

VRIJE UNIVERSITEIT

**Antibiotic Treatment and Commensal
Staphylococcus Aureus Resistance
in Primary Care in Europe**

A nine-country study

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad Doctor aan
de Vrije Universiteit Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus
prof.dr. V. Subramaniam,
in het openbaar te verdedigen
ten overstaan van de promotiecommissie
van de Faculteit der Geneeskunde
op vrijdag 20 november 2015 om 11.45 uur
in de aula van de universiteit,
De Boelelaan 1105

door

Eva Maria Elisabeth van Bijnen

geboren te Vlijmen

promotoren: prof.dr. F.G. Schellevis
prof.dr. C.A. Bruggeman

copromotoren: dr. W.J. Paget
dr. E.E. Stobberingh

Samenvatting (Summary in Dutch)

INLEIDING

Sinds de jaren veertig van de twintigste eeuw zijn antibiotica op grote schaal beschikbaar; hierdoor kunnen voorheen dodelijke bacteriële infecties effectief behandeld worden. Het gebruik van antibiotica vormt tevens echter de grootste risicofactor voor de ontwikkeling van resistentie hiertegen. We spreken van antimicrobiële resistentie (AMR) wanneer een bacterie niet gevoelig is voor een klinisch relevante dosis van een antibioticum, of wanneer de bacterie een eigenschap bezit die het effect van een antibioticum teniet doet. Deze resistentie kan van nature zijn (genetisch 'aangeboren'), of kan zijn verkregen door overdracht van genen van een andere bacterie.

Door deze evolutionaire ontwikkeling van antimicrobiële resistentie zijn er minder effectieve middelen beschikbaar voor de behandeling van bepaalde bacteriële infecties, wat leidt tot verhoogde ziektelast, sterfte en kosten. Tegelijkertijd worden er nauwelijks meer nieuwe antibiotica ontwikkeld door de farmaceutische industrie. Verschillende publieke organen zetten daarom artsen aan tot verstandig gebruik van bestaande antibiotica, dit houdt in: 1) uitsluitend antibiotica voor te schrijven en te gebruiken indien het echt nodig is, en 2) bij het voorschrijven van een antibioticum te kiezen voor een effectief middel ter bestrijding van de bacterie die het meest waarschijnlijk de infectie veroorzaakt.

Veel ziekteverwekkende (pathogene) bacteriën zijn afkomstig uit onze eigen commensale flora (bacteriën die normaal aanwezig zijn zonder ziekte te veroorzaken), maar die wel een reservoir vormt van resistentie-genen. Een volwassene draagt gemiddeld een triljoen bacteriën met zich mee die gemakkelijk genen kunnen uitwisselen in deze besloten omgeving. De meeste van deze symbiotische bacteriën zijn onschadelijk, en dragen onder andere bij aan ons immuunsysteem, maar opportunistisch gedrag van onze eigen microbiota veroorzaakt regelmatig infecties. Onderdeel van de commensale flora is *Staphylococcus aureus*, een bacterie die onder andere in verband wordt gebracht met huidinfecties. Sinds de ontdekking van antibiotica heeft *S. aureus* de kans gekregen resistentie te ontwikkelen, wat onder andere heeft geleid tot het ontstaan van methicilline resistente *S. aureus* (MRSA). Er zijn nog slechts een paar middelen beschikbaar om infecties veroorzaakt door deze agressieve bacterie-variant te behandelen.

Tot voor kort was er vooral aandacht voor antimicrobiële resistentie in de ziekenhuisomgeving. Recent is ook een stijging van de resistentie gerapporteerd in de algemene bevolking buiten het ziekenhuis. Tegelijkertijd wordt in de eerstelijnszorg het grootste deel (90%) van de antibiotica voorgeschreven: gepast gebruik van antibiotica in de eerste lijn is dus van groot belang om resistentie-ontwikkeling tegen te gaan.

Binnen Europa is er een grote variatie in het aantal antibioticavoorschriften; dit suggereert dat er mogelijk sprake is van overgebruik. Hiernaast zijn er ook verschillen gerapporteerd in de keuze voor de soort antibiotica. In de eerstelijnszorg wordt vaak een empirische behandelingsmethode toegepast (d.w.z. dat er een antibioticum wordt voorgeschreven op basis van algemene kennis over de ziekteverwekkende bacterie; dus ontbreekt informatie over het veroorzakende pathogeen bij deze individuele patiënt). Om deze reden is het van belang om gegevens over resistentie in de algemene bevolking te verzamelen en deze kennis te betrekken bij de behandeling van een bacteriële infectie en op te nemen in behandelrichtlijnen. In aanvulling hierop is het zinvol om te onderzoeken bij welke patiënten de kans groter is dat ze bepaalde resistente bacteriën bij zich dragen om de optimale behandeling te kunnen kiezen. Op deze manier kan de verdere ontwikkeling van AMR in de eerstelijnszorg tegengegaan worden.

Dit proefschrift heeft als doel hieraan bij te dragen door onderzoek naar de antimicrobiële resistentie van *S. aureus* in de commensale flora. In het eerste deel van het proefschrift staat het huidige resistentieniveau van *S. aureus* en de risicofactoren die hiermee samenhangen centraal. Vervolgens wordt deze kennis in het tweede deel toegepast op de dagelijkse praktijk, door deze resistentiegegevens in verband te brengen met de (aanbevelingen voor) behandeling van huidinfecties in de eerstelijnszorg, dit alles in negen Europese landen.

APRES studie

De gegevens voor dit proefschrift zijn verzameld in het kader van de APRES studie: 'The appropriateness of prescribing antibiotics in primary care in Europe with respect to antibiotic resistance' (zie ook hoofdstuk 3). Deze 4,5 jaar durende studie (2009-2014) werd gesubsidieerd door de Europese Commissie (7^e Kaderprogramma) en gecoördineerd door het NIVEL, samen met in totaal 15 partners uit negen landen. Voor meer informatie zie www.nivel.eu/apres.

RESULTATEN

Commensale *Staphylococcus aureus* resistentie in Europa

Het eerste deel van het proefschrift beschrijft de resistentie van commensale *S. aureus* in negen Europese landen. In **Hoofdstuk 3** is de studieopzet beschreven: bij een steekproef van bezoekers van huisartsen zijn monsters afgenomen uit het neusslijmvlies met een wattenstokje, dit betrof ongeveer 200 personen per huisarts en 20 huisartsen per land. Personen konden niet deelnemen wanneer ze op het moment van deelname mogelijk een bacteriële infectie hadden, in de laatste drie maanden antibiotica hadden gebruikt, of recent opgenomen waren geweest in een ziekenhuis. Uit de monsters is in lokale laboratoria *S. aureus* geïsoleerd, welke vervolgens getest is op resistentie tegen een scala aan antibiotica in het centrale laboratorium van de APRES studie in Maastricht. Daarnaast zijn gegevens over het voorschrijven van antibiotica uit de Huisarts Informatie Systemen (HIS) van de deelnemende praktijken verzameld. In alle deelnemende landen werden tevens de meest gebruikte behandelrichtlijnen voor huidinfecties bijeengebracht.

De prevalentie en het resistentieniveau van *S. aureus* zijn beschreven in **Hoofdstuk 4**. In totaal zijn ruim 32.000 monsters afgenomen. De gemiddelde prevalentie van dragerschap van *S. aureus* was 21,6%. De verschillen tussen landen bleven bestaan na correctie voor leeftijd en geslacht: de prevalentie onder Zweedse deelnemers was meer dan twee keer zo hoog als onder Hongaarse deelnemers (29% versus 12%). Het resistentie niveau van de geïsoleerde *S. aureus* was vrij laag (<10%). De uitzonderingen hierop waren het relatief hoge niveau van resistentie tegen macroliden, welke in Frankrijk en België tussen de 15 en 20% was, en de al vaak bevestigde hoge resistentie tegen penicilline in alle landen: deze varieerde van 65% in Oostenrijk tot 87% in Spanje. De prevalentie van MRSA was maximaal 2,1%.

