

STREPTOMYCETY ASOCIOVANÉ S ČLOVĚKEM

– UNIKÁTNÍ EKOLOGICKÁ NIKA, UNIKÁTNÍ BIOSYNTETICKÝ POTENCIÁL



Antibiotická rezistence v ČR: jak společně zastavit nezastavitelné
Praha, 14.-15. listopadu 2024

Kateřina Petříčková

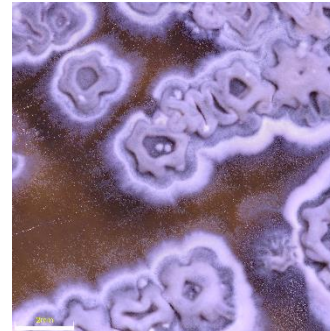
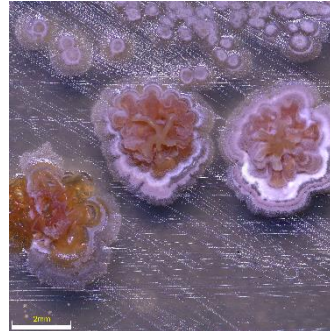


1. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

Ústav imunologie a mikrobiologie

STREPTOMYCETY A PŘÍBUZNÉ AKTINOBAKTERIE

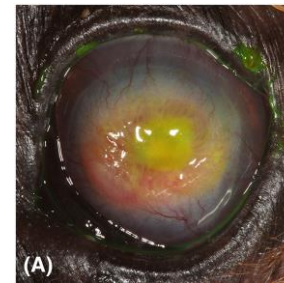
- vláknité, diferencující, Gram-pozitivní
- primárně půdní a vodní biotopy
- složitý životní cyklus
- velký, plastický genom
- rozvinutý **sekundární metabolismus**
- vysoká **ekologická adaptabilita**
- **asociace s vyššími organismy**
- **hygienická teorie** – jedny z mikrobů trénujících imunitní systém hostitele



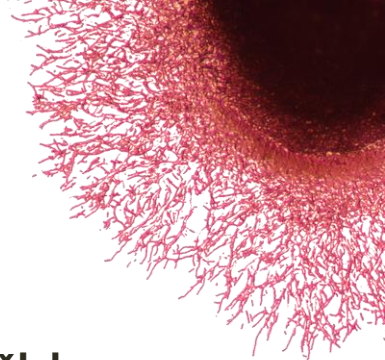
A. Chroňáková BC AVČR

STREPTOMYCETY JAKO PATOGENY

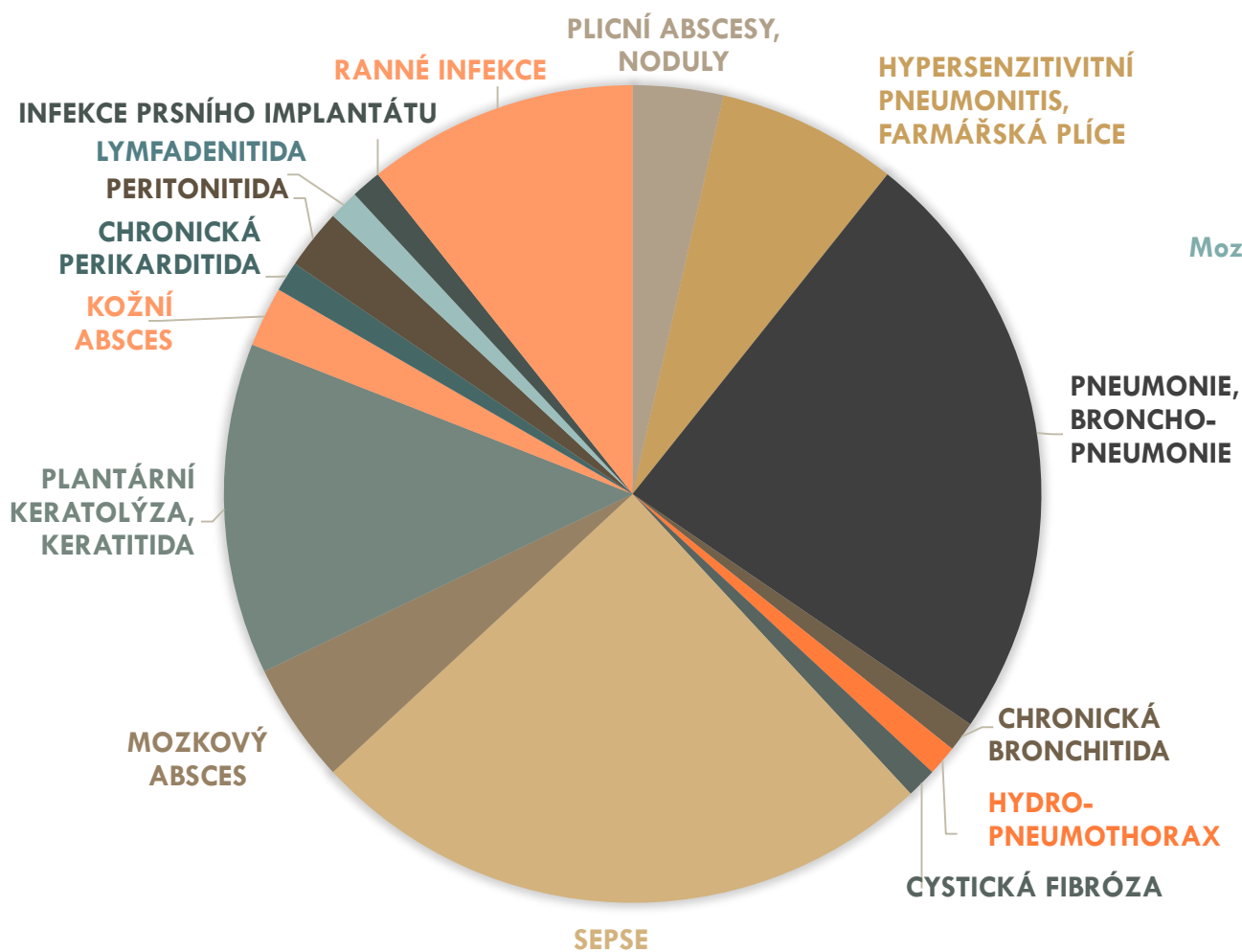
rostliny	strupovitost (<i>S. scabies</i> a další)
zvířata	pyogranulomatózní dermatitida celulitida (psi, kočky) keratitida (psi) aktinomycetomy (endemické)
člověk	aktinomycetomy (<i>S. somaliensis</i> , <i>S. sudanensis</i>) další oportunní infekce



