

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

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

VonSpecht, Martha

Lopardo, Horacio

Rol de los estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* en infecciones de piel y partes blandas: reporte de 3 casos.

Amalfa F¹, Lavallen L², Ahumada F², Stupka J¹, Funes Pivetta N³, Zamar F³, Lopardo H⁴

1. Hospital General de Agudos P. Piñero. Área Bacteriología, Servicio de Laboratorio. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

2. Hospital Nacional Baldomero Sommer. Área Bacteriología, Servicio de Microbiología. General Rodríguez. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

3. Hospital General de Agudos P. Piñero. Servicio de Cirugía Maxilofacial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

4. Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Acta Bioq Clin Latinoam 2019; 53 (4):545-9

Se describieron tres casos de infecciones por estreptococos del grupo *Streptococcus anginosus* (GSA), que pertenecen al grupo viridans y que pueden presentar los tres tipos de hemólisis. Este grupo está conformado por tres especies: *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus constellatus*. Los GSA forman parte de la microbiota habitual de la cavidad oral humana, del tracto respiratorio superior y del tracto gastrointestinal. También son agentes causales de colecciones purulentas, especialmente abscesos, incluso aquellos localizados en órganos sólidos como hígado, cerebro y pulmón. Además, últimamente se ha reconocido su participación en exacerbaciones bronquiales en pacientes con fibrosis quística.

En este trabajo se describieron infecciones producidas por mordeduras humanas en dos casos y en el tercero probablemente por automordedura derivada de un traumatismo facial.

Las mordeduras producidas por seres humanos representan entre el 3 y el 4% de todas las mordeduras y se pueden clasificar en tres tipos de acuerdo a las circunstancias de la agresión:

- Mordeduras oclusivas: aquellas en las que el agresor clava voluntariamente sus dientes en la víctima. Generalmente ocurren durante peleas y altercados (caso 1)
- Heridas por puñetazo: comprenden las heridas producidas en el puño cerrado de un agresor cuyo golpe impacta sobre el borde cortante de los dientes de la víctima (caso 3).
- Autoagresiones: con frecuencia en pacientes psiquiátricos o con alteraciones de conciencia (caso 2).

El riesgo de infección de las heridas por mordeduras humanas es de alrededor del 18%. La mayoría de las mordeduras humanas se localizan en las manos (86%) (casos 1 y 3), en un 8% en la cabeza o cara (caso 2) y solo un 2% en otros sitios según Talan (Clin Infect Dis 2003;37:1481–

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

9). En su mayoría, las heridas asociadas a mordeduras contienen bacterias aerobias y anaerobias que reflejan la microbiota oral y de piel. Por lo tanto los cultivos son frecuentemente polimicrobianos, con desarrollo de tres o más gérmenes, y en más del 50% de los casos hay aislamiento de anaerobios. En estos casos relatados las infecciones fueron monomicrobianas. En el estudio de Talan et al. se aislaron *Streptococcus* spp. en el 84% de los cultivos (con 53% precisamente GSA).

Role of *Streptococcus anginosus* group streptococci in skin and soft tissue infections: report of 3 cases.

Three cases of streptococcal infections of the *Streptococcus anginosus* group (SAG) were described. SAG belong to the viridans group and can present all three types of hemolysis. This group is made up of three species: *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus constellatus*. GSA isolates are part of the normal microbiota of the human oral cavity, upper respiratory tract, and gastrointestinal tract. They are also causative agents of purulent collections, especially abscesses, even those located in solid organs such as liver, brain, and lung. Furthermore, their participation in bronchial exacerbations in patients with cystic fibrosis has recently been recognized.

In this work, infections caused by human bites were described in two cases and in the third, probably due to self-bite, derived from facial trauma.

Human bites represent between 3 and 4% of all bites and can be classified into three types according to the circumstances of the attack:

- Occlusive bites: those in which the aggressor voluntarily digs his teeth into the victim. They generally occur during fights and altercations (case 1).
- Punch injuries: they include wounds produced in the closed fist of an attacker whose blow impacts on the cutting edge of the victim's teeth (case 3).
- Self-harm: frequently in psychiatric patients or with disturbances of consciousness (case 2).

