

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

**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

# LANEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

## Comparison of three nucleic acid amplification tests and culture for detection of group B *Streptococcus* from enrichment broth.

Shin JA<sup>a</sup>, Pridea DT<sup>a,b</sup>

a. Department of Pathology, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA.

b. Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA.

**J. Clin Microbiol 2019; 57: e01958-18.** <https://doi.org/10.1128/JCM.01958-18>

Colonization of pregnant women with group B streptococcus (GBS) can result in vertical transmission to neonates during labor/delivery. GBS infections in neonates can cause severe complications, such as sepsis, meningitis, and pneumonia. Accurate detection is critical because administration of intrapartum antibiotics can significantly reduce transmission.

Authors compared three commercial methods of nucleic acid amplification with blood agar culture for the detection of group B streptococci (GBS) from the 18-24 h enrichment broth obtained from 500 vaginal /rectal swabs of pregnant women. The molecular methods were Hologic Panther Fusion GBS (HPF), Luminex Aries GBS (LA) and Cepheid Xpert GBS LB (CX). One hundred and eight samples were positive by culture (21.6%) and 61 were negative by culture but positive by the three molecular methods. In total, EGB was detected in 31.0% (n: 155) by at least one of the commercial methods. By GBF EGB was detected in 143 cases (28.6%), by CX in 147 (29.4%) and by LA in 155 (31.0%). False positives were obtained in 2 cases with HPF, in 13 with LA and in 6 with CX (all with CT> 36).

The relative sample capacity, the time for first result, and maximum number of specimens processed in 24 h, can be seen in the table.

Method	Sample capacity	Time to first reult (h)	Troughput in 24h
HPF	120	2.4	1,005
CX IV	4	1	96
CX Infinity 80	80	1	1,920
LA M1	6	2	72
LA	12	2	144

As advantages of commercial methods, the authors referred to less technical work, less time to obtain the result and greater sensitivity. Furthermore, they said that these methods should be considered the new gold standard for intrapartum GBS screening. As disadvantages of HPF they pointed out the high cost / effectiveness when processing few samples, and of LA, the need to repeat 19 (3.8%) invalid results due to the presence of inhibitors.

# LANEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

## COMMENTS

One question is what clinical impact has the highest speed in the detection of GBS?

Another question is why did they compare the sensitivity of these methods with the subculture in blood agar and not with a chromogenic medium for GBS, which have shown greater sensitivity?

In fact there is an Argentinian study that compares both culture methodologies in which the subculture in blood agar showed to be 14.9% less sensitive than the subculture in chromogenic medium (Montibello *et al.* Rev Argent Microbiol 2011;43:4-8).

On the other hand, false positives, as the authors said, can cause allergic reactions to mothers, increased colonization with resistant microorganisms and neonatal mycosis

Before stating that these methods represent the gold standard for maternal screening of GBS, I consider that additional studies should be done with better comparators to determine the different sensitivity in the detection of GBS and to verify the prevention of neonatal sepsis to measure the clinical impact that means using methods that, in our country, are very expensive.

## **Comparación de tres pruebas de amplificación de ácidos nucleicos y cultivo para la detección de estreptococos del grupo B a partir de caldos de enriquecimiento.**

Las embarazadas colonizadas con estreptococos del grupo B (EGB) pueden provocar transmisión vertical a los recién nacidos durante el parto y, a partir de allí, pueden causar complicaciones graves, como sepsis, meningitis y neumonía. La detección precisa es crítica porque la administración de antibióticos intraparto puede reducir significativamente la transmisión.

Los autores compararon tres métodos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos con el cultivo en agar sangre para la detección de EGB a partir del desarrollo de 18-24 h en caldo de enriquecimiento obtenido de 500 hisopados vaginales/rectales de mujeres embarazadas. Los métodos moleculares eran Hologic Panther Fusion GBS (HPF), Luminex Aries GBS (LA) y Cepheid Xpert GBS LB (CX). Ciento ocho resultaron positivos por cultivo (21,6%) y 61 negativos por cultivo y positivos por los tres métodos moleculares. En total, en el 31,0% (n: 155) se detectó EGB por al menos uno de los métodos comerciales. Por HPF se detectó EGB en 143 casos (28,6%), por CX en 147 (29,4%) y por LA en 155 (31,0%). Se obtuvieron falsos positivos en 2 casos con HPF, en 13 con LA y en 6 con CX (todos con CT>36).

