

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 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

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 2019

Novel multiplex immunoassays for quantification of IgG against group B *Streptococcus* capsular polysaccharides in human sera.

Buffi G¹, Galletti B¹, Stella M¹, Proietti D¹, Balducci E¹, Romano MR¹, Mori E¹, Fabbrini M¹, Giuliani MM¹, Berti F¹, Margarit I¹

1. GSK, Siena, Italy

mSphere 4:e00273-19. 2019. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00273-19>

Group B *Streptococcus* (GBS) infections constitute a major cause of invasive disease during the first three months of life. GBS vaccination of pregnant women can be a valuable strategy to protect their infants. The GBS capsular polysaccharides (CPSs) have shown promise as vaccine targets in clinical studies. Functional antibodies elicited by individual CPS variants are not cross-reactive; hence, each single variant is required for protection against the corresponding serotype, the protection will depend on the establishment of immunological correlates of protection. This implies that the development of a quality-ensured standardized serological assay for the precise quantification of antibody levels against the major GBS CPS serotypes is important. Authors mentioned the controversial results obtained in the past during the development of GBS CPS enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). The use of unconjugated CPSs as ELISA coating agents resulted in poor assay sensitivity, while conjugated polysaccharides were suspected to expose new epitopes or destroy relevant ones and, thus, alter specific IgG quantification. Authors developed two microsphere multiplex immunoassays based on the Luminex technology for the simultaneous determination of CPS-specific IgG antibodies against GBS Ia, Ib, II, III, and V in human sera. The first assay is based on the use of biotinylated CPSs coupled to streptavidin-derivatized magnetic microspheres (Biotin-CPS MIA), while the second is a sandwich assay with plain CPSs coupled to magnetic microspheres coated with polysaccharide-specific mouse monoclonal antibodies (Sandwich MIA). This type of assay allows higher throughput and significant reduction of timing for clinical sample analysis, and it requires lower serum volume than the monovalent ELISAs.

Both assays showed good specificity although the Biotin-CPS MIA presented higher sensitivity and lower complexity than the Sandwich MIA.

The developed Biotin-CPS MIA could represent a valuable tool for the precise quantification of human IgGs directed to the main GBS CPSs and, as such, assist the development of a vaccine against this important pathogen.

Nuevo inmunoensayo múltiple para cuantificación de polisacáridos capsulares IgG de *Streptococcus* grupo B en suero humano

Las infecciones causadas por estreptococos del grupo B (GBS) son la principal causa de las infecciones invasivas en los neonatos. La vacunación de las mujeres embarazadas podría ser una estrategia a implementar para proteger a los infantes. Entre los blancos (*targets*) para las futuras vacunas se encuentra el polisacárido capsular. Los anticuerpos que se generan por las distintas

variantes de polisacárido no poseen reactividad cruzada contra serotipos distintos y es por ello que cada variante capsular requerirá protección contra su propio serotipo. Esto a su vez dependerá de la respuesta inmunológica que se genere. Es por ello que el para la correcta evaluación de una vacuna se requiere el desarrollo de un ensayo serológico estandarizado a fin de poder realizar una precisa cuantificación de los niveles de anticuerpos contra los distintos serotipos de GBS. Los autores mencionan que los resultados obtenidos previamente mediante ELISA son controversiales, como, por ejemplo, el uso de CPS no conjugado que resulta en una disminución de la sensibilidad. En cambio, se cree que con los CPS conjugados se exponen epitopes nuevos o se destruyen aquellos relevantes y es por eso que se altera la cuantificación mediante IgG. Teniendo en cuenta esto, los autores desarrollaron un ensayo múltiple con microesferas, basado en la tecnología Luminex que permite la simultánea detección de los IgG CPS específicos contra los serotipos Ia, Ib, II, III, y V a partir de suero humano. Uno de los ensayos utiliza CPS biotinilado acoplado a microesferas magnetizadas acopladas a estreptavidina (Biotin-CPS MIA), mientras que el segundo ensayo es de tipo *sandwich* con el CPS acoplado a microesferas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales CPS-específicos (Sandwich MIA). Estos tipos de ensayo permiten disminución del tiempo de ensayo a partir de muestras clínicas y requieren menores volúmenes de suero que los ELISA tradicionales monovalentes. Ambos ensayos mostraron buena especificidad, pero Biotin-CPS MIA presentó mayor sensibilidad y menor complejidad que Sandwich MIA.