In **Hoofdstuk 5** zijn risicofactoren voor het dragen van een resistente *S. aureus* bacterie, zoals antibioticagebruik, leeftijd en beroep, nader bekeken. Van de 6.906 geïsoleerde *S. aureus* was 77% resistent tegen minstens een antibioticum, en in 7,1% werd meervoudige resistentie (tegen meer dan drie verschillende antibiotica) aangetroffen. Het aantal antibioticavoorschriften van de deelnemende huisartsen had geen significant effect op het dragerschap van een resistente *S. aureus*, terwijl jongere leeftijd van de deelnemers en een hogere proportie van penicillinevoorschriften in een huisartsenpraktijk de kans op

dragerschap van een resistente *S. aureus* wel verhoogden. Tevens vonden we een hoger risico op meervoudige resistentie bij deelnemers werkzaam in de gezondheidszorg of kinderopvang. Tenslotte werd de variatie in resistentie vooral verklaard op nationaal niveau en niet zozeer op praktijkniveau.

Behandeling van bacteriële huidinfectie in de eerstelijns zorg

In **Hoofdstuk 2** zijn de eerstelijns richtlijnen voor de behandeling van bacteriële huidinfecties beschreven, inclusief de mate waarin deze gebaseerd zijn op gegevens over resistentie. Dertien richtlijnen uit acht Europese landen waren beschikbaar voor de behandeling van vaak voorkomende huidinfecties gerelateerd aan *S. aureus*: impetigo, cellulitis, erysipelas, folliculitis en furunkel. Onze resultaten laten internationaal overeenkomsten zien: alle aanbevolen antibiotica behoren tot de bèta-lactam klasse, meestal smal-spectrum. De geadviseerde duur van de behandeling was zeer consistent, de dosering varieerde echter sterk tussen de richtlijnen: de hoogste doseringen werden geadviseerd in Zweden. Zeven richtlijnen (54%) verwezen niet naar wetenschappelijke publicaties met betrekking tot resistentie; indien deze informatie wel aanwezig was, was deze veelal (75%) van internationale oorsprong en dus niet nationaal of regionaal.

Hierna is in **Hoofdstuk 6** de congruentie tussen de resistentiepatronen van commensale *S. aureus* en de feitelijke antibiotische behandeling van huidinfecties beschreven. Gegevens uit huisartsenpraktijken over voorgeschreven antibiotica waren beschikbaar uit in vijf landen: België, Kroatië, Frankrijk, Hongarije en Nederland. Bèta-lactam penicillines (veelal co-amoxiclavulaanzuur) werden in 43% van de gevallen gebruikt voor de behandeling van huidinfecties in de eerste lijn. Huisartsen in Frankrijk en Nederland vielen op met een hoog aandeel (>20%) van voorschriften van tetracyclines en bijna geen lincosamides, terwijl huisartsen in Hongarije juist vaker macrolides voorschreven voor huidinfecties. Huisartsen in Frankrijk en België schreven vaker penicillines voor (vooral amoxicilline, in beide landen 11%), vergeleken met huisartsen in de andere landen.

Voor elk land werd een “nationale congruentiemaat” berekend, gebaseerd op het aantal voorgeschreven antibiotica en het bijbehorende *S. aureus* resistentie niveau in een land. Deze congruentiemaat varieerde van 84% in Frankrijk tot 93% in Kroatië. Wanneer bèta-lactamase gevoelige penicillines buiten beschouwing worden gelaten stijgt de congruentiemaat naar boven de 94% voor alle vijf landen.

In **Hoofdstuk 7** relateerden we de eerder beschreven behandelrichtlijnen aan de resistentiepatronen van commensale *S. aureus*. Vrijwel alle eerste- en tweede-keuze aanbevelingen voor antibiotica sloten aan op de commensale resistentiepatronen van *S. aureus* in de betreffende landen, en betroffen antibiotica (veelal flucloxacilline) waarvoor in minder dan 20% van de gevallen resistentie bestond.

DISCUSSIE

In **Hoofdstuk 8** zijn de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift weergegeven en gerelateerd aan recente literatuur. Ook zijn methodologische overwegingen beschreven, en worden aanbevelingen gedaan voor verder onderzoek, de eerstelijnszorg en beleidsmakers.

Het doel van dit proefschrift was om kennis te vergaren omtrent resistentiepatronen in commensale *S. aureus*. Onze resultaten lieten op dit gebied een duidelijke spreiding tussen en ook binnen landen zien, dit wordt bevestigd door andere studies. Hoewel resistentiegenen zich niet houden aan landsgrenzen, blijkt er wel degelijk sprake te zijn van nationale patronen. Terwijl de behandelrichtlijnen redelijk consistente aanbevelingen bevatten, was er veel variatie in de voorgeschreven antibiotica voor de behandeling van huidinfecties. Deze resultaten worden ook in andere studies gevonden. Er lijkt in de Noord-Europese landen (die bekend staan om hun lagere resistentieniveau 's) een andere aanpak te worden gekozen dan in Zuid-Europa: in de eerstgenoemde regio worden minder vaak antibiotica voorgeschreven, en ook minder gevarieerd, maar wel met een hogere dosis. Op basis van onze resultaten kunnen we geen uitspraken doen over het oorzakelijke verband: worden er in Zuid-Europa meer verschillende antibiotica gebruikt vanwege de al bestaande hogere resistentie, of is de resistentie verhoogd als gevolg van deze voorschrijfpatronen? Uiteraard zijn er vele andere factoren die meespelen bij de behandeling van een bacteriële infectie, zoals kosten, kennis, en kwaliteit van de zorg. De informatie over resistentie die gepresenteerd wordt in dit proefschrift is een van deze aspecten, die een randvoorwaarde voor effectiviteit van behandeling kan worden genoemd.

Vergeleken met de resistentieniveaus van *S. aureus* in ziekenhuizen, is er binnen de eerstelijnszorg nog geen reden tot grote onrust, ook niet wat betreft de prevalentie van MRSA. Wel is het van belang om deze situatie te handhaven,

en acht te slaan op de nationale verschillen die wij aangetoond hebben om het probleem van resistentie-ontwikkeling op een gepaste wijze aan te pakken. Op deze manier zal de gezondheidszorg nog gedurende lange tijd in staat zijn om bacteriële infecties effectief te behandelen.

Methodologische overwegingen

Dit proefschrift heeft waardevolle kennis over resistentiepatronen in commensale *S. aureus* opgeleverd, welke op meerdere niveaus van belang is: 1) op een 'ecologisch' niveau biedt het inzicht in de blootstelling aan antibiotica binnen een populatie, en 2) in de dagelijkse praktijk van de huisarts bieden deze resultaten handvatten om de behandeling van *S. aureus* infecties te verbeteren. Binnen dit kader zijn er enkele methodologische aannames gedaan die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

Een belangrijke aanname betreft de extrapolatie van de gevonden resistentiepatronen van commensale *S. aureus* in het neusslijmvlies, naar de resistentiepatronen van pathogene *S. aureus* bij huidinfecties. Het is bekend dat commensale *S. aureus* zich kan ophouden op meerdere locaties op het lichaam. Hoewel de neus de meest voorkomende locatie is, hebben we door ons hiertoe te beperken tot mogelijk 50% van commensaal *S. aureus* over het hoofd gezien. Onze aanname wordt echter ondersteund door een studie van Miller, welke een hoge mate van congruentie tussen de zogenaamde spa-types van commensale en pathogene *S. aureus* monsters rapporteerde. Wij kennen geen studie die de resistentiepatronen van commensale en pathogene *S. aureus* vergelijkt.