La capacidad relativa de procesamiento, los tiempos de positividad y el máximo de muestras procesadas en un día se pueden ver en la tabla.

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

Método	Capacidad (nº de muestras por vez)	Tiempo (h)	Máximo nº de muestras procesadas en 24h
HPF	120	2,4	1.005
CX IV	4	1	96
CX Infinity 80	80	1	1.920
LA M1	6	2	72
LA	12	2	144

Como ventajas de los métodos comerciales, los autores refirieron un menor trabajo técnico, menor tiempo en la obtención del resultado y mayor sensibilidad. Más aún ellos afirman que deberían ser considerados el nuevo *gold standard* para el screening de EGB intraparto. Como desventajas de HPF señalaron el alto costo/efectividad al procesar pocas muestras y de LA la necesidad que hubo de repetir 19 (3,8%) resultados inválidos por presencia de inhibidores.

## COMENTARIOS

Una pregunta es ¿qué impacto clínico tiene la mayor velocidad en la detección de EGB?

Otra pregunta es ¿por qué compararon la sensibilidad de estos métodos con el subcultivo en agar sangre y no con uno de los medios cromogénicos para EGB, que han mostrado mayor sensibilidad?

De hecho hay un estudio argentino que compara ambas metodologías de cultivo en el que el subcultivo en agar sangre mostró ser un 14,9% menos sensible que el subcultivo en medio cromogénico (Montibello y *col.* Rev Argent Microbiol 2011;43:4-8).

Por otra parte, los falsos positivos, como dicen los autores, pueden provocar reacciones alérgicas a las madres, aumento de colonización con microorganismos resistentes y micosis neonatal

Antes de declarar que estos métodos representan el *gold standard* para el *screening* materno de EGB considero que se deberían hacer estudios adicionales con mejores comparadores para determinar la diferente sensibilidad en la detección de EGB y de verificación de la prevención de la sepsis neonatal, para medir el impacto clínico de métodos que en nuestro país resultan muy costosos.

## **International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact.**

Gladstone RA<sup>a</sup>, Lo SW<sup>a</sup>, Lees JA<sup>b</sup>, Croucher NJ<sup>c</sup>, van Tonder AJ<sup>a</sup>, Corander J<sup>a,d</sup>, Page AJ<sup>a</sup>, Marttinen P<sup>e</sup>, Bentley LJ<sup>a</sup>, Ochoa TJ<sup>f</sup>, Ho PL<sup>g</sup>, du Plessis M<sup>h</sup>, Cornick JE<sup>i</sup>, Kwambana-Adams B<sup>j,k</sup>, Benisty R<sup>l</sup>, Nzenze SA<sup>m,n</sup>, Madhi SA<sup>m,n</sup>, Hawkins PA<sup>o</sup>, Everett DB<sup>p</sup>, Antonio M<sup>k,q</sup>, Dagan R<sup>l</sup>, Klugman KP<sup>o</sup>, von Gottberg A<sup>h</sup>, McGee L<sup>r</sup>, Breiman RF<sup>o,s</sup>, Bentley SD<sup>a</sup>, The Global Pneumococcal Sequencing Consortium\*

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

- a. Parasites and microbes, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, UK.
- b. New York University School of Medicine, New York, NY, USA.
- c. Faculty of Medicine, School of Public Health, Imperial College London, UK.
- d. Department of Biostatistics, University of Oslo, 0317 Oslo, Norway.
- e. Department of Computer Science, Helsinki Institute for Information Technology HIIT, Espoo, Finland.
- f. Instituto de Medicina Tropical, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru.
- g. Department of Microbiology, Carol Yu Centre for Infection, Queen Mary Hospital, The University of Hong Kong, Hong Kong, China.
- h. Centre for Respiratory Diseases and Meningitis, National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg, South Africa.
- i. Malawi-Liverpool-Wellcome-Trust Clinical Research Programme, Blantyre, Malawi.
- j. NIHR Global Health Research Unit on Mucosal Pathogens, Division of Infection and Immunity, University College London, London, UK.
- k. WHO Collaborating Centre for New Vaccines Surveillance, Medical Research Council Unit The Gambia at London School of Hygiene & Tropical Medicine, Atlantic Boulevard, Fajara, PO Box 273 Banjul, the Gambia.
- l. The Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel.
- m. Medical Research Council: Respiratory and Meningeal Pathogens Research Unit, University of the Witwatersrand, South Africa.
- n. Department of Science and Technology, National Research Foundation: Vaccine Preventable Diseases, University of the Witwatersrand, South Africa.
- o. Rollins School Public Health, Emory University, USA.
- p. Queens Research Institute, University of Edinburgh, UK.
- q. Division of Microbiology & Immunity, Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK.
- r. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.
- s. Emory Global Health Institute, Atlanta, USA.