Nicholls et al., Aust. Vet. J. 92(1-2), 38-40 (2014)
Ledbetter et al., Vet. Ophthalmol. 26(3), 211-218 (2023)

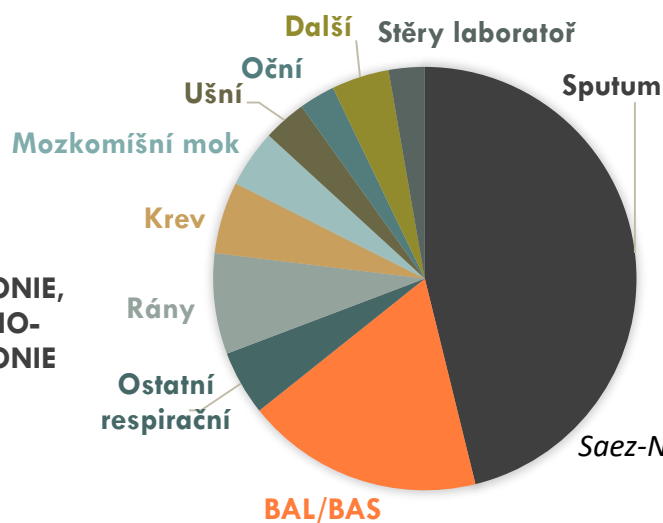


OPORTUNNÍ STREPTOMYCETOVÉ INFEKCE U LIDÍ



PŘÍPADOVÉ STUDIE DO R. 2021 VE SVĚTĚ DLE LITERATURY

Retrospektivní studie, 1996-2019, Španělsko Neobvyklé aerobní aktinobakterie:



286 izolátů
19 rodů, 88 druhů

Streptomyces (182, 45 druhů)
Actinomadura (29, 5 druhů)
Nocardiopsis (21, 6 druhů)

Saez-Nieto et al., 2021, *New Microbes and New Inf.*

Naše sbírka, cca od r. 2000, ČR

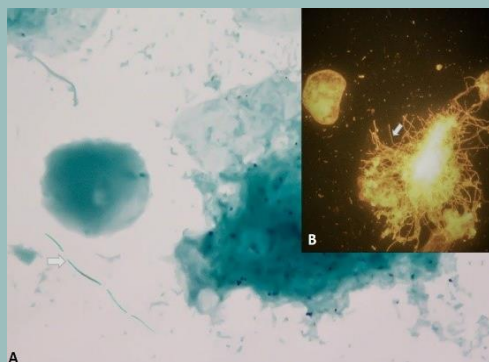
- NRL pro patogenní aktinobakterie (ON Příbram) – 30
- ZÚ Ostrava – 61
- ON Příbram – 8
- FN Plzeň – 2

hlavně respirační (+ hemokultura, spojivka, děloha)

Herbrík et al., 2020, *Front. Microbiol.*

KLINICKÉ KMENY V BCCO SBÍRCE

(BC AV ČR, ČESKÉ BUDĚJOVICE)