Onze studie richt zich op de commensale flora vanwege de vorming van een resistentiereservoir aldaar, waarin overdracht van resistentiegenen gemakkelijk kan plaatsvinden. Hierdoor is antimicrobiële resistentie vaak eerst in deze omgeving waar te nemen, alvorens zich te verspreiden naar pathogene bacteriën (vaak afkomstig uit de commensale flora). Om deze reden wordt de commensale flora als de belangrijkste informatiebron over resistentie beschouwd.

Een andere belangrijke aanname betreft de relatie tussen *S. aureus* en huidinfecties: dit proefschrift heeft verondersteld dat de vijf huidinfecties waarover de behandelrichtlijnen zijn beoordeeld te allen tijde door *S. aureus* veroorzaakt worden. Hoewel dit wordt gerapporteerd voor het grootste deel van deze huidinfecties, is dit een extrapolatie: ook andere pathogenen zoals

streptokokken veroorzaken huidinfecties. Op basis van het andere resistentiepatroon van streptokokken zou het voorschrijven van bijvoorbeeld penicilline voor deze infecties wel juist kunnen zijn. Tenslotte hebben we ons in deze studie beperkt tot de huidinfecties welke behandeld zijn met systemische antibiotica; toekomstig onderzoek zou zich ook kunnen richten op niet of anders (bijvoorbeeld met lokale middelen) behandelde varianten.

De derde methodologische aanname is gerelateerd aan de verzamelde gegevens over voorgeschreven antibiotica. In elk van de negen deelnemende landen hebben ongeveer twintig huisartsenpraktijken aan de APRES studie deelgenomen. Deze huisartsen zijn geworven via bestaande netwerken, welke op hun beurt weer representatief zijn voor de landelijke populatie van huisartsen (met betrekking tot leeftijd en geslacht). Echter in verschillende landen (zoals Spanje en België) is het duidelijk dat het netwerk maar een beperkte regio van het land beslaat, daarom geldt de representativiteit enkel voor deze regio (respectievelijk Catalonië en Vlaanderen).

Hiernaast bleek de verzameling van gegevens over antibioticavoorschriften zeer complex te zijn. Er werden binnen Europa en ook zelfs binnen landen verschillende software systemen in huisartsenpraktijken gebruikt. Ook voor het registreren van de diagnose werden verschillende classificatiesystemen gebruikt (bijvoorbeeld ICPC en ICD10), en de registratie van het patiëntenbestand gebeurde op wisselende wijze. In sommige landen zijn patiënten verplicht zich in te schrijven bij een vaste huisarts, terwijl in andere landen alleen informatie bekend is over de mensen die de huisarts bezoeken.

Niet alle huisartsenpraktijken waarin monsters bij deelnemers zijn afgenomen waren uiteindelijk in staat voorschrijfgegevens aan te leveren. Onze aanname is dat deze ontbrekende gegevens vergelijkbaar zijn met de gegevens die we wel hebben verkregen. Dit wordt ondersteund door de validatie met gegevens van het Europese Netwerk voor de Surveillance van Antimicrobiële Consumptie (ESAC-Net). Het bleek helaas in de meeste landen onmogelijk om data over de hoeveelheid antibioticum per voorschrift, in de vorm van Defined Daily Doses (DDDs), aan te leveren. Onze studie laat zien dat er op het gebied van homogene (en daardoor vergelijkbare) registratie van gegevens nog veel winst te behalen is in de eerstelijnszorg in Europa.

Tenslotte is het van belang de 'ecologische context' van het gehele proefschrift

in acht te nemen, met name met betrekking tot Hoofdstuk 5 en 7. In Hoofdstuk 5 vergelijken we de resistentie van commensale *S. aureus* in monsters van individuele deelnemers met de blootstelling aan antibiotica van alle personen die de huisartsenpraktijk in een jaar bezochten. In Hoofdstuk 7 worden gegevens over resistentie op nationaal niveau uitgezet tegen de aanbevelingen in nationale behandelrichtlijnen. Hierin ligt de aanname dat deze maten een goede benadering zijn van individuele kenmerken. Gezien het feit dat er bij de behandeling van bacteriële infecties in de eerstelijnszorg vaak ook geen individuele gegevens over pathogenen en resistentie beschikbaar zijn, menen wij dat onze resultaten zinvol zijn voor de dagelijkse praktijk van de huisarts.

Aanbevelingen

Dit proefschrift heeft nieuwe kennis en inzichten gebracht in de huidige stand van zaken over resistentie van commensale *S. aureus*, welke gebruikt kunnen worden om de verdere ontwikkeling van resistentie een halt toe te roepen. We besluiten met enkele aanbevelingen voor relevante sectoren: de wetenschap, de huisarts, en beleidsmakers.

Aanbevelingen voor toekomstig onderzoek

De ecologische studie-opzet toegepast in dit proefschrift heeft waardevolle kennis opgeleverd omtrent resistentie in commensaal *S. aureus*. Gebleken is dat huisartsen in de deelnemende Europese landen de behandeling van huidinfecties op verschillende manieren benaderen en uitvoeren. Een studie op patiënt-niveau zou meer informatie opleveren omtrent de relatie tussen diagnose, resistentie en de uiteindelijke effectiviteit van de behandeling.

Ten tweede raden we aan meer onderzoek te doen naar de overeenkomst tussen *S. aureus* geïsoleerd uit het neusslijmvlies en deze afkomstig van andere delen van het lichaam (zoals de huid). Met name de relatie tussen resistentie in commensale *S. aureus* en pathogene varianten is dan interessant; met deze informatie kan ons begrip van resistentie vergroot worden.

Hiernaast zouden studies over resistentiepatronen in andere commensale bacteriën ook van nut zijn. Aangezien infecties veelal worden veroorzaakt door een scala aan verschillende pathogenen, zou meer kennis over resistentiepatronen van toegevoegde waarde zijn. Deze kennis zou kunnen worden verwerkt in behandelrichtlijnen, naast informatie voor huisartsen hoe het onderscheid te maken tussen infecties veroorzaakt door deze verschillende

pathogenen.

Tenslotte is de mate waarin behandelrichtlijnen worden opgevolgd een interessant onderwerp van onderzoek, wat buiten de reikwijdte van dit proefschrift viel. Onze studie liet zien dat er binnen een land meerdere richtlijnen naast elkaar kunnen bestaan. Wat zijn voor een huisarts redenen om een infectie te behandelen, en wanneer deze behandeld wordt, op basis waarvan wordt dan voor een bepaald antibioticum gekozen? Een recente studie in verpleeghuizen liet zien dat tot 25% van de behandelingen met antibiotica niet passend zijn. Deze situatie zou kunnen verbeteren door middel van interventies gericht op de voorschrijvende arts.

Aanbevelingen voor de eerstelijnszorg

Recent zijn verschillende interventies ontwikkeld om het voorschrijven van antibiotica te optimaliseren. Deze interventies richten zich vooral op het reduceren van onnodige voorschriften, en het verhogen van kennis van de arts en de patiënt. Het “uitgestelde recept” is een voorbeeld van een succesvolle strategie: de patiënt krijgt wel een voorschrift voor een antibioticum, maar wordt aangemoedigd het antibioticum pas na enkele dagen bij de apotheek op te halen, wanneer er geen verbetering is opgetreden in de gezondheidssituatie. Om kennis te vergroten kunnen posters ingezet worden, bijvoorbeeld in het kader van “Antibiotic Awareness Day” welke jaarlijks georganiseerd wordt in november. Deze dag heeft als doel het publiek en zorgverleners te informeren over resistentie tegen antibiotica, en vervolgens normen, verwachtingen en houdingen ten aanzien van het voorschrijven en gebruik van antibiotica te veranderen.

Hiernaast zouden huisartsen ook kunnen profiteren van meer kennis over resistentiepatronen bij patiënten in de eigen praktijk. Deze kunnen in samenwerking met lokale laboratoria verkregen worden, wanneer bijvoorbeeld op reguliere basis monsters van de commensale flora of van pathogenen getest worden. Dit levert waardevolle informatie op over de resistentie in de praktijkpopulatie. Gecombineerd met het rekening houden met risicofactoren, zou dit de effectiviteit van de behandeling van bacteriële infecties kunnen verhogen.

