

Aspetti microbiologici emergenti: i Gram positivi

Edoardo Carretto

S.C. Microbiologia -IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova
Reggio Emilia

SIMIT: Attualità in infettivologia
Le infezioni associate alle cure sanitarie, Ferrara 20 giugno 2013

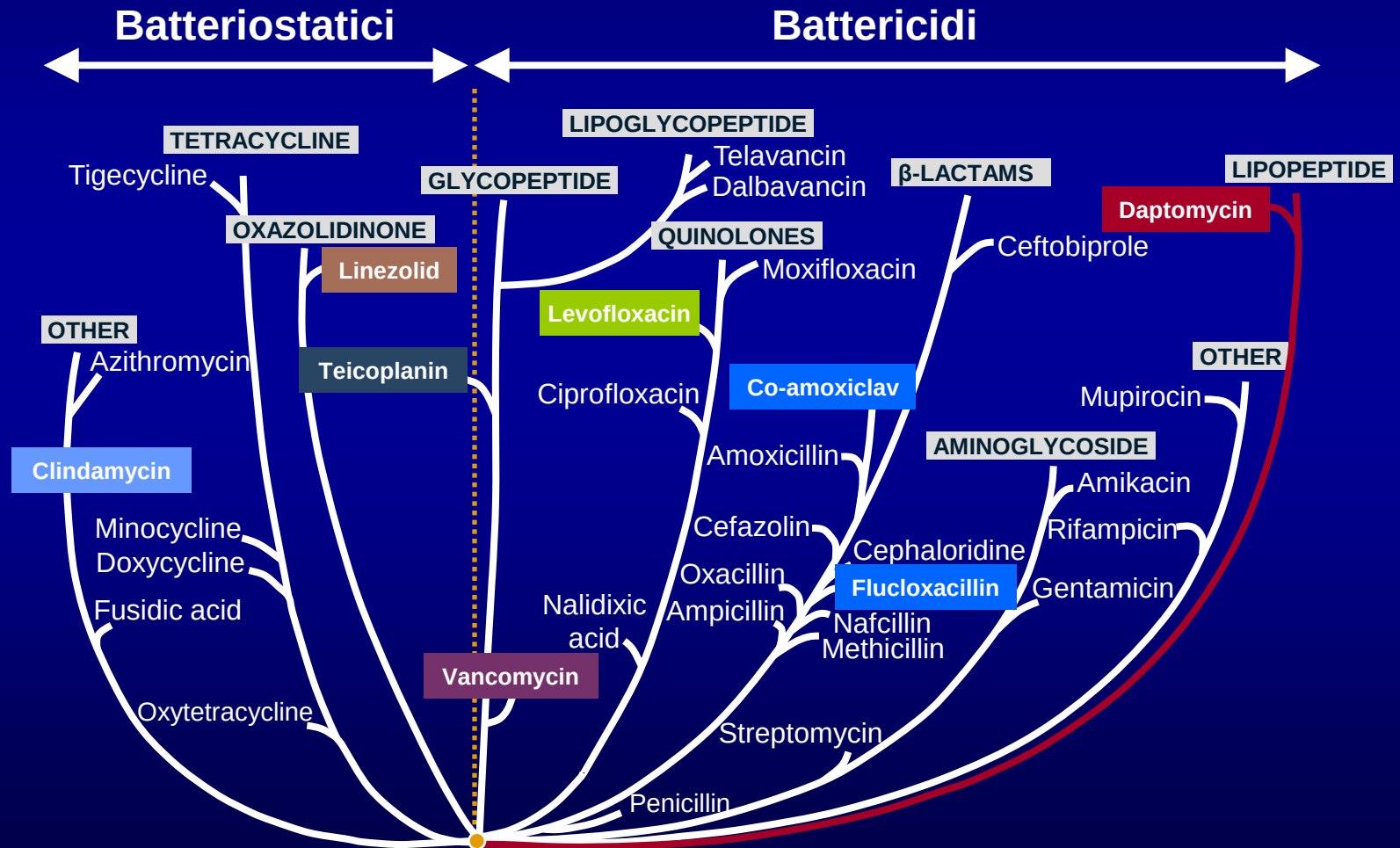
Infezioni associate all'assistenza: ruolo dei Gram positivi

- Infezioni delle vie urinarie (enterococchi)
- Polmoniti associate a ventilazione (stafilococco aureo)
- Infezioni di ferita chirurgica (stafilococco aureo, enterococchi...)
- Sepsì (stafilococco aureo)
- Sepsì correlate a dispositivi intravascolari (stafilococchi coagulasi negativi)
- ...

Armamentario terapeutico

- Oxacillina, cefalosporine di I generazione (MSSA)
- Aminopenicilline (*Enterococcus faecalis*)
- Glicopeptidi (MRSA, *Enterococcus faecium*)
- Linezolid
- Daptomicina
- Tigeciclina
- ... ceftobiprole, dalbavancina, oritavancina, telavancina, omadacycline, pleuromutiline (?) ...

Attività batteriostatica – battericida per i diversi antibiotici



Gram positivi e β -lattamici: meccanismi di resistenza

- **Inattivazione enzimatica dell'antibiotico:** le beta-lattamine sono inattivate da enzimi, denominati β -lattamasi, che idrolizzano il legame amidico dell'anello β -lattamico con formazione di derivati inattivi. Tali enzimi possono essere a codificazione cromosomica o plasmidica, inducibili o costitutivi, prodotti da batteri Gram positivi o negativi.
- **Modificazione del sito bersaglio:** tale meccanismo prevede alterazioni nelle PBP capaci di impedire il legame dell'antibiotico al sito bersaglio.
- **Diminuita penetrazione** dell'antibiotico nella cellula: è un meccanismo che determina bassi livelli di resistenza ed è dovuto a cambiamenti delle strutture esterne.
- **Espulsione dell'antibiotico dalla cellula batterica attraverso pompe di efflusso**, raramente.

Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)

- Ceppi di SA con CMI per la meticillina di 4 mcg/ml.
- In essi, tuttavia, la resistenza non è dovuta alla presenza del gene *mecA*.
- Producono invece quantità elevate di β -lattamasi, che sono parzialmente in grado di inattivare l'oxacillina e altri β -lattamici. Sono stati eccezionalmente descritti ceppi BORSA che presentano mutazioni delle PBPs -1, -2 e -4, sempre senza possedere il gene *mecA*.
- Questi ceppi sono riconoscibili poiché:
 - non possiedono il gene *mecA*
 - non sono multiresistenti (altre classi di antibiotici)
 - non crescono su oxacillin-salt agar
- Restano sensibili a terapia con β -lattamine coniugate.