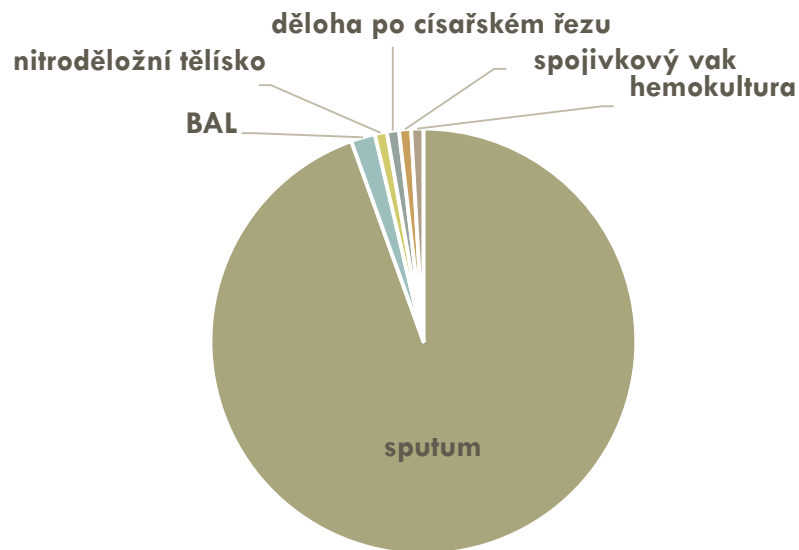


Kolonizace plic (sputum) –
streptomycety a další
bakterie, CHOPN pacient

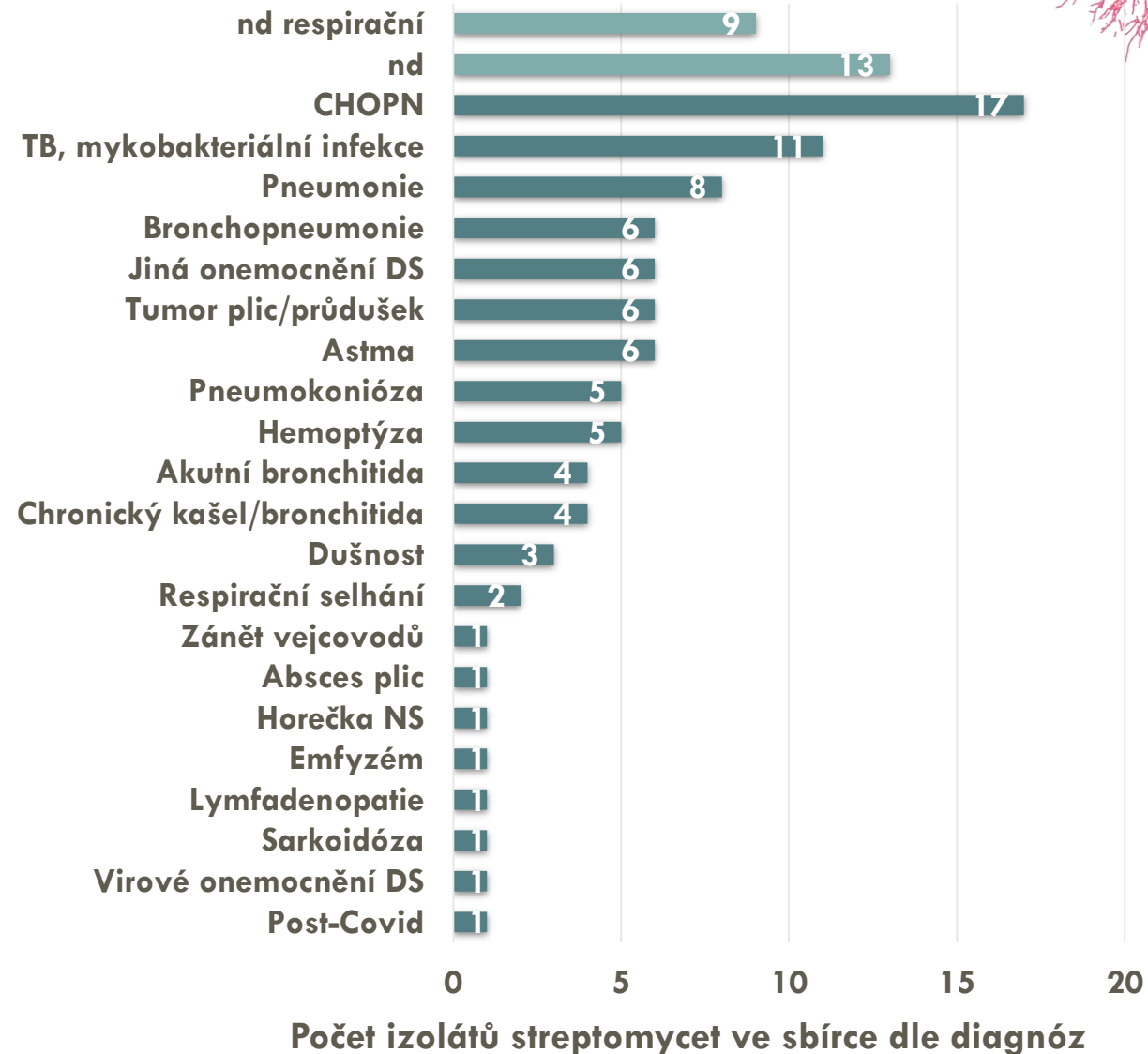
A: Malachitová zeleň

B: FM (zvětšení 1000 x)

