



Genomsko sekvenciranje za ugotavljanje virulentnega potenciala bakterij

12. Likarjev simpozij

13.6.2024

Andraž Celar Šturm, mag. biotehnol., asist. Anja Erbežnik, dr. vet. med.

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Medicinska fakulteta
Univerza v Ljubljani



Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)

Glavni koraki:

- osamitev DNK
- priprava knjižnic
- sekvenciranje
- analiza podatkov



Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)

Primeri analiz:

- analiza genov za antibiotično rezistenco
- analiza virulentnih dejavnikov
- analiza izbruhov na podlagi sorodnosti
- tipizacija bakterijskih sevov



Metode določanja virulentnih dejavnikov

Poravnava z blast

gen ABC

- Poravnava sekvenc (blastn, blastp)

nepopolno sestavljen gen - nizek % ujemanja velikosti

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
fyuA	100	2022 / 2022	NODE_8_length_229710_cov_84.228029	156125..158146	Siderophore receptor	CXZC01000008



Metode določanja virulentnih dejavnikov

Poravnava z blast

gen ABC

- Poravnava sekvenc (blastn, blastp)

nepopolno sestavljen gen - nizek % ujemanja velikosti

- Mapiranje odčitkov na genske sekvence (BWA, KMA)



Metode določanja virulentnih dejavnikov

Poravnava z blast

gen ABC

- Poravnava sekvenc (blastn, blastp)

nepopolno sestavljen gen - nizek % ujemanja velikosti

- Mapiranje odčitkov na genske sekvence (BWA, KMA)
- Anotiranje genomov (prokka, bakta)



določanje odprtih bralnih okvirjev (ORF), primerjava ortolognih skupin



Podatkovne zbirke virulentnih dejavnikov

- Virulence Factor Database (VFDB)
- VirulenceFinder

Service [Instructions](#) [Output](#) [Article abstract](#) [Citations](#) [Version history](#)

Software version: 2.0.5 (2024-01-31)
Database version: (2022-12-02)

Select species

Listeria	▲
S. aureus	
Escherichia coli	
Enterococcus	▼

Vir: <https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>

- Kaj če naše vrste ni v zbirkah?

Znižanje meje identitete in pokritosti gena, priprava lastnih sekvenčnih zbirk

[Acinetobacter](#)
[Aeromonas](#)
[Anaplasma](#)
[Bacillus](#)
[Bartonella](#)
[Bordetella](#)
[Brucella](#)
[Burkholderia](#)
[Campylobacter](#)
[Chlamydia](#)
[Clostridium](#)
[Corynebacterium](#)
[Coxiella](#)
[Enterococcus](#)
[Escherichia](#)
[Francisella](#)
[Haemophilus](#)
[Helicobacter](#)
[Klebsiella](#)
[Legionella](#)
[Listeria](#)
[Mycobacterium](#)
[Mycoplasma](#)
[Neisseria](#)
[Pseudomonas](#)
[Rickettsia](#)
[Salmonella](#)
[Shigella](#)
[Staphylococcus](#)
[Streptococcus](#)
[Vibrio](#)
[Yersinia](#)

Vir: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>



Priprava podatkovnih zbirk

- Pregled literature -> pridobitev sekvenc

indeksiranje sekvenc

- blast – (makeblastdb)
- mapiranje (npr. KMA db)

Vir: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66621598>

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Gene

Full Report ▾

clpS ATP-dependent Clp protease adapter ClpS [*Cutibacterium acnes* HL096PA1]

