

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

Editor Committee: STREP group of SADEBAC (Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas), Asociación Argentina de Microbiología.

Comité Editor: Grupo STREP de SADEBAC (Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas), Asociación Argentina de Microbiología.

Bonofiglio, Laura

Mollerach, Marta

Gagetti, Paula

Toresani, Inés

García Gabarrot, Gabriela

Vigliarolo, Laura

Kaufman, Sara

Von Specht, Martha

Lopardo, Horacio

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

Mucosal infections and invasive potential of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* are enhanced by oligopeptide binding proteins AliC and AliD

Bradshaw JL^a, Pipkins HR^a, Keller LE^a, Pendarvis JK^b, McDaniel LS^a

^a Department of Microbiology and Immunology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi, USA

^b School of Animal and Comparative Sciences, Bio5 Institute, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA

Int J Infect Dis 2017; 65:128-32

Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* (NESp) colonizes the nasopharynx and is associated with noninvasive diseases such as otitis media (OM), conjunctivitis, and nonbacteremic pneumonia. Selective pressure against the polysaccharide capsule provided by current vaccines has likely driven the increase in NESp colonization and disease establishment. It has been observed that oligopeptide-binding proteins expressing NESp, AliC and AliD, are isolated during invasive pneumococcal disease (IPD). Authors hypothesize that AliC and AliD are major NESp virulence determinants that facilitate persistence and development of IPD.

The study evaluates the impact of AliC and AliD on NESp virulence by examining *in vitro* virulence-associated phenotypes and investigating these oligopeptide binding proteins during *in vivo* models of pathogenesis.

The results revealed that NESp expressing AliC and AliD intensified virulence compared to isogenic mutants. Both oligonucleotides enhanced murine nasopharyngeal colonization and pulmonary infection and were required for OM in a chinchilla model. Moreover, AliC and AliD increased pneumococcal survival in chinchilla whole blood and aid in resistance to killing by human leukocytes. Comparative proteome analysis revealed significant alterations in protein levels when AliC and AliD were absent. Virulence-associated proteins, including a pneumococcal surface protein C variant (CbpAC), were significantly downregulated, while starvation response indicators were upregulated in the double mutant relative to wild-type levels.

Authors also found that differentially expressed CbpAC was essential for NESp adherence to epithelial cells, virulence during OM, reduction of C3b deposition on the NESp surface, and binding to nonspecific IgA. Altogether, the rise in NESp prevalence urges the need to understand how NESp establishes disease and persists in a host. This study highlights the roles of AliC, AliD, and CbpAC in the pathogenesis of NESp. Furthermore, identifies virulence determinants and host survival mechanisms employed by NESp with a high pathogenic potential and virulence determinants shared by NESp and encapsulated strains that may serve as broad prevention and therapeutic targets.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

Los oligopéptidos de unión a proteínas AliC y AliD favorecen las infecciones de mucosas y el potencial invasivo de *Streptococcus pneumoniae* no encapsulado.

Streptococcus pneumoniae no encapsulado (NESp) coloniza la nasofaringe y se asocia con enfermedades no invasivas como otitis media (OM), conjuntivitis y neumonía no bacteriana. La presión selectiva contra el polisacárido capsular proporcionada por las vacunas actuales probablemente ha favorecido a un aumento en la colonización e infección por NESp.

