

SENSIBILIDAD DISMINUIDA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS EN ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLITICOS

Dr. Horacio A. Lopardo

RESUMEN

Últimamente, se están detectando mutaciones en las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) de los estreptococos beta-hemolíticos que corresponden a sitios que en *Streptococcus pneumoniae* han determinado sensibilidad disminuida a los antibióticos beta-lactámicos. Primero, se describieron cepas con sensibilidad intermedia a penicilina en *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), luego en *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (mayormente grupos C y G) y, más recientemente, cepas con sensibilidad disminuida a aminopenicilinas y cefalosporinas de tercera generación en *Streptococcus pyogenes* (grupo A). El costo biológico de estas modificaciones nos permite pensar que los niveles de resistencia no han de ser tan elevados como para comprometer por ahora la efectividad clínica de los beta-lactámicos.

Palabras clave: *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; Antibióticos beta-lactámicos; Penicilina.

Medicina Infantil 2021; XXVIII: 38 - 42.

ABSTRACT

Recently, mutations in penicillin-binding proteins (PBPs) of beta-hemolytic streptococci have been detected corresponding to sites that in *Streptococcus pneumoniae* have been determined to have decreased sensitivity to beta-lactam antibiotics. First, strains with intermediate sensitivity to penicillin were described in *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci), subsequently in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (mainly groups C and G) and, more recently, strains with decreased sensitivity to third-generation aminopenicillins and cephalosporins were found in *Streptococcus pyogenes* (group A). The biological cost of these modifications suggests that, for now, resistance levels are not high enough to compromise the clinical effectiveness of beta-lactams.

Key words: *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; Beta-lactam antibiotics; penicillin.

Medicina Infantil 2021; XXVIII: 38 - 42.

INTRODUCCION

Primero apareció la resistencia a penicilina (PEN) en los estreptococos alfa y gamma-hemolíticos. *Streptococcus pneumoniae* había mantenido su *status* de bacteria sensible a la PEN hasta que

ocurrió el brote sudafricano de cepas multirresistentes a fines de la década del 70¹ a través de modificaciones en mosaico de los genes que codifican sus proteínas ligadoras de PEN (PBP)². Estas proteínas están involucradas en la biosíntesis de la pared celular bacteriana. Esta sensibilidad disminuida a la PEN en *S. pneumoniae* parece haber sido originalmente adquirida de estreptococos del grupo viridans por transferencia horizontal³.

Luego, las cepas de *S. pneumoniae* resistentes y

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

con sensibilidad intermedia a la PEN se extendieron a todo el mundo⁴ e incluso llegaron a la Argentina⁵. Actualmente, en nuestro medio, los porcentajes de no sensibilidad a la PEN siguen siendo cercanos al 40%, pero la resistencia, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) $\geq 2 \mu\text{g/ml}$, disminuyó a niveles menores del 10%⁵.

Esta adquisición de mecanismos de resistencia producida en *S. pneumoniae* no se correspondió con eventos similares en estreptococos beta-hemolíticos, los que se mantuvieron dentro del rango de sensibilidad a la PEN hasta hace muy poco tiempo⁶.

En esta actualización se describirán los cambios ocurridos en los últimos años en la sensibilidad a los antibióticos beta-lactámicos (ABL) en los estreptococos beta-hemolíticos. Estos cambios, al igual que los observados previamente en *S. pneumoniae* y en estreptococos del grupo viridans, se debieron a modificaciones en las PBP. A continuación se resumirán los estudios referentes a la pérdida de actividad de la PEN y otros ABL sobre *Streptococcus agalactiae* (grupo B) (GBS), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (grupos C y G) (SDSE) y *Streptococcus pyogenes* (grupo A) (GAS).

***Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield)**

En 2014, en un trabajo publicado en Medicina Infantil, se hizo alusión a la sensibilidad disminuida a la PEN en GBS⁷. En la presente actualización se ha ampliado la información correspondiente a este tema con los agregados resultantes de nuevas experiencias.

Varios investigadores, a fines de los 90 y a principios del milenio, informaron la presencia de GBS con valores de CIM de PEN por encima del punto de corte de sensibilidad establecido por el CLSI⁸. Algunos de ellos fueron confirmados por métodos de referencia en Alemania⁹, Canadá¹⁰, Taiwán¹¹, Japón¹², Hong Kong¹³, Irán¹⁴ y Argentina¹⁵.

