

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 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

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

Heterogeneity of *Streptococcus anginosus* β -hemolysis in relation to CRISPR/Cas.

Bauer R¹, Neffgen N¹, Grepels A¹, Furitsch M¹, Mauerer S¹, Barbaqadze S², Haase G³, Kestler H⁴, Spellerberg B¹.

1. Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Ulm, Ulm, Germany.
2. General Microbiology Lab, Eliava Bacteriophage, Microbiology and Virology Institute, Tbilisi, Georgia.
3. LDZ Microbiology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany.
4. Institute of Medical Systems Biology, Ulm University, Ulm, Germany.

Mol Oral Microbiol. 2020 Jan 24. doi: 10.1111/omi.12278. [Epub ahead of print]

In spite of being commensal bacteria of the oropharyngeal mucosa, group *S. anginosus* streptococci (GSA) were recognized as important bacterial pathogens in invasive infections.

One virulence factor present in GSA is a streptolysin S (SLS) gene cluster (*sag* genes), conferring a β -hemolytic phenotype. SLS was previously identified and characterized in *S. pyogenes*, other streptococci, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* and *Listeria monocytogenes*. SLS is a small nonimmunogenic bacteriocin-like peptide, encoded by *sagA*, which undergoes extensive posttranslational modifications. Interestingly the *sagA* gene encoding the hemolytic peptide of SLS is duplicated in some strains of GSA, displaying a very prominent β -hemolytic phenotype. However, most clinical GSA isolates are not β -hemolytic.

CRISPR/Cas was first identified as a bacterial immunity system protecting bacteria from invading foreign DNA.

The aim of this study was to characterize the heterogeneity of *sag* gene distribution in β -hemolytic as well as in nonhemolytic GSA strains and to investigate putative determinants of genetic heterogeneity by correlating these findings with the presence of CRISPR/Cas.

Out of 21 β -hemolytic GSA strains, seven contained the duplicated *sagA* gene whereas the rest of the strains harbored only a single *sagA* copy.

All 66 non β -hemolytic strains displayed a uniform genotype and lack the complete SLS operon. In none of the analyzed strains authors could detect a partial deletion of SLS genes or the disruption of hemolysin genes by the insertion of mobile genetic elements.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

One analysis revealed that the single *sagA* copies that were found in the majority of strains (genotype I) were distinct from the duplicated *sagA* genes present in some of the GSA strains (genotype II).

The CRISPR/Cas bacterial immunity system controls the uptake of foreign DNA and has been shown in some species to be negatively associated with the presence of genetic virulence determinants. Correlating CRISPR/Cas genes with hemolysin genes, a strong inverse correlation was detected: a *cas9* gene could be detected in 5 out of 21 β -hemolytic GSA and in 43 out of 66 non β -hemolytic strains.

In GSA the presence or absence of *sag* genes was found to occur in bloc, suggestive of gene cassettes or an integron cassette, and further supports the hypothesis of acquisition of SLS genes by horizontal gene transfer in this species.

In summary authors observed an unusual genetic heterogeneity of *sag* genes in GSA that was further correlated with specific GSA lineages. Several independent findings are suggestive of uptake of SLS genes by horizontal transfer which appears to be controlled through CRISPR/Cas.

Heterogeneidad de la hemólisis de los estreptococos del grupo *S. anginosus* en relación a GSACRISPR/Cas

A pesar de ser bacterias comensales de la mucosa orofaríngea, los estreptococos del grupo *S. anginosus* (GSA), son patógenos bacterianos reconocidos como agentes causales de infecciones invasivas.

El grupo de genes que codifican la estreptolisina S (SLS) (genes *sag*) es un factor de virulencia presente en GSA que confiere un fenotipo β -hemolítico. SLS fue previamente identificado y caracterizado en *S. pyogenes*, otros estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*. SLS es un pequeño péptido similar a una bacteriocina, no es inmunogénico y está codificado por *sagA*, que sufre amplias modificaciones postraduccionales. Curiosamente, el gen *sagA* que codifica el péptido hemolítico de SLS está duplicado en algunas cepas de GSA que muestran un fenotipo β -hemolítico muy prominente. Sin embargo, la mayoría de los aislados clínicos de GSA no son β -hemolíticos.