The risk of infection from human bite wounds is around 18%. Most human bites are located on the hands (86%) (cases 1 and 3), 8% on the head or face (case 2) and only 2% in other sites, according with Talan (Clin Infect Dis 2003 ; 37: 1481–9). Most bite-associated wounds contain aerobic and anaerobic bacteria that reflect the oral and skin microbiota. Therefore, the cultures are frequently polymicrobial, with the development of three or more organisms, and in more than 50% of the cases there is isolation of anaerobes. In these reported cases the

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

infections were monomicrobial. In the study by Talan et al. *Streptococcus* spp. were isolated in 84% of the cultures (with 53% precisely GSA).

***Streptococcus pyogenes pbp2x* mutation confers reduced susceptibility to β -lactam antibiotics.**

Vannice K^{1,2}, Ricaldi J³, Nanduri S³, Fang FC⁴, Lynch J⁴, Bryson-Cahn C⁴, Wright T⁴, Duchin J², Kay M², Chochua S³, Van Beneden C³, Beall B³.

1. Centers for Disease Control and Prevention, Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Epidemic Intelligence Service, Division of Scientific Education and Professional Development, Epidemiology Workforce Branch.
2. Public Health - Seattle & King County, Prevention Division, Communicable Disease Epidemiology & Immunization.
3. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Bacterial Diseases, Respiratory Diseases Branch.
4. Harborview Medical Center, Seattle, WA.

Clin Infect Dis 2019 Oct 20. pii: ciz1000

Vannice *et al.* studied 282 invasive isolates of *Streptococcus pyogenes* or group A streptococci (GAS). The whole genome of 36 of them was sequenced. Five of them belonged to the 43.4 *emm* subtype, and two beared a *pbp2x* mutation (T553K). Minimum inhibitory concentrations (MICs) for ampicillin and amoxicillin were 0,25 μ g/ml (just the breakpoint), 8-fold higher than for controls, and the MIC for cefotaxime (0.06 μ g/ml) was 3-fold higher than for near-isogenic control isolates, consistent with a first-step in developing β -lactam resistance. Penicillin MICs, however, were 0.015 both for the two mutants and for the other three 43.4 isolates. Four out of the five isolates were isolated from four homeless men and the fifth was a man who worked at a facility providing services to people living homeless in Seattle.

Both patients from which mutants were isolated had previous several repetitive invasive bacterial infections caused by *Streptococcus agalactiae*, GAS, or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Concluding, authors discovered a novel GAS *pbp2x* mutation conferring elevated MICs to β -lactams to *S. pyogenes*, which could serve as a selective advantage and as a first step in development of resistance to β -lactams in GAS.

Mutaciones en *pbp2x* le confieren sensibilidad reducida a antibióticos β -lactámicos a *Streptococcus pyogenes*

Vannice *et al.* estudiaron 282 aislados invasivos de *Streptococcus pyogenes* o estreptococos del grupo A (GAS). Se secuenció el genoma total de 36 de ellos. Cinco pertenecían al subtipo *emm* 43.4, y dos tenían una mutación en *pbp2x* (T553K). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de ampicilina y amoxicilina para los dos aislados fueron de 0,25 μ g/ml (justo en el punto de corte), 8 veces más elevadas que los controles y las CIM de cefotaxima (0,06 μ g/ml) fueron 3 veces más altas que las de los aislados de control, casi isogénicos. Esto es consistente con un primer paso en el desarrollo de resistencia a β -lactámicos. Sin embargo, las CIM de penicilina fueron 0,015 μ g/ml tanto para los dos mutantes como para los otros tres aislamientos del subtipo 43.4. Cuatro de los cinco aislamientos se aislaron de igual número de hombres en situación de calle y el quinto era un hombre que trabajaba en una instalación que prestaba servicios justamente a personas que vivían sin hogar en Seattle.

Ambos pacientes de los que se aislaron mutantes habían sufrido previamente varias infecciones bacterianas invasivas repetitivas causadas por *Streptococcus agalactiae*, GAS o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, para lo cual habían recibido varios cursos de antibióticos, principalmente β -lactámicos. En conclusión, los autores descubrieron una nueva mutación en el gen *pbp2x* que le confiere CIM de β -lactámicos algo más elevadas a *S. pyogenes*, lo que podría servir como una ventaja selectiva y como un primer paso en el desarrollo de resistencia a β -lactámicos en GAS.