Aislados de *S. agalactiae* con sensibilidad disminuida a PEN por modificación de la PBP2x fueron descritos en el Japón en 2006 y publicados en 2008¹⁶.

En Japón también se detectaron varios GBS con CIM de PEN desde $0,25 \mu\text{g/ml}$ hasta $1 \mu\text{g/ml}$, con sustituciones de aminoácidos no solo en PBP2x sino también en PBP1A, en PBP2B y en PBP2A¹⁷.

Cepas con cambios en otras PBP distintas de PBP2x similares se describieron en Canadá¹⁸.

En 2011 en Japón se aislaron tres GBS multirresistentes de materiales clínicos de adultos mayores con patología de base. Se trataba de variantes de colonia pequeña que tenían sensibilidad reducida a la PEN, a la ampicilina (AMP) y a ceftriaxona (CRO) y eran resistentes a eritromicina, clindamicina y levofloxacina con valores de CIM muy elevados¹⁹.

Por su parte, Dahesh et al. en los EE.UU. identificaron un conjunto clonal de cuatro aislamientos

de *S. agalactiae* invasivos, independientes, con CIM elevadas de ABL que compartían una mutación en el gen *pbp2x* (Q557E), mutación que corresponde a una de las alteraciones que confieren resistencia a PEN en *S. pneumoniae*. La sensibilidad a ABL se reestableció a través del reemplazo o complementación alélica con el *pbp2x* de tipo salvaje²⁰.

AMP y PEN igualmente continúan siendo activas contra GBS. Si bien, como se vio, se han aislado algunas cepas con sensibilidad disminuida, ambos siguen siendo los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones por este patógeno. Existen informes de cepas tolerantes a penicilina (actividad bactericida disminuida) pero estas evidencias *in vitro* han tenido una dudosa relevancia clínica²¹.

Recientemente Hirai et al. en Japón relataron un caso de meningitis por GBS en un varón de 41 años con tratamiento inmunosupresivo por histiocitosis. El estreptococo era multirresistente: tenía sensibilidad disminuida a PEN (CIM = $0,5 \mu\text{g/ml}$), era resistente a macrólidos y fluoroquinolonas, pero era sensible a AMP y a cefotaxima (CTX). El paciente tuvo una buena evolución después de 4 días de un tratamiento con CRO, vancomicina y corticoides y de 17 días de AMP²².

Los GBS multirresistentes no son poco comunes en Japón. Incluso los porcentajes de no sensibilidad a AMP (15%), CTX (28%) y CRO (36%) son elevados entre las cepas no sensibles a PEN²³.

En una publicación del año 2010²⁴ se describió un caso clínico de una infección articular de una prótesis de cadera en una mujer de 55 años. En el año 2004 se había aislado un GBS sensible a PEN (GBS 1) del líquido articular (Tabla 1). Recibió un tratamiento de 6 semanas con 12 MU diarias de PEN G y continuó por vía oral en forma indefinida con PEN V (300 mg/día). Tres años después se detectó una colección paraarticular de la que se aisló un GBS con una CIM de PEN de $0,25 \mu\text{g/ml}$ (GBS 2) (Tabla 1).

TABLA 1: SENSIBILIDAD A BETA-LACTAMICOS DE LOS ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO B AISLADOS DE UNA PACIENTE CON INFECCION EN SU PROTESIS DE CADERA²⁴.

Antibiótico	CIM de GBS 1	CIM de GBS 2	CLSI
Penicilina G	$0,06 \mu\text{g/ml}$	$0,25 \mu\text{g/ml}$	$\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$
Ceftriaxona	$0,12 \mu\text{g/ml}$	$1 \mu\text{g/ml}$	$\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$
Oxacilina	$1 \mu\text{g/ml}$	$4 \mu\text{g/ml}$	ND
Ampicilina	$0,12 \mu\text{g/ml}$	$0,5 \mu\text{g/ml}$	$\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$
Meropenem	$0,03 \mu\text{g/ml}$	$0,25 \mu\text{g/ml}$	$\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$

CIM: concentración inhibitoria mínima; GBS 1: estreptococo aislado en 2004; GBS 2: estreptococo aislado en 2007; CLSI: punto de corte del CLSI para establecer sensibilidad en estreptococos beta-hemolíticos (7). ND: no definido por el CLSI.