**EBioMedicine, 2019;43:338–346. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.021>**

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

Pneumococcal conjugate vaccines (PCV) have reduced the incidence of invasive pneumococcal disease, caused by vaccine serotypes, but non-vaccine-serotypes remain a concern. The Global Pneumococcal Sequencing project (GPS, <http://www.pneumogen.net/gps/>), aims to provide an international understanding of pneumococcal population structure and PCV impact. It includes pneumococcal collections from invasive disease and asymptomatic carriage from multiple low and middle-income countries, and, collected before and after PCV introductions. In the present study 13,454 pneumococcal isolates representing 30 countries and 5 continents, available from the ongoing GPS project by June 2017, were included. Sixty-four percent of the collection were isolated from IPD, 96% of the collection were isolated between 2000 and 2017 and 74% were from children aged  $\leq 5$  years old.

Investigators from each country provided epidemiological information including clinical manifestation, host age group, isolation year and sample source. Participating laboratories performed antibiotic susceptibility testing where facilities allowed (<50% of isolates) and this information was used to assess the sensitivity and specificity of genotypic prediction, and the validity of generating new, genome-derived, susceptibility data.

Isolates were Illumina sequenced and raw data, assembled and deposited in the European Nucleotide Archive. The MLST sequences types (STs) and serotype were derived from the genomes. The genomes were screened for the presence of known genes and mutations conferring resistance to penicillin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol and cotrimoxazole.

Isolates from this combined dataset were grouped into lineages by popPunk, which clusters them using core and accessory distances. These lineages were coined in Global Pneumococcal Sequence Clusters (GPSCs), and a reference database was created – available at <https://www.pneumogen.net/gps/assigningGPSCs.html> – that can be used to assign the GPSCs to new genomes.

To define (GPSCs) and improve global representation, the GPS dataset ( $n = 13,454$ ) was supplemented with published datasets from the Netherlands, Thailand, USA and UK. The combined dataset ( $n = 20,027$ ) represented Africa (40%), Asia (25%), Europe (19%), North America (12%), and South America (5%). The combined collections were clustered into 621 GPSCs. Thirty-five GPSCs had >100 isolates in the GPS dataset and were classified as dominant-GPSCs.

GPSCs often encompassed related CCs, with a mean number of 2.6 CCs per dominant-GPSC (SD  $\pm 1.5$ , excluding singleton STs). The GPSCs are broadly back-compatible with MLST as the vast majority of STs were found exclusively within a GPSC.

In 22/35 (63%) of dominant-GPSCs both non-vaccine serotypes and vaccine serotypes were observed in the years up until, and including, the first year of pneumococcal conjugate vaccine introduction.

At an international level, they have shown that pneumococcal non-vaccine serotypes exist alongside vaccine serotypes, within dominant GPSCs that account for the majority of the pneumococcal population. Additionally, they showed that antibiotic resistance is associated to a subset of GPSCs, many of which are dominant and globally disseminated.

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

The GPSC database can be updated when novel GPSCs are assigned in future collections, enabling stable international comparisons of pneumococcal population structure.

## **Definición genómica internacional de linajes neumocócicos, para contextualizar enfermedades, resistencia a antibióticos e impacto de vacunas.**

Las vacunas neumocócicas conjugadas (PCV) han reducido la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva causada por serotipos de vacunas, pero los serotipos no vacunales siguen siendo motivo de preocupación. El proyecto de secuenciación neumocócica global (GPS, <http://www.pneumogen.net/gps/>), tiene como objetivo comprender la estructura de la población neumocócica global y el impacto de las PCV. Incluye colecciones de neumococos de enfermedad invasiva y portación nasofaríngea de países de bajos y medianos ingresos, y muestras recolectadas antes y después de la introducción de las PCV.