Aanbevelingen voor beleidsmakers

Dit proefschrift laat zien dat resistentie in commensale *S. aureus* bij bezoekers van huisartsenpraktijken momenteel beduidend lager is dan in de

ziekenhuisomgeving. Desondanks is het belangrijk om een verslechtering te voorkomen, en tevens de huidige situatie te verbeteren. Resistentiepatronen en antibiotica-voorschrijfgedrag variëren per land: dit impliceert dat een nationale aanpak van dit probleem aan te bevelen is. Op internationaal niveau kan men uiteraard leren van 'best practices'.

Er zijn verschillende variabelen op nationaal niveau die invloed kunnen hebben op de ontwikkeling van resistentie: bijvoorbeeld of en in welke mate antibiotica zonder recept verkrijgbaar zijn, bijvoorbeeld via het internet. Een andere belangrijke factor is de aanwezigheid van een surveillance netwerk in een land om de ontwikkeling van resistentie op de voet te volgen. Meerdere studies hebben de waarde van een dergelijk netwerk in de strijd tegen antimicrobiële resistentie onderschreven. In Europa waren Denemarken, Zweden en Nederland de voorlopers op dit gebied: midden jaren negentig zijn respectievelijk DANMAP, STRAMA en SWAB opgericht. Tegelijkertijd staan deze landen bekend om hun lage resistentieniveau, in de eerste lijn maar ook in ziekenhuizen. De activiteiten van deze surveillance netwerken richten zich met name op het verspreiden van kennis omtrent antibiotica(resistentie) onder huisartsen, beleidsmakers, en groepen die behandelrichtlijnen opstellen. Dit heeft er in Zweden mede toe geleid dat het voorschrijfbeleid voor antibiotica aangepast is: hier vinden we, vergeleken met andere landen, een laag aantal voorgeschreven antibiotica, en wanneer er wordt voorgeschreven een kleinere variatie in soorten antibiotica en in een hogere dosis dan elders.

De hierboven genoemde initiatieven kunnen alle onder de noemer 'antimicrobial stewardship' geschaard worden. Evaluatiestudies van dergelijke stewardship programma's rapporteren een verminderd gebruik van antibiotica en een lager resistentieniveau. De Amerikaanse Vereniging van Infectieziekten (IDSA) heeft inmiddels richtlijnen gepubliceerd voor het opzetten van een antimicrobial stewardship programma, welke ook bruikbaar zijn in de eerstelijnszorg. Deze gezamenlijke strijd zal onze kansen tegen de evolutionaire kracht van antimicrobiële resistentie vergroten. Tenslotte zullen we, om niet alleen de situatie te stabiliseren maar ook daadwerkelijk te verbeteren, onze geest moeten openen, want:

"Vooruitgang is onmogelijk zonder verandering. Degenen die hun gedachten niet kunnen veranderen, kunnen niets veranderen".

— George Bernard Shaw

8

Summary and General Discussion

SUMMARY

Background and aim

The aim of this thesis is to contribute to efforts against resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), particularly in primary care, and to reduce the impact of antimicrobial resistance (AMR) on society. The multifactorial public health problem of AMR crosses national borders [1] and calls for combined efforts in several settings, for example, the hospital setting, primary care and veterinary sectors [2-5]. Since antibiotic usage is the main risk factor for the development of AMR [6-7], the primary care setting, where the majority of antibiotics for human use is being prescribed, is a critical area of attention [8]. Next to this, an increasing prevalence of community-associated resistance has been observed in the last decade, whilst attention has mainly been on the hospital setting [9-11].

The thesis aims to fill a knowledge gap and assesses community-associated AMR in the commensal microbiota, an important reservoir of AMR [12,13]. In particular, we have studied the major pathogen *S. aureus* which is associated with diagnoses ranging from relatively mild skin and soft tissue (SSTI) infections to severe bacteraemia, e.g. caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [9,14,15]. Based on the large variation in antibiotic prescription volume and patterns across Europe [16], we might be able to increase the appropriateness of antibiotic treatment by learning from best practices and changing prescription habits. In order to combat the development of AMR, national patterns of AMR should ideally be taken into account in the development of antibiotic treatment guidelines and in the treatment of bacterial infections [17-20]. Studies in the thesis therefore encompass AMR, antibiotic use and treatment guidelines in nine European countries, from Sweden in the North, Hungary in the East to Spain in the South.

The thesis collected valuable new data on AMR in commensal *S. aureus*, and combined with treatment guidelines and antibiotic treatment patterns of SSTIs in Europe several aspects of AMR have been assessed. The first part of the thesis concerns with AMR levels in commensal *S. aureus* in the community, and the risk factors for carrying such resistant bacteria. In the second part, we have applied this knowledge to daily practice by relating the AMR patterns to treatment guidelines and antibiotic prescriptions for skin infections.

Main findings

Commensal Staphylococcus aureus resistance in Europe

The first part of the thesis addressed AMR patterns of commensal *S. aureus*, using data collected in nine European countries. In **Chapter 3** the design of the APRES study ‘*The appropriateness of prescribing antibiotics in primary health care in Europe with respect to antibiotic resistance*’ is described, in which data were collected on AMR, antibiotic prescription patterns and treatment guidelines in primary care.

AMR was studied in a convenience sample from the community in the nine European countries by taking nose swabs: participants were eligible for inclusion when they visited their GP for a non-infectious condition and had not been prescribed antimicrobial agents nor had been hospitalized in the previous three months. Data on antibiotic prescriptions over the previous 5 years were extracted from the Electronic Medical Records (EMR) of General Practitioners (GPs). In all participating countries, the prevailing SSTIs treatment guidelines were collected.

The prevalence of *S. aureus* was described in **Chapter 4**. The overall prevalence of nasal *S. aureus* carriage was found to be 21.6%. After standardization for gender and age, a wide range in nasal *S. aureus* carriage rates was found between countries: prevalence in Swedish participants was more than twice as high compared with Hungarian participants (29% versus 12%).

In general, antibiotic resistance levels among the isolated *S. aureus* were low. Exceptions were the relatively high levels of macrolide resistance, which exceeded 15% in France and Belgium, and the (well-established) high levels of resistance to penicillin in all countries: ranging from 65% (Austria) to 87% (Spain). The prevalence of MRSA did not exceed 2.1% in any of the participating countries.

In **Chapter 5** we assessed the relationship between potential risk factors other than antibiotic use (such as age and profession of the patient) and resistance in commensal *S. aureus*. Of the 6,906 *S. aureus* isolates, 77% showed resistance to at least one antibiotic, 7.1% demonstrated multidrug resistance (3 or more

antibiotic classes), 78 (1.3%) cases of MRSA were found. Based on the EMR data, a large variation in antibiotic exposure was found between and within countries. While the level of exposure to antibiotics had no significant effect on carriage of resistant bacteria, younger age and a higher proportion of penicillin prescriptions in a general practice were associated with higher odds for any resistance at all in commensal *S. aureus*. Next to this, we found higher overall multidrug resistance rates in participants working in healthcare or a nursery. Finally, the variation in AMR was mostly explained at a country level (and not on a general practice level).

Treatment of SSTIs in primary care

In **Chapter 2**, we reviewed primary care treatment guidelines for bacterial skin infections (often associated with *S. aureus*) and assessed to what extent they are based on antibiotic resistance data. Thirteen primary care treatment guidelines were obtained from eight countries across Europe, regarding common skin infections in primary care: Impetigo, Cellulitis, Erysipelas, Folliculitis and Furuncle. Our results showed a high agreement across countries: all recommended antibiotics were of the beta-lactam class and mainly small spectrum. The advised treatment durations were consistent; the dosages however varied considerably, with the highest dosages recommended in Sweden. Seven guidelines (54%) were not based on scientific publications related to resistance, and in the guidelines that did include evidence on AMR, 75% of the references were from abroad.