Los autores concluyen que el ensayo de Biotin-CPS MIA es una herramienta precisa para la cuantificación de IgG humana directamente a partir de los CPS principales de GBS y permitirá ser utilizado en la evaluación de una futura vacuna.

The Yin and Yang of Streptococcus Lung Infections in Cystic Fibrosis: a Model for Studying Polymicrobial Interactions

Scott JE¹, O'Toole GA¹

1. Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire, USA

Journal of Bacteriology.2019. <https://doi.org/10.1128/JB.00115-19>.

Patients with cystic fibrosis (CF) have a thick, dehydrated mucus in their airway, which reduces mucociliary clearance and allows for colonization by bacteria. Historically, *Streptococcus* spp. isolated from airway-derived sputum samples were considered to be oropharyngeal contaminants from the process of expectoration. However, given the proximity of the oral cavity and the lower airway, streptococci are increasingly recognized as members of the pulmonary microbiome with CF.

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 2019

Here, authors analyze the complex role of different *Streptococcus* species in respiratory tract infections associated with CF. Several studies have characterized the correlation between the *Streptococcus milleri* group (SMG; also known as the anginosus group streptococci [AGS]) and pulmonary exacerbation. These studies demonstrate that when SMG isolates are the numerically dominant pathogens in the lung, patients experience an exacerbation that will not resolve until the levels of SMG in the airway have been adequately reduced. Studies that evaluate the interrelation between *P. aeruginosa* and *Streptococcus* species, show increased production of elastase, phenazine and rhamnolipids by strains of *P. aeruginosa* exposed to anginosus group streptococci.

The data so far indicate that some species of oral streptococci can enhance the production of the virulence factor of *P. aeruginosa* in vitro and in vivo.

In addition, recent studies suggest that pathogenic streptococci, such as *S. pyogenes* and *S. pneumoniae*, that are typically associated with acute infections of the respiratory tract, can also be found in the airways of patients with CF and would be associated with an exacerbation of the process.

One report suggests a mechanism by which *P. aeruginosa* could modify the airway environment and could promote the growth or persistence of *S. pneumoniae* and biofilm formation

On the other hand, different recent studies of microbiome and works carried out by the authors indicate that colonization of the CF lung by oral *Streptococcus* spp. may be associated with a disease burden less severe than that associated and correlates with clinical stability.

Perhaps this increased diversity helps to mitigate airway damage directly or by effectively competing against traditional CF pathogens, such as *P. aeruginosa* and *Burkholderia*.

Thus, in contrast to the positive interaction described above, some interactions between *P. aeruginosa* and streptococci can be detrimental to *P. aeruginosa*. For example, oral streptococci, such as *S. oralis*, *S. sanguinis*, and *S. gordonii*, have been shown to produce H₂O₂, which can inhibit *P. aeruginosa* when the streptococci are established as primary colonizers. Likewise, the environmental conditions influence, and the H₂O₂ produced, which reacts with excess nitrite in the medium to form reactive nitrogenous intermediates (RNI) that inhibit *P. aeruginosa* growth. Then, in younger and healthier patients at the onset of the disease it is found that they have a greater diversity in the microbiome of the airway, including more streptococci and, therefore, a lower abundance of pathogens typical of CF.

Just as streptococci can affect *P. aeruginosa*, the converse is true as well. A recent report from the group showed that *P. aeruginosa* limits *Streptococcus* growth, probably via iron sequestration, however, the mechanisms of such underlying interactions are still poorly understood.

The role that streptococci play in the CF lung needs to be investigated further, because the current evidence indicates that the predominance of the *Streptococcus milleri* group correlates with exacerbations, while the increased relative abundance of other streptococci may correlate with a lower disease burden in CF patients. It is currently unclear how these complex relationships between streptococci and outcomes in CF patients are mediated. It is also important to note that there is clearly variability in the observations made regarding interactions as a function of which isolate of *P. aeruginosa* and/or a *Streptococcus* sp; therefore, investigators

should strongly consider using multiple isolates of *P. aeruginosa* (mucoïd and nonmucoïd) and multiple *Streptococcus* species, including *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* to better understand the generality of any finding related to polymicrobial interactions.

