

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°2

June 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°2

June 2019

First case in Korea of Group B *Streptococcus* with reduced penicillin susceptibility harboring amino acid substitutions in penicillin-binding Protein 2X.

Ahram Yi¹, Chang-Ki Kim², Kouji Kimura³, Yoshichika Arakawa³, Mina Hur⁴, Yeo-Min Yun⁴ and Hee-Won Moon⁴

1. Department of Laboratory Medicine, Green Cross Laboratories, Yongin, Korea;
2. Seoul Clinical Laboratories, Yongin, Korea;
3. Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan;
4. Department of Laboratory Medicine, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

Annals of Laboratory medicine.2019 <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.4.414>

Penicillin is the preferred choice for intrapartum antimicrobial prophylaxis and the treatment of GBS infections. Although GBS is mostly susceptible to penicillin, clinical isolates with reduced susceptibility to penicillin or ampicillin have been reported in Japan, USA and Mozambique. Authors report two GBS isolates with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) harboring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2X (PBP2X) isolated from two adult patients. This is the first report on PRGBS in Korea.

Case 1: A 76-year-old Korean woman presented with dyspnea and mild fever. She had been suffering from multiple diseases, and had been treated with antimicrobials for septic shock in a long-term care facility. At admission, a computed tomography scan of her chest revealed signs of pneumonia. *Streptococcus agalactiae* colonies identified by using a Vitek 2 (bioMérieux)(93% probability), and confirmed with the CAMP test and a 16S rRNA sequencing.

Case 2: An 87-year-old Korean woman presented with fever, cough, and sputum for several days. She was treated with tazobactam/piperacillin in a long-term care facility for at least five days. She suffered from dementia, Parkinson's disease, and intraventricular hemorrhage. A chest CT scan revealed signs of pneumonia. From sputum collected on the 23rd day after admission, *S. agalactiae* was obtained by culture and was identified by using the Vitek 2 (97%), and confirmed with a 16S rRNA sequencing.

These two isolates were non-susceptible to penicillin according to commercial minimal inhibitory concentration (MIC) tests, including Vitek 2 AST-ST01, E-test (bioMérieux) and additional antibiotic susceptibility tests, using the broth microdilution method according to the CLSI and a Sensititre DKMGN panel (TREK Diagnostic Systems). However, they were susceptible to ampicillin (MIC≤0.25 µg/mL), cefotaxime, ceftriaxone, linezolid, trimethoprim/sulfamethoxazole, and vancomycin, and resistant to erythromycin, clindamycin, levofloxacin, and tetracycline, according to the CLSI guidelines. Because amino acid substitutions in PBP2X are considered the first step towards β-lactam non-susceptibility the pbp2x sequence was analyzed. Amino acid substitutions in PBP2X (G398A, V405A, and Q557E) were identified in both isolates.

The CLSI defines GBS susceptibility to penicillin as an MIC ≤0.12 µg/mL. Non-susceptibility to penicillin is associated with the acquisition of amino acid substitutions near the active-site motifs

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°2

June 2019

in the transpeptidase domain of PBP2X, and two amino acid substitutions in PBP2X, V405A and/or Q557E, are regarded as key substitutions. Most of the PRGBS reported in the literature were from elderly patients; in Japan, most isolates were from sputa of elderly patients, similar to our cases. Both isolates had V405A and Q557E substitutions in PBP2X, supporting the fact that these isolates are PRGBS. Kimura et al. proposed PRGBS classification based on amino acid substitutions in PBPs (PBP2X, PBP2B, PBP2A, PBP1B, and PBP1A); they suggested that amino acid substitution in PBP2X is key and the first step towards β -lactam non-susceptibility. Additional data on molecular subtypes are needed to clarify microbiological and clinical characteristics of each isolate.

Primer caso en Corea de estreptococos del grupo B con sensibilidad reducida a la penicilina y que presentan sustituciones de aminoácidos en la proteína ligadora de penicilina 2X.

La penicilina es la opción preferida para la profilaxis antimicrobiana intraparto y el tratamiento de infecciones por EGB. Aunque el EGB es mayormente sensible a la penicilina, se han reportado aislamientos clínicos con sensibilidad reducida a la penicilina o ampicilina en Japón, Norteamérica y Mozambique. Los autores reportaron dos aislamientos de EGB con sensibilidad reducida a la penicilina (PRGBS) que presentaban sustituciones de aminoácidos en la proteína ligadora de penicilina 2X (PBP2X) aislados de dos pacientes adultos. Estos son los primeros casos descritos en Korea.