Zdroj: V. Ulmann, ZÚOVA

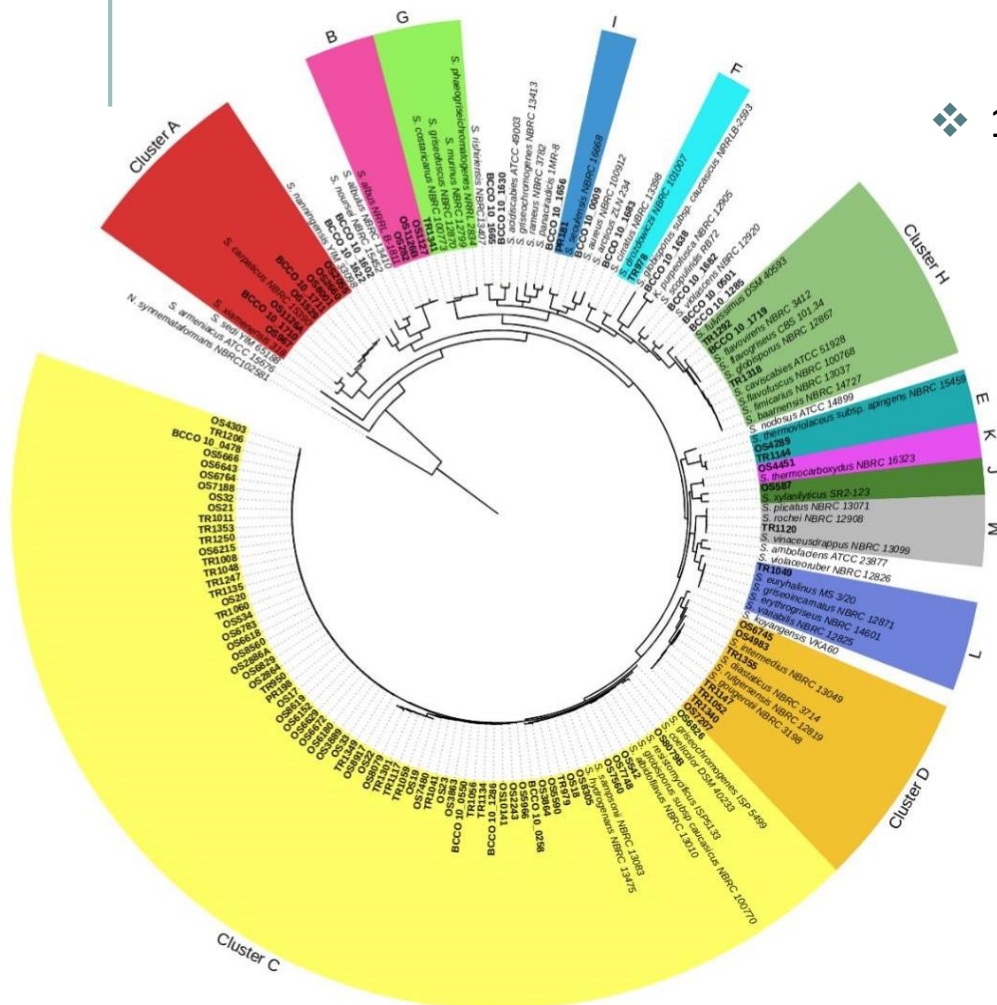


Původ izolátů dle klinického vzorku



Počet izolátů streptomycet ve sbírce dle diagnóz

KLINICKÉ KMENY V BCCO SBÍRCE



❖ 16S rRNA fylogeneze:
17 odlišných fylotypů
(MALDI *Streptomyces*: >2.1)

Antibiotika vhodná k terapii

- ❖ AMI
- ❖ GEN
- ❖ LIN
- ❖ VAN

Přirozená rezistence k PEN

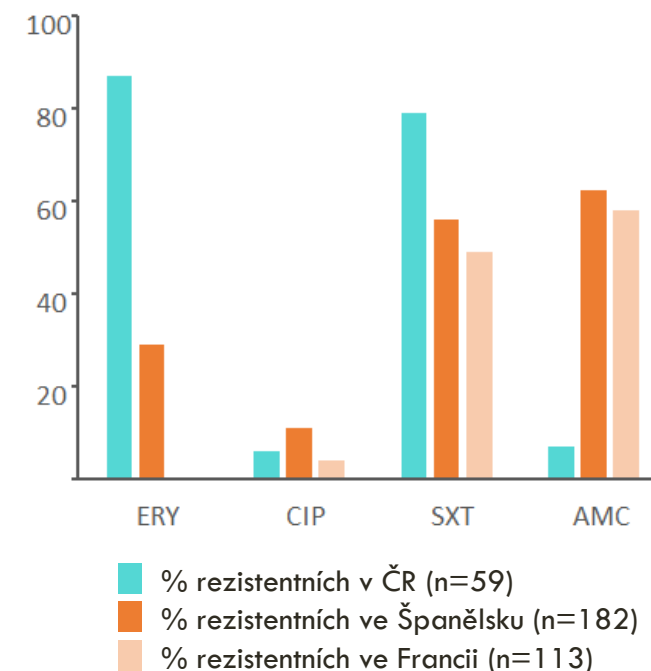
Další ATB - variabilita

- ❖ mezidruhová
- ❖ vnitrodruhová
- ❖ geografická

OPEN

Evaluation and comparison of antibiotic susceptibility profiles of *Streptomyces* spp. from clinical specimens revealed common and region-dependent resistance patterns

Lucie Kotrbová¹, Ana Catalina Lara¹, Erika Corretto¹, Josef Scharfen², Vit Ulmann³, Kateřina Petříčková⁴ & Alicja Chroňáková^{1,2}