El Yin y el Yang de las infecciones pulmonares por estreptococos en fibrosis quística: un modelo para estudiar las interacciones polimicrobianas

Los pacientes con fibrosis quística (FQ) tienen un moco espeso y deshidratado en sus vías respiratorias, que reduce el aclaramiento mucociliar y permite la colonización por bacterias. Históricamente, *Streptococcus* spp. aislados de muestras de esputo se consideraron contaminantes orofaríngeos del proceso de expectoración. Sin embargo, dada la proximidad de la cavidad oral y la vía aérea inferior, los estreptococos son cada vez más reconocidos como miembros del microbioma pulmonar con FQ.

Aquí, se analiza el complejo papel de las distintas especies de estreptococos en las infecciones de las vías respiratorias asociadas a la FQ.

Varios estudios han caracterizado la correlación entre el *Streptococcus* grupo *milleri* (SMG; también conocido como estreptococos del grupo anginosus [AGS]) y la exacerbación pulmonar. Estos estudios demuestran que cuando los aislamientos SMG son patógenos numéricamente dominantes en el pulmón, los pacientes experimentan una exacerbación que no se resolverá hasta que los niveles de SMG en la vía aérea se hayan reducido. Estudios que evalúan la interrelación entre *P. aeruginosa* y especies de estreptococos, demuestran un aumento de producción de elastasa, fenazina y ramnolípidos por cepas de *P. aeruginosa* expuestas a estreptococos del grupo anginosus. Los datos hasta ahora indican que algunas especies de estreptococos orales puede potenciar la producción del factor de virulencia de *P. aeruginosa* *in vitro* e *in vivo*. Además, estudios recientes sugieren que los estreptococos patógenos, tales como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, que generalmente se asocian con infecciones agudas del tracto respiratorio, también pueden encontrarse en las vías aéreas de pacientes con FQ y se asociarían con una exacerbación del proceso.

Un informe sugiere un mecanismo por el cual *P. aeruginosa* podría modificar el ambiente de la vía aérea y podría promover el crecimiento o persistencia de *S. pneumoniae* y la formación de biopelículas.

Por otra parte, distintos estudios recientes de microbioma y trabajos realizados por los autores indican que la colonización del pulmón con FQ por especies de *Streptococcus* spp. de la vía oral puede estar asociado con una carga de enfermedad menos grave y se correlaciona con estabilidad clínica. Quizás esta mayor diversidad ayuda a mitigar el daño de las vías aéreas directamente, reduciendo la inflamación o compitiendo efectivamente contra los tradicionales patógenos de la FQ, como *P. aeruginosa* y *Burkholderia*.

Así, en contraste con la interacción positiva descrita anteriormente, algunas interacciones entre *P. aeruginosa* y estreptococos pueden ser perjudiciales para *P. aeruginosa*. Por ejemplo, se demostró que los estreptococos orales, como *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. gordonii*, producen H₂O₂, que puede inhibir a *P. aeruginosa* cuando los estreptococos se establecen como colonizantes primarios. Asimismo, las condiciones ambientales influyen, y el H₂O₂ producido, puede reaccionar, con exceso de nitrito en el medio, para formar intermedios nitrogenados reactivos

(RNI) que inhiben el crecimiento de *P. aeruginosa*. Entonces, en los pacientes más jóvenes y más sanos al comienzo de la enfermedad se encuentra que tienen una mayor diversidad en el microbioma de la vía aérea, incluyendo más estreptococos y, por lo tanto, una menor abundancia de patógenos típicos de la FQ.

Así como los estreptococos pueden afectar a *P. aeruginosa*, lo contrario también es cierto. Un informe reciente de este grupo de investigadores demostró que *P. aeruginosa* limita el crecimiento de *Streptococcus*, probablemente mediante secuestro de hierro. Sin embargo, los mecanismos de tales interacciones subyacentes todavía son poco conocidos.

El papel que juegan los estreptococos en el pulmón con FQ debe investigarse más a fondo, porque la evidencia actual indica que el predominio de estreptococos del grupo milleri se correlaciona con las exacerbaciones, mientras que la mayor abundancia relativa de otros estreptococos puede correlacionarse con una menor carga de enfermedad en pacientes con FQ. Actualmente no está claro cómo operan estas complejas relaciones entre estreptococos y pacientes con FQ.

También es importante tener en cuenta que hay claramente variabilidad en las observaciones hechas con respecto a las interacciones entre aislamientos de *P. aeruginosa* y / o *Streptococcus* spp. Por lo tanto, los investigadores deben considerar fuertemente el uso de múltiples aislados de *P. aeruginosa* (mucoide y no mucoide) y múltiples especies de *Streptococcus*, inclusive *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* para mejorar la comprensión de cualquier hallazgo relacionado con interacciones polimicrobianas.

Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand

Yongkiettrakul S¹, Maneerat K², Arechanajan B³, Malila Y¹, Srimanote P³, Gottschalk M⁴ and Visessanguan W¹

1. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Rd., KhlongNueng, KhlongLuang, PathumThani 12120, Thailand.

2. College of Alternative Medicine, ChandrakasemRajabhat University, Bangkok, Thailand.

3. Graduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, PathumThani, Thailand.

4. Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, QC, Canada.

BMC Veterinay Research, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1732-5>

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 2019

Streptococcus suis naturally colonizes upper respiratory tract of pigs and it is an important zoonotic bacterial pathogen of pigs and humans worldwide. It can cause systemic diseases in newborn and, more commonly, weaned piglets, resulting in sepsis, meningitis, endocarditis and arthritis, as well as human infection who came in contact with infected pigs or consumed pork products that got contaminated with this pathogenic bacteria. *S. suis* species currently comprise of 38 serotypes. Serotype 2 of *S. suis* is considered as the most common type recovered from both pigs and humans worldwide and other serotypes, such as 1, 3, 5, 7, 8, 9, 14, 16, 21 and 24, are also capable to induce disease in pigs and, some of them, also in humans. In the porcine industry, antimicrobials are used to control infection in pigs due to *S. suis* and prevent transmission to humans through derived foods. However, the increased use of antimicrobial agents in pigs and humans increases resistance and this has become a global problem in recent years.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of *S. suis* isolated from human patients and diseased and asymptomatic pigs in different regions of Thailand.

For it, the antimicrobial sensitivity of 262 strains of *S. suis* to 20 different drugs was analyzed. Was defined as multidrug resistance isolation (MDR), the one that presents resistance to at least three classes of antimicrobials agents. The result showed that there were 144 distinct antimicrobial resistance (AMR) patterns. Overall, 99.3% (260/262) of Thai *S. suis* strains resisted to at least one antibiotic. Susceptibility tests indicated widespread resistance to macrolides and tetracycline of *S. suis* strains in the country. The MDR *S. suis* strains were isolated from pigs only and were found in different isolation periods and different regions of the country. Most of the MDR *S. suis* strains were autoagglutinating (AA) (63 strains) and followed by non-serotype 2 (42 strains), NT (24 strains), and serotype 2 (9 strains). All 27 strains of *S. suis* isolated from human patients showed the highest level of antimicrobial susceptibility. In general, isolates from pigs showed sensitivity to most of the tested antimicrobials. However, *S. suis* strains isolated from asymptomatic pigs from three different sources showed high resistance to ampicillin, chloramphenicol, penicillin G, ciprofloxacin, and trimethoprim/ sulfamethoxazole. In addition, this category of *S. suis* strains also showed the highest frequency of intermediate susceptibility to penicillin G.

The results showed that most of the serotype 2 *S. suis* strains were highly sensitive to antibiotics that act on cell-wall synthesis, and antibiotic that inhibit DNA synthesis. *S. suis*, non-serotype 2, AA, and NT strains exhibited less sensitive to the same drugs and high frequency of intermediate susceptibility to penicillin G. But nevertheless, among the serotypes described, serotype 2 is the most virulent and frequently isolated from both diseased pigs and human patients.

This study revealed similar AMR patterns in *S. suis* strains isolated from different sources and in discrete periods of time and this could suggest a zoonotic transmission of AMR *S. suis* between pigs and humans. The AMR patterns of Thai *S. suis* isolated strains also revealed that only *S. suis* strains isolated from pigs exhibited MDR and most of the MDR *S. suis* strains were isolated from asymptomatic pigs. This finding confirmed that asymptomatic pigs could potentially serve as reservoirs for MDR *S. suis*.

Beta-lactam antibiotics remain as the most effective therapeutic drugs for the treatment of *S. suis* infection in both humans and pigs in Thailand; however, a high prevalence of intermediate

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 2019

susceptibility of Thai-isolated *S. suis* to penicillin G, gentamicin, enrofloxacin, and norfloxacin indicates a tendency for AMR problems in the future.

It is important to continuously monitor the antimicrobial susceptibility of *S. suis*, particularly in countries with intensive pig production.

Sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus suis* aislado de cerdos enfermos, cerdos asintomáticos y pacientes humanos en Tailandia

Streptococcus suis coloniza naturalmente el tracto respiratorio superior de los cerdos y es un importante patógeno bacteriano zoonótico de cerdos y humanos en todo el mundo. Puede causar enfermedades sistémicas en lechones recién nacidos y, más comúnmente, destetados, lo que resulta en sepsis, meningitis, endocarditis y artritis, así como infección en humanos que entraron en contacto con cerdos infectados o consumieron productos de cerdos contaminados con esta bacteria patógena. *S. suis* actualmente comprende 38 serotipos. *S. suis* serotipo 2 se considera el más común recuperado de cerdos y humanos en todo el mundo y otros serotipos, como 1, 3, 5, 7, 8, 9, 14, 16, 21 y 24, son capaces de inducir enfermedad en cerdos y, algunos de ellos, también en humanos. En la industria porcina, los antimicrobianos se usan para controlar la infección debida a *S. suis* en cerdos y prevenir la transmisión a los humanos a través de alimentos derivados. Sin embargo, el mayor uso de agentes antimicrobianos en cerdos y humanos eleva la resistencia y esto se ha convertido en un problema global en los últimos años.

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *S. suis* de pacientes humanos y cerdos enfermos y asintomáticos en diferentes regiones de Tailandia.

Para ello, se analizó la sensibilidad de 262 cepas de *S. suis* a 20 drogas diferentes.

Se definió como aislamiento resistente a múltiples drogas (MDR), el que presentaba resistencia a al menos tres clases de agentes antimicrobianos. Los resultados mostraron 144 patrones distintos de resistencia a los antimicrobianos (AMR). En general, el 99,3% (260/262) de las cepas de *S. suis* tailandesas fueron resistentes al menos a un antibiótico. Las pruebas de sensibilidad indicaron resistencia generalizada a macrólidos y tetraciclinas en cepas de *S. suis* en el país. Las cepas de *S. suis* MDR se aislaron solo de cerdos y se encontraron en diferentes períodos de aislamiento y en diferentes regiones del país. La mayoría de las cepas de *S. suis* MDR fueron autoaglutinantes (AA) (63 cepas) y seguidas de no serotipo 2 (42 cepas), NT (24 cepas) y serotipo 2 (9 cepas). Las 27 cepas de *S. suis* aisladas de pacientes humanos mostraron el mayor nivel de sensibilidad a los antimicrobianos. En general, los aislamientos de cerdos mostraron sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos probados. Sin embargo, las cepas de *S. suis* aisladas de cerdos asintomáticos de tres fuentes diferentes mostraron alta resistencia a ampicilina, cloranfenicol, penicilina, ciprofloxacina y trimetoprima/sulfametoxazol. Además, esta categoría de cepas de *S. suis* mostró la más alta frecuencia de sensibilidad intermedia a penicilina. Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas de *S. suis* serotipo 2 fueron muy sensibles a los antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared celular y a los antibióticos que inhiben la síntesis de ADN. Las cepas de *S. suis*, no serotipo 2, AA y NT exhibieron menos sensibilidad a los mismos antibióticos y una alta frecuencia de sensibilidad intermedia a la penicilina. Sin

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°3

September 2019

embargo, entre los serotipos descritos, el 2 es el más virulento y frecuentemente aislado tanto de cerdos enfermos como de pacientes humanos.

Este estudio reveló patrones de AMR similares en cepas de *S. suis* aisladas de diferentes fuentes y en períodos de tiempo discretos y esto podría sugerir una transmisión zoonótica de *S. suis* AMR entre cerdos y humanos. Los patrones de AMR de las cepas aisladas de *S. suis* tailandesas también revelaron que solo las cepas de *S. suis* aisladas de cerdos exhibieron MDR y la mayoría de las cepas de *S. suis* MDR se aislaron de cerdos asintomáticos. Este hallazgo confirmó que los cerdos asintomáticos podrían servir potencialmente como reservorios de *S. suis* MDR.

Los antibióticos beta-lactámicos siguen siendo los más efectivos para el tratamiento de la infección por *S. suis* tanto en humanos como en cerdos en Tailandia; sin embargo, una alta prevalencia de aislamientos de *S. suis* con sensibilidad intermedia a penicilina G, gentamicina, enrofloxacin y norfloxacin indica una tendencia a problemas de resistencia a los antimicrobianos en el futuro.

Es importante monitorear continuamente la sensibilidad a los antimicrobianos en *S. suis*, particularmente en países con producción intensiva de cerdos.