

Prevalens av betalaktamas-negativa ampicillin-resistenta (BLNAR) *Haemophilus influenzae*, samt klonal spridning - en litteraturgenomgång

Sammanställd av
Simon Athlin, ST-läkare Infektionskliniken, Örebro
För Referensgruppen för antibiotikafrågor (RAF) 2009-2010
Presenterad vid RAFs internat i Mossbylund 27 augusti 2010

Introduktion

Haemophilus influenzae är en vanligt förekommande orsak till samhällsförvärdad infektion såsom akut media otit, sinuit, exacerbation av KOL och pneumoni. Dessa infektioner orsakas av stammar av icke-kapslade *H. influenzae*, sedan kapslade typ b stammar i stort har försvunnit i stora delar av världen efter genomförda vaccinationsprogram (1). Då samhällsförvärdade infektioner med *H. influenzae* idag till största delen behandlas empiriskt är det därför viktigt att övervaka förekomst av resistens och resistensmekanismer för att kunna ge rekommendationer för behandling (2).

Teoretisk referensram

Den första resistensmekanism mot betalaktamantibiotika som beskrevs hos *H. influenzae* var produktion av enzymet betalaktamas, vilket kunde göra penicilliner overksamma. Den första rapporten om betalaktamas-positiv ampicillin-resistens (BLPAR) publicerades i USA 1974 (3). Förmågan till resistens kunde spridas mellan bakterierna genom plasmider och de viktigaste mekanismerna beskrevs som TEM-1 eller ROB-1 betalaktamas. Detta ledde så småningom till att kombinationen av amoxicillin och betalaktamas-hämmande klavulansyra skulle vara förstahandsmedel för behandling (2).

På 80-talet identifierades betalaktamas-negativa ampicillin-resistenta (BLNAR) stammar i USA, vilka man till en början inte ansåg utgjorde något större kliniskt problem, då de förekom i låg frekvens i samhället. Mekanismen till denna resistens förklaras av mutationer i *ftsI* genen som kodar för *Penicillin-Binding Proteins* (PBP). Mutationer leder till förändrade aminosyror, vilka därmed förändrar strukturen av proteinet och minskar dess förmåga att binda till penicillin-molekyler. Till skillnad från helt känsliga stammar, dvs. betalaktamas-negativa ampicillin-känsliga (BLNAS) *H. influenzae*, kan dessa resistenta stammar motstå penicilliner och cefalosporiner (4).

Ubukata et al (2001) var först med att indela BLNAR stammar i tre olika grupper, utifrån vilka mutationer som inträffar i *ftsI* genen. Indelningen utgår ifrån karaktäristiska substitutioner enligt tabellen nedan (5).

Tabell 1 Gruppindelning av BLNAR utifrån mutationer i *ftsI* genen

Grupp	Substitutioner	Grad av resistens
I	Arg-517 → His-517	Låg (Low-BLNAR)
II	Asn-526 → Lys-526	Låg (Low-BLNAR)
III	Arg-517 → His-517 Met-377 → Ile-377, Ser-385 → Thr-385, Leu-389 → Phe-389	Hög (BLNAR)

Substitutionen i grupp I sker nära den stabila aminosyrasekvensen Lys-Thr-Gly (KTG) och kan ske isolerat eller i kombination med andra nära eller perifera substitutioner i proteinet. Substitutionen i grupp II sker också i närheten av sekvensen KTG, och kan ske isolerat eller i kombination med andra karaktäristiska substitutioner och delas därför in i subgrupperna II a-d. Grupp III karaktäriseras av dels samma substitution som i grupp I (Arg-517 → His-517), samt ytterligare tre samtidiga substitutioner i närheten av den stabila aminosyrasekvensen Ser-Ser-Asn(SSN) (6).

Ett försök att förenkla indelningen har gjorts av Hasegawa et al (2004) som föreslagit att isolat med isolerade substitutioner i närheten av KTG-sekvensen skall betecknas Low-BLNAR och de med substitutioner nära både KTG och SSN betecknas BLNAR. Man finner olika grad av resistens i grupperna, med hög grad av resistens i grupp III och intermediär resistens (BLNAI) i grupp I och II (7). Samtidig betalaktamas-medierad resistens och kromosomal resistens genom mutationer i *ftsI* gener definieras som betalaktamas-producerande amoxicillin-klavulansyra-resistenta stammar (BLPACR) (8).

Prevalensen av betalaktamas-medierad resistens har ökat successivt de senaste decennierna, där studier ibland annat USA har visat en ökning från 15,2% (1983/84) till 36,4% (1994/95) och 31,3% (1997/98) (2, 9, 10). Den kromosomal resistensen är inte fullt lika väl beskriven, men framför allt i Japan har man sett en ökad spridning och därför finns flera prevalensstudier gjorda.

I och med ökad spridning av resistens ökar intresset för epidemiologiska studier av klonal spridning av kromosomalt resistent *H influenzae* stammar. Genom pulsältselektrofores (PFGE) kan man typa stammar för epidemiologisk kartläggning (4). Därigenom skulle man kunna öka förståelsen för spridningsmönster och utforma behandlingsrekommendationer därefter.