Gene *mecA*

- L'espressione genica per le PBP2a è sotto il controllo di un complesso di geni denominati *mec* complex.
- Il gene *mecA* porta l'informazione per la proteina PBP2a, il gene *mecI* esprime una proteina che reprime l'espressione del *mecA*, infine il *mecRI* codifica l'espressione di una proteina che funge da co-induttore del gene *mecA*.
- Questo complesso di geni ha una localizzazione cromosomica, ma presenta anche elementi genetici mobili (inserzione di sequenza-trasposoni) che vengono utilizzati per la diffusione attraverso plasmidi.

SA: resistenza alla meticillina

- La quasi totalità dei SAMR produce anche β -lattamasi.
- La resistenza alla meticillina comporta resistenza a tutti i β -lattamici
- E' frequente per questi ceppi una resistenza multipla: oltre che per i β -lattamici anche per fluorchinoloni, macrolidi, lincosamidi, tetracicline e aminoglicosidi. Essi mostrano una resistenza variabile ad antibiotici quali cotrimoxazolo e rifamicine.
- Recenti studi di epidemiologia molecolare hanno messo in evidenza l'origine clonale di ceppi di SAMR: il fenotipo più diffuso nel nostro paese mostra sensibilità a glicopeptidi, rifampicina e cotrimoxazolo, con resistenza a tutte le altre molecole.

MRSA, some new

- Alla fine del secolo scorso viene segnalato CA-MRSA, che inizialmente possiede SCCmec types IV e V.
- Queste cassette geniche erano caratteristiche di ceppi di stafilococchi coagulasi negativi (in particolare *Staphylococcus epidermidis*).
- I più frequenti sequence typing dei ceppi di MSSA isolati dalla cute sono l'ST30 e l'ST8; questo background genetico è lo stesso dei CA-MRSA (ST30 = "Oceania" clone; ST8 = USA300 clone)

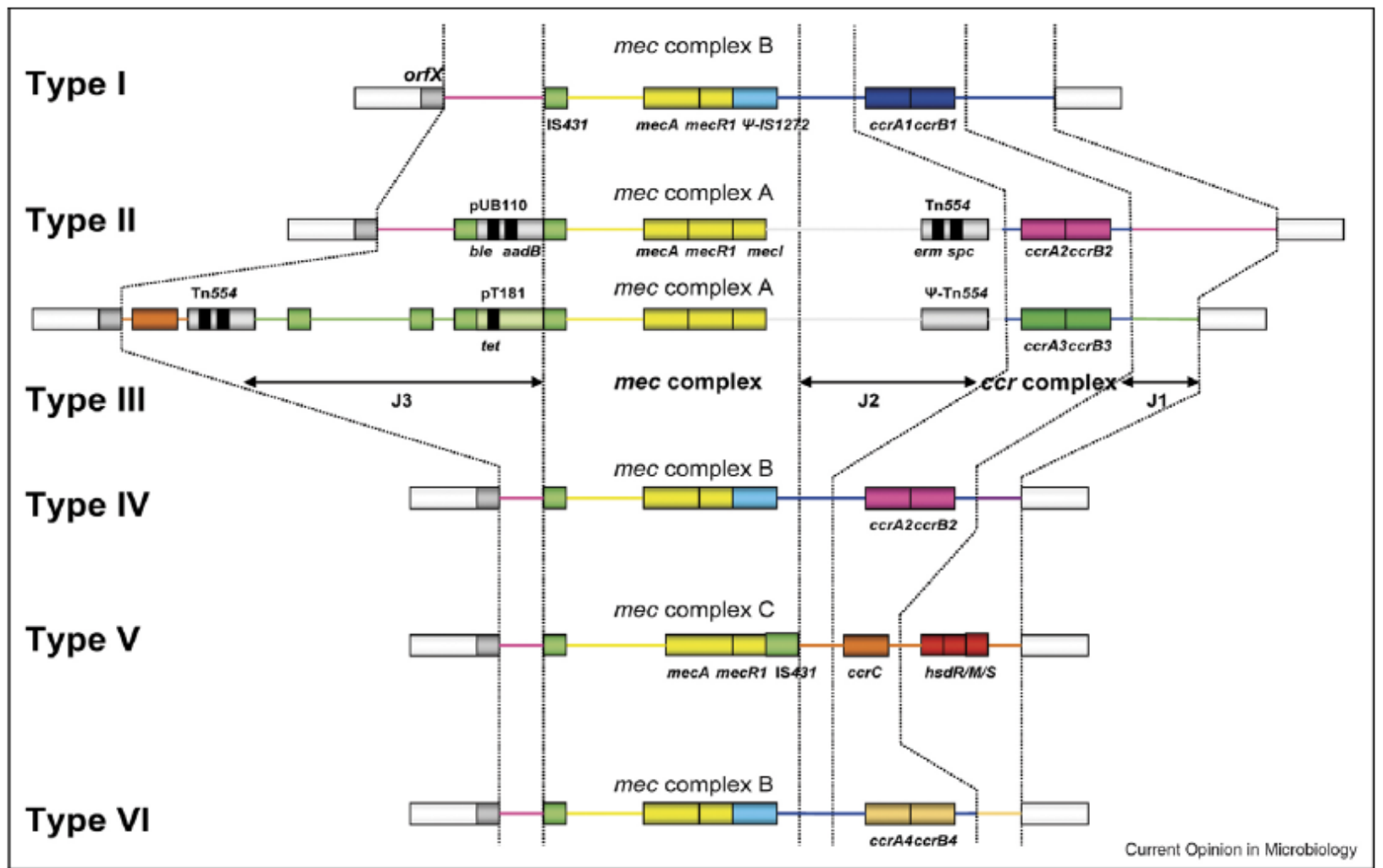
HA-MRSA vs. CA-MRSA

	HA-MRSA	CA-MRSA
Prima segnalazione	1970	1990
Infezioni	tutti i tipi	primariamente cute e tessuti molli
Resistenza a β -lattamici	SCC <i>mec</i> I-III	SCC <i>mec</i> IV
Altre molecole	resistenza multipla	spesso non multiresistente
Fattori di virulenza	diversi	leucocidina Panton-Valentine (+++)

Fenotipo di resistenza più frequente:
resistenza a meticillina e fluorchinoloni, sensibilità alle altre molecole

La cassetta genica SCCmec

- In anni recenti si è evidenziato che il gene *mecA* è inserito in una più ampia regione cromosomica, definita staphylococcal cassette chromosome, o SCCmec.
- La cassetta SCCmec è integrata nel cromosoma di stafilococco aureo in una posizione specifica (*attB_{sc}*), che è situata vicino al sito di origine della replicazione batterica.
- Sulla base dell'organizzazione genetica del materiale presente nelle vicinanze del gene *mecA*, ne sono state identificate tre classi:
 - la classe A contiene in sequenza i tre geni *mecI-mecR1-mecA*
 - le classi B e C sono caratterizzate dal fatto che i geni regolatori sono interrotti da specifiche insertion sequences, χ IS1272- Δ *mecR1-mecA* e IS431- Δ *mecR1-mecA*, rispettivamente