In **Chapter 6** the congruence between the AMR patterns in commensal *S. aureus* and the actual treatment of SSTIs was presented in five countries. Beta-lactamase resistant penicillin, mainly represented by co-amoxiclav, was most often (43%) used for the treatment of SSTIs in primary care. France and the Netherlands stood out with a higher proportion (>20%) of tetracycline treatments (J01AA) and almost no lincosamides (ATC J01FF), while macrolides were more often prescribed for the treatment of SSTIs in Hungary. France and Belgium showed higher proportions of treatment of SSTIs with penicillins, mainly amoxicillin (both 11%), compared to the other three countries.

National congruence rates were calculated, based on the volume of each prescribed antibiotic and the resistance rate of commensal *S. aureus* against that antibiotic. The rates ranged from 84% (France) to 93% (Croatia). We also showed that the use of more penicillins decreased the congruence rate:

excluding penicillins for the treatment of SSTIs resulted in a congruence rate of 94% or higher in all countries.

Finally, in **Chapter 7** we assessed the treatment guidelines in the light of commensal *S. aureus* AMR patterns. Most of the first- and second-choice recommendations were congruent with the AMR patterns of commensal *S. aureus*, except for two recommendations for penicillin (a single dose aimed at pathogenic streptococci).

DISCUSSION

Commensal *Staphylococcus aureus* resistance in Europe

The prevalence of carriage of *S. aureus* in our study was on average 22%, with considerable inter-country variation (ranging from 12-29%). In previous studies, the average prevalence in healthy adults has been approximately 27%, although several recent studies have reported a prevalence of around 20% [21,22]. In our study, we have only used the anterior nares as a sampling site for *S. aureus*, which could lead to an underestimation of the true prevalence, since the pharynx, skin, and perineum are also common habitats of commensal *S. aureus* [23,24]. The inter-country variation in prevalence, with participants in Sweden having a prevalence more than double that of Hungary, could not be explained by the study design. Although *S. aureus* was isolated in eight different laboratories, we used standard protocols for the isolation and identification of *S. aureus* and carried out a validation study before the start of the investigation. It can be argued that genetic host factors play a role in this variation, as these have been found to contribute to *S. aureus* nasal carriage [25] and these factors were not taken into account in our study. Future studies on the prevalence of *S. aureus* carriage should further explore explanations for this inter-country variation [26].

The low resistance levels in commensal *S. aureus* found in our study cannot be directly compared to other investigations due to a lack of comparable studies. Few studies have focused on the commensal flora, and the ones that did investigate community-associated *S. aureus* often only focused on MRSA [10,27]. Nosocomial *S. aureus* pathogens have been studied more extensively and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) hosts a website on which up-to-date resistance rates of several pathogens are presented [28]. Several countries have also developed a national database in

which annual AMR data are presented [29].

The prevalence of MRSA we found in the commensal flora (maximum of 2.1%) is congruent with the reports of previous studies [30-33], and very low compared to prevalence in hospital settings [34,35]. Since several studies have shown a decrease in MRSA prevalence and/or infections [36], it can be argued that the low MRSA prevalence in our study could be the result of the increased public awareness of MRSA (and of AMR in general) and the subsequent measures taken to control MRSA over the recent years [37]. Several European countries have developed programmes aimed at reducing antibiotic prescriptions, and increasing public knowledge about MRSA and AMR [38]. Measures to control the spread of MRSA have focused on trying to break the chain of transmission (e.g. the isolation of colonized or infected patients or better hygiene) or trying to reduce the selective pressure for the emergence and persistence of MRSA by improving antibiotic prescribing) [39].

Regarding the risk factors we found for carrying resistant *S. aureus*, other studies have also reported multi-resistance in healthcare workers [40]. Higher proportional prescription of penicillins and younger age were also shown to be a risk factor in our study. While most other similar studies have not reported age as a risk factor [11,41,42], the ones that do report varying results [40,43]. For example, the elderly and children are often more exposed to antibiotic treatments and therefore more likely to carry a resistant *S. aureus* [43]. Other recent studies have confirmed that antibiotic prescriptions are a risk factor for AMR [41]. Although within-country variance in prescribed antibiotics was found, as has previously been described in other reports [16,44,45], we found the country level was the main factor which explained variations in AMR across Europe.

Treatment of SSTIs in primary care

The first part of the thesis described the resistance patterns of commensal *S. aureus* in primary care. Given that they are quite low across Europe, one might assume that the treatment of SSTIs, commonly associated with *S. aureus* [15], is straightforward. However, **Chapter 4** showed national variation in resistance patterns, while at the same time local AMR data is often not available in empirical treatment in primary care. In the second part of the thesis, we have further investigated the national differences in the treatment of SSTIs.

Our analysis of treatment guidelines for skin infections showed quite a lot of consistency between countries. However, the Swedish guidelines stand out: the recommended dosage is higher, and a narrow-spectrum beta-lactamase susceptible penicillin is often the recommended antibiotic. Differences in national guidelines could, for example, be explained by the availability of AMR data, different interpretations of evidence, cultural factors such as differing evaluations of risks and benefits, local market authorization procedures or other characteristics of the health care systems [46]. Evidence-based data regarding AMR was relatively limited for the treatment guidelines: only 46% included data on AMR, mostly from other countries. Although similar studies have not been undertaken for *S. aureus* infections, a study on bacterial meningitis guidelines also showed many differences between countries and a low integration of relevant AMR data [47].

Although the recommendations in the treatment guidelines were consistent, wide variation in actual prescriptions was observed. The thesis did not consider the extent of guideline adherence in the different countries, since individual factors also need to be taken into account when prescribing an antibiotic. The decision to prescribe an antibiotic is complex, based not only on the diagnosis and an assessment of the likely risk of complications, but also, for example, on the doctor–patient relationship, the patient’s history and expectations, and the time constraints of the consultation [44,48]. The GP will, in choosing an antibiotic, also consider various characteristics of the patient, like allergies, or the likelihood of the diagnosis.

The variation in antibiotic prescription patterns that we found within and between countries has been confirmed by and is congruent with several other published studies [16,45,49]. Also regarding antibiotic prescriptions, Scandinavian countries (represented by Sweden in our study) stand out with a proportionally high use of narrow-spectrum penicillins, which is, for example, shown by the ESAC network [50]. A 2013 study which conducted qualitative interviews of 80 primary care clinicians in nine European countries, showed that Northern European respondents generally favoured narrow-spectrum agents, motivated by containing resistance whilst Southern/Eastern European respondents were more often motivated by maximizing treatment effectiveness and so justified the use of broad-spectrum antibiotics [51]. This approach might be more appropriate in southern and eastern European countries, where AMR rates are relatively high. Our study could not assess whether the higher AMR

rates in southern countries were the result of more diverse prescription patterns, or on the contrary the prescription patterns are the result of the national AMR patterns. Longitudinal studies could provide more insight into the exact nature of this relationship.

METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS

The data that have been presented in the first part of the thesis form a unique database of commensal *S. aureus* AMR patterns across nine European countries. The results we have shown are valuable in two ways: 1) on an ecological level they provide insight into the selective pressure on a population level, and 2) the commensal AMR data can be used in daily practice to improve the treatment of individual patients with *S. aureus* infections, in particular SSTIs. The most important assumptions we made concern the extrapolation of the resistance rates and patterns we found in the nasal commensal flora, to those in pathogenic *S. aureus* (related to skin infections). It has been demonstrated that commensal *S. aureus* can be isolated from several body sites. Although the nares are the most common site [23,24], by swabbing only the nares we potentially missed up to 50% of all carriers. Despite this, a study by Miller compared isolates from several body sites and classified both the infection strains and the colonizing strains regarding their Spa-type, resulting in a high congruency between the sites [24]. Nonetheless, we are not aware of any study comparing the actual AMR patterns of infection strains versus colonizing strains. We choose to study the commensal flora because of its importance as a reservoir of resistance, in which resistance can easily be transferred to other bacteria. This results in antibiotic resistance often being present in commensal bacteria first, before disseminating to their pathogenic counterparts [13,52], which often originate from one's own flora [24,53]. For this reason, the commensal flora is the most important source of information regarding the current ecological status of AMR. Also, by including patients without current bacterial infection, our sample size is powered to assess differences on an international level, providing valuable information about a possible approach to combat AMR.