Frågeställning

Mot bakgrund av det ökade problemet med kromosomalt resistent stammar (BLNAR) av *H. influenzae*, och ett behov av att kartlägga förekomst av klonal spridning som bidragande faktor för den ökade prevalensen av BLNAR, har författaren fått i uppdrag av RAF att utföra en litteraturgenomgång av den senaste beskrivna prevalensen för BLNAR samt av klonal spridning, i världen och i Sverige.

Metod

Litteratursökning har utförts via PubMed. Endast fritt publicerade artiklar har studerats i sin helhet, annars har jag utgått från tillgängliga abstrakt. Aktuellt resistensläge i Sverige har hämtats från sammanställda data från den nationella resistensövervakningen som presenteras via ResNet (<http://resnet.smi.se/ResNet/>) och preliminära resultat av en studie utförd vid SMI som presenterats vid RAF-Ms workshop i maj 2010. Prevalens i Örebro Läns Landsting har hämtats från ResNet samt extraherats från insamlade data från Mikrobiologiska laboratoriet, Universitetssjukhuset i Örebro, för perioden januari t o m augusti 2010.

Resultat

Litteratursökning

Söker man i PubMed efter studier gjorda som berör BLNAR finner man vid dags dato (augusti 2010) ett resultat enligt nedan.

Tabell 2 Sökning för BLNAR i PubMed augusti 2010

Sökord [all fields]	Antal träffar	Prevalensstudier
Blnar	149	100*
Blnar AND Europe	13	11
Blnar AND United States	9	6
Blnar AND Sweden/Norway/Denmark/Finland	2	1

*Approximativt

Utgår man från titlarna på artiklarna kan man snabbt sortera bort ca 50 studier som inte berör prevalensen av BLNAR. De studier som då har exkluderats beskriver i första hand generella antimikrobiella resistensmönster, metodbeskrivningar för resistensbestämning, fallrapporter, samt prevalens för annan antimikrobiell resistens. Av de ca 100 studier som diskuterar prevalensen, har 10 publicerats under 2009 eller 2010. Noterbart är att då majoriteten av studier om förekomst av BLNAR har utförts i Japan är de tillgängliga i sin helhet enbart på japanska i flera fall, där endast abstract finns på engelska. För att få en jämförelse mellan de olika delarna av världen har utöver de 10 senast publicerade studierna ytterligare 4 artiklar från Europa och en från USA granskats, vilka publicerats 2007 eller 2008. Således har litteraturgenomgången inkluderat totalt 15 artiklar.

Vid sökning för klonal spridning ser man att det finns få studier publicerade enligt nedan.

Tabell 3 Sökning för klonal spridning i PubMed augusti 2010

Sökord [all fields]	Antal träffar	Klonal spridning
Blnar AND clonal	8	6

Dessa artiklar diskuterar förekomst av klonal spridning i Japan (n = 2), USA (n = 1), Norge (n = 1), Spanien (n = 1), samt elva europeiska länder (n = 1) (4, 27-31). Samtliga studier är publicerade 2002 eller senare. Sökning istället av termer, eller kombinationer av termer, som PGFE, Haemophilus, clone, disseminate gav inte något ytterligare. Vid genomgång av artiklarna noterades ytterligare tre studier (Japan, USA, Frankrike) som avhandlade klonal spridning, vilka inkluderades i sammanställningen, se diskussion (13, 35,36).

Litteraturgenomgång - prevalens

Sawada *et al.* (juli 2010, artikel på japanska) testade känsligheten för 1317 kliniska isolat av *H. influenzae* vid en barnklinik i Japan under perioden 2004-2008. Man kunde konstatera att 83 (6,3%) av dessa isolat avsåg *H. influenzae* typ b (Hib). Man såg 47,8% BLNAS, 32,7% BLNAR, 8,9% BLNAI, 6,8% BLNPAR och 3,7% BLPACR (11).

Pérez-Trallero *et al.* (juli 2010) gjorde en multicenterstudie i Spanien på 34 spanska sjukhus mellan 2006-2007, där man inkluderade 2736 isolat av *H. influenzae*. Man jämförde resultaten med tidigare studieresultat från 1996-1997, 1998-1999 och 2001-2002. Under denna 11-årsperiod såg man en trend i minskad resistens, där prevalensen av ampicillin-resistenta stammar gick från 37,6% till 16,1%, betalaktamas-produktion från 25,7% till 15,7% och betalaktamas-negativ ampicillin resistens (BLNAR) från 13,5 till 0,7% hos *H. influenzae*. (12)

Kishii *et al.* (januari 2010) studerade 191 stammar av *H. influenzae* hos barnpatienter i Japan mellan 2005-2008. Stammarna isolerades från vätska från mellanörat hos barnpatienter med akut mediaotit. Man noterade att andelen BLNAR var 49,2%. Man