En el presente estudio se incluyeron 13.454 neumococos de 30 países y 5 continentes, disponibles en el proyecto GPS en junio de 2017. El 64% de la colección se aisló de IPD, el 96% se aisló entre 2000 y 2017 y el 74% de niños  $\leq 5$  años.

Los investigadores de cada país proporcionaron información epidemiológica, incluida la manifestación clínica, grupo de edad del huésped, año de aislamiento y fuente de la muestra.

Los laboratorios participantes que contaban con las instalaciones necesarias realizaron pruebas de sensibilidad a los antibióticos (<50% de los aislados) y esa información se utilizó para evaluar la sensibilidad y especificidad de la predicción genotípica, y validar los datos de sensibilidad derivados de los genomas.

Los genomas de los aislados fueron secuenciados por tecnología Illumina, ensamblados y depositados en el Archivo Europeo de Nucleótidos. A partir de los genomas se infirieron los secuenciotipos (ST) y los serotipos. Los genomas se examinaron para detectar la presencia de genes y mutaciones conocidos que confieren resistencia a la penicilina, la tetraciclina, la eritromicina, el cloranfenicol y el cotrimoxazol.

Los aislamientos de este conjunto de datos combinados se agruparon en linajes mediante *popPunk*, que los agrupa de acuerdo a distancias del genoma core y accesorio. Estos linajes se denominaron *Global Pneumococcal Sequence Clusters* (GPSCs), y se creó una base de datos de referencia, disponible en <https://www.pneumogen.net/gps/assigningGPSCs.html>, que se puede usar para asignar los GPSC a nuevos genomas. Para definir los GPSCs y mejorar la representación global, el conjunto de datos GPS (n = 13.454) se complementó con datos publicados de los Países Bajos, Tailandia, EE. UU. y el Reino Unido. El conjunto de datos combinado (n = 20.027) representó a África (40%), Asia (25%), Europa (19%), América del Norte (12%) y América del Sur (5%).

Las colecciones combinadas se agruparon en 621 GPSC. Treinta y cinco GPSC tenían >100 aislamientos en la colección de datos y se clasificaron como GPSC dominantes.

Los GPSC a menudo abarcaban CC relacionados, con un número medio de 2,6 CC por GPSC dominante (SD  $\pm$  1,5, excluyendo ST de *singleton*). Los GPSC son ampliamente compatibles con MLST ya que la gran mayoría de los ST se encontraron exclusivamente dentro de un GPSC.

# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

En 22/35 (63%) de los GPSC dominantes, se observaron serotipos no vacunales y serotipos vacunales en los años previos a la introducción de la PCV, e incluso, durante el año de su introducción.

A nivel internacional se ha demostrado que los serotipos no vacunales existen junto con los serotipos vacunales dentro de los GPSC dominantes que representan la mayoría de la población neumocócica. Además, se mostró que la resistencia a los antibióticos se asocia a un subgrupo de GPSC, muchos de los cuales son dominantes y están diseminados a nivel mundial. La base de datos GPSC se podrá actualizar cuando se asignen nuevos GPSC en futuras colecciones, lo que permitirá comparar la estructura de la población neumocócica a nivel mundial.

## **PcsB expression diversity influences on *Streptococcus mitis* phenotypes associated with host persistence and virulence.**

Harth-Chu EN<sup>1</sup>, Alves LA<sup>1</sup>, Theobaldo JD<sup>1</sup>, Salomão MF<sup>1</sup>, Höfling JF<sup>1</sup>, King WF<sup>2</sup>, Smith DJ<sup>2</sup>, Mattos-Graner RO<sup>1</sup>.

1. Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, UNICAMP, Piracicaba, Brazil.