Caso 1: una mujer coreana de 76 años se presentó con disnea y fiebre leve. Había padecido múltiples enfermedades y había sido tratada con antimicrobianos para el *shock* séptico en un centro de atención de pacientes crónicos. Al ingreso, una tomografía computarizada de su tórax reveló signos de neumonía. Desarrolló *Streptococcus agalactiae* en el esputo identificado por un sistema Vitek 2 (bioMérieux) (93% de probabilidad) y confirmado por una prueba CAMP. Además se confirmó y por secuenciación del gen *16s rRNA*.

Caso 2: una mujer coreana de 87 años se presentó con fiebre, tos y esputo durante varios días. Fue tratada con piperacilina/tazobactama en un centro de atención a largo plazo durante al menos cinco días. Sufría de demencia, enfermedad de Parkinson y hemorragia intraventricular. Una tomografía computarizada del tórax reveló signos de neumonía. Del esputo recolectado el día 23 después de la admisión se cultivó *S. agalactiae*, identificado con Vitek 2 (97%) y confirmado por secuenciación del gen *16s rRNA*.

Estos dos aislamientos no fueron sensibles a la penicilina de acuerdo con las pruebas comerciales de CIM, incluyendo Vitek 2 AST-ST01, E-test (bioMérieux) y pruebas adicionales de sensibilidad: microdilución en caldo según CLSI y un panel Sensititre DKMGN (TREK Diagnostic Systems). Sin embargo, fueron sensibles a la ampicilina (MIC \leq 0,25 μ g / ml), cefotaxima, ceftriaxona, linezolid, trimetoprima/sulfametoxazol y vancomicina, y resistentes a la eritromicina, clindamicina, levofloxacina y tetraciclina, según las recomendaciones del CLSI.

Debido a que las sustituciones de aminoácidos en PBP2X se consideran el primer paso hacia la no-susceptibilidad de β -lactámicos, se analizó la secuencia de *pbp2x*. Las sustituciones de aminoácidos en PBP2X (G398A, V405A y Q557E) se identificaron en ambos aislamientos. El CLSI

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°2

June 2019

define la sensibilidad de los EGB a la penicilina por una CIM $\leq 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. La no sensibilidad a la penicilina se asocia con la adquisición de sustituciones de aminoácidos cerca del sitio activo en el dominio transpeptidasa de PBP2X, y dos sustituciones de aminoácidos en PBP2X, V405A y/o Q557E, que se consideran sustituciones clave.

La mayoría de los PRGBS reportados en la literatura fueron de pacientes ancianos; en Japón, la mayoría de los aislamientos fueron de pacientes ancianos, similares a estos casos. Ambos aislamientos tuvieron sustituciones V405A y Q557E en PBP2X, lo que respalda el hecho de que estos aislamientos son PRGBS. Kimura *et al.* propusieron la clasificación de PRGBS basada en sustituciones de aminoácidos en PBP (PBP2X, PBP2B, PBP2A, PBP1B y PBP1A) y sugirieron que la sustitución de aminoácidos en PBP2X es clave y el primer paso hacia la no sensibilidad a los β -lactámicos. Se necesitan datos adicionales sobre los subtipos moleculares para aclarar las características microbiológicas y clínicas de cada aislamiento.

Subinhibitory concentrations of amoxicillin, lincomycin, and oxytetracycline commonly used to treat swine increase *Streptococcus suis* biofilm formation

Waack U^{1,2}, Nicholson TL^{2*}

1. United States Department of Energy, Oak Ridge Institute for Science and Education, Oak Ridge, TN, United States
2. United States Department of Agriculture, National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, Ames, IA, United States