CRISPR/Cas se identificó por primera vez como un sistema de inmunidad bacteriana que protege a las bacterias de la invasión de ADN extraño.

El objetivo de este estudio fue caracterizar la heterogeneidad de la distribución del gen *sag* en cepas β -hemolíticas y no hemolíticas de GSA e investigar los posibles determinantes de la heterogeneidad genética al correlacionar estos hallazgos con la presencia de CRISPR / Cas.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

De las 21 cepas β -hemolíticas de GSA, siete contenían el gen *sagA* por duplicado, mientras que el resto de las cepas albergaban solo una copia de *sagA*.

Las 66 cepas no β -hemolíticas mostraron un genotipo uniforme carente del operón SLS completo. En ninguna de las cepas analizadas los autores pudieron detectar una eliminación parcial de los genes SLS o la disrupción de los genes de hemolisina mediante la inserción de elementos genéticos móviles.

Un análisis reveló que las copias únicas de *sagA* que se encontraron en la mayoría de las cepas (genotipo I) eran distintas de los genes *sagA* duplicados presentes en algunas de las cepas de GSA (genotipo II).

El sistema de inmunidad bacteriana CRISPR/Cas controla la absorción de ADN extraño y en algunas especies se ha asociado negativamente con la presencia de determinantes de virulencia genética. En GSA se observó una correlación inversa de los genes CRISPR/Cas con los genes de hemolisina: se pudo detectar un gen *cas9* en 5 de 21 GSA β -hemolíticos y en 43 de 66 cepas no β -hemolíticas.

En GSA, se descubrió que la presencia o ausencia de genes *sag* ocurre en bloque, lo que sugiere la presencia de *cassettes* génicos o de un *cassette* integron y respalda aún más la hipótesis de adquisición de genes SLS por transferencia horizontal en esta especie.

En resumen, los autores observaron una heterogeneidad genética inusual de los genes *sag* en GSA que se correlacionó con linajes específicos de este grupo de especies. Varios hallazgos independientes sugieren la incorporación de genes SLS por transferencia horizontal que parece estar controlada a través de CRISPR / Cas.

Clinical Relevance and Molecular Pathogenesis of the Emerging Serotypes 22F and 33F of *Streptococcus pneumoniae* in Spain.

Sempere J¹, de Miguel S², González-Camacho F¹, Yuste J^{1,3} and Domenech M¹.

1. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain,

2. Servicio de Epidemiología de la Comunidad de Madrid, Dirección General de Salud Pública, Madrid, Spain,

3. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain.

Clinical Front. Microbiol 2020. 11:309. doi: 10.3389/fmicb.2020.00309

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

Serotype replacement in *Streptococcus pneumoniae* is a frequent phenomenon after the introduction of conjugated vaccines, with emerging serotypes 22F and 33F as frequent non-PCV13 serotypes in children and adults in some countries. Since the introduction of PCV13 in Spain in the year 2010, isolates of serotypes 22F and 33F are rising among risk populations, being CC433 in 22F and CC717 in 33F the main clonal complexes. Characterization of mechanisms involved in evasion of the host immune response by these serotypes is of great importance in public health because they are included in the future conjugated vaccines PCV15 and PCV20.

The objectives of this study were to evaluate the impact of current vaccine strategies in the epidemiology of serotypes 22F and 33F during the period 2009–2018 and to characterize the ability of those serotypes to form biofilms and avoid the phagocytosis process and produce infection.

Pneumococcal strains of IPD of different serotypes received at the Spanish Pneumococcal Reference Lab (SPRL) from hospitals located at all the Spanish regions through a passive surveillance system were studied.

In children, IPD cases by serotype 22F showed a similar trend until 2016 which is the year when PCV13 was introduced at the national pediatric vaccination calendar, but since 2016 a continuous rise occurred. The proportion of IPD cases by serotype 22F was 1.08% in 2009 and 6.23% in 2018. However, for serotype 33F the situation was stable in the last 10 years. Overall, the results suggest that serotype 22F was more prevalent in children than serotype 33F with a more pronounced effect in the last 2 years concurring with the introduction of PCV13 in the national immunization pediatric calendar.