Genetic organization of SCCmec types I-VI (Maria Miragaia, Ph.D. thesis, Universidade Nova de Lisboa, 2006).

de Lencastre H et al., Current Opinion in Microbiology 2007, 10:428-35

Classificazione di SCCmec

Currently identified SCCmec types in *S.aureus* strains

SCCmec types	ccr gene complexes	mec gene complexes	strains
I	1 (A1B1)*	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C1)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1(A1B1)	C2	JCSC6943
X	7(A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8(A1B3)	E	LGA251

Qualcosa di nuovo: *mecC*

- Una nuova variante del gene *mecA*, denominata *mecA*-LGA251, che possiede un'omologia <70% con il gene *mecA* classico, è stata recentemente descritta in isolati di MRSA sia umani che animali.
- Problemi di rilevazione: CMI non elevate per meticillina e oxacillina (4-16 mcg/ml).
- Studio da dati NEQAS:
 - solo 225/299 laboratori che utilizzavano tecniche fenotipiche hanno correttamente identificato la meticillino-resistenza
 - 49/68 laboratori che utilizzavano tecniche molecolari hanno refertato l'isolato come meticillino-sensibile; 3/69 come indeterminato; 16 come MRSA → 3 home-made, 13 correzioni dopo valutazione fenotipica

Qualcosa di nuovo: SCC modificate

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert MRSA-SA BC G3	4	In Vitro Diagnostic

Test Result:

MRSA NEGATIVE;
SA POSITIVE

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	30.4	296.0	NA	PASS
SPA	20.4	402.0	POS	PASS
mec	21.2	642.0	POS	PASS
SCC	0	-2.0	NEG	PASS

User: <None>

Status: Done

Reagent Lot ID*: 10312

Expiration Date*: 11/04/12

Cartridge S/N*: 80437401

S/W Version: 4.0c

Notes:

Error Status: OK

Start Time: 04/19/12 15:44:30

End Time: 04/19/12 16:46:05

Module Name: A2

Module S/N: 602095

Instrument S/N: 704021

Studio APSI 2012

	RE	BG	AN	NO	TOTALI	%
I	8	2	8	0	18	20,45
II	0	0	0	0	0	0,00
II a	0	0	0	0	0	0,00
II b	0	0	1	9	10	11,36
III (mercury)	0	0	0	0	0	0,00
III a	0	0	0	0	0	0,00
IV a	1	2	1	0	4	4,55
IV b	0	0	0	0	0	0,00
IV c	16	6	10	1	33	37,50
IV d	0	0	0	0	0	0,00
IV e	0	0	0	0	0	0,00
IV f	0	0	0	0	0	0,00
V	0	0	0	0	0	0,00
VI	0	0	0	0	0	0,00
VIII	0	0	0	0	0	0,00
ND	12	6	1	4	23	26,14
TOTALE	37	16	21	14	88	E.C. 2013

Increased Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from a University Hospital during a 5-Year Period[▽]

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) **60**, 788–794

doi:10.1093/jac/dkm258

Advance Access publication 10 July 2007

JAC

Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001–05

Journal of Antimicrobial Chemotherapy
doi:10.1093/jac/dkm258
Advance Access publication 10 July 2007

Decrease in

Gregory Steinkraus^{1*}, Roger White² and Lawrence Friedrich³
Staphylococcus aureus: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983–2002

Jérôme Robert*, Roland Bismuth and Vincent Jarlier

Université Pierre et Marie Curie-Paris6; AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Paris, F75013, France

JAC

.....*reus* isolates
from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage

Juan-Ignacio Alós^{1*}, Ana García-Cañas¹, Paloma García-Hierro¹
and Francisco Rodríguez-Salvanés²

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, Carretera de Toledo km. 12.5, 28905 Getafe, Madrid, Spain; ²Departamento de Bioestadística, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain

- **VISA – hVISA** = ceppi per cui la CMI della vancomicina è nel range 2-16 mcg/ml
- **VRSA** = ceppi per cui la CMI della vancomicina è superiore a 16 mcg/ml
- La ridotta sensibilità dei ceppi **GISA** è causata dalla **sovraproduzione del target** (accumulo di precursori del peptidoglicano).
- Questi ceppi presentano una **velocità di duplicazione estremamente rallentata** e presentano spesso il fenomeno delle “small colony variants”.



Michigan VISA strain:
evidente il fenomeno delle
microcolonie. Queste due
varianti presentavano la
stessa CMI per
vancomicina (8 mcg/ml) e
lo stesso profilo in PFGE

Rilevamento di VISA / VRSA

metodo	VISA	VRSA
Kirby-Bauer	NO	si può rilevare crescita all'interno dell'alone di inibizione
Sistemi automatizzati	NON affidabile	NON affidabile
CLSI broth microdilution reference MIC	SI	SI
CLSI agar dilution reference MIC	SI	SI
Etest (0.5 McFarland, 24h di incubazione)	SI	SI

Nota:

i VISA sono per solito SAMR, ma potrebbero essere anche MSSA!

VRSA - (rari isolati segnalati ad oggi)

isolato	CMI vancomicina ($\mu\text{g/ml}$) ¹
1	1024
2	32 ²
3	64 ²
4	256 ²
...	...

¹ esecuzione di CMI con micrometodo in brodo secondo gli standard CLSI

² risultati errati o inconsistenti (alcuni $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) con sistemi automatizzati

April 2004 - CDC recommendation: add vancomycin agar screen
if using automated method

Stafilococchi coagulasi negativi

- Indispensabile dare un significato clinico all'isolamento.
- Da considerarsi: sede dell'isolamento (sterile o no), fattori predisponenti (biomateriali), caratteristiche della coltura, identificazione del microrganismo (alcuni ceppi sembrano essere correlati con una patogenicità maggiore)
- L'identificazione non deve eseguita routinariamente (test fenotipici non sicuramente discriminanti; test differenziativi richiedono tempo). **Richiesta invece per tutti i ceppi sicuramente responsabili di infezioni gravi!**
- Difficoltosa la valutazione della purezza della coltura: le caratteristiche macroscopiche non sono ben valutabili a 24h, ma divengono chiare a 72h.