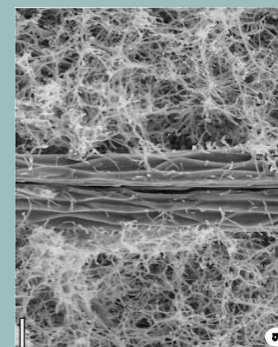
- 1 dominantní fylotyp - *S. albidoflavus*
- 4 fylotypy s několika kmeny (*carpaticus*, *albus*, *diastaticus*, *flavogriseus*)
- 8 unikátních (1 kmen)

Kotrbová et al., 2022, *ScientificReports*
Gras et al., 2022, *Open Forum Infectious Diseases*
Saez-Nieto et al., 2021, *New Microbes and New Inf.*

ADAPTACE STREPTOMYCET NA SOUŽITÍ S HOSTITELEM

OBECNÉ ADAPTACE U STREPTOMYCET ASOCIOVANÝCH S HOSTITELEM

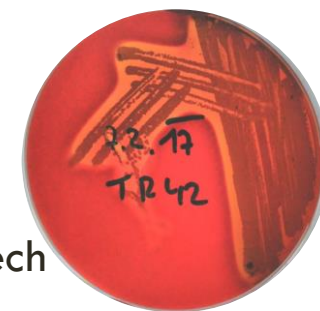
- ❖ symbionty – **protektivní mutualismus** - **vyšší antimikrobní aktivity než půdní izoláty**
 - ❖ **ochrana před patogeny**, vyšší výskyt aktivit proti houbám, Gram+ i Gram- bakteriím
 - ❖ spektrum aktivit koreluje s typem hostitele (koevoluce)
 - ❖ všechny izoláty – antimykotika
 - ❖ cvrčci, kobylky, termiti, švábi, blanokřídlí – anti-Gram-
 - ❖ mořské ryby – anti-Gram-
 - ❖ švábi, motýli – antimykotika
 - ❖ rostliny a volně žijící – anti-Gram+
 - ❖ **ochrana před predátory** – cytotoxiny u symbiontů mořských hub, sasanek



Currie et al., 1999, Nature

RŮSTOVÉ ADAPTACE NA KOLONIZACI LIDSKÉHO TĚLA

- ❖ **rychlý růst a sporulace** – do 24 hod → do 72 hod (vs. půdní 2-4 dny → 5-8 dní)
- ❖ **vyšší teplotní optimum** – 37 °C (vs. 28-30 °C u půdních)
- ❖ dobrý **růst na krevním agaru**, omezení schopnosti růst na typických rostlinných agarech
- ❖ častější **β-hemolýza** (75 % versus <50 % kmenů u půdních izolátů)
- ❖ velmi široké strukturní spektrum **sideroforů** včetně vysokoafinitních
- ❖ častá **produkce polysacharidů** (pouzdra ?), která komplikuje extrakci sekundárních metabolitů polárními rozpouštědly (vyšší adhezivita ?)



JAKÉ
ADAPTACE
MAJÍ LIDSKÉ
KMENY ???

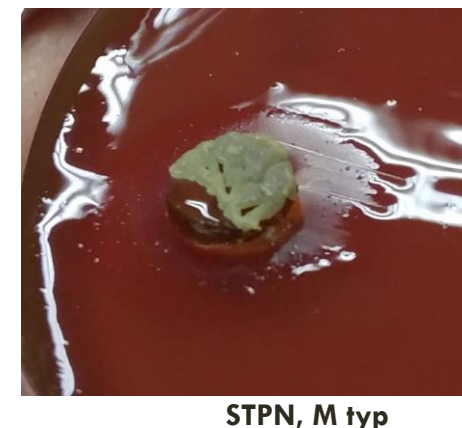
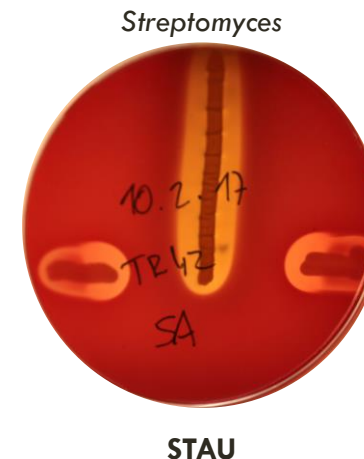
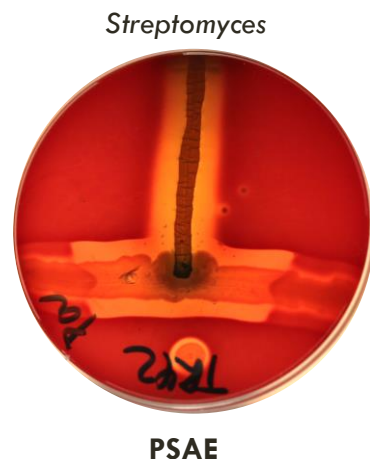
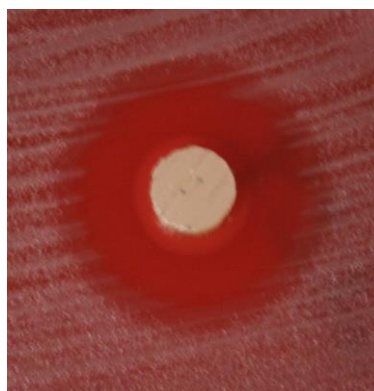
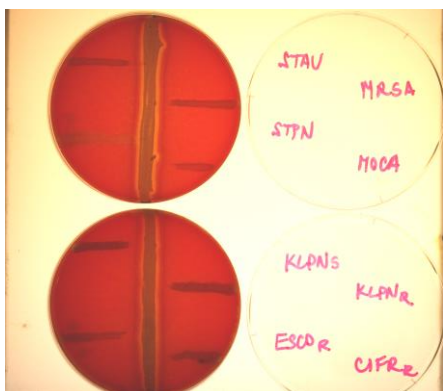
KLINICKÉ STREPTOMYCETY