Se ha observado que las proteínas de unión a oligopéptidos que expresan NESp, AliC y AliD, se aíslan durante la enfermedad neumocócica invasiva (DPI). Los autores plantean la hipótesis de que AliC y AliD son los principales determinantes de la virulencia en NESp, que facilitan la persistencia y el desarrollo de la EPI. El estudio evalúa el impacto de AliC y AliD en la virulencia de NESp mediante el análisis de los fenotipos asociados a la virulencia *in vitro* e investigando estas proteínas de unión a oligopéptidos con modelos de patogénesis *in vivo*. Los resultados revelaron que NESp que expresaban AliC y AliD intensificaron la virulencia en comparación con los mutantes isogénicos. Ambos oligonucleótidos mejoraron la colonización nasofaríngea murina y la infección pulmonar y se requirieron para OM en un modelo de chinchilla. Además, AliC y AliD aumentaron la supervivencia neumocócica en la sangre total de chinchilla y la resistencia frente a leucocitos humanos. El análisis proteómico comparativo reveló alteraciones significativas en los niveles de proteínas cuando AliC y AliD estaban ausentes. Las proteínas asociadas a la virulencia, incluida una variante de la proteína C de la superficie neumocócica (CbpAC), descendieron significativamente, mientras que los indicadores de respuesta a la deprivación nutricional aumentaron en el doble mutante en relación con los niveles de tipo salvaje. Los autores también encontraron que la CbpAC era esencial para la adherencia de NESp a las células epiteliales, para la virulencia durante la OM, para la reducción de la deposición de C3b en la superficie de NESp y para la unión a la IgA no específica. En conjunto, dado el aumento en la prevalencia de NESp urge la necesidad de entender cómo se establece la enfermedad por NESp. Este estudio destaca los roles de AliC, AliD y CbpAC en la patogénesis de NESp. Además, identifica los determinantes de virulencia y mecanismos de supervivencia empleados por NESp con un potencial patogénico alto y los determinantes de virulencia compartidos por NESp y cepas encapsuladas que pueden servir para una prevención más amplia y como sitios blanco para los tratamientos.

Molecular cloning and docking of *speB* gene encoding cysteine protease with antibiotic interaction in *Streptococcus pyogenes* NBMKU12 from the clinical isolates

Balasubramanian N¹, Varatharaju G², Shanmugaiah V², Balakrishnan K¹, Thirunarayan MA³

¹ Department of Immunology, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai, India,

² Department of Microbial Technology, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai, India,

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

³ Department of Microbiology, Apollo Hospitals, Chennai, India

Front Microbiol 2018; 9: 1-13.

This study focuses on the antibiotic resistance of *S. pyogenes* and their interaction with cysteine protease. Only seven isolates of *S. pyogenes* and the strain NBMKU12, isolated from a urinary tract infection were included. In the NBMKU12 isolate, only the *tem* gene was detected among the 13 antibiotic genes for which it was tested. Out of the seven *S. pyogenes* isolates 71.4% were found to be resistant to ampicillin, 57.1% to ceftriaxone, and penicillin-G 42.8%. No resistance was observed for the antibiotics amoxicillin / clavulanic acid, azithromycin, and erythromycin.

The MIC analysis showed antibiotic susceptibilities to ampicillin (0.25 mcg/mL), chloramphenicol (4 µg/ml), ceftriaxone (1.5 µg/ml), clavulanic acid (2.5 µg/ml), and vancomycin (1 µg/ml). Furthermore, when analysis for presence of 13 virulence genes were carried out in NBMKU12 isolate, only *speJ* and *speB* were detected. The *speB* encoding a cysteine protease gene was cloned. This was followed by performing DNA sequencing to understand the putative cysteine protease interaction with antibiotics, inhibitors, and substrate. The *speB* gene consists of 1197 nucleotides and encodes a protein with multiple domains, including a signal peptide (aa 1–22), an inhibitor region (aa 27–156), and a catalytic cysteine domain (aa 160–367). The tested culture supernatants of NBMKU12 isolate exhibited the proteolytic activity against casein, papaya and pineapple used as substrates. The proteolytic activity suggests the expression of the *speB* gene. Molecular docking analysis of cysteine protease showed that erythromycin (bond length 2.41 Å), followed by chloramphenicol (2.51 Å), exhibited a strong interaction; while penicillin-G (3.24 Å) exhibited a weak interaction, and this factor could be considered as a cause for penicillin-G resistance. Authors highlighted that this study contributes to a better understanding of *speB* gene encoding cysteine protease, antibiotic resistance, and their interaction in the isolate, *S. pyogenes* NBMKU12. They stated that the antibiotics and cysteine protease interaction study confirms the resistance or sensitivity of *S. pyogenes*. Moreover, they hypothesized that the isolate NBMKU12 was resistant to most of the tested antibiotics, and this resistance might be a cause for mutation.