Gene ID: 66621598, updated on 6-Jun-2024

```
>htaA
ATGACCACATCGGCCATGCGCAAAATCGTCGCCAGTGTGCTCGGGGCCATCTTGGCCCTTACCGGAGTGT
TGATCACTCCGGCGGCATGGGCAGCTGGTCCGACGGTAACCGTGATACCAGTAGGTCGGGAGGGAGGTGA
TATCACCATCAGTGGGAAGGGATTCTCGACTACCGGCTTCGGTGTCTACGTTGCTGTGGCACC GGCCCTCG
GTGCCCAGTTCTATGGCAATTCGGAAGTTCTACGGCTATGACCCGAGCAAGGACACGACGGAGTCCC
CTCACCACGAAGGCTCATGGAGTTGGTAAGACAGATCACTCTGACGATACCCGTACTCCGGTGACCTATC
TCCATTGCAATGGCTCGTGAAGCTTTCGGCGGGCCAACTGGAACGGTTCGGCCCTTCACTTTCCCT
CTCACCAGCGGCTCATTGATCCTGCTACCAAAT
>CAMP1
ATGAAGGTTAAGTTCTTAGCAGCGCCGCTGATTGTTGGTGCCTTGATGGCGCCGGCAGCTTTCTCTGGAG
CGACAGCTCATGCTGCCCCGGTTGCCCCATAGTTGCGGTGAGCGCCACTCAGCCCAATAAGACCCCTTTC
ATCAGCTGAAGGACGAAATGGCGGCTGTGAAGAAGGCTCTTGCGGAGGCTCAGAAGATGCCTGACCTCAA
ACCCAACGATGTGGCCACCTTACACCAAGACCAAGCTGTCCCGTGTGCTTCGCCAGATTGTTTTCG
>CAMP2
ATGAAGAAGACCCATCTTGTAGCTCCCTCCTTGTGCGGCAATGCTCGTACCAGCGGCGCTGTCAGCTC
CCAGTGCTCATGCTGTGAGCCGACGACGACCATCTCGGCGACGACCCACGAGCTCTCGGCCAGTGA
CGCTCGCAATAGCATCCAGCTTCTGAACGCACATATTGCGACCTTCAGTCAGTACAGAAATCCGTCCCC
GGTTCTGACTACTCTGACCAGATCCGAGATCTTCAAGGCTGCCTTCGACCTGCGTGGCCTCATCGAGA
CCCTTGCCCATGGGGGATCCGTTCTACGACCTTCGACGATCATGCCGAGGATCAAGTTGGTGCACC
CACTATTGACACCATTACACTGCTACCACCACTCTCCAAAACAAGGTCGCCCCGCCACGTCGAACCT
ATTCAACTCCCCGATGTCAAGAAGGCTGCCTGA
```




Cutibacterium spp. (*C. acnes*) → G + bacil

Otežuje diagnostiko okužb
vsadkov; predvsem je
oteženo razlikovanje med
okužbo in kontaminacijo

1. Kot oportunistični patogen in kontaminant/predstavnik kožne mikrobiote
2. Zaradi počasne rasti (podaljšana inkubacija do 14 dni)
3. Tvorba biofilma → otežena kultivacija

V zadnji letih je vedno več diagnosticiranih primerov okužb tudi z drugimi predstavniki iz rodu *Cutibacterium* → ***C. avidum***, ***C. granulorum***, ***C. namnetense***, ***C. humerusii***



DOMNEVNI VIRULENTNI DEJAVNIKI *C. acnes*

- Vplivajo na produkcijo biofilma,
- zavirajo imunski odziv gostitelja,
- omogočajo boljšo prilagoditev bakterije na okolje,
- spodbujajo celično adhezijo,
- delujejo kot mediatorji vnetja,
- kodirajo CAMP faktorje, adhezine, proteine
toplotnega šoka, lipaze, itd.



Sekvenciranje celotnega genoma pri izbranih bakterijskih izolatih iz rodu *Cutibacterium* spp. in analiza virulentnih dejavnikov

64 izolatov *Cutibacterium* spp. prehodno izoliranih pri bolnikih s sumom na okužbo različnih vsadkov med leti 2012 in 2022:

- *C. acnes* (53), *C. avidum* (6), *C. granulorum* (4), *C. namnetense* (1).

Bakterijski izolati:

- 51/64 vzorcev iz sonikacijske tekočine
- 13/64 tkivnih homogenizatov

Izolate smo opredelili kot:

1. **povezani z okužbo** (≥ 2 pozitivni kužnini z istim patogenom (kultivacija) ali ≥ 50 CFU/ml v sonikacijski tekočini),
2. **manj verjetno oz. nepovezani z okužbo.**



[Microorganisms](#). 2023 Dec; 11(12): 2971.

Published online 2023 Dec 12. doi: [10.3390/microorganisms11122971](https://doi.org/10.3390/microorganisms11122971)

PMCID: PMC10745319

PMID: [38138116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38138116/)

Comparative Genomic Analysis of *Cutibacterium* spp. Isolates in Implant-Associated Infections

[Anja Erbežnik](#), Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, [Andraž Celar Šturm](#), Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, [Katja Strašek Smrdel](#), Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, [Tina Triglav](#), Conceptualization, Software, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, and [Polona Maver Vodičar](#), Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration*

María Guembe, Academic Editor



Sekvenciranje celotnega genoma

- **Illumina NextSeq 550** → sekvenciranje kratkih odčitkov obeh koncev (2×150 bp) z minimalno pokritostjo 150×.
- **Anotacija bakterijskih genomov** → Prokka v1.14.6; referenčni genom HLO96PA1 (*C. acnes*)

Določanje potencialnih virulentnih dejavnikov:

1. Izbranih 40 predhodno opisanih pri *Cutibacterium acnes* → ABRicate v.1.0.1. ter zDB.
2. Dodatni vrstno specifični (*C. granulosum*, *C. avidum*, *C. namnetense*) homologi → *in silico* (blastn_ffa, tblastn in blastp znotraj orodja zDB).
3. Homologe smo opredelili kot:
 - homologe z zelo visoko identiteto (> 95 %),
 - homologe z visoko identiteto (>80 % in <95 %),
 - homologe z nizko identiteto (>60 % in <80 %) in
 - homologe z zelo nizko identiteto (<60 %).