Frontiers in Microbiology 2018; 9: 2707. doi: 10.3389/fmicb.2018.02707

Streptococcus suis is a gram positive pathogen that colonizes the respiratory tract of pigs. Infected animals may remain asymptomatic carriers or develop clinical signs of disease including pneumonia, meningitis, and arthritis. Asymptomatic carriers are considered a transmission reservoir and can serve as a source of infection for other animals. Biofilms formation is a bacteria's survival method that contributes to chronic or persistent infections. Growth in biofilms may increase the ability of bacteria to survive external challenges such as antimicrobials, host immune factors, environmental stressors and changes in nutrient availability. Authors hypothesized that sub-MICs of important antibiotics used in the swine industry would increase the formation of *S. suis* biofilm. To address this hypothesis, authors measured the development of *S. suis* biofilms upon exposure to sub-MICs of antibiotics under both static and flow-cell conditions. They studied a virulent *S. suis* strain (ISU606) isolated from a pig displaying neurological symptoms consistent with *S. suis* disease and obtained from the Iowa State University College of Veterinary Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, Ames, IA. MICs against ISU606 were determined by a standard broth dilution method for twelve antibiotics: amoxicillin, bacitracin, carbadox, chlortetracycline, lincomycin, neomycin, oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, gentamicin, sulfadimethoxine, and tiamulin. If ISU606 was

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°2

June 2019

determined to be resistant to an antibiotic, a therapeutic concentration was used for all subsequent experiments. The appropriate concentration of antibiotic was added to the overnight cultures of ISU1606 and static biofilm and flow-cell biofilm assays were performed. Chosen antibiotics were those commonly used to treat any swine disease and typically administered through food or water for two main reasons. First, a common and efficient treatment practice routinely involves administering antibiotics in the food or water when a pig in the shared space exhibits symptoms consistent with a bacterial infection. Subsequently, clinically healthy pigs may come into contact with an antibiotic that is not effective against *S. suis*. Secondly, due to their rooting behavior, pigs have the potential for small amounts of food and/or water to contact areas within their upper respiratory tract, such as nasal passages, where bacteria present there would be exposed to antibiotics.

Of the 12 antibiotics tested, three increased biofilm formation at sub-MICs: amoxicillin, lincomycin, and oxytetracycline. Amoxicillin demonstrated a statistically significant increase at 1/2 and 1/4 MICs. Lincomycin resulted in a significant increase in biofilm formation at 1/2, 1/4, and 1/32 MIC, suggesting a biphasic relationship between antibiotic concentration and biofilm formation. Oxytetracycline significantly increased biofilm formation at 1/4, 1/8, and 1/16 MICs. The other nine antibiotics did not increase biofilm formation at any concentration tested. Using the concentrations identified as effective in increasing biofilm formation in *S. suis* strain ISU1606, the biofilm formation of an additional 11 clinical *S. suis* isolates was measured. All strains increased biofilm production when exposed to sub-MIC concentrations of amoxicillin, lincomycin, or oxytetracycline. Lincomycin increased biofilm production in eight of the 11 tested strains, while amoxicillin increased seven and oxytetracycline increased three. These results demonstrate that increased biofilm formation after exposure to sub-MIC concentrations of these antibiotics is a species-wide phenotype and not limited to single *S. suis* isolate. The increased biofilm formation resulting from sub-MICs of lincomycin is especially concerning given that the therapeutic dose was utilized in the biofilm assays. Thus, if a swine herd was being treated with lincomycin for respiratory symptoms, it would be feasible for *S. suis* colonizing the respiratory tract of a member of the herd to be potentially exposed to sub-MICs of lincomycin that could lead to increased biofilm formation.

Concentraciones subinhibitorias de amoxicilina, lincomicina y oxitetraciclina comunmente usadas para el tratamiento de cerdos aumentan la formación de *biofilms* por *Streptococcus suis*

S. suis es un patógeno gram positivo que coloniza el tracto respiratorio de los cerdos. Los animales infectados pueden permanecer como portadores asintomáticos o desarrollar signos clínicos de infección como neumonía, meningitis o artritis. Los portadores asintomáticos son considerados como reservorios de transmisión y pueden servir como fuentes de infección de otros animales. La formación de *biofilms* es un método de supervivencia de la bacteria que contribuye al desarrollo de infecciones crónicas o persistentes. El crecimiento en *biofilms* puede aumentar la habilidad para sobrevivir a desafíos externos como la exposición a antimicrobianos