2. Department of Immunology and Infectious Disease, The Forsyth Institute, Cambridge, MA, United States.

**Front Microbiol. 2019 Nov 12;10:2567. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02567>**

*Streptococcus mitis* is part of the oropharynx microbiota, but in certain circumstances it can produce severe diseases as bacteremia and endocarditis. Authors analyzed both *S. mitis* strains isolated from the oral cavity at commensal states and other isolates from blood samples. They observed that *S. mitis* express the surface immunodominant protein PcsB required for binding to sucrose-derived exopolysaccharides (EPS). Immuno dot blot assays with anti-PcsB antibodies and RT-qPCR transcription analyses revealed strain-specific profiles of PcsB production associated with diversity in *pcsB* transcriptional activities. Blood strains showed significantly higher levels of PcsB expression compared to commensal isolates.

Because *Streptococcus mutans* co-colonizes *S. mitis* dental biofilms, and secretes glucosyl-transferases (GtfB/C/D) for the synthesis of highly insoluble EPS from sucrose, profiles of *S. mitis* binding to EPS, biofilm formation and evasion of the complement system were assessed in sucrose-containing BHI medium supplemented or not with filter-sterilized *S. mutans* culture supernatants. These analyses showed significant *S. mitis* binding to EPS and biofilm formation in the presence of *S. mutans*. In addition, these phenotypes were abolished if strains were grown in culture supernatants of a *gtfBCD*-defective *S. mutans* mutant. Increased PcsB expression was further correlated with increased resistance to deposition of C3b/iC3b of the complement system after exposure to human serum, when strains were previously grown in



# LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°4

December 2019

the presence of *S. mutans* supernatants. Finally, analyses of PcsB polymorphisms and bioinformatic prediction of epitopes with significant binding to MHC class II alleles revealed that blood isolates harbor PcsB polymorphisms in its functionally conserved CHAP-domain, suggesting antigenic variation. These findings reveal important roles of PcsB in *S. mitis*-host interactions under commensal and pathogenic states, highlighting the need for studies to elucidate mechanisms regulating PcsB expression in this species.

## **La diversidad de expresión de PcsB influye sobre los fenotipos de *Streptococcus mitis* asociados con la persistencia en el hospedador y con la virulencia.**

*Streptococcus mitis* es parte de la microbiota orofaríngea, pero en ciertas circunstancias puede producir enfermedades graves como bacteriemia y endocarditis. Los autores analizaron cepas comensales de *S. mitis* aisladas de la cavidad oral y otras de muestras de sangre. Observaron que *S. mitis* expresa la proteína inmunodominante de superficie PcsB requerida para la unión a exopolisacáridos derivados de sacarosa (EPS). Los ensayos de inmunotransferencia con anticuerpos anti-PcsB y los análisis de transcripción RT-qPCR revelaron perfiles de producción de PcsB específicos de cepa, asociados con la diversidad en las actividades transcripcionales de *pcsB*. Las cepas de sangre mostraron niveles significativamente más altos de expresión de PcsB en comparación con los aislamientos comensales. Debido a que *Streptococcus mutans* co-coloniza las biopelículas dentales con *S. mitis* y secreta glucosiltransferasas (GtfB / C / D) para la síntesis de EPS altamente insoluble a partir de sacarosa, se obtuvieron distintos perfiles de *S. mitis* respecto de la unión a los EPS, de la formación de biopelículas y de la evasión del sistema del complemento. Esto fue evaluado en medio BHI con sacarosa suplementado o no con sobrenadantes de cultivo de *S. mutans* esterilizados por filtración. Estos análisis mostraron una unión significativa de *S. mitis* a EPS y la formación de biopelículas en presencia de sobrenadantes de *S. mutans*. Además, estas propiedades se anularon cuando se cultivaron las cepas en sobrenadantes de cultivo de un mutante de *S. mutans* defectuoso en *gtfBCD*. El aumento de la expresión de PcsB se correlacionó aún más con el aumento de la resistencia a la deposición de C3b / iC3b del sistema del complemento después de la exposición al suero humano, cuando las cepas se cultivaron previamente en presencia de sobrenadantes de *S. mutans*. Finalmente, los análisis de polimorfismos PcsB y la predicción bioinformática de epitopes con unión significativa a alelos MHC de clase II revelaron que los aislados de sangre albergan polimorfismos PcsB en su dominio CHAP funcionalmente conservado, lo que sugiere una variación antigénica. Estos hallazgos revelan un rol importante de PcsB en las interacciones entre *S. mitis* y el hospedador en estados comensales y patógenos, y destacan la necesidad de realizar estudios para dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de PcsB en esta especie.