POZOROVANÉ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY

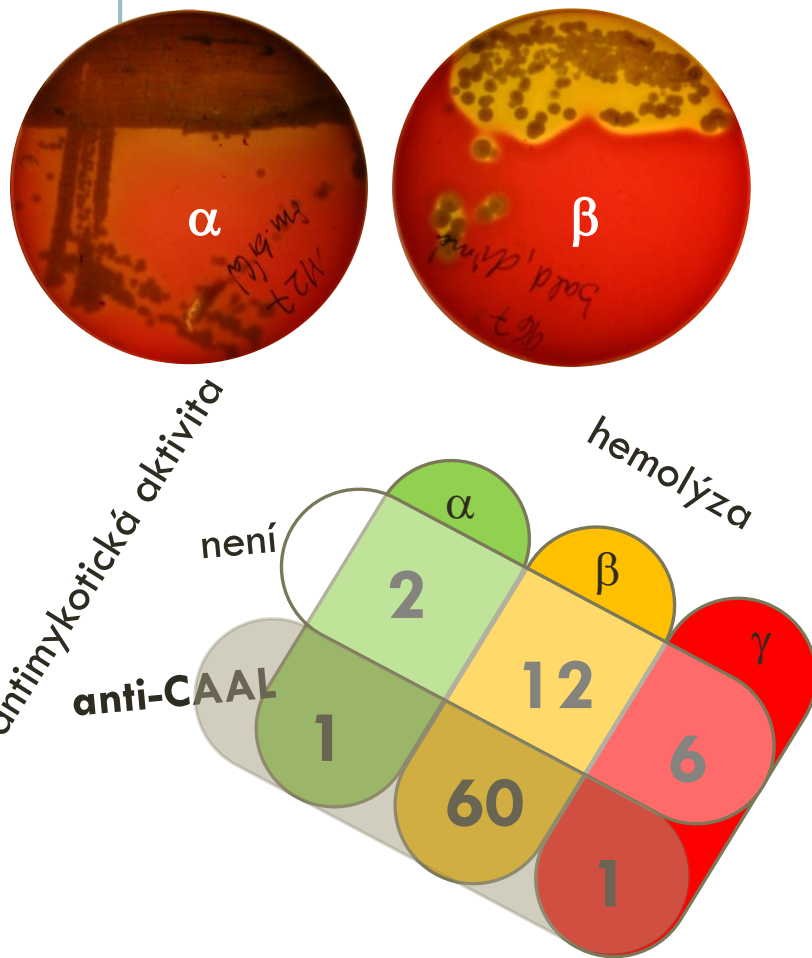
- ❖ testováno 83 kmenů - T-test, nebo bločky s vysporulovaným kmenem
 - ❖ **77 % kmenů - inhibice *Candida albicans*** v T-testu, z nich 4 kmeny vysoce aktivní i proti vláknitým mikromycetám
 - ❖ 17 % kmenů – inhibice *Staphylococcus aureus* (většina z nich též *Streptococcus pneumoniae*)
 - ❖ 25 % kmenů – inhibice *Moraxella catarrhalis*, ale ne dalších Gram- (*ESCO*, *KLPN*, *PSAE*)
 - ❖ 5 % kmenů – inhibice mykobakterií na modelu *M. tuberculosis* a *M. fortuitum* (Middlebrook, BactAlert)
 - ❖ aktivita proti širokému spektru patogenů často díky produkci toxických látek (aktinomycin, antimycin)

DALŠÍ INTERAKCE

- ❖ synergie hemolyzinů (s *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*)
- ❖ vzájemný vliv na produkci sekundárních metabolitů, diferenciaci, pohyblivost (*P. aeruginosa*)
- ❖ inhibice pouzdra (*Streptococcus pneumoniae*)



VYSOKÁ FREKVENCE β -HEMOLÝZY \rightarrow ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA

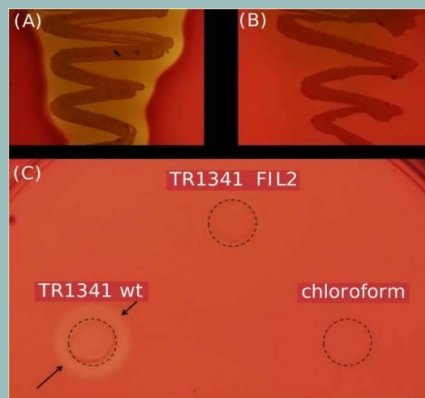


Spolupráce s Ústavem přístrojové techniky AV ČR – vývoj metodiky detekce polyenů pomocí Ramanovy spektroskopie

S. sp. TR1341

β -hemolýza způsobena produkcí polyenů (filipin, fungichromin) proteinové hemolyziny nehrají roli:

A. Divoký kmen, B. Δ FIL kmen, C. Aktivita extraktu (FIL2 = Δ FIL)



Z 10 náhodně vybraný β kmenů:

- 7 produkuje **kandicidin A, D**
- 1 produkuje **filipin/fungichromin**
- 2 nebyly identifikovány polyeny při kultivaci na standardních médiích

DLE GENOMŮ NEJEN POLYENY !