Comparative genomic analysis and identification of pathogenicity islands of hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* Brazilian strain

Lannes-Costa PS¹, Baráúna RA², Ramos JN³, Veras JFC³, Conceição MVR², Vieira VV⁴, de Mattos-Guaraldi AL⁵, Ramos RTJ², Doran KS⁶, Silva A², Nagao PE⁷.

1. Laboratory of Molecular Biology and Physiology of Streptococci, Institute of Biology Roberto Alcántara Gomes, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2. Center of Genomics and Systems Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil.

3. National Institute for Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

4. Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

5. Faculty of Medical Sciences, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

6. Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, United States of America.

7. Laboratory of Molecular Biology and Physiology of Streptococci, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Electronic address: pnagao@uol.com.br.

Infect Genet Evol. 2020 Jun;80:104195. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104195. Epub 2020 Jan 15.

The precise repertoire of shared and unique attributes that account for the emergence of *Streptococcus agalactiae* as a major pathogen for human populations remains yet undefined. EGB capsular polysaccharide (CPS) is not only an important virulence factor, but also allows it to be classified into serotypes. Several epidemiological studies have identified a remarkable association of *S. agalactiae* capsular type III strains with meningitis. Capsular type III strains belonging to the clonal complex 17 specifically sequence type 17 (ST-17) have historically been designated as “hypervirulent”. In this study, it is presented the genome of the first strain (GBS90356) isolated in Brazil belonging to capsular type III (ST-17). It was isolated from a newborn with fatal meningitis and a comparative analysis with other pathogenic *S. agalactiae* strains recovered from public data. Interestingly, the sequence of a single genome does not reflect how genetic variability and pathogenesis are driven within a bacterial species. Then, to make a more accurate estimate of the size of the *S. agalactiae* pangenome, 109 complete genomes from various hosts were included (42 human strains, including the study strain, GBS90356, 3 cattle, 55 fish and 9 strains of other animal origins). Then, the pangenome was calculated for 20 genomes of *S. agalactiae* belonging to capsular type III (including 6 ST-17 strains) isolated from human hosts, and finally, the analysis of pathogenicity islands (PAIs) were carried out for 6 strains belonging to ST-17 (NGBS128, COH1, 874391, BM110, SG-M6 and the strain under study GBS90356). Unique genes were 22 single genes to the GBS90356 strain.

To date, the open pan-genome ($\alpha = 0.8365$) of *S. agalactiae* type III showed a large plasticity, where the new genome sequences may contribute to the emergence of other genomes. PAIs have a large number of virulence genes grouped in blocks that play important roles in the

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

bacterial pathogenicity. Detection and analysis of PAIs in the *S. agalactiae* GBS90356 genome by GIPSy v1.1.2 software predicted 10 PAIs (SagPAI_1 through SagPAI_10) which corresponded to 15% of the genome size with a total of 352 genes. In general, PAIs 2, 4, 5 and 8 are poorly conserved among the *S. agalactiae* ST-17 strains analyzed in this study. SagPAI_1, *S. agalactiae* showed only *cps* and *neu* genes, which encode for sialic acid and the polysaccharide capsule, respectively, and enable the bacteria to evade the host immune defenses and confer the ability to develop meningitis. SagPAI_2 presented a wellknown Large Integrative Conjugative Element (ICE) Tn916 carrying the *tetM* gene conferring resistance to tetracycline. On the other hand, mercury resistance genes (*mer* operon) were found. In SagPAI_5, 135 genes were identified, including laminin-binding protein (*lmb* gene), which appears to have a pronounced role in bacterial tropism of the central nervous system, allowing *S. agalactiae* to cross the blood-brain barrier and *lacR*, a putative negative regulator of the operon that binds to the promoter in the absence of lactose. PAIs 2 and 5 were mainly detected in ST-17 strains and related to the presence of an integrase. SagPAI_2 and 5 presented ABC transporters genes. These genes encode for the maturation protease, essential for cell viability, virulence, nutrition, acquisition and exportation of other substances, including capsular polysaccharides and hemolysin. SagPAI_10 presented *cfb* gene, which encodes an extracellular pore-forming protein known as CAMP factor, responsible for the systemic spread of in the host. The PAIs genes of *S. agalactiae* were classified into GO (Gene Ontology) functional groups: 102 genes related to the biological process, 105 genes to cellular components and 235 for molecular function, commonly shared by the *S. agalactiae* strains.