In adults, serotypes 22F and 33F showed an increase of 52% and 48% respectively, when the pre-PCV13 period (year 2009) was compared to the last year 2018. Incidence rate ratios showed that serotype 22F rapidly increased after PCV13 was introduced in Spain with a constant increasing trend until 2018. For serotype 33F, a similar pattern was observed after the introduction of PCV13.

Isolates of serotype 22F belonged to five different sequence types being 71% of the isolates associated with CC433. In contrast, isolates of serotype 33F showed a less clonal diversity with 93% of the strains associated to CC717.

Regarding to biofilm formation, it was greater in clinical isolates of pediatric origin ($p < 0.001$), and isolates from blood were best biofilm formers than isolates from others sources (CSF, PF, otic) regardless of the serotype analyzed. Additionally, the level of resistance to phagocytosis

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

using clinical isolates from blood and grown as planktonic or biofilms was analyzed. For serotype 22F, no differences were found between pediatric or adult isolates. In serotype 33F, a higher resistance level to phagocytosis was observed in the pediatric isolate grown as planktonic culture, suggesting that children may be more susceptible to IPD by this serotype.

The authors demonstrated that pediatric isolates of 22F and 33F, that form better biofilm than isolates from adults, could have an advantage to colonize the nasopharynx of children and therefore, be important in carriage and subsequent dissemination to the elderly. The increased ability of serotype 22F to avoid the host immune response, might explain the emergence of this serotype in the last years.

Relevancia clínica y patogenia molecular de los serotipos emergentes 22F y 33F de *Streptococcus pneumoniae* en España.

El reemplazo de serotipos en *Streptococcus pneumoniae* es un fenómeno frecuente después de la introducción de vacunas conjugadas, y los serotipos 22F y 33F emergieron en algunos países entre los serotipos no PCV13 en niños y adultos. Desde la introducción de PCV13 en España en el año 2010, los aislamientos de los serotipos 22F y 33F están aumentando entre las poblaciones de riesgo y CC433 en 22F y CC717 en 33F son los principales complejos clonales. La caracterización de los mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune del huésped por estos serotipos es de gran importancia en la salud pública porque están incluidos en las futuras vacunas conjugadas PCV15 y PCV20.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar el impacto de las estrategias actuales de vacuna en la epidemiología de los serotipos 22F y 33F durante el período 2009–2018 y caracterizar la capacidad de esos serotipos para formar biopelículas y evitar el proceso de fagocitosis y producir infección.

Se incluyeron cepas neumocócicas de IPD de diferentes serotipos recibidos en el Laboratorio Español de Referencia Neumocócica (SPRL) de hospitales ubicados en todas las regiones españolas a través de un sistema de vigilancia pasiva.

En niños los casos de IPD por el serotipo 22F mostraron una tendencia similar hasta 2016, que es el año en que se introdujo PCV13 en el calendario nacional de vacunación pediátrica, pero desde 2016 se produjo un aumento continuo. La proporción de casos de IPD por el serotipo 22F fue de 1,08% en 2009 y 6,23% en 2018. Sin embargo, para el serotipo 33F la situación fue estable en los últimos 10 años. En general, los resultados sugieren que el serotipo 22F es más frecuente que el serotipo 33F en niños, con un efecto más pronunciado en los últimos 2 años,

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

hecho que coincide con la introducción de PCV13 en el calendario nacional de inmunización pediátrica. En adultos los serotipos 22F y 33F mostraron un aumento del 52% y 48% respectivamente, cuando se comparó el período anterior a PCV13 (año 2009) con el año 2018. Las tasas de incidencia mostraron que el serotipo 22F aumentó rápidamente luego de la introducción de PCV13 en España con una tendencia creciente constante hasta 2018. Para el serotipo 33F, se observó un patrón similar después de la introducción de PCV13.