Z 62 kmenů s aktivitou proti CAAL vybráno **50** dle taxonomie

❖ aktivita proti klinickým izolátům vláknitých mikromycet (VFN)?

➤ *Aspergillus fumigatus* PL 1390
sputum, vorikonazolová profylaxe
vor^R ivu^R posa^S amf^S

➤ *Mucor sp.* PL 1566
výtěř z krku
ivu^R posa^R amf^S

Kmen	Průměr inhibiční zóny	
	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>
TR37	12 mm	18 mm
TR39	19 mm	0
TR42	10 mm	10 mm
OS10141	12 mm	0

TR1301



děloha po císařském řezu
taxonomická skupina *S. albidoflavus*

TR1341



plíce, chronická bronchitida, po TB
taxonomická skupina *S. murinus*

VLIV NA BUŇKY THP-1 LINIE LIDSKÝCH MONOCYTŮ

EXTRAKT SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ:

- ❖ inhibice fagocytózy na 30%
- ❖ silná **INHIBICE** zánětlivé **odpovědi** - produkce IL-1 β po stimulaci LPS snížena na 0 - 40 %

INTERAKCE BUNĚK TR1301 S THP-1:

- ❖ malý vliv na životnost a aktivaci THP-1 („neviditelnost“ pro imunitní systém)
- ❖ protizánětlivý charakter metabolitů TR38 posílen

EXTRAKT SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ:

- ❖ inhibice fagocytózy nd
- ❖ silná **AKTIVACE** zánětlivé **odpovědi** (produkce IL-1 β) – cca 3x nárůst

INTERAKCE BUNĚK TR1341 S THP-1:

- ❖ silný **cytotoxický** efekt na životnost buněk
- ❖ **prozánětlivý** efekt metabolitů TR42 posílen

ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY EXPERIMENTÁLNĚ POTVRZENÉ A PREDIKOVANÉ Z GENOMŮ

- ❖ silná inhibice kandid, ne vláknitých hub a bakterií
- ❖ látky potenciálně kódované v genomu (**BGC**):

- **candicidin** – antimykotický hemolytický polyen
- **lineární polyen** – neomediomycin, linearmycin
- **surugamid** – inh. katepsinu B, kancerostat., antimykot.
- podobnost k **nigericinu** – ionofor, blok Golgi aparátu
- **oligomycin** – makrolid, inhibitor V-ATPázy, toxický
- polycyklické tetramátové makrolaktamy – antimykot.
- četné **siderofory**

- ❖ silná inhibice napříč spektrem mikroorganismů
- ❖ látky potenciálně kódované v genomu (**BGC**):

- **filipin (pentamycin)** - antimykotický hemolyt. polyen
- **aktinomycin X2** – cytotoxický napříč spektrem
- **rhizoamid A-C** – antimykotický (lyze hyf)
- **leupeptin** neribozomální peptid – inhibitor proteáz
- **kolossin** NRP – asi mezidruhová komunikace
- četné **siderofory**

TR1301



děloha po císařském řezu
taxonomická skupina *S. albidoflavus*

TR1341

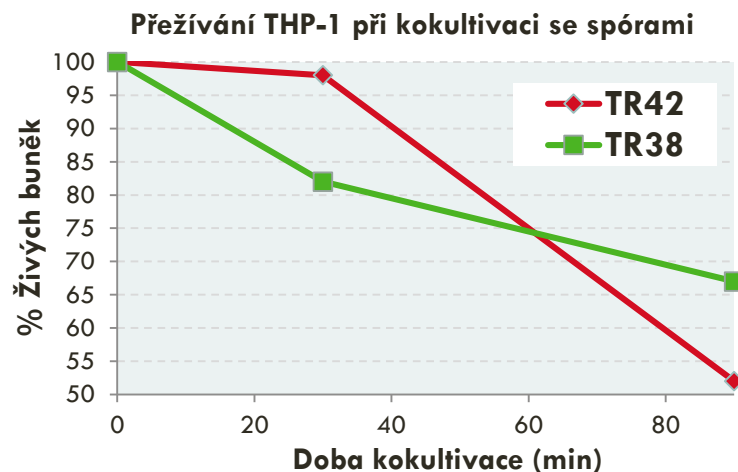


plíce, chronická bronchitida, po TB
taxonomická skupina *S. murinus*

GENOMOVÉ ANALÝZY – HOMOLOGY VIRULENČNÍCH GENŮ (VFDB databáze, <https://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)

- ❖ geny anaerobní nitrátové respirace: **ano**
- ❖ geny pro hemolyziny: **β-hemolyzin**
- ❖ geny glyoxalátového cyklu: **ne**
- ❖ **Mce operon**: **ano**, typu Mce8