Another important assumption referred to the relationship between *S. aureus* and SSTIs: we assumed that the five assessed skin infections are always caused by *S. aureus*. While this has been reported for most of these skin infections [15,54], this is an extrapolation for all cases of skin infection. Other pathogens

often causing SSTIs are streptococci, with presumably different AMR patterns. For example, recent studies indicate that penicillin resistance in streptococci remains low [55], implying that penicillin, which is mostly ineffective against *S. aureus*, could be used for streptococci. This thesis only focused on skin infections, since the other infections related to *S. aureus* (e.g. bacteraemia) have a low prevalence in primary care and are more often found in a hospital setting, where different AMR levels are found [34]. Finally, we were only able to analyse diagnosed SSTIs which were treated with systemic antibiotics. Future studies should investigate not or otherwise treated diagnosed SSTIs.

The third major methodological assumption made for the thesis is related to the collection of prescription data. In our study, GP networks participated in each of the nine countries. For each network, approximately 20 practices took part in the data collection: the swabbing of the patients and the provision of EMRs. The participating practices were representative for the network, which in turn is assumed to be representative for the country as a whole (e.g. regarding age and gender). Nonetheless, we know that in some countries (e.g. Spain and Belgium) the GP network was located in one region, and therefore the participating practices were only representative for that particular region (respectively Catalonia and Flanders). This might influence the representativeness of the data for the whole country; however no data for the other regions was available.

Next to this point, the collection of prescription data was complex. Different registration and software systems are used, between and also within countries. Different systems for coding diagnostic information are also used (e.g. ICPC versus ICD10), and in some countries patients are required to be registered (listed) at a certain practice whilst GPs in other countries can only provide information on the patients who visited the practice in the last year. Diagnostic codes can be re-coded, and a different patient system does not affect the proportional prescription rates presented in Chapter 5, but this will influence our measurement of the total amount of antibiotics prescribed per 100 patients.

Not all practices that participated in the swabbing process were able to provide complete and valid prescription data in a comparable format. We assumed that missing data display the same patterns as the available data. This is supported by our validation of the data, as the prescription data we collected was

compared with the national ESAC data [16, 56]. Our initial goal was to also include data on the volume of prescribed antibiotics, using Defined Daily Doses (DDDs) [57], however, for most of the countries it was not possible to calculate valid DDD values for the prescribed antibiotic packages. Our study shows the drawbacks of different registration systems, within and between countries. This provides an opportunity for policy makers in Europe to encourage homogeneity and congruence in data collection procedures in the primary care setting.

Overall, the methodological context of the entire thesis is an ecological one, particularly regarding Chapters 5 and 7. In Chapter 5 we compare the individual characteristics of commensal AMR with antibiotic exposure on a (higher) practice level: the amount of antibiotic prescriptions in the practice of the participant. In Chapter 7 we compare aggregated AMR data on a national level with antibiotic treatment recommendations in national primary care treatment guidelines. We have assumed that these ecological measures are the best approximation of the same variable on an individual level. A study design with antibiotic exposure and treatment data on an individual level would have provided other information; however, given that empirical treatment in primary care is often carried out with no individual data (e.g. from culture), we believe our design contributes to daily practice in primary care.

RECOMMENDATIONS

The international and ecological approach of the thesis has filled a knowledge gap and provides valuable insights into the current situation regarding AMR in commensal *S. aureus*. These insights can be used to further control the development of AMR and improve the treatment of *S. aureus* infections in primary care. This section will provide recommendations for several stakeholders: the scientific field, general practitioners and policy makers.

Recommendations for future research

The ecological study design applied in this thesis has provided some valuable new insights and was a first step in collecting information on commensal AMR across Europe. The comparison between countries has shown differences in the treatment of SSTIs in primary care. A study conducted on the individual patient level, however, assessing the direct link between diagnosis, resistance and outcomes of the treatment would provide more detailed information on the effectiveness of the antibiotic treatment of SSTIs or other *S. aureus* infections.

Secondly, related to one of the assumptions made in this thesis, we recommend the scientific community to further investigate the congruence between *S. aureus* in the nasal flora and on other bodily sites, and in particular the relationship between resistance in the commensal flora and in pathogenic bacteria. This information would be a valuable contribution to making AMR data more easily interpretable.

Next to this, studies regarding commensal AMR patterns of other pathogens would also be very useful. Since infections are typically caused by a range of different pathogens, more AMR data could be integrated into the guidelines, along with information on how to distinguish between the clinical expressions of the different pathogens.

Finally, it would be interesting to further assess the adherence to treatment guidelines. Our study revealed, for example, that multiple guidelines may exist in one country. What are the reasons for GPs to choose a treatment, and if an antibiotic is prescribed, what influences their choice of antibiotic? A recent study in nursing homes showed that up to 25% of the antibiotic prescriptions in that setting were not appropriate [58]. This could, for example, be improved by interventions aimed at prescribers, like was shown by other studies [59,60].

Recommendations for general practice

Several interventions have been developed lately to decrease or improve antibiotic prescription behavior. Given the national variations in AMR patterns these incentives would preferably be fine-tuned to the national situation, but the overall aim of these approaches is usually to reduce unnecessary prescriptions, and to increase both patient and physician knowledge on AMR [44]. For example, a multicenter trial in six European countries, combining point-of-care testing with communication training led to a 62% reduction in antibiotic prescribing for acute respiratory tract infections in primary care [60]. Other interventions might include delayed prescribing: the patient receives a prescription but is urged to only obtain the actual drug once the situation remains unaltered after a certain amount of time. This has been shown to reduce antibiotic use by patients without negatively impacting on patient outcome and has the additional benefit that patients become less reliant on antibiotics [44]. Interventions to increase knowledge might include posters

aimed at patients, or initiatives such as the “Antibiotic Awareness Day” which is initiated by the EC each year in November. Its aim is to inform the public and general practice about AMR, change social norms about prescribing, and influence attitudes towards antibiotic resistance and use [61].

Next to this, GPs could benefit from knowledge on local AMR patterns. These could be obtained in cooperation with local laboratories, where samples are sent for culture. While treatment guidelines in primary care are based on empirical treatment, a suggestion might be that each GP practice regularly sends a culture to the laboratory (e.g. 1 in every 20 patients), focusing on the most common pathogens in primary care such as streptococci, staphylococci and/or *Escherichia coli*. After a while, this would result in an overview of AMR in the commensal flora from the practice population, providing valuable information to be discussed in GP practice and with interdisciplinary medical teams. This surveillance information, alongside the incorporation of risk factors regarding carriage of a resistant pathogen, could increase treatment effectiveness for individual patients [62]. Finally, feedback on their own prescription behavior could increase awareness regarding AMR in GPs. To achieve such a feedback system the first step is to maintain EMRs correctly and consistently [63].

Recommendations for policy makers

Although the public health problem of AMR at the moment might be smaller in primary care compared with the hospital setting [ears], it is certainly important to keep the problem at bay and try to improve the current situation. Our results show between-country variation for both commensal AMR levels and antibiotic prescription patterns; therefore an important approach towards AMR will be on the national policy level. International efforts such as learning from best practices might be useful to decrease the impact of AMR on society [64]. This is, for example, one of the activities of WHO-Euro, which connects several countries, regions and settings in order to approach AMR with interdisciplinary expertise [65]. Several differences on a country level can be identified as influencing the development of AMR, for which tools can be developed.