Commentary

The authors seem to be unaware of the biology and pathogenesis of group A streptococci: they erroneously cite Rato *et al.* (J Clin Microbiol 2011; 29:2470-9) to justify a phrase by which superantigens and exotoxins are mentioned and not the M protein responsible for rheumatic fever. In addition, in the introduction, the authors mentioned, also erroneously, that the majority (and not the entirety, so far) of strains of *S. pyogenes* are sensitive to penicillin and cited the work of Bassetti *et al.* (Emerg Infect Dis 2000; 6:180-3) in which it is clearly said that sensitivity to penicillin is universal. They mentioned an increase of up to 50% in the resistance of streptococci, through a work by Nunes *et al.* which refers only to *S. pneumoniae*, a bacterium clearly different from *S. pyogenes*. They also say that temporary changes in streptococcal resistance have been demonstrated based on this same article by Nunes *et al.*

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

and in another one by Camara *et al.* where no reference is made to temporary changes or environmental factors.

Their results are not very credible and, in one case at least, contradictory: on 7 strains and one in particular (NBMKU12) they say they have observed by diffusion with discs (no inhibition zones data are presented), a 71.4% resistance to ampicillin, 57.1% resistance to ceftriaxone and 42.8% resistance to penicillin. NBMKU12 was considered resistant to ampicillin when they obtained a MIC value in the sensitivity range (0.25 µg / ml). They also tested amoxicillin / clavulanic acid, an antibiotic obviously not recommended for β-hemolytic streptococci by CLSI. In their search for resistance markers, they only found the gene that codes for a TEM-type β-lactamase, which was never found in gram-positive cocci. The authors kept this data obtained by genetic study without performing an enzymatic analysis that would verify or not that the sequence found encoded the enzyme, more when the strain NBMKU12 did not show resistance to ampicillin by Etest.

The authors conclude that *speB*, a toxin present in virtually all isolates of *S. pyogenes*, interacts with the activity of antibiotics. If this was the case, the problem with β-lactams in *S. pyogenes* would be alarming.

Clonación molecular y acoplamiento del gen *speB* que codifica la cisteína proteasa con interacción con los antibióticos en *Streptococcus pyogenes* NBMKU12, uno de los aislados clínicos

Este estudio se centra en la resistencia a los antibióticos de *S. pyogenes* y su interacción con la cisteína proteasa. Sólo se incluyeron siete aislamientos de *S. pyogenes* y la cepa NBMKU12, aislada de una infección del tracto urinario. En el aislado NBMKU12, solo se detectó el gen *tem* entre los 13 genes de resistencia a los antibióticos probados. De los siete aislamientos de *S. pyogenes*, se encontró que el 71,4% era resistente a la ampicilina, 57,1% a la ceftriaxona y 42,8% a la penicilina G. No se observó resistencia para amoxicilina/ácido clavulánico, azitromicina y eritromicina.

La determinación de CIM mostró los siguientes valores para la ampicilina (0,25 µg/ml), cloranfenicol (4 µg/ml), ceftriaxona (1,5 µg/ml), ácido clavulánico (2,5 µg/ml) y vancomicina (1 µg/ml). Además, cuando el análisis de la presencia de 13 genes de virulencia se llevó a cabo en el aislado NBMKU12, solo se detectaron *speJ* y *speB*. El *speB*, que codifica un gen de la cisteína proteasa, fue clonado. A esto le siguió la secuenciación del ADN para comprender la interacción probable de la cisteína proteasa con antibióticos, inhibidores y sustratos. El gen *speB* consta de 1197 nucleótidos y codifica una proteína con múltiples dominios, incluido un péptido señal (aa 1–22), una región inhibidora (aa 27–156) y un dominio catalítico de cisteína (aa 160–367). Los sobrenadantes de cultivo probados del aislado NBMKU12 mostraron la actividad proteolítica contra la caseína, la papaya y la piña utilizadas como sustratos. La actividad proteolítica sugiere la expresión del gen *speB*. El análisis de acoplamiento molecular de la cisteína proteasa mostró que la eritromicina (longitud del enlace 2,41 Å), seguida por cloranfenicol (2,51 Å), exhibió una fuerte interacción; mientras que la penicilina-G (3,24 Å) mostró una interacción débil, y este factor podría considerarse como una causa de resistencia a la penicilina G. Los autores destacaron que este estudio contribuye a una mejor comprensión

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

del gen *speB* que codifica la cisteína proteasa, la resistencia a los antibióticos y su interacción en el aislado NBMKU12. Afirmaron que el estudio de interacción de los antibióticos con la cisteína proteasa confirmaban la resistencia o sensibilidad de *S. pyogenes*. Además, plantearon la hipótesis de que el aislado NBMKU12, según ellos, era resistente a la mayoría de los antibióticos probados y esta resistencia podría ser causada por una mutación.