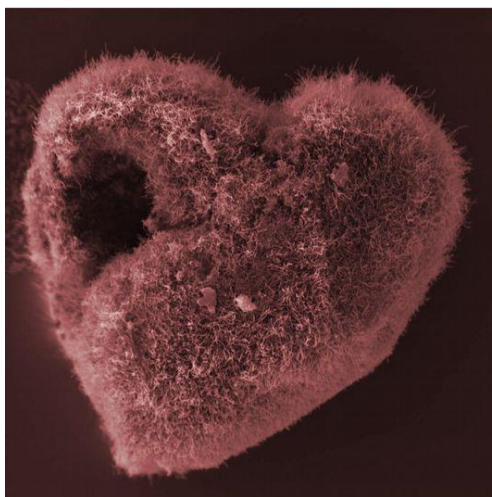
Mce operon nutný pro intracelulární přežívání u patinogenních aktinobakterií; Mce8 u rychle rostoucích mykobakterií, nokardií, rhodokoků, gordonii)



- ❖ geny anaerobní nitrátové respirace: **ne**
- ❖ geny pro hemolyziny: několik pro **fosfolipázu C**, včetně hemolytického typu
- ❖ geny glyoxalátového cyklu: **ano** (u mykobakterií nutné pro intracelulární přežívání, usnadňuje metabolismus MK)
- ❖ **Mce operon**: **ne** (u streptomycet neobvyklý status, bylo prokázáno, že jeho ztráta vede ke schopnosti zabíjet améby po pohlcení do fagozomu)

- ❖ geny pro **ureázy** - odolnost vůči nízkému pH, močovina jako zdroj dusíku
- ❖ gen pro **enolázu** - adheze streptokoků – váže plazminogen, zahajuje vazbu na eukaryotické buňky
- ❖ geny pro **adheziny** – homologie s geny z *Listeria*, *GAS*, *Clostridioides difficile*
- ❖ geny pro **příjem Cu, Fe** - detoxikace + příjem mikronutrientů
- ❖ geny podobné genům pro **biosyntézu LPS** – povrchové molekuly?
- ❖ geny **blokuující maturaci fagozómu** (*Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*)
- ❖ **mykobakteriální proteazómový operon**
- ❖ geny **oxidativního stresu** – pro katalázu, superoxiddismutázu, alkylhydroperoxid reduktázu

ZÁVĚREČNÉ POSTŘEHY



A PLÁNY

BAKTERIE ASOCIOVANÉ S HOSTITELI

- ❖ atraktivním zdrojem bioaktivních látek včetně těch antimikrobních
- ❖ odlišnost kódovaných **sekundárními metabolity** od volně žijících příbuzných (koevoluce)
- ❖ **antimikrobní aktivity často reflektují přirozené konkurenty** (symbionty/patogeny) v dané ekologické nise
- ❖ časté jsou též **aktivity přímo ovlivňující buňky hostitele** – imunomodulační, cytotoxické
- ❖ vhodné jsou **alternativní kultivační postupy**, v tradičních kulturách nemusí k produkci docházet (kokultivace s konkurentem nebo hostitelskými buňkami)

- ❖ u stávajících potenciálních producentů z klinických vzorků chceme ověřit charakter:
 - produkovaných **antifungálních aktivit** – nové polyeny? jiné struktury?
 - antibiotických aktivit cílících na **Gram-negativy**
 - látek s **anti-mykobakteriální** aktivitou
 - a sledovat **quorum-quenching** aktivity



- ❖ **další modely asociovaných streptomycet**
 - kmeny ze střeva malých vodních/půdních korýšů ze skupiny **stejnonožek (Isopoda)**
 - kódují nezvyklé množství látek s **aktivitou proti Gram-negativním bakteriím**
 - přirozenými symbionty/patogeny stejnonožek - **riketsie a mykoplazmata** – produkují „jejich“ streptomycety antibiotika cílící na tuto skupinu bakterií?

PODĚKOVÁNÍ SPOLUPRACOVNÍKŮM



1. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

Ústav imunologie a mikrobiologie

Kateřina Petříčková
Jan Bobek

Miroslav Petříček

Jiří Hrdý

Matouš Čihák

Dominika Gorniaková

Lenka Súkeníková

Andrej Herbrík

Natalie Bergmann

Eliška Filipová

Lucia Šateková

Zuzana Žlábková

Lucia Šateková



BIOLOGICKÉ
CENTRUM
AV ČR, v. v. i.

Ústav půdní biologie

Alica Chroňáková

Václav Křišťůfek

Erika Corretto

Ana Catalina Lara

Lucie Kotrbová



Pracoviště laboratorních metod

Ilja Stříž

Eva Čečrdlová



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
Přírodovědecká
fakulta

Přírodovědecká fakulta

Helena Langhansová

David Kahoun

Petr Pospíchal



Nemocnice
Trutnov

NRL pro patog. aktinomycety

Josef Scharfen



OBLASTNÍ NEMOCNICE
PŘÍBRAM, a. s.

Petr Ježek



Oddělení bakteriologie a mykologie

Vít Ulmann



Ústav mikrobiologie

Jana Amlerová



VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ
NEMOCNICE V PRAZE

Klinická mikrobiologie a ATB centrum ÚBLD

Kateřina Svobodová