For example, one of these characteristics is over-the-counter-sales of antibiotics, which used to be common practice in part of the European Union, mostly in the southern countries [66]. Nowadays, this is prohibited and a prescription is mandatory to receive an antibiotic. However, in the era of digital

purchases this might be difficult to control. The contribution of this former policy to the higher overall AMR levels in the South is unknown, but rational and prudent use of antibiotics will certainly improve the situation [17].

Another important factor that sets apart certain countries is the existence of a surveillance network. It is widely argued that this type of surveillance systems contributes to controlling AMR, e.g. by increasing awareness of GPs and policy makers and resulting in more evidence-based guidelines and possibly higher adherence [67-69]. The first countries to have developed such a network in the mid-nineties were Denmark, Sweden and The Netherlands (respectively DANMAP, STRAMA and SWAB [29,70,71]). These countries are known internationally for their low AMR rates, both in hospitals and the community. The activities deployed by these groups focus on matters regarding antibiotic use and containment of antibiotic resistance, and facilitating an interdisciplinary working model, involving all relevant stakeholders, including national and local authorities and non-profit organizations. This has, for example, resulted in slightly different policies in Sweden, regarding an overall lower prescription volume, high dosage of antibiotics and a smaller variation in antibiotic treatments [56], and it is not clear yet whether this policy might also be beneficial for other European countries [72].

These interdisciplinary and multi-faceted approaches are needed to tackle this ecological public health problem. All across Europe, national and international stakeholders have urged action on the area of diagnostics [2], the development of new antibiotics or exploring non-antibiotic approaches [73], and initiatives in the husbandry and food sector [74,75]. This has, for example, led to a decrease of antibiotic prescriptions in the veterinary sector in the Netherlands, previously one of the highest prescribers for animal use, of 50% in only a few years' time [76,77].

These aforementioned initiatives can be grouped under the often used term 'antimicrobial stewardship'. Several programmes have been initiated across Europe, mostly in hospitals [78-82]. Evaluations of these programs have reported lower antibiotic use and resistance in the hospitals concerned, which have translated into lower costs and shorter hospital stays [83]. The Infectious Diseases Society of America (IDSA) has identified several important factors on how to set up a successful antimicrobial stewardship programme and has created guidelines [84]. These have already been extrapolated to other settings,

such as the education of GPs or providing the public with information on AMR [60,85]. Actions on multiple levels involving stakeholders from several settings will increase our chances in the battle against the natural evolutionary force of bacteria, and will help maintain all of the current tools to combat infectious diseases at our disposal. Finally, in order to not only stabilize but also improve the current situation, we will need to open up our minds:

“Progress is impossible without change, and those who cannot change their minds cannot change anything”.

— George Bernard Shaw

REFERENCES

1. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 2013;13(12):1057-98.
2. World Health Organisation. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 Accessed 28 March 2015.
3. European Commission. Staff working paper of the services of the Commission on antimicrobial resistance. http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/antimicrobial_resistance.pdf Accessed 28 March 2015.
4. UK Government Department of Health. Antimicrobial Resistance Strategy. 2013-2018 UK AMR strategy. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/238876/AMR_Strategy_Impact_Assessment_-_FINAL_22_August_2013.pdf Accessed on 28 March 2015.
5. Marshall BM, Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(4):718-733.
6. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis* 2014;14:13.
7. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 340:c2096.
8. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M; ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005; 365:579-87.
9. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:275-86.
10. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol* 2012;15:588-95.
11. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. *Clin Infect Dis* 2003; 36:131-9.
12. Davies JE: Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* 1997;207:15-27.
13. Nys S. Antibiotic resistance and the commensal flora. Role of the commensal flora in the development and spread of antimicrobial resistance. PhD thesis. Universiteit Maastricht; 2005.
14. Kluytmans-VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW. Community-acquired methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clin Microbiol Infect 2006; 12 Suppl 1:9-15.
15. Bernard P. Management of common bacterial infections of the skin. Curr Opin Infect Dis 2008, 21:122–128.
 16. Adriaenssens N, Coenen S, Versporten A, Muller A, Minalu G, Faes C et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe (1997-2009). J Antimicrob Chemoth 2011; 66 Suppl:vi3-12.
 17. Carrie AG, Zhanel GG. Antibacterial use in community practice: assessing quantity, indications and appropriateness, and relationship to the development of antibacterial resistance. Drugs 1999; 57:871-81.
 18. Kronenberg A, Koenig S, Droz S, Mühlemann K. Active surveillance of antibiotic resistance prevalence in urinary tract and skin infections in the outpatient setting. Clin Microbiol Infect 2011, 17:1845–1851.
 19. Beardsley JR, Williamson JC, Johnson JW, Ohi CA, Karchmer TB, Bowton DL. Using local microbiologic data to develop institution-specific guidelines for the treatment of hospital-acquired pneumonia. Chest 2006;130:787-93.
 20. Andremont A, Bonten M, Kluytmans J, Carmeli Y, Cars O, Harbarth S. Fighting bacterial resistance at the root: need for adapted EMEA guidelines. Lancet Infect Dis 2011; 11: 6-8.
 21. Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 2010; 362: 9-17.
 22. Chen CS, Chen CY, Huang YC. Nasal carriage rate and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among medical students at a Taiwanese university. Int J Infect Dis 2012;16(11):e799-803.
 23. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis 2005; 5: 751-62.
 24. Miller LG, Eells SJ, Taylor AR, David MZ, Ortiz N, Zychowski D et al. *Staphylococcus aureus* colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology. Clin Infect Dis 2012 ;54(11):1523-35.
 25. Johannessen M, Sollid JE, Hanssen AM. Host- and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. Front Cell Infect Microbiol 2012; 2:56.
 26. Van Belkum A, Emonts M, Wertheim H, De Jongh C, Nouwen J, Bartels H et al. The role of human innate immune factors in nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. Microbes Infect 2007; 9: 1471-7.
 27. Carleton HA, Diep BA, Charlebois ED, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Community-Adapted Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Population Dynamics of an Expanding Community Reservoir of MRSA. JID 2004; 190:1730-8.

28. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net). http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/databse.aspx Accessed 28 March 2015
29. Prins JM, Degener JE, De Neeling AJ, Gyssens IC; SWAB Board. Experiences with the Dutch Working Party on antibiotic policy (SWAB). *Euro Surveill* 2008; 13(46). pii: 19037.
30. Lozano C, Gomez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 500-5.
31. Sa-Leao R, Sanches IS, Couto I, Alves CR, de Lencastre H. Low prevalence of methicillin-resistant strains among *Staphylococcus aureus* colonizing young and healthy members of the community in Portugal. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 237-245.
32. Donker GA, Deurenberg RH, Driessen C, Sebastian S, Nys S, Stobberingh EE et al. The population structure of *Staphylococcus aureus* among general practice patients from The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:137-43.
33. Fritz SA, Garbutt J, Elward A, Shannon W, Storch GA. Prevalence of and risk factors for community-acquired methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* colonization in children seen in a practice-based research network. *Pediatrics* 2008;121(6):1090-8.
34. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf> Accessed 28 March 2015
35. Johnson AP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (suppl 4): iv43-iv48.
36. Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Petit S, Gershman K et al. Health Care–Associated Invasive MRSA Infections, 2005-2008. *JAMA* 2010;304(6):641-647.
37. Johnson AP, Davies J, Guy R et al. Mandatory surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia in England: the first 10 years. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 802-9.
38. Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, Pittet D et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob Resist Infect Control* 2012, 1:11.
39. Charani E, Holmes AH. Antimicrobial stewardship programmes: the need for wider engagement. *BMJ Qual Saf.* 2013;22(11):885-7.
40. Kristinsson KG. Effect of antimicrobial use and other risk factors on antimicrobial resistance in pneumococci. *Microb Drug Resist* 1997;3(2):117-23.
41. Catry B, Latour K, Jans B, Vandendriessche S, Preal R, Mertens K et al. Risk factors for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a multi-laboratory study. *PLoS One*