LANCEFIELD STREPTOCOCCAL NEWSLETTER

Vol 5, N°2

June 2019

o a factores inmunes del huésped, como el estrés ambiental y cambios en la disponibilidad de nutrientes. Los autores se preguntaron si las concentraciones sub-CIM de algunos antibióticos utilizados en la industria porcina podrían incrementar la formación de *biofilms* en *S. suis*. Para abordar esta hipótesis, midieron el desarrollo de *biofilms* en *S. suis* bajo la exposición a concentraciones sub-CIM de antibióticos bajo condiciones de estáticas o en flujo celular. Se estudió una cepa virulenta de *S. suis* (ISU1606) aislada de un cerdo con síntomas neurológicos compatibles con enfermedad por *S. suis* y obtenida del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria del estado de Iowa. Se determinó la CIM contra ISU1606 por el método de dilución en caldo para doce antibióticos: amoxicilina, bacitracina, carbadox, clortetraciclina, lincomicina, neomicina, oxitetraciclina, tilosina, enrofloxacin, gentamicina, sulfadimetoxina y tiamulina. En caso de que la cepa ISU1606 se manifestara resistente a algún antibiótico, en los experimentos posteriores se utilizó la concentración terapéutica.

Se agregaron las concentraciones apropiadas de antibiótico a los cultivos y se realizaron los ensayos de *biofilms* estáticos y con flujo. Los antibióticos seleccionados fueron los comunmente usados para tratamiento de cualquier infección en porcinos y generalmente administrados a través del alimento o agua, por dos razones. Primero porque es la vía más común y eficiente cuando un cerdo, que se encuentra en un ambiente compartido, muestra síntomas de infección bacteriana. Por lo tanto, cerdos clínicamente sanos pueden entrar en contacto con antibióticos que no son efectivos contra *S. suis*. En segundo lugar, las vías respiratorias altas del animal (como sus fosas nasales) y las bacterias allí presentes, pueden tener contacto con pequeñas cantidades de alimento o agua, y así verse expuestas al antibiótico. De los doce antibióticos estudiados, tres mostraron aumento estadísticamente significativo de la formación de *biofilm* a concentraciones sub-CIM: amoxicilina, lincomicina y oxitetraciclina. Amoxicilina lo hizo a 1/2 y 1/4 de la CIM, lincomicina a 1/2, 1/4 y 1/32 de la CIM, lo que sugirió una relación bifásica entre la concentración del antibiótico y la formación del *biofilm*; y oxitetraciclina a 1/2, 1/4 y 1/16. Los otros nueve antibióticos no aumentaron la formación de *biofilm* a ninguna de las concentraciones estudiadas. Se estudió la formación de *biofilms* en otros once aislamientos clínicos de *S. suis*, con las concentraciones identificadas como efectivas en aumentar la formación de *biofilms* en ISU1606. Todas las cepas incrementaron la formación de *biofilm* cuando fueron expuestas a concentraciones sub-CIM de amoxicilina, lincomicina y oxitetraciclina. Lincomicina aumentó la producción de *biofilm* en ocho de once cepas, mientras que amoxicilina lo hizo en siete y oxitetraciclina, en tres. Estos resultados demuestran que el incremento en la formación de *biofilm* por exposición a concentraciones sub-CIM de algunos antibióticos es un fenotipo de especie y no estaría limitado a una cepa en particular de *S. suis*. El incremento en la formación de *biofilm* por exposición a concentraciones sub-CIM de lincomicina es preocupante, dado que en el ensayo de *biofilm* se usó la concentración terapéutica. Por lo tanto, si una piara de cerdos fuera tratada con lincomicina por síntomas respiratorios, podría ser posible que *S. suis* colonizantes del tracto respiratorio de un miembro del grupo de animales expuestos a concentraciones sub-CIM de lincomicina, aumentaran su capacidad de formación de *biofilms*.

Impact on public health of the spread of high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci

Sparo M¹, Delpech M¹ and García Allende N²

1. Clinical Department, Medicine School, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina,

2. Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina

Front. Microbiol. 9:3073. doi: 10.3389/fmicb.2018.03073

Enterococci are intrinsically resistant to many antimicrobials groups. These bacteria colonize dairy and meat products and integrate the autochthonous microbiota of mammal's gastrointestinal tract. Antimicrobials consumption constitutes an important risk factor for colonization with multi-drug resistant enterococci because of the suppression of the competitive indigenous microbiota in the gastrointestinal tract. Antimicrobials can be used in animal husbandry with therapeutic, prophylactic/metaphylactic and growth promotion purposes. Despite the use of antibiotics as growth promoters has been forbidden in many countries, worldwide, foods supplemented with antimicrobials are freely acquired in several countries with no veterinarian control, including in Argentina. In enterococci, vancomycin resistance is associated with different *van* genotypes each corresponding with a typical Van phenotype. These genes are chromosomal or extrachromosomal encoded in transposons and/or plasmids. In human *E. faecalis* and *E. faecium*, VanA and VanB (inducible resistance) are the most relevant types. In the last decades, *vanA-E. faecium* were recovered from animals and food of this origin. In humans, *E. faecium* is the main reservoir of VanA and VanB phenotypes. Acquisition of high-level aminoglycoside resistance (HLGR) is a significant therapeutic problem for patients with severe infections because it negates the synergistic effect between aminoglycosides and a cell-wall-active agent. The most ubiquitous HLGR gene among human and food enterococci is *aac* (6')-Ie-aph (2'')-Ia that encodes AAC(6')-APH(2'')-Ia, with acetyltransferase and phosphotransferase activities. Enterococci with this enzyme express resistance to available aminoglycosides, except for streptomycin. Due to the fast dissemination of this genetic determinant, the impact of its horizontal transferability among enterococcal species from different origin has been considered. The extensive use of antibiotics in food-producing animals contributes to an increase in drug-resistant animal bacteria that can be transmitted to humans. Innovation is needed for the development of new antibacterial drugs and for the design of combination therapies with conventional antibiotics. Nowadays, semi-purified bacteriocins and probiotics are becoming an attractive alternative to the antibiotic in animal production. Therefore, a better understanding of a complex and relevant issue for Public Health such as high-level vancomycin and gentamicin resistance in enterococci and their impact is needed. It is necessary to consider the spread of *vanA E. faecium* and high-level gentamicin resistant *E. faecalis* strains of different origin in the environment, and also highlight the potential horizontal transferability of these resistance determinants to other bacteria.

Impacto en salud pública de la diseminación de enterococos con resistencia de alto nivel a gentamicina y resistencia a vancomicina

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchas clases de antibióticos. Estas bacterias colonizan los productos lácteos y cárnicos e integran la microbiota autóctona del tracto gastrointestinal de los mamíferos. El consumo de antibióticos constituye un importante factor de riesgo para la colonización con enterococos resistentes a múltiples drogas debido a la supresión de la microbiota indígena competitiva en el tracto gastrointestinal. Los antibióticos se usan en la cría de animales con fines terapéuticos, profilácticos / metafilácticos y como promotores del crecimiento. A pesar de que el uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha sido prohibido en muchos países, los alimentos suplementados con antibióticos se pueden adquirir libremente en varios países sin control veterinario, incluso en la Argentina. En los enterococos, la resistencia a la vancomicina se asocia con diferentes genotipos *van*, cada uno correspondiente a un fenotipo Van característico. Estos genes son cromosómicos o extracromosómicos codificados en transposones y / o plásmidos. En humanos los fenotipos más relevantes son *E. faecalis* y *E. faecium* VanA y VanB (resistencia inducible). En las últimas décadas, *vanA-E. faecium* fueron recuperados de animales y alimentos de origen animal. En humanos, *E. faecium* es el principal reservorio de los fenotipos VanA y VanB. La adquisición de resistencia a los aminoglucósidos de alto nivel (HLGR) es un problema terapéutico importante para los pacientes con infecciones graves, ya que anula el efecto sinérgico entre los aminoglucósidos y un agente activo de la pared celular. El gen HLGR más ubicuo entre los enterococos humanos y de alimentos es *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica la enzima AAC(6')-APH(2'')-Ia con función de acetiltransferasa y fosfotransferasa. Los enterococos con esta enzima expresan resistencia a los aminoglucósidos disponibles, excepto a la estreptomina. Debido a la rápida diseminación de este determinante genético, se ha considerado el impacto de su transferibilidad horizontal entre especies enterocócicas de diferente origen. El uso extensivo de antibióticos en animales productores de alimentos contribuye a un aumento de bacterias resistentes a los antibióticos en animales que pueden transmitirse a los seres humanos. Se necesita innovación para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos y para el diseño de terapias combinadas con antibióticos convencionales. Hoy en día, las bacteriocinas y los probióticos semipurificados se están convirtiendo en una alternativa atractiva a los antibióticos en la producción animal. Por lo tanto, se necesita una mejor comprensión de la resistencia a vancomicina y a altos niveles de gentamicina en enterococos y su impacto en la salud pública. Es necesario considerar la propagación de las cepas de *E. faecium vanA* y *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a gentamicina de distinto origen en el medio ambiente, y la posibilidad de transferencia horizontal de estos determinantes de resistencia a otras bacterias.