The study of the presence of homologous recombination regions and the number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the six *S. agalactiae* ST-17 strains showed 13 recombination events for NGBS128, 12 for COH1, 10 for 874391, 9 for GBS90356, 4 for BM110 and no recombination was found for the SG-M6 strain. Interestingly, a large number of SNPs were observed in the *S. agalactiae* GBS90356 strain in recombination regions that can influence adaptability, variability and high bacterial genomic plasticity.

Twenty signal peptide proteins were detected for the 352 proteins described within the 10 PAIs identified, suggesting that the majority of proteins involved in the *S. agalactiae* pathogenicity are not secreted. Twelve of the 20 secreted proteins (60%) were located in the SagPAI_5

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

Thus, this study contributes to the understanding of pathogenesis by further delineating the hypervirulence of ST-17 lineages, and also related the presence of uncharacterized proteins transposons, important source of evolutionary novelty in gene regulation.

Thus, the detection of homologous recombination events in *S. agalactiae* ST-17 strains becomes relevant. In this work, the pangenome of 20 strains of human *S. agalactiae* belonging to capsular type III is open ($\alpha = 0.83$), showing a complex set of genetic material and a high level of adaptability by horizontal gene transfer. Furthermore, the PAIs SagPAI_2 and 5 presented two relevant integral regions, which show the mobile genetic elements that can contribute to the hypervirulence and plasticity of the ST-17 lineage.

Transfer mechanisms of mobile elements within *S. agalactiae* remain poorly understood. Future genomic studies are needed to better understand the biological and functional role of these recombination events during the pathogenesis and transmission of the strain, contributing to the development of control strategies against *S. agalactiae* infections.

Análisis genómico comparativo e identificación de islas de patogenicidad del clon brasileño hipervirulento ST-17 de *Streptococcus agalactiae*

Aún no se ha definido cuál es el repertorio preciso de atributos compartidos y únicos que explican la aparición de *Streptococcus agalactiae* como un patógeno importante para las poblaciones humanas.

El polisacárido capsular EGB (CPS) no solo es un factor de virulencia importante, sino que también permite clasificarlo en serotipos. Varios estudios epidemiológicos han identificado una asociación notable de cepas capsulares tipo III de *S. agalactiae* con meningitis. Históricamente, las cepas capsulares tipo III que pertenecen al complejo clonal 17, específicamente la secuencia tipo 17 (ST-17), han sido designadas como "hipervirulentas". En este estudio, se presenta el genoma de la primera cepa (GBS90356) aislada en Brasil perteneciente al tipo III capsular (ST-17). Esta cepa fue aislada de un recién nacido con meningitis fatal y se realizó un análisis comparativo con otras cepas patógenas de *S. agalactiae* recuperadas de datos previamente publicados. Curiosamente, la secuencia de un genoma único no refleja el modo en que la variabilidad genética y la patogénesis se manejan dentro de una especie bacteriana.

Para hacer una estimación más precisa del tamaño del pangenoma de *S. agalactiae*, se incluyeron 109 genomas completos de varios hospedadores (42 cepas humanas, incluida la cepa del estudio, GBS90356, 3 bovinas, 55 de peces y 9 cepas de otros animales). Luego, se

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

calculó el pangenoma para 20 genomas de *S. agalactiae* que pertenecían al tipo III capsular (incluidas 6 cepas ST-17) aisladas de huéspedes humanos, y finalmente, se realizó el análisis de las islas de patogenicidad (PAI) para 6 cepas pertenecientes a ST-17 (NGBS128, COH1, 874391, BM110, SG-M6 y la cepa en estudio GBS90356). Los genes únicos fueron 22 genes individuales para la cepa GBS90356.