SCN: sensibilità a vancomicina

- Possibile fenomeno di multiresistenza, anche con diminuita suscettibilità ai glicopeptidi -*S. epidermidis* multiresistenti = reservoir di geni di resistenza (Pfaller, CMR, 1988)
- *S. haemolyticus* può presentare una ridotta sensibilità alla vancomicina: 18 ceppi sono stati subcoltivati in medium contenenti vancomicina. In 4 ceppi incremento di 3-4 volte la CMI (1-8 mcg/ml) (Watanakunakon, JAC, 1988)
- Analoghe evidenze per *S. epidermidis*: concentrazione subinibenti di vancomicina sono in grado di selezionare dopo breve tempo ceppi con CMI 8-16 mcg/ml (Herwaldt, EJCMID, 1991)
- Test in vitro con imipenem: BHI addizionato con 12 mcg/ml di vancomicina, Kirby-Bauer con dischetto di imipenem = doppio alone di crescita attorno all'imipenem = le colonie interne sono resistenti alla vancomicina (Schwalbe et al., JID, 1990)

SCN: sensibilità a teicoplanina

- La resistenza alla teicoplanina è stata dimostrata per *S. epidermidis* e per *S. haemolyticus*.
- Difficoltà di comparazione fra i risultati.
- Resistenza non crociata per vancomicina. Possibile peraltro la traslocazione dei geni *van* di resistenza degli enterococchi.
- L'utilizzo della teicoplanina in corso di infezione da SCN dovrebbe essere limitata a casi selezionati.

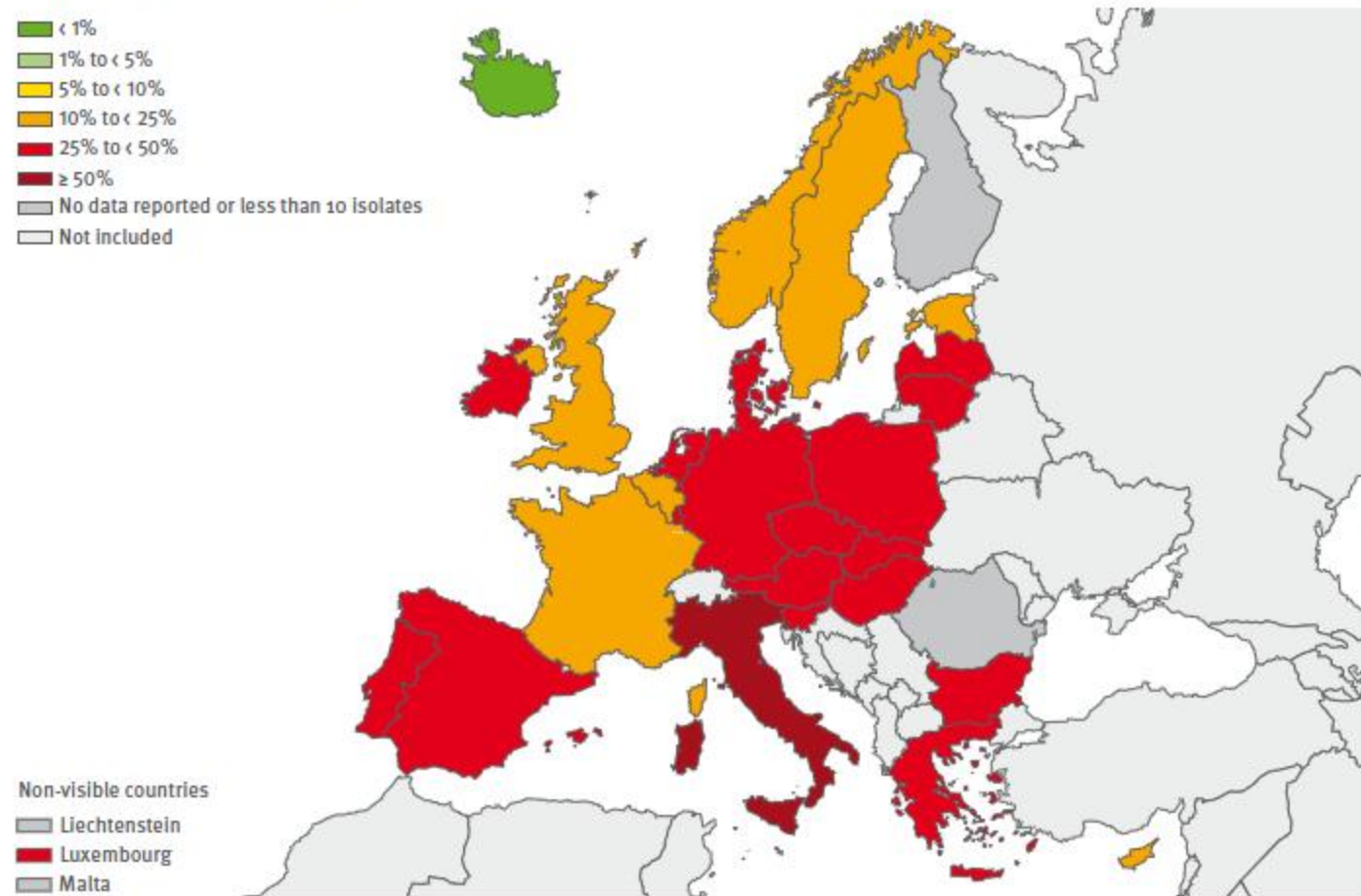
Enterococchi: resistenze intrinseche

- Gli aminoglicosidi a concentrazioni standard, le cefalosporine, clindamicina, cotrimoxazolo possono risultare sensibili *in vitro*, ma essendo sempre resistenti *in vivo* **NON VANNO MAI TESTATI** nell'antibiogramma di *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis*. Quest'ultimo è anche resistente alle nuove sinergistine (quinopristin/ dalfopristin).
- La resistenza può ricondursi all'incapacità di penetrare nella cellula (aminoglicosidi); all'utilizzo di vie alternative per i folati (cotrimoxazolo)...
- I fluorochinoloni, a dispetto dei valori di CMI, non sono indicati nella terapia delle infezioni da enterococco per una dimostrata scarsa efficacia *in vivo* cui si associa la rapida espressione di resistenza *in vitro*.

Enterococchi: HLR per aminoglicosidi

- Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti agli aminoglicosidi.
- Questi antibiotici penetrano attraverso la membrana batterica per trasporto attivo e gli enterococchi sono privi della pompa ionica necessaria (resistenza *in vitro*).
- *In vivo*, allorché la membrana cellulare batterica viene discontinuata da antibiotici quali i β -lattamici, gli aminoglicosidi penetrano nella cellula e qui esplicano la loro azione.
- Tuttavia, potrebbero essere presenti nella cellula batterica enzimi in grado di modificare l'antibiotico rendendoli inattivi. Si parla in questo caso di resistenza di alto livello per gli aminoglicosidi.
- Questo spiega perché la terapia empirica delle infezioni enterococciche prevede l'utilizzo di β -lattamico + aminoglicoside
- Questo tipo di resistenza è in significativo aumento.