Comentario

Los autores parecen desconocer la biología y patogenia de los estreptococos del grupo A: citan erróneamente a Rato *et al.* (J Clin Microbiol 2011; 29:2470-9) para justificar una frase por la que se menciona a superantígenos y exotoxinas y no a la proteína M como responsables de la fiebre reumática. Además, en la introducción, los autores mencionan, también erróneamente, que la mayoría (y no la totalidad, hasta el momento) de las cepas de *S. pyogenes* son sensibles a la penicilina y citan el trabajo de Bassetti *et al.*, (Emerg Infect Dis 2000; 6:180–3) en el que claramente se dice que la sensibilidad a penicilina es universal. Mencionan un aumento de hasta un 50% en la resistencia de los estreptococos, a través de un trabajo de Nunes *et al.* que está referido únicamente a *S. pneumoniae*, una bacteria claramente diferente de *S. pyogenes*. También dicen que se ha demostrado cambios temporales en la resistencia a los estreptococos basados en este mismo artículo de Nunes *et al.* y en otro de Camara *et al.* donde no se hace referencia ni a cambios temporales ni a factores ambientales.

Sus resultados son poco creíbles y, en un caso al menos, contradictorios: sobre 7 cepas y una en particular (NBMKU12) dicen haber observado por difusión con discos (no se presentan datos de halos de inhibición) un 71,4% de resistencia a ampicilina, 57,1% de resistencia a ceftriaxona y 41,8% de resistencia a penicilina. NBMKU12 es considerada resistente a ampicilina cuando obtuvieron un valor de CIM en el rango de sensibilidad (0,25 µg/ml). Además ensayaron amoxicilina/ácido clavulánico, antibiótico obviamente no recomendado para estreptococos β-hemolíticos por CLSI. En su búsqueda de marcadores de resistencia, sólo encontraron insólitamente el gen que codifica para una β-lactamasa de tipo TEM, nunca hallada en cocos gram positivos. Los autores se quedaron con este dato obtenido por estudio genético sin efectuar un análisis enzimático que comprobaría o no que esa secuencia encontrada codificaba la enzima, más cuando la cepa NBMKU12 no presentaba resistencia por Etest a la ampicilina.

Los autores finalmente concluyen que *speB*, una toxina presente en prácticamente todos los aislados de *S. pyogenes*, por tratarse de una proteinasa, interactúa con proteínas que tienen que ver con la actividad de los antibióticos. Si así fuera, el problema con los β-lactámicos en *S. pyogenes*, sería mayúsculo.

Foodborne Outbreak of Group G Streptococcal Pharyngitis in a School Dormitory in Osaka, Japan

Yamaguchi T^{#1}, Kawahara R^{#2}, Katsukawa C², Kanki M², Harada T², Yonogi S², Iwasaki S³, Uehara H⁴, Okajima S³, Nishimura H², Motomura K², Miyazono M⁵, Kumeda Y⁶, Kawatsu K².

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 4, N°4

Diciembre 2018

¹ Osaka Institute of Public Health, Osaka, Japan yamaguchi@iph.osaka.jp.

² Osaka Institute of Public Health, Osaka, Japan.

³ Shijonawate Public Health Center, Osaka Prefectural Government, Osaka, Japan.

⁴ Osaka Prefectural Central Market Food Sanitation Inspection Laboratory, Osaka, Japan.

⁵ Tondabayashi Public Health Center, Osaka Prefectural Government, Osaka, Japan.

⁶ Research Center for Microorganism Control, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan.

Contributed equally

J Clin Microbiol. 2018; 56(5). pii: e01884-17. doi: 10.1128/JCM.01884-17

β -hemolytic streptococci are classified according to the polysaccharide antigen in the cell wall. The main β -hemolytic streptococci that causes pharyngitis are group A (GAS), C (GCS) and G (GGS). Numerous superficial antigenic factors have been described for GAS, GCS and GGS. Among these, the M protein is type-specific and is extensively used as an epidemiological marker.