Los aislamientos del serotipo 22F pertenecían a cinco secuenciotipos diferentes y el 71% de los aislamientos estaban asociados al CC433. En contraste, los aislamientos del serotipo 33F mostraron menor diversidad clonal, con el 93% de las cepas asociadas al CC717.

La formación de biopelículas fue mayor en aislamientos clínicos de origen pediátrico ($p < 0,001$), y los aislamientos de sangre fueron mejores formadores de biopelículas que los aislamientos de otras fuentes (CSF, PF, ótica) independientemente del serotipo analizado. Adicionalmente se analizó el nivel de resistencia a la fagocitosis utilizando aislamientos clínicos de sangre cultivados como plancton y biopelículas. Para el serotipo 22F, no se encontraron diferencias entre los aislados pediátricos o de adultos. En el caso del serotipo 33F, se observó un mayor nivel de resistencia a la fagocitosis en el aislamiento pediátrico cultivado como cultivo planctónico, lo que sugiere que los niños pueden ser más susceptibles a la IPD por este serotipo.

En conclusión, los autores demostraron que los aislamientos pediátricos de los serotipos 22F y 33F, que forman una mejor biopelícula que los aislamientos de adultos, podrían tener una ventaja para colonizar la nasofaringe de los niños y, por lo tanto, ser importantes en el transporte y posterior diseminación a los ancianos. La mayor capacidad del serotipo 22F para evitar la respuesta inmune del huésped podría explicar la aparición de este serotipo en los últimos años.

Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle.

Tomazi T¹, de Souza Filho AF², Heinemann MB², Veiga dos Santos M^{1,*}

1. Department of Animal Production and Nutrition, Milk Quality Research Laboratory (Qualileite), University of São Paulo, Pirassununga, Brazil.

2. Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Laboratory of Bacterial Zoonosis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

* mveiga@usp.br

PLoS ONE 13(6):e0199561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199561>

Streptococcus agalactiae is a contagious pathogen of bovine mastitis, and the mammary gland is considered as the main reservoir in dairy herds. This microorganism is still an important cause of bovine intramammary infection (IMI) in several regions, such as certain countries in South America.

The aim of the study was to characterize *S. agalactiae* isolates recovered from clinical mastitis (CM) cases in dairy cows and determine the association of antimicrobial susceptibility (AMS) and genotypes clustered according to the genetic similarity.

A total of 89 isolates of *S. agalactiae* recovered from milk samples of 62 dairy cows diagnosed with CM in 9 dairy herds were selected for this study. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was performed and AMS was determined by broth microdilution test for penicillin, ampicillin, oxacillin, cephalothin, ceftiofur, penicillin/novobiocin, erythromycin, pirlimycin, tetracycline, and sulfadimethoxine. Descriptive analysis was used to report the frequency of RAPD-types and genotypic clusters within herd, housing system, season and CM severity scores. The MIC50 and MIC90 of the isolates were calculated and survival analysis was completed to verify the differences of AMS among genotypic clusters.

Results of RAPD showed a great genotypic diversity of *S. agalactiae* (45 RAPD-types) and three clusters (Ia, Ib and II) were created based on the genetic similarity among genotypes. Authors observed high genetic similarity after clustering within and between herds.

Authors observed high susceptibility of strains to most antimicrobials, except to tetracycline and erythromycin. Isolates showed high susceptibility to ampicillin (98.3%), ceftiofur (97.7%), cephalothin (96.5%), oxacillin (96.5%), penicillin+novobiocin (100%), penicillin (97.7%, 2 isolates with MIC = 0.25 µg/ml), pirlimycin (83.7%) and sulfadimethoxine (98.3%). On the other hand, lower susceptibility frequencies were observed for erythromycin (70.9%) and tetracycline (31.4%). According with authors, interpretive criteria for ampicillin, erythromycin, oxacillin, penicillin, sulfadimethoxine and tetracycline were based on human data, but CLSI did not recommend breakpoints for oxacillin or sulfadimethoxine. Moreover, oxacillin MICs observed in this study were excessively high in comparison of the literature data. Differences in the AMS among clusters were observed for ampicillin, ceftiofur, erythromycin, pirlimycin, sulfadimethoxine and tetracycline.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

They concluded that *S. agalactiae* is still highly susceptible to most antimicrobials, although differences in susceptibility to certain antimicrobials were observed among genotypic clusters. High genotypic diversity was found among isolates; however, after clustering based on RAPD results, a high genotypic similarity was observed within and between herds.