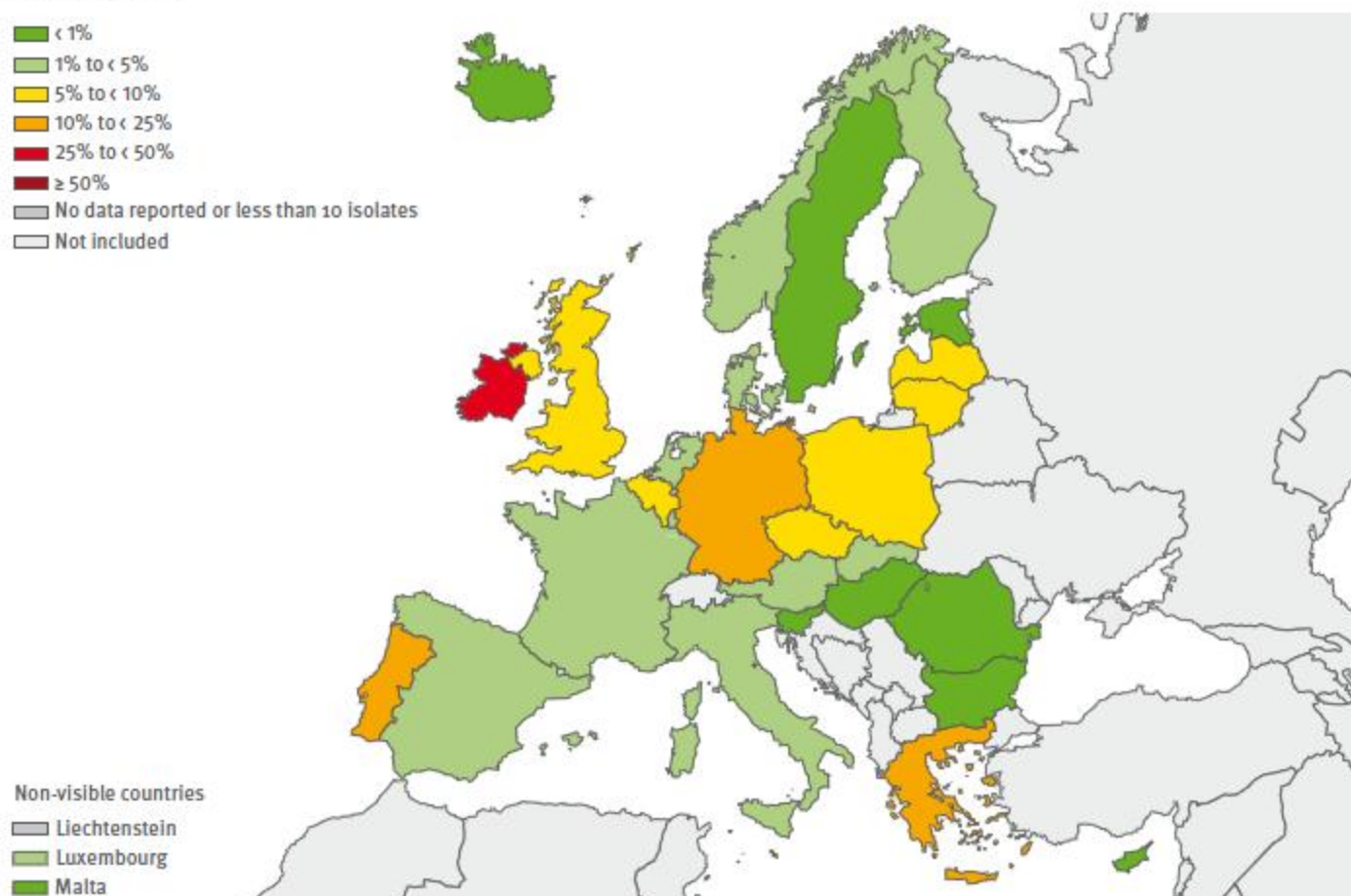
Figure 4.40: *Enterococcus faecalis*: percentage (%) of invasive isolates with high-level resistance to aminoglycosides, by country, EU/EEA countries, 2011



VRE: fenotipi di resistenza

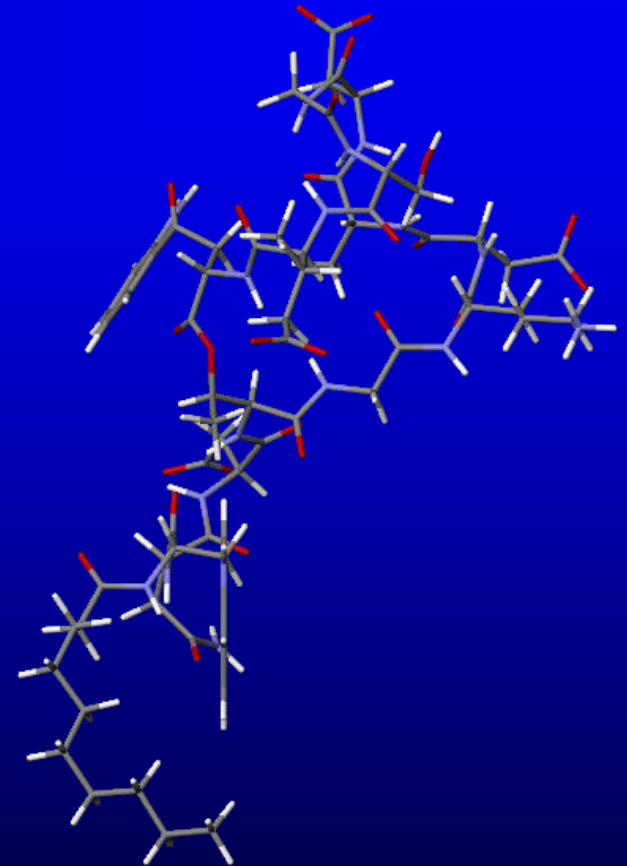
- **van-A**, ad opera del gene *vanA* che codifica per la sintesi di un peptide terminale D-ala-D-lac, determina **resistenza di alto livello per vancomicina e teicoplanina** (CMI in mcg/ml rispettivamente >64 e >16), è **inducibile e trasferibile**;
- **van-B**, ad opera del gene *vanB*, che codifica per la sintesi di un peptide terminale D-ala-D-lac, determina **resistenza di livello variabile per vancomicina e sensibilità alla teicoplanina** (CMI in mcg/ml rispettivamente >4 e 0.5-1), è **inducibile e trasferibile**;
- **van-C**, ad opera del gene *vanC*, che codifica per la sintesi di un peptide terminale D-ala-D-lac, determina **resistenza di basso livello per vancomicina e sensibilità alla teicoplanina**, è **costitutivo** e quindi **non trasferibile**.