Streptococcus pyogenes (GAS) is a widely prevalent bacterial pathogen which can infects superficial tissue sites, including the upper respiratory tract mucosal epithelium or the epidermal layer of the skin, and causes pharyngitis or impetigo. *S. pyogenes* can also cause skin and soft tissue infection, septic arthritis, bacteremia, and endocarditis. Although GAS causes most streptococcal infections, GCS- and GGS-mediated infections have also been reported.

GAS can also cause food-borne outbreaks, although this is a rare event, large-scale outbreaks exceeding 100 patients have been reported. GGS, which is included in the subspecies *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), is a common component of the normal microbiota of human skin, pharynx, and gastrointestinal tract. Food-borne outbreaks caused by GGS are also rare, and have not been reported by isolation from causative foods.

This paper report the first case of food-borne outbreak caused by GGS in Osaka, Japan, that was identified by isolating SDSE from the causative food. In September 2016, 140 patients with primary symptoms of sore throat and fever were identified in a school dormitory. Epidemiological and laboratory investigations determined that this symptomatic condition was a food-borne outbreak of GGS, being isolated from samples from patients, cooks and foods. The average onset time was 44.9 hours and the prevalence rate was 62%. The strain of GGS was identified as SDSE of two *emm* types: *stG652.0* and *stC36.0*. The causative food, a broccoli salad, was contaminated with the two types of SDSE, totaling 1.3×10^4 CFU/g. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of samples from patients, cooks and foods produced similar band patterns among samples with the same *emm* type. This result suggested the possibility of exposure from the contaminated food, being this study the first to report a case of food-borne outbreak caused by SDSE in Japan.

Brote de intoxicación alimentaria de faringitis estreptocócica del grupo G en un dormitorio escolar en Osaka, Japón

Los estreptococos β -hemolíticos se clasifican de acuerdo al antígeno polisacárido presente en la pared celular. Los principales estreptococos β -hemolíticos que causan faringitis son los estreptococos grupo A (GAS, por su sigla en inglés), C (GCS) y G (GGS). Se han descrito numerosos factores antigénicos superficiales para GAS, GCS y GGS. La proteína M es la que se usa ampliamente como marcador epidemiológico.

Streptococcus pyogenes (GAS) es un patógeno bacteriano ampliamente prevalente que puede infectar tejidos superficiales, como el epitelio de la mucosa del tracto respiratorio superior o la capa epidérmica de la piel, y causa faringitis o impétigo. *S. pyogenes* también puede causar infección de la piel y tejidos blandos, artritis séptica, bacteriemia y endocarditis. Aunque el GAS causa la mayoría de las infecciones estreptocócicas, también se han notificado infecciones del mismo tipo mediadas por GCS y GGS.

El GAS también puede causar brotes transmitidos por alimentos, aunque este es un evento raro; se han informado brotes a gran escala que superan los 100 pacientes. Los GGS, que están incluidos en la subespecie—*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE), es un componente habitual de la microbiota normal de la piel humana, la faringe y el tracto gastrointestinal. Los brotes transmitidos por alimentos causados por GGS también son raros, y no se ha reportado el aislamiento del microorganismo de los alimentos causales.

Este trabajo informa sobre el primer caso de brote de origen alimentario causado por GGS en Osaka, Japón, que se identificó aislando el SDSE del alimento causal. En septiembre de 2016, se notificaron en un dormitorio escolar 140 pacientes con síntomas primarios de dolor de garganta y fiebre. Las investigaciones epidemiológicas y de laboratorio determinaron que esta condición sintomática era un brote de GGS transmitido por alimentos, que se aisló de muestras de pacientes, cocineros y alimentos. El tiempo promedio de inicio fue de 44,9 horas y la tasa de prevalencia fue del 62%. Se identificaron SDSE de dos tipos de *emm*: stG652.0 y stC36.0. El alimento causante, una ensalada de brócoli, se contaminó con los dos tipos de SDSE, con un total de $1,3 \times 10^4$ UFC/g. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de muestras de pacientes, cocineros y alimentos produjo patrones de bandas similares entre muestras con el mismo tipo de *emm*. Este resultado sugirió la posibilidad de exposición a los alimentos contaminados. Este estudio es el primero en informar un caso de brote transmitido por alimentos causado por SDSE en Japón.