Un estudio de electroforesis en campos pulsantes (PFGE) demostró que los dos aislados eran idénticos. Se indicó continuar con 600 mg PEN V cada 8 horas. El absceso fue drenado en 2008 y se realizó un desbridamiento de la zona. En este caso, el cultivo fue negativo y se decidió seguir el tratamiento durante otros 14 días con 500 mg de cefadroxilo cada 12 horas. Las imágenes posteriores mostraron una cura definitiva de la infección a pesar de haber sido tratada con ABL.

Un caso similar fue registrado en Canadá con buena evolución después de un tratamiento con cefazolina¹⁸.

En otro trabajo se describió un caso de una úlcera de decúbito recurrente infectada con GBS, GGS y *Staphylococcus aureus*. A pesar de la sensibilidad reducida a PEN (CIM = 0,25 µg/ml), y a cefazolina (CIM = 2 µg/ml) del GBS, el tratamiento con 2000 mg/día de este último antibiótico, durante 4 días, resultó efectivo²⁶.

A pesar de todo esto continúa habiendo consenso para emplear PEN o AMP en el tratamiento de infecciones graves y en el trabajo de parto de la mujer colonizada para prevenir infecciones neonatales por GBS²⁷.

No obstante, sería importante determinar la sensibilidad a ABL en todo GBS aislado de infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis (en especial las posprotésicas) y endocarditis, dado que cepas con sensibilidad disminuida a PEN u otros beta-lactámicos podrían, eventualmente, en esos casos, comprometer el tratamiento.

***Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (grupos C y G de Lancefield)**

En varios trabajos se informó la presencia de estreptococos de los grupos G y/o C con CIM ≥ 0,25 µg/ml (sensibilidad disminuida) sin análisis posteriores, sin la certificación de centros de referencia e, incluso, sin comentarios al respecto.

En Alemania, en 1997, por agar dilución se detectaron dos aislados de GCS con sensibilidad intermedia a PEN (CIM = 0,5 µg/ml) que no fueron posteriormente estudiados⁹.

En ese mismo año, en un caso de falla terapéutica con PEN V de una faringitis en un niño de 6 años, se aisló una cepa de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) del grupo C con resistencia a penicilina por el método de difusión con discos. La cepa fue estudiada en el centro de referencia correspondiente al Reino Unido (*Central Public Health Laboratory Service, Colindale, U.K.*) donde se determinó que presentaba una CIM de PEN de 2 µg/ml y una CIM de AMP de 4 µg/ml. El paciente se curó con eritromicina. Lamentablemente no se pudo determinar el mecanismo involucrado, por pérdida de viabilidad de la cepa²⁸.

En 2016 se publicó un trabajo en el que se re-

lataron episodios de bacteriemia en tres pacientes producidos por SSDE con sensibilidad reducida a la PEN fehacientemente documentada. La CIM de PEN era de 0,5 µg/mL por microdilución y entre 0,5 y 2 µg/mL por Etest. En los tres casos no hubo mejoría con el tratamiento con PEN pero sí con cefuroxima o meropenem, antibióticos a los cuales los aislados eran sensibles. Se notaron diferencias en las PBP2x, PBP1a y PBP2a, respecto de aislados sensibles obtenidos en la misma área. Algunas de las mutaciones eran similares a las que exhibían los neumococos resistentes a PEN. Los pacientes habían sido tratados en el mismo centro de salud y se presume, por estudios moleculares, que estas cepas habían sido introducidas desde alguna región externa al área geográfica. Las tres cepas diferían en su sensibilidad a macrólidos²⁹.

***Streptococcus pyogenes* (grupo A de Lancefield)**

Se creía que había muy pocas probabilidades de que *S. pyogenes* adquiriera resistencia a PEN dado que después de 80 años no se había manifestado ningún cambio en los valores de sus CIM³⁰.

Una de las probables razones serían problemas en el intercambio de material genético por mecanismos ineficientes o por que estas bacterias fabrican hasta 5 DNAsas distintas que obstruirían dicho intercambio. Otra explicación podría ser que los cambios en sus PBP, que son proteínas asociadas a la síntesis de pared celular, tendrían un costo biológico tal que las haría inviables. Además, se postulaba que no podrían expresar hipotéticas beta-lactamasas o que éstas podrían ser tóxicas para los GAS. Finalmente, se mencionó que podrían no haberse dado aún las circunstancias favorables para que la presión de selección ejercida por el uso de ABL culminara con la aparición de GAS resistentes a PEN³¹.