- 2014 Feb 26;9(2):e89579.
42. Hidron AI, Kourbatova EV, Halvosa JS, Terrell BJ, McDougal LK, Tenover FC et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clin Infect Dis* 2005;41(2):159-66.
 43. Davis MF, Peterson AE, Julian KG, Greene WH, Price LB, Nelson K et al. Household risk factors for colonization with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS One* 2013;8(1):e54733.
 44. Shallcross LJ. Antibiotic overuse: a key driver of antimicrobial resistance. *Br J Gen Pract* 2014; 64(629): 604–605.
 45. Cordoba G, Siersma V, Lopez-Valcarcel B, Bjerrum L, Llor C, Aabenhuis R et al. Prescribing style and variation in antibiotic prescriptions for sore throat: cross-sectional study across six countries. *BMC Fam Pract* 2015; 16:7.
 46. Burgers JS, Bailey JV, Klazinga NS, Van Der Bij AK, Grol R, Feder G et al. Inside Guidelines: Comparative analysis of recommendations and evidence in diabetes guidelines from 13 countries. *Diabetes Care* 2002; 25: 1933-9.
 47. De Gaudio M; Chiappini E; Galli L; De Martino M. Therapeutic Management of Bacterial Meningitis in Children: A Systematic Review and Comparison of Published Guidelines from a European Perspective. *J Chemotherapy* 2010; 22(4): 226-237.
 48. Drekonja D, Filice G, Greer N, Olson A, MacDonald R, Rutks I, Wilt TJ (editors). *Antimicrobial Stewardship Programs in Outpatient Settings: A Systematic Review*. Washington (DC): Department of Veterans Affairs; 2014.
 49. Grundmann H, Aanensen DM, Van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010; 7:e1000215.
 50. Versporten A, Coenen S, Adriaenssens N, Muller A, Minalu G, Faes C et al. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC):outpatient penicillin use in Europe (1997–2009). *Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 6: vi13–vi23.
 51. Wood F, Phillips C, Brookes-Howell L, Hood K, Verheij T, Coenen S et al. Primary care clinicians' perceptions of antibiotic resistance: a multi-country qualitative interview study. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):237-43.
 52. Andremont A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 2003; 69: 601-7.
 53. De Lastours V, Chau F, Tubach F, Pasquet B, Ruppé E, Fantin B. Independent behavior of commensal flora for carriage of fluoroquinolone-resistant bacteria in patients at admission. *Antimicrob Agents Ch* 2010; 54: 5193–200.
 54. Ray GT, Suaya JA, Baxter R. Microbiology of skin and soft tissue infections in the age of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76(1):24-30.
 55. Albrich WC, Monnet DL, Harbarth S: Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis* 2004,

- 10:514–517.
56. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial consumption interactive database (ESAC-Net). http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/database.aspx Accessed 28 March 2015.
 57. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index 2015. http://www.whocc.no/atc_ddd_index/ Accessed 28 March 2015.
 58. Van Buul LW, Veenhuizen RB, Achterberg WP, Schellevis FG, Essink RTGM, de Greeff SC et al. Antibiotic Prescribing In Dutch Nursing Homes: How Appropriate Is It? *J Am Med Dir Assoc* 2015;16(3):229-37.
 59. Pulcini C, Gyssens IC. How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. *Virulence* 2013;4(2):192-202.
 60. Little P, Stuart B, Francis N, Douglas E, Tonkin-Crine S, Anthierens S et al. Effects of internet-based training on antibiotic prescribing rates for acute respiratory-tract infections: a multinational, cluster, randomised, factorial, controlled trial. *Lancet* 2013;382(9899):1175-82.
 61. European Centre for Disease Prevention and Control: European Antibiotic Awareness day. <http://ecdc.europa.eu/en/EAAD/Pages/Home.aspx> Accessed 28 March 2015 .
 62. Wilson AP, Kiernan M. Recommendations for surveillance priorities for healthcare-associated infections and criteria for their conduct. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67 Suppl 1:i23-8.
 63. Miller RH, Sim I. Physicians' use of electronic medical records: barriers and solutions. *Health Aff (Millwood)* 2004;23(2):116-26.
 64. Cully M. Public health: The politics of antibiotics. *Nature* 2014;509(7498):S16-7.
 65. Leung E, Weil DE, Raviglione M, Nakatani H; World Health Organization World Health Day Antimicrobial Resistance Technical Working Group. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ* 2011; 89: 390-2.
 66. Llor C, Cots JM. The Sale of Antibiotics without Prescription in Pharmacies in Catalonia, Spain. *Clin Infect Dis* 2009; 48(10): 1345-1349.
 67. Lugtenberg M, Burgers JS, Westert GP. Effects of evidence-based clinical practice guidelines on quality of care: a systematic review. *Qual Saf Health Care* 2009; 18:385-92.
 68. Lamy JB, Ebrahiminia V, Riou C, Seroussi B, Bouaud J, Simon C et al. How to translate therapeutic recommendations in clinical practice guidelines into rules for critiquing physician prescriptions? Methods and application to five guidelines. *BMC Med Inform Decis Mak* 2010; 10:31-44.
 69. Grol R, Van Weel C. Getting a grip on guidelines: how to make them more relevant for practice. *Br J Gen Pract* 2009; 59: e143–e144.
 70. Hammerum AM, Heuer OE, Emborg HD, Bagger-Skjøt L, Jensen VF, Rogues AM et al. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program.

- Emerg Infect Dis 2007; 13(11): 1633–1639.
71. Mölstad S, Erntell M, Hanberger H, Melander E, Norman C, Skoog G et al. Sustained reduction of antibiotic use and low bacterial resistance: 10-year follow-up of the Swedish Strama programme. *Lancet Infect Dis* 2008;8(2):125-32.
 72. Enne VI: Reducing antimicrobial resistance in the community by restricting prescribing: can it be done? *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:179-182.
 73. Fernebro J. Fighting bacterial infections—Future treatment options. *Drug Resist Update* 2011; 14(2): 125–139.
 74. Fluit AC. Livestock associated *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(8): 735–744.
 75. Van Cleef BA, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011;17: 502-505.
 76. SWAB. Nethmap 2014: Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in The Netherlands. http://www.wageningenur.nl/upload_mm/1/a/1/0704c512-5b42-4cef-8c1b-60e9e3fb2a62_NethMap-MARAN2014.pdf Accessed on 28 March 2015.
 77. Grave K, Torren, Edo J, Mackay D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2037-40.
 78. Ohi CA, Dodds Ashley ES. Antimicrobial stewardship programs in community hospitals: the evidence base and case studies. *Clin Infect Dis* 2011; 53 Suppl 1: S23-8; quiz S9-30.
 79. MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial Stewardship Programs in Health Care Systems. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 638–656.
 80. Drew RH. Antimicrobial stewardship programs: how to start and steer a successful program. *J Manag Care Pharmy* 2009; 15(2 Suppl):S18-23.
 81. Cunha CB, Varughese CA, Mylonakis E. Antimicrobial stewardship programs (ASPs): the devil is in the details. *Virulence* 2013;4(2):147-9.
 82. Lee CR, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(9):4274-305.
 83. Tumbarello M, Sali M, Trearichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B et al. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase- Producing *Escherichia coli*: Risk Factors for Inadequate Initial Antimicrobial Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9): 3244–3252.
 84. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. *Clin Infect Dis* 2007; 44:159–77.
 85. Earnshaw S, Mancarella G, Mendez A, Todorova B, Magiorakos AP, Possenti E et al. European Antibiotic Awareness Day: a five-year perspective of Europe-wide actions to promote prudent use of antibiotics. *Eurosurveillance* 2014; 19(41): pii 20928.