Prisotnost vseh izbranih VD smo potrdili med preiskovanimi genomi.

C. acnes* in *C. namnetense → največje število VD in najbolj podobna razporeditev.

C. granulosum najmanjše število identificiranih VD in **najbolj raznolika porazdelitev v primerjavi z drugimi vrstami *Cutibacterium* spp.**

Z analizo nismo dokazali specifične prisotnosti VD v povezavi z:

1. določenimi anatomskimi mesti ali
2. klinično manifestacijo (izolat povezan z okužbo ali izolat manj verjetno oz. nepovezan z okužbo).

Razlike opazne v prisotnosti VD na ravni:

1. vrste,
2. podvrste in
3. filotipa *Cutibacterium* spp.

POTENCIALNI VD ZA RAST IN ZORENJE BIOFILMA

<i>IA₁</i>	<i>IA₂</i>	<i>IB</i>	<i>IC</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>C. namnetense</i>	<i>C. avidum</i>	<i>C. granulorum</i>
<i>dsA1/dsA2 – dermatan sulfat – vnetje in poškodba tkiva, spodbuda kolonizacije</i>								
<i>rscB – sinteza enkratcelularnih polisaharidov – biofilm</i>								
<i>luxS - kvorum zaznavanje – adhezija na površino</i>								
<i>flp pili – adhezija, kolonizacija, spodbujanje vnetja, poškodbe tkiva</i>								
<i>YaaT – spodbujanje kolonizacije in vnetja, preživetje</i>								<i>NIŽJA IDENTITETA</i>
<i>Putativni adhezivni proteini – adhezija, kolonizacija, formacija biofilma</i>								
<i>acsA -acetil-CoA sintetaza – pridobivanje energije, preživetje</i>								
<i>YhjD/YihY/BrkB – formacija biofilma</i>								
<i>ytpA – rast, preživetje, formacija biofilma</i>								
<i>srtF – sortaza F – pritrjevanje površinskih beljakovin – adhezinov. Tvorba biofilma</i>							<i>srtF</i>	
<i>nanA/B – sialidaze – kolonizacija, rast biofilma, mediator vnetja</i>							<i>1 izolat</i>	
<i>Glikozidaza – spodbujanje vnetja, poškodbe tkiva, kolonizacija</i>								<i>2 izolata</i>



IA ₁	IA ₂	IB	IC	II	III	C. namnetense	C. avidum	C. granulosum
<i>Dppb</i> (pridobivanje in uporaba peptidov za rast in preživetlje)								<i>dppB_2</i>
<i>deoR</i> (regulacija presnove sladkorjev/pomembni za prilagoditev in preživetje bakterij na koži)								
<i>clpS</i> (preživetje bakterije)		<i>clpS</i>			<i>clpS</i>			
<i>PUFA</i> izomeraza (presnova in uporaba maščobnih kislin)								
<i>Lipohidrolaza</i> (<i>menH</i>) (hidroliza lipidov, patogeneza aken)								
<i>Endo-β-N-acetilglukosaminidaza</i> (razgradnja glikolipidov in glikoproteinov – spodbujanje vnetja)								
<i>Endoglikokeramidaze</i> (spodbujanje vnetja)								
		<i>gntK</i> Glukozaminil-N-acetil transferaza – sinteza celične stene bakterije + preživetje v žlezah na koži						
<i>RoxP</i> – odziv na stres, omogoča preživetje								
<i>htaA</i> – vezava hemoglobina – spodbujanje vnetja, omogoča preživetje								
CAMP 1-5					CAMP 1,3,4,5		CAMP 3,5	CAMP 3-5
<i>HYL-IA /IB/II</i>				<i>HYL-IB/II</i>	<i>HYL-IA</i>		<i>HYL-IA</i>	
HSP								
<i>gehA</i> – lipaze – patogeneza nastanka aken								
<i>gehB</i> - patogeneza nastanka aken								Nizka identiteta





clpS

- Proteinski adaptor Clp proteaza → vpliv na znotrajcelično razgradnjo proteinov (odziv na stres, formacija biofilma).
- **V literaturi poročajo o prisotnosti v filotipu IA → kar se ujema z našimi rezultati.**
- Dodatno smo potrdili prisotnost gena *clpS* še v filotipu III ter *C. avidum*.
- Gensko zaporedje z visokim ujemanjem *clpS*-ja smo potrdili tudi v drugih izolatih *C. acnes*. Pri tem smo opazili značilno insercijo nukleotida T na poziciji 129.
- Predvidevamo, da bi lahko le-ta povzročila zamik bralnega okvirja in posledično odsotnost proteinskega produkta.



HVALA ZA POZORNOST



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo