenomové sekvenace (whole genome sequencing, WGS) poskytuje data, ze kterých lze získat informace o genomu bakterií. V současné době se v některých databázích podstatně navýšil počet popsaných genů GAS, což umožnilo skládání genomů invazivních izolátů. Jedním z programů využívaných v naší studii je SRST2 (Short Read Sequence Typing for Bacterial Pathogens) [4], který pracuje s databází VFDB (Virulence Factor DataBase) [5]. SRST2 umožňuje srovnání genomu vyšetřovaných izolátů s referenční databází genů, a tak stanoví geny SAg přítomné v genomu GAS. Další platformou použitou v naší studii je PubMLST databáze [6] nabízející rozsáhlou škálu nástrojů k analýze WGS dat a platforma Bacterial and Viral Bioinformatic Center (BV-BRC) [7]. Platforma BV-BRC pracuje s databázemi VFDB a Victor [8].

MATERIÁLY A METODY

Kmeny *S. pyogenes*

V rámci naší studie bylo celogenomové sekvenaci podrobeno deset izolátů invazivních GAS. Kmeny invazivních GAS byly získány z klinického materiálu pacientů s invazivním onemocněním v letech 2018–2019. Uvedené kmeny byly spojeny s diagnózami sepse, septický šok, flegmóna. Sedm z osmi pacientů zemřelo. Izoláty invazivních GAS byly dvou *emm* typů, a to 5 kmenů typu *emm1* a 5 kmenů typů *emm28*. Kmeny typu *emm28* označené 96-19, 95-19 a 88-19 byly izolovány od jednoho pacienta v časovém rozmezí tří dnů a z materiálu rozličných biologických lokalit. Souhrn kmenů, klinické i epidemiologické informace o pacientech jsou uvedeny v tabulce 1.

Extrakce DNA

Z kmenů invazivních GAS byla izolována deoxyribonukleová kyselina (DNA) použitím kitu MagAttract® HMW DNA Mini kit (QIAGEN). Izolovaná DNA byla následně podrobena kvalitativní kontrole s použitím gelové elektroforézy a kvantitativní kontrole spektrofotometrickým měřením koncentrace DNA.

Celogenomová sekvenace a úprava dat

Příprava knihoven a celogenomová sekvenace byla provedena na pracovišti EMBL (European Molecular Biology Labolatory, Heidelberg, Německo) s využitím přístroje Illumina MiSeq. Našemu pracovišti byla následně poskytnuta raw WGS data ve formátu fastq souborů. K sestavení genomů z primárních raw WGS dat se použila platforma BV-BRC, která využívá assembly pipeline Unicycler verze v0.4.8 [9] s *de novo* assemblerem SPAdes [10]. Hodnota parametru K-mer byla zvolena 127. U dvou izolátů byla využita hodnota parametru K-mer 115. Průměrný počet kontigů v sestavených genomech byl 55 (47–62).

Zpracování dat z celogenomové sekvenace

K *emm* typování invazivních GAS se použila databáze PubMLST podporovaná platformou Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb) [11]. Ke zjištění přítomnosti genů virulentních faktorů *speA, speC, speG, speH, spel, speJ, speK, speL, speM, smeZ* a *ssa* a *emm* z dat WGS byl použit nástroj komplexní analýza genomu

proLékaře.cz | 31.10.2026

(Comprehensive Genome Analysis) platformy BV-BRC a program SRST2.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Použitím databáze PubMLST byl pro všechny izoláty stanoven *emm* typ (viz tab. 1). *Emm* typy byly dále ověřeny použitím programu SRST2 a platformy BV-BRC, které zpracovávají primární raw WGS data. Program SRST2 potvrdil totožné *emm* typy všech kmenů. Platforma BV-BRC potvrdila *emm* geny u všech izolátů a umožnila vizualizovat uspořádání *emm* a *emm*-like genů. Mga locus u pěti kmenů typu *emm28* označené 45-19, 88-19, 95-19, 96-19 a 385-19 obsahoval geny *mga*, *mrp, emm*, *enn* a *scpA* (C5a peptidáza). Další variantu uspořádání *emm* a *emm*-like genů vykazují izoláty typu *emm1* označené 39-18, 86-18, 93-18, 213-18 a 62-19, kde se ve Mga lokusu vyskytují geny *mga*, *emm*, *sic*, *scpA* a je zde začleněn gen *mlp (*mobile element protein).

U všech deseti kmenů invazivních GAS se WGS analýzou s použitím platformy BV-BRC určil MLST (multilocus sequence typing) sekvenční typ (ST). Kmeny *emm1* patří shodně k ST-28 a kmeny *emm28* k ST-52.