Figure 4.41: *Enterococcus faecium*: percentage (%) of Invasive Isolates resistant to vancomycin, by country, EU/EEA countries, 2011



Daptomicina

- Primo antibiotico della classe dei glicolipopeptidi¹
- Lilly 1980 → sospeso per disturbi muscolari; Cubist 2000 → no effetti collaterali
- Ampia struttura basata su carbossili e gruppi nitrosi derivati dalla fermentazione di *Streptomyces roseosporus*
- Ampia attività diretta nei confronti di Gram positivi, inclusi MRSA, hVISA/VISA e VRE²
- Il più rapido battericida³
- Killing concentrazione-dipendente⁴



1. Kern M. *Int J Clin Pract* 2006;60:370–378

2. Novartis Europharm Ltd. Cubicin (daptomycin) Summary of product characteristics. 2008

3. LaPlante KL, Rybak MJ. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4665–4672

4. Drugeon H, Juvin M. ECCMID 2006; Poster 1581

Resistenza alla daptomicina

- La resistenza alla daptomicina è rarissima e si manifesta per mutazione nel target. In genere associata a esposizione a vancomicina.
- Singole mutazioni nei geni *mprF*, *rpoB*, *rpoC*, e *yycG* comportano una riduzione del legame della daptomicina Ca-polimerizzata con la parete cellulare, comportando un incremento di basso livello delle CMI
- Recentemente è stata descritta una mutazione nel sistema tricompartimentale *liaFSR* in *Enterococcus faecium* che si correla con modificazioni di parete, aumento delle CMI e fallimento terapeutico in casi di endocardite.
- Possibili altri meccanismi non correlati con mutazioni conformazionali (stafilococco)?

Correlation between Mutations in *liaFSR* of *Enterococcus faecium* and MIC of Daptomycin: Revisiting Daptomycin Breakpoints

Jose M. Munita,^{a,b} Diana Panesso,^{a,d} Lorena Diaz,^{a,d} Truc T. Tran,^{a,e} Jinnethe Reyes,^{a,d} Audrey Wanger,^h Barbara E. Murray,^{c,f,g} and Cesar A. Arias^{a,c,d}

Laboratory for Antimicrobial Research, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA^a; Clínica Alemana—Universidad del Desarrollo School of Medicine, Santiago de Chile, Chile^b; Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, Center for the Study of Emerging and Reemerging Pathogens, Houston, Texas, USA^c; Molecular Genetics and Antimicrobial Resistance Unit, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia^d; University of Houston College of Pharmacy, Houston, Texas, USA^e; Laboratory of Enterococcal Research, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA^f; Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA^g; and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA^h

Mutations in *liaFSR*, a three-component regulatory system controlling cell-envelope stress response, were recently linked with the emergence of daptomycin (DAP) resistance in enterococci. Our previous work showed that a *liaF* mutation increased the DAP MIC of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain from 1 to 3 $\mu\text{g/ml}$ (the DAP breakpoint is 4 $\mu\text{g/ml}$), suggesting that mutations in the *liaFSR* system could be a pivotal initial event in the development of DAP resistance. With the hypothesis that clinical enterococcal isolates with DAP MICs between 3 and 4 $\mu\text{g/ml}$ might harbor mutations in *liaFSR*, we studied 38 *Enterococcus faecium* bloodstream isolates, of which 8 had DAP MICs between 3 and 4 $\mu\text{g/ml}$ by Etest in Mueller-Hinton agar. Interestingly, 6 of these 8 isolates had predicted amino acid changes in the *LiaFSR* system. Moreover, we previously showed that among 6 DAP-resistant *E. faecium* isolates (MICs of $>4 \mu\text{g/ml}$), 5 had mutations in *liaFSR*. In contrast, none of 16 *E. faecium* isolates with a DAP MIC of $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ harbored mutations in this system ($P < 0.0001$). All but one isolate with *liaFSR* changes exhibited DAP MICs of $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ by Etest using brain heart infusion agar (BHIA), a medium that better supports enterococcal growth. Our findings provide a strong association between DAP MICs within the upper susceptibility range and mutations in the *liaFSR* system. Concomitant susceptibility testing on BHIA may be useful for identifying these *E. faecium* first-step mutants. Our results also suggest that the current DAP breakpoint for *E. faecium* may need to be reevaluated.

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Issue: Antimicrobial Therapeutics Reviews

Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall

Arnold S. Bayer,^{1,2} Tanja Schneider,³ and Hans-Georg Sahl³

¹Los Angeles Biomedical Research Institute at Harbor-University of California, Los Angeles, Torrance, California. ²David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, Los Angeles, California. ³Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology-Pharmaceutical Microbiology Section, University of Bonn, Bonn, Germany

Address for correspondence: Arnold S. Bayer, LA Biomedical Research Institute, 1124 West Carson St, Bldg RB2-Room 225, Torrance, CA 905092. abayer@labiomed.org

The bactericidal, cell membrane–targeting lipopeptide antibiotic daptomycin (DAP) is an important agent in treating invasive *Staphylococcus aureus* infections. However, there have been numerous recent reports of development of daptomycin resistance (DAP-R) during therapy with this agent. The mechanisms of DAP-R in *S. aureus* appear to be quite diverse. DAP-R strains often exhibit progressive accumulation of single nucleotide polymorphisms in the multi-peptide resistance factor gene (*mprF*) and the *yycFG* components of the *yycFGHI* operon. Both loci are involved in key cell membrane (CM) events, with *mprF* being responsible for the synthesis and outer CM translocation of the positively charged phospholipid, lysyl-phosphatidylglycerol (L-PG), while the *yyc* operon is involved in the generalized response to stressors such as antimicrobials. In addition, other perturbations of the CM have been identified in DAP-R strains, including extremes in CM order, resistance to CM depolarization and permeabilization, and reduced surface binding of DAP. Moreover, modifications of the cell wall (CW) appear to also contribute to DAP-R, including enhanced expression of the *dlt* operon (involved in D-alanylation of CW teichoic acids) and progressive CW thickening.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; daptomycin; antibiotic resistance; endocarditis

Early *In Vitro* and *In Vivo* Development of High-Level Daptomycin Resistance Is Common in Mitis Group Streptococci after Exposure to Daptomycin

Cristina García-de-la-Mària,^a Juan M. Pericas,^a Ana del Río,^a Ximena Castañeda,^a Xavier Vila-Farrés,^b Yolanda Armero,^a Paula A. Espinal,^b Carlos Cervera,^b Dolors Soy,^c Carlos Falces,^d Salvador Ninot,^d Manel Almela,^b Carlos A. Mestres,^d Jose M. Gatell,^a Jordi Vila,^{b,e} Asuncion Moreno,^a Francesc Marco,^b Jose M. Miró,^a the Hospital Clinic Experimental Endocarditis Study Group

Infectious Diseases Service,^a Microbiology Service,^b Pharmacy Service,^c and Cardiovascular Institute,^d Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona), Barcelona, Spain^e