Varios estudios informaron la presencia de cepas no sensibles a PEN (CIM ≥ 0,25 µg/ml), pero esa "no sensibilidad" no fue confirmada por centros de referencia ni por estudios moleculares³²⁻³⁵. Numerosos trabajos publicados en la China también informaron porcentajes diversos de sensibilidad reducida e incluso resistencia no fehacientemente documentados a PEN, CRO y otros ABL en GAS³⁶.

Entre 2017 y 2018 se estudiaron 282 GAS por un posible brote de infecciones invasivas en Seattle, EE.UU. Vannice et al. analizaron las secuencias del genoma completo de 36 de ellas y observaron mutaciones puntuales en las PBP2x en dos de ellas que estaban clonal y epidemiológicamente relacionadas y pertenecían a un genotipo raro (*emm* 43.4). Si bien estas bacterias eran sensibles a PEN (CIM = 0,015 µg/ml), presentaban niveles de CIM de ampicilina y amoxicilina 8 veces mayores que los de cepas del mismo genotipo que no exhibían los mismos cambios en sus PBP2x. Del mismo modo, las CIM de CTX eran dos veces mayores³⁷.

Aunque las CIM de estos beta-lactámicos aumentaron varias veces, éstas se mantuvieron dentro de la categoría de sensibilidad. Además, hubo antibióticos que no modificaron su CIM incluyendo la PEN, como ya se mencionó. Se presume que este polimorfismo de la PBP2x no les confiere a estas bacterias ninguna ventaja evolutiva, pero tampoco les aumenta su costo biológico, porque sus curvas de crecimiento no difieren de las de las cepas casi isogénicas utilizadas como controles. Por otra parte, las cepas con sensibilidad disminuida a los ABL se aislaron de pacientes expuestos por largo tiempo a tratamientos con este tipo de antibióticos. Esta exposición prolongada parecería ser una presión de selección necesaria para permitirles efectuar los cambios requeridos para enfrentar la presencia de los antibióticos³⁸.

Ya se mencionó que el polimorfismo de PBP2x surgió en una cepa de GAS de un genotipo bastante infrecuente (*emm46*). Vannice et al. pensaban que, por ese hecho, estas cepas con sensibilidad disminuida a los ABL podrían seguir siendo raramente encontradas en la clínica³⁷. Sin embargo, un estudio del genoma completo de 7.025 GAS obtenidos principalmente de infecciones invasivas de Europa, EE.UU., Australia y Canadá, pertenecientes a los genotipos *emm1*, *emm28* y *emm89*, comprobó que 137 de ellas presentaban mutaciones no silentes (que cambian la codificación de aminoácidos) en el gen *pbp2x* (39). Si bien estas mutaciones no se tradujeron en niveles de CIM de ABL de la magnitud de los de los dos GAS descritos por Vannice et al. (37) y ninguno presentó una CIM por encima del punto de corte de ninguno de los ABL, se apreciaron diferencias respecto de los utilizados como controles³⁹.

CONCLUSIONES

Llegó el momento en que los estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A, B, C y G fueran perdiendo su sensibilidad a los ABL, la que hasta hace poco tiempo era considerada universal. Modificaciones en sus PBP, especialmente en la PBP2x parecen ser el puntapié inicial para la aparición de estreptococos con resistencia *in vivo* a la PEN y a otros beta-lactámicos. Afortunadamente, por ahora, parece que el costo biológico de estas modificaciones determina que los niveles de resistencia no sean tan elevados como para comprometer la efectividad clínica de estos antibióticos.

Conflictos de intereses

El autor declara no tener conflictos de interés respecto del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. N Engl J Med 1978; 299: 735-40.