Distribuce streptokokových pyrogenních toxinů *speA, speC, speG, speH, speI, speJ, speK, speL, speM* a streptokokového mitogenního toxinu *smeZ* a streptokokového superantigenu *ssa* byla u kmenů stejného *emm* typu stejná. Potvrdila se jak použitím programu SRST2 pracujícího s referenční databází VFDB, tak komplexní analýzou genomu pomocí platformy BV-BRC pracující s referenčními databázemi VFDB a Victors.

Na základě alignmentu genomů všech izolátů invazivních GAS typu *emm28* provedených použitím platformy BV-BRC se domníváme, že kmeny 95-19 a 96-19

Tabulka 2. Distribuce genů sledovaných superantigenů hodnocená programem SRST2 a platformou BV-BRC
Table 2. Superantigen gene distribution analysed by the SRST2 software and BV-BRC platform

Kmen		39-18	86-18	93-18	213-18	62-19		45-19	88-19	95-19	96-19	385-19
BV-BRC	*emm*	*emm1*	*emm1*	*emm1*	*emm1*	*emm1*		*emm28*	*emm28*	*emm28*	*emm28*	*emm28*
SRST2		*emm1*	*emm1*	*emm1*	*emm1*	*emm1*		*emm28*	*emm28*	*emm28*	*emm28*	*emm28*
BV-BRC	*speA*	X	X	X	X	X						
SRST2		X	X	X	X	X						
BV-BRC	*speC*							X	X	X	X	X
SRST2								X	X	X	X	X
BV-BRC	*speG*	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
SRST2		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
BV-BRC	*speH*							X	X	X	X	
SRST2								X	X	X	X	
BV-BRC	*speI*							X	X	X	X	
SRST2								X	X	X	X	
BV-BRC	*speJ*	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
SRST2		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
BV-BRC	*speK*											
SRST2												
BV-BRC	*speL*											
SRST2												
BV-BRC	*speM*											
SRST2												
BV-BRC	*smeZ*	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
SRST2		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
BV-BRC	*ssa*											
SRST2												
BV-BRC	*speB*	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
SRST2		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X

X – přítomnost daného genu v genomu kmene
X – presence of the gene in the strain genome

proLékaře.cz | 31.10.2026

izolované od jednoho pacienta jsou shodné, přičemž izolát 88-19 od téhož pacienta je geneticky odlišný.

ZÁVĚR

Tato studie vedla k zavedení možnosti využití programu SRST2 (tab. 2) a nástrojů platforem PuMLST a BV-BRC ke zpracování WGS dat invazivních GAS do NRL pro streptokokové nákazy. Analýza WGS dat invazivních GAS různými nástroji přispěje k upřesnění konfliktních výsledků týkajících se profilů streptokokových superantigenů publikovaných v literatuře. Streptokokové superantigeny se považují za významné faktory virulence, i když jejich spojitost s konkrétními klinickými projevy se nepodařilo definitivně prokázat. Geny streptokokových superantigenů mohou být považovány za markery přítomnosti a přenosu profágů. Přítomnost genů superantigenů v genomech invazivních GAS je podmínka nutná, nikoliv však dostačující, k jejich expresi na povrchu mikroorganismu nebo jako extracelulární produkt.

LITERATURA

1. Holm SE. Invasive group A streptococal infections. *The New England Journal of Medicine,* 1996;335:590–591.
2. Imohl M, Fitzner Ch, Perniciaro S, et al. Epidemiology and distribution of 10 superantigens among invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany from 2009 to 2014. *Plos One,* 2017;12(7):e0180757. doi: 10.1371/journal.pone.0180757.
3. Lintges M, Arlt S, Uciechowski P, et al. A new closed-tube multiplex real-time PCR to detect eleven superantigens od *Streptococcus pyogenes* dentifies a strain without superantigen aktivity. *International Journal of Medical Microbiology,* 2007;297:471–475.
4. Inouye M, Dashnow H, Raven LA, et al. SRST2. Rapid genomic surveillance for public health and hospital mikrobiology labs. *Genome Medicine,* 2014;6(90). doi:10.1186/s13073-014-0090-6.
5. Liu B, Zheng D, Zhou S, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acid Research,* 2022;50(D1):D912–D917.
6. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res,* 2018;3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
7. Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC: a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research,* 2023;51(D1):D678–D689.
8. Sayers S, Li L, Ong E, et al. Victors: a web-based knowledge base of virulence factors in human and animal pathogens. *Nucleic Acids Researchs,* 2019;47(D1):D693–D700.
9. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, et al. Unicycler: resolving bacteria genome assemblies from short and long sequencing reads. *PloS Computational Biology,* 2017;13(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology,* 2012;19(5):455–477.
11. Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics,* 2010;11(1). doi: 10.1186/1471-2105-11-595.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav –SZU, 75010330“)

Do redakce došlo dne 8. 12. 2022.

Adresa pro korespondenci:
Ing. Renata Veselá
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 49/48
110 00 Praha 10
e-mail: renata.vesela@szu.cz