Hasta la fecha, el pangenoma abierto ($\alpha = 0.8365$) de *S. agalactiae* tipo III mostró una gran plasticidad, donde las nuevas secuencias del genoma pueden contribuir a la aparición de otros genomas. Los PAI tienen una gran cantidad de genes de virulencia agrupados en bloques que juegan un papel importante en la patogenicidad bacteriana. La detección y el análisis de PAI en el genoma de *S. agalactiae* GBS90356 por el *software* GIPSy v1.1.2 predijeron 10 PAI (SagPAI_1 a SagPAI_10) que correspondían al 15% del tamaño del genoma con un total de 352 genes. En general, los PAI 2, 4, 5 y 8 están pobremente conservados entre las cepas de *S. agalactiae* ST-17 analizadas en este estudio. SagPAI_1 mostró solo genes *cps* y *neu*, que codifican para el ácido siálico y la cápsula de polisacárido, respectivamente, y permiten a las bacterias evadir las defensas inmunes del huésped y conferir la capacidad de desarrollar meningitis. SagPAI_2 presentó un conocido Elemento Conjugativo Integrativo grande (ICE) Tn916 portador del gen *tetM* que confiere resistencia a la tetraciclina. Por otro lado, se encontraron genes de resistencia al mercurio (*mer* operón). En SagPAI_5, se identificaron 135 genes, incluida la proteína de unión a laminina (gen *lmb*), que parece tener un papel pronunciado en el tropismo bacteriano del sistema nervioso central, permitiendo que *S. agalactiae* cruce la barrera hematoencefálica y *lacR*, un supuesto regulador negativo del operón que se une al promotor en ausencia de lactosa. Los PAI 2 y 5 se detectaron principalmente en cepas ST-17 y se relacionaron con la presencia de una integrasa. SagPAI_2 y 5 presentaron genes transportadores ABC. Estos genes codifican para la proteasa de maduración, esencial para la viabilidad celular, virulencia, nutrición, adquisición y exportación de otras sustancias, incluidos los polisacáridos capsulares y la hemolisina. SagPAI_10 presentó el gen *cfb*, que codifica una proteína extracelular formadora de poros conocida como factor CAMP, responsable de la propagación sistémica en el huésped. Los genes PAI de *S. agalactiae* se clasificaron en grupos funcionales GO (Ontología Genética): 102 genes relacionados con el proceso biológico, 105 genes para componentes celulares y 235 para función molecular, comúnmente compartidos por las cepas de *S. agalactiae*.

El estudio de la presencia de regiones de recombinación homólogas y el número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las seis cepas de *S. agalactiae* ST-17 mostró 13

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°2

June 2020

eventos de recombinación para NGBS128, 12 para COH1, 10 para 874391, 9 para GBS90356, 4 para BM110 y no se encontró recombinación para la cepa SG-M6. Curiosamente, se observó un gran número de SNP en la cepa *S. agalactiae* GBS90356 en regiones de recombinación que pueden influir en la adaptabilidad, variabilidad y alta plasticidad genómica bacteriana.

Se detectaron veinte proteínas del péptido señal para las 352 proteínas descritas dentro de los 10 PAI identificados, lo que sugiere que la mayoría de las proteínas involucradas en la patogenicidad de *S. agalactiae* no se secretan. Doce de las 20 proteínas secretadas (60%) se ubicaron en el SagPAI_5.

Por lo tanto, este estudio contribuye a la comprensión de la patogénesis al delinear aún más la hipervirulencia de los linajes ST-17, y también relaciona la presencia de transposones de proteínas no caracterizadas, fuente importante de novedades evolutiva en la regulación génica.

Por lo tanto, la detección de eventos de recombinación homóloga en cepas de *S. agalactiae* ST-17 se vuelve relevante. En este trabajo, el pangenoma de 20 cepas de *S. agalactiae* humano perteneciente al tipo capsular III está abierto ($\alpha = 0,83$) y muestra un conjunto complejo de material genético y un alto nivel de adaptabilidad por transferencia horizontal de genes. Además, los PAI SagPAI_2 y 5 presentaron dos regiones integrales relevantes, que muestran los elementos genéticos móviles que pueden contribuir a la hipervirulencia y plasticidad del linaje ST-17.

Los mecanismos de transferencia de elementos móviles dentro de *S. agalactiae* siguen siendo poco conocidos. Se necesitan futuros estudios genómicos para comprender mejor el papel biológico y funcional de estos eventos de recombinación durante la patogénesis y la transmisión de la cepa y para contribuir al desarrollo de estrategias de control contra las infecciones por *S. agalactiae*.