2. Smith AM, Klugman KP. Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2393-6.
3. Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, et al. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 2001; 69: 2477-86.
4. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2009; 15 (Suppl. 3): 7-11.
5. Lopardo HA, Fossati S. Viviendo treinta años con el enemigo: neumococos resistentes a los antibióticos en la Argentina. Acta Bioquím Clin Latinoam 2016; 50: 693-712.
6. Bonofiglio L, Gagetti P, García Gabarrot G, et al. Susceptibility to β -lactams in β -hemolytic streptococci. Rev Argent Microbiol 2018;50:431-5.
7. Lopardo H. Sensibilidad reducida a los antibióticos en los estreptococos del grupo B. Med Infant 2014; 21: 324-7.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100, 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2020.
9. Traub WH, Leonhard B. Comparative susceptibility of clinical group A, B, C, F, and G beta-hemolytic streptococcal isolates to 24 antimicrobial drugs. Chemotherapy 1997;43:10-20.
10. de Azavedo JC, McGavin M, Duncan C, et al. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3504-8.
11. Hsueh PR, Teng LJ, Lee LN, et al. High incidence of erythromycin resistance among clinical isolates of *Streptococcus agalactiae* in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3205-8.
12. Morikawa Y, Kitazato M, Katsukawa C, et al. Prevalence of cefotaxime resistance in group B streptococcus isolates from Osaka, Japan. J Infect Chemother 2003;9:131-3
13. Chu YW, Tse C, Tsang G K-L, et al. Invasive group B streptococcus isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong. J Antimicrob Chemother 2007;60:1407-9.
14. Jannati E, Roshani M, Arzanlou M, et al. Capsular serotype and antibiotic resistance of group B streptococci isolated from pregnant women in Ardabil, Iran. Iran J Microbiol 2012;4:130-5.
15. Vidal P, Bertolini P, Flores G, et al. First isolation of *Streptococcus agalactiae* with reduced susceptibility to penicillin in Argentina. Abstract 0313. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Buenos Aires 9-12 de noviembre de 2014.
16. Kimura K, Suzuki S, Wachino JI, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2890-7.
17. Nagano N, Nagano Y, Kimura K et al. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 4258-67.
18. Longtin J, Vermeiren C, Shahinas D, et al. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2983-5.
19. Banno H, Kimura K, Tanaka Y, et al. Characterization of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. J Clin Microbiol 2014; 52: 169-71.
20. Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, et al. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2915-8.
21. Kim KS. Clinical perspectives on penicillin tolerance. J Pediatr 1988; 112: 214-6.
22. Hirai J, Kinjo T, Haranaga S, et al. A case report of cerebral meningitis caused by penicillin-non-susceptible group B streptococcus in an immunocompromised adult patient. Infect Drug Resist 2020; 13:2155-60.
23. Kitamura M, Kimura K, Ido A, et al. Relatively high rates of cefotaxime- and ceftriaxone-non-susceptible isolates among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) in Japan. J Antimicrob Chemother 2019; 74: 931-4.
24. Gaudreau C, Lecours R, Ismail J, et al. Prosthetic hip joint infection with a *Streptococcus agalactiae* isolate not susceptible to penicillin G and ceftriaxone. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 594-5.
25. Nagano N, Kimura K, Nagano Y, et al. Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 1326-8.

26. Balter S, Zell ER, O'Brien KL, et al. Impact of intrapartum antibiotics on the care and evaluation of the neonate. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:853-7.
27. Eltringham IJ, Hutchinson NA. A case of pharyngitis caused by penicillin resistant group C streptococcus. *J Infect* 1997; 34: 88-9.
28. Fuursted K, Stegger M, Hoffmann S, et al. Description and characterization of a penicillin-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clone isolated from blood in three epidemiologically linked patients. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 3376-80.
29. Macris MH, Hartman N, Murray B, et al. Studies of the continuing susceptibility of group A streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 377-81.
30. Horn DL, Zabriskie JB, Austrian R, et al. Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1341-5.
31. Amábile-Cuevas CF, Hermida-Escobedo C, Vivar R. Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin by E-test against *Streptococcus pyogenes*. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl 1): S30-2.
32. Capoor MR, Nair D, Deb M, et al. Resistance to erythromycin and rising penicillin MIC in *Streptococcus pyogenes* in India. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 334-6.
33. Berwal A, Chawla K, Shetty S, et al. Trend of antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolated from respiratory tract infections in tertiary care hospital in south Karnataka. *Iran J Microbiol* 2019; 11: 13-8.
34. Ogawa T, Terao Y, Sakata H, et al. Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 318: 143-51.
35. Yu D, Zheng Y, Yang Y. Is there emergence of β -lactam antibiotic-resistant *Streptococcus pyogenes* in China? *Infect Drug Resist* 2020, 13:2323-7.
36. Vannice KS, Ricaldi J, Nanduri S, et al. *Streptococcus pyogenes* *pbp2x* mutation confers reduced susceptibility to β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 2020; 71:201-4.
37. Hanage WP, Shelburne SA III. *Streptococcus pyogenes* with reduced susceptibility to β -lactams: how big an alarm bell? *Clin Infect Dis* 2020; 71: 205-6.
38. Musser JM, Beres SB, Zhu L, et al. Reduced *in vitro* susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to β -lactam antibiotics associated with mutations in the *pbp2x* gene is geographically widespread. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01993-19.