Finally, differences in the survival curves were observed among genotypic clusters for six (ampicillin, ceftiofur, erythromycin, pirlimycin, sulfadimethoxine and tetracycline) of 10 antimicrobials evaluated, indicating that AMS can vary according to the strain causing CM.

Caracterización molecular y perfiles de sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* aislado de mastitis clínica en ganado lechero.

Streptococcus agalactiae es agente etiológico de la mastitis bovina y se considera que la glándula mamaria es el principal reservorio en los rebaños lecheros. Este microorganismo continúa siendo una causa importante de infección intramamaria bovina (IMI) en varios países. El objetivo del estudio fue caracterizar los aislamientos de *S. agalactiae* recuperados de casos de mastitis clínica (CM) en vacas lecheras y determinar la asociación de sensibilidad antimicrobiana (AMS) y genotipos agrupados de acuerdo con la similitud genética.

Un total de 89 aislamientos de *S. agalactiae* recuperados de muestras de leche de 62 vacas lecheras diagnosticadas con CM en 9 rebaños fueron seleccionados para este estudio. Se utilizó la técnica de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para la caracterización genotípica y se determinó el perfil de sensibilidad mediante la técnica de microdilución en caldo para penicilina, ampicilina, oxacilina, cefalotina, ceftiofur, penicilina/novobiocina, eritromicina, pirlimicina, tetraciclina y sulfadimetoxina. Se utilizó un análisis descriptivo para informar la frecuencia de los tipos de RAPD y los grupos genotípicos dentro de los puntajes de gravedad de la manada, el sistema de alojamiento, la estación del año y el CM. Se calcularon las CIM50 y CIM90 y se completó el análisis de supervivencia para verificar las diferencias de AMS entre los grupos genotípicos.

Los resultados de RAPD mostraron una gran diversidad genotípica de *S. agalactiae* (45 tipos de RAPD) y se crearon tres grupos (Ia, Ib y II) basados en la similitud genética entre genotipos. Se observó una alta similitud genética de los aislamientos después de la agrupación dentro y entre los rebaños.

Los aislamientos mostraron alta sensibilidad a ampicilina (98,3%), ceftiofur (97,7%), cefalotina (96,5%), oxacilina (96,5%), penicilina + novobiocina (100%), penicilina (97,7%; dos aislados con CIM = 0,25 µg/ml), pirlimicina (83,7%) y sulfadimetoxina (98,3%). Por otro lado, se observaron

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 6, N°1

March 2020

frecuencias de sensibilidad más bajas para eritromicina (70,9%) y tetraciclina (31,4%). Según los autores, los criterios interpretativos para ampicilina, eritromicina, oxacilina, penicilina, sulfadimetoxina y tetraciclina se basaron en datos de cepas humanas, sin embargo el CLSI no dio recomendaciones para el uso de puntos de corte para oxacilina ni para sulfadimetoxina. Además, las CIM de oxacilina obtenidas en este trabajo resultan excesivamente elevadas en comparación con los datos de la literatura. Se observaron diferencias en AMS entre los grupos genotípicos para ampicilina, ceftiofur, eritromicina, pirlimicina, sulfadimetoxina y tetraciclina. Se encontró una gran diversidad genética entre los aislamientos; sin embargo, después de la agrupación basada en los resultados de RAPD, se observó una alta similitud dentro y entre los rebaños.

Finalmente, se observaron diferencias en las curvas de supervivencia entre los grupos genotípicos para seis de diez antimicrobianos evaluados (ampicilina, ceftiofur, eritromicina, pirlimicina, sulfadimetoxina y tetraciclina), lo que indica que la AMS puede variar según la cepa que causa CM.