The development of high-level daptomycin resistance (HLDR; MIC of ≥ 256 mg/liter) after exposure to daptomycin has recently been reported in viridans group streptococcus (VGS) isolates. Our study objectives were as follows: to know whether *in vitro* development of HLDR after exposure to daptomycin was common among clinical isolates of VGS and *Streptococcus bovis*; to determine whether HLDR also developed during the administration of daptomycin to treat experimental endocarditis caused by the daptomycin-susceptible, penicillin-resistant *Streptococcus mitis* strain *S. mitis* 351; and to establish whether combination with gentamicin prevented the development of HLDR *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies were performed with 114 VGS strains (mitis group, 92; anginosus group, 10; mutans group, 8; and salivarius group, 4) and 54 *Streptococcus bovis* strains isolated from 168 consecutive patients with infective endocarditis diagnosed between 1995 and 2010. HLDR was only observed after 24 h of exposure to daptomycin in 27% of the mitis group, including 27% of *S. mitis* isolates, 47% of *S. oralis* isolates, and 13% of *S. sanguis* isolates. In our experimental model, HLDR was detected in 7/11 (63%) and 8/12 (67%) isolates recovered from vegetations after 48 h of daptomycin administered at 6 mg/kg of body weight/24 h and 10 mg/kg/24 h, respectively. *In vitro*, time-kill experiments showed that daptomycin plus gentamicin was bactericidal against *S. mitis* 351 at tested concentrations of 0.5 and 1 times the MIC and prevented the development of HLDR. *In vivo*, the addition of gentamicin at 1 mg/kg/8 h to both daptomycin arms prevented HLDR in 21 out of 23 (91%) rabbits. Daptomycin plus gentamicin was at least as effective as vancomycin plus gentamicin. In conclusion, HLDR develops rapidly and frequently *in vitro* and *in vivo* among mitis group streptococci. Combining daptomycin with gentamicin enhanced its activity and prevented the development of HLDR in most cases.

Additional Routes to *Staphylococcus aureus* Daptomycin Resistance as Revealed by Comparative Genome Sequencing, Transcriptional Profiling, and Phenotypic Studies

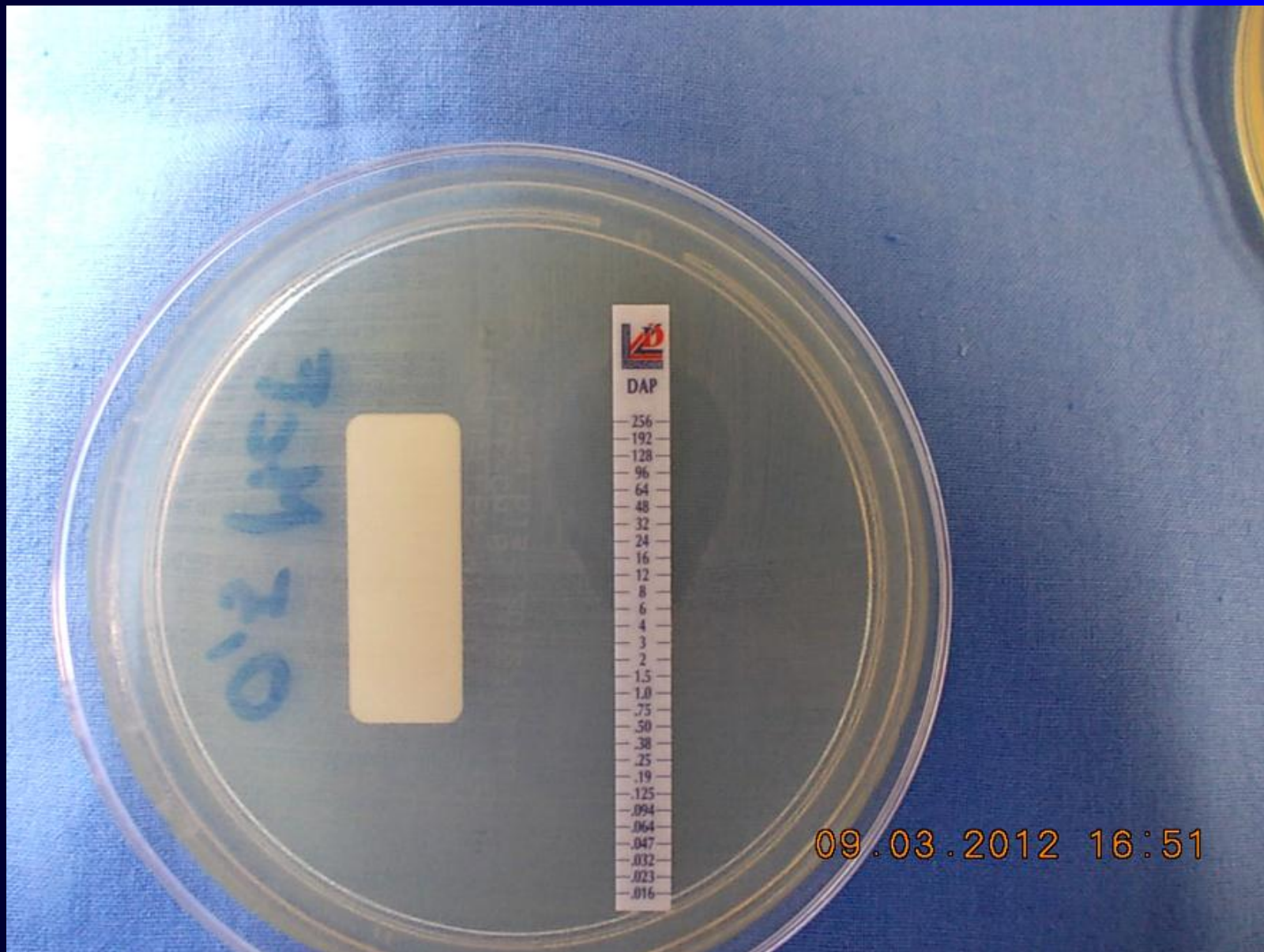
Yang Song¹, Aileen Rubio², Radheshyam K. Jayaswal¹, Jared A. Silverman², Brian J. Wilkinson^{1*}

1 Microbiology Group, School of Biological Sciences, Illinois State University, Normal, Illinois, United States of America, **2** Cubist Pharmaceuticals, Inc., Lexington, Massachusetts, United States of America

Abstract

Daptomycin is an extensively used anti-staphylococcal agent due to the rise in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, but the mechanism(s) of resistance is poorly understood. Comparative genome sequencing, transcriptomics, ultrastructure, and cell envelope studies were carried out on two relatively higher level (4 and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) laboratory-derived daptomycin-resistant strains (strains CB1541 and CB1540 respectively) compared to their parent strain (CB1118; MW2). Several mutations were found in the strains. Both strains had the same mutations in the two-component system genes *walkK* and *agrA*. In strain CB1540 mutations were also detected in the ribose phosphate pyrophosphokinase (*prs*) and polyribonucleotide nucleotidyltransferase genes (*pnpA*), a hypothetical protein gene, and in an intergenic region. In strain CB1541 there were mutations in *clpP*, an ATP-dependent protease, and two different hypothetical protein genes. The strain CB1540 transcriptome was characterized by upregulation of *cap* (capsule) operon genes, genes involved in the accumulation of the compatible solute glycine betaine, *ure* genes of the urease operon, and *mscL* encoding a mechanosensitive channel. Downregulated genes included *smpB*, *femAB* and *femH* involved in the formation of the pentaglycine interpeptide bridge, genes involved in protein synthesis and fermentation, and *spa* encoding protein A. Genes altered in their expression common to both transcriptomes included some involved in glycine betaine accumulation, *mscL*, *ure* genes, *femH*, *spa* and *smpB*. However, the CB1541 transcriptome was further characterized by upregulation of various heat shock chaperone and protease genes, consistent with a mutation in *clpP*, and *lytM* and *sceD*. Both strains showed slow growth, and strongly decreased autolytic activity that appeared to be mainly due to decreased autolysin production. In contrast to previous common findings, we did not find any mutations in phospholipid biosynthesis genes, and it appears there are multiple pathways to and factors in daptomycin resistance.

Citation: Song Y, Rubio A, Jayaswal RK, Silverman JA, Wilkinson BJ (2013) Additional Routes to *Staphylococcus aureus* Daptomycin Resistance as Revealed by Comparative Genome Sequencing, Transcriptional Profiling, and Phenotypic Studies. PLoS ONE 8(3): e58469. doi:10.1371/journal.pone.0058469



Linezolid

- Legame con la subunità ribosomiale 23S bloccando a un livello iniziale il processo della sintesi proteica
- Nessun meccanismo di cross-resistenza con altre molecole che agiscono quali inibitori della sintesi proteica
- Originariamente si riteneva assai improbabile l'insorgenza di resistenza (modo d'azione multi-target), tuttavia in un protocollo compassionevole 2/169 pazienti avevano sviluppato resistenza per mutazione dell'rRNA (G2576T)
- Fenomeni di induzione della resistenza *in vitro*:
 - negli stafilococchi, la frequenza di mutazione è 10^{-9} - 10^{-11}
 - negli enterococchi, la possibilità di sviluppo della resistenza (G2576T) è più probabile in *E. faecalis* rispetto a *E. faecium*

Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Linezolid Due to *cfr* in a Human Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*

Lorena Diaz,^{a,b} Pattarachai Kiratisin,^c Rodrigo E. Mendes,^d Diana Panesso,^{a,b} Kavindra V. Singh,^a and Cesar A. Arias^{a,b}

Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas^a; Molecular Genetics and Antimicrobial Resistance Unit, Universidad El Bosque, Bogota, Colombia^b; Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand^c; and JMI Laboratories, North Liberty, Iowa^d

Nonmutational resistance to linezolid is due to the presence of *cfr*, which encodes a methyltransferase responsible for methylation of A2503 in the 23S rRNA. The *cfr* gene was first described in animal isolates of staphylococci, and more recently, it has been identified in *Staphylococcus aureus* from human clinical infections, including in an outbreak of methicillin-resistant *S. aureus*. In enterococci, *cfr* has been described in an animal isolate of *Enterococcus faecalis* from China. Here, we report an isolate of linezolid-resistant *E. faecalis* (603-50427X) recovered from a patient in Thailand who received prolonged therapy with the antibiotic for the treatment of atypical mycobacterial disease. The isolate lacked mutations in the genes coding for 23S rRNA and L3 and L4 ribosomal proteins and belonged to the multilocus sequence type (MLST) 16 (ST16), which is commonly found in enterococcal isolates from animal sources. Resistance to linezolid was associated with the presence of *cfr* on an ~97-kb transferable plasmid. The *cfr* gene environment exhibited DNA sequences similar to those of other *cfr*-carrying plasmids previously identified in staphylococci (nucleotide identity, 99 to 100%). The *cfr*-carrying plasmid was transferable by conjugation to a laboratory strain of *E. faecalis* (OG1RF) but not to *Enterococcus faecium* or *S. aureus*. The *cfr* gene was flanked by IS256-like sequences both upstream and downstream. This is the first characterization of the potential horizontal transferability of the *cfr* gene from a human linezolid-resistant isolate of *E. faecalis*.

An overview on Staphylococcal linezolid resistance in Italy

Bongiorno D¹, Campanile F¹, Mongelli G¹, Falcone M², Menichetti F³, Novelli A⁴, Repetto A⁵, Pecile P⁶, Sarti M⁷, Sartor A⁸, Scarparo C⁸, Tascini C³, Venditti M², Zoppi F⁶ and Stefani S¹.

¹. University of Catania; ². La Sapienza University, Rome; ³. University Hospital of Pisa; ⁴. University of Florence; ⁵. University of Perugia; ⁶. Careggi University Hospital, Florence; ⁷. S. Agostino Hospital, Modena; ⁸. S.M della Misericordia University Hospital, Udine. Italy.

n° of strain	Species	Principal mechanism leading to LNZ resistance	23S rRNA
1*	<i>S.epidermidis</i> *	negative	-
16	<i>S.epidermidis</i>	<i>cfr</i> gene (A2503)	-
1	<i>S.epidermidis</i>	<i>cfr</i> gene (A2503)	-
2	<i>S.epidermidis</i>	<i>cfr</i> gene (A2503)	-
1	<i>S.epidermidis</i>	L4 insertion	-
2	<i>S.epidermidis</i>	L4 insertion	-
1	<i>S.epidermidis</i>	L3/L4	-
1	<i>S.epidermidis</i>	L4	-
6	<i>S.epidermidis</i>	23S rRNA mut	G2576T
1	<i>S.epidermidis</i>	23S rRNA mut	G2576T
6	<i>S.epidermidis</i>	23S rRNA mut	G2576T
2	<i>S.epidermidis</i>	<i>cfr</i> gene (A2503)	-
6	<i>S.epidermidis</i>	23S rRNA mut	G2447T
1	<i>S.hominis</i>	<i>cfr</i> gene (A2503)	-
2	<i>S.hominis</i>	23S rRNA mut	G2576T
1*	<i>S.aureus</i>	23S rRNA partial mut	G2576T
1	<i>S.capitis</i>	23S rRNA mut	G2576T

Da ricordare...

- Nonostante le molecole di più recente introduzione siano affidabili dal punto di vista dello sviluppo di resistenze, è possibile si selezionino ceppi resistenti.
- Come per tutti gli altri antibiotici, la loro somministrazione non può prescindere dall'analisi *in vitro* della loro sensibilità.
- I test di sensibilità vanno sempre eseguiti con più metodiche, richiedono un approfondimento identificativo e il ceppo deve quindi essere inviato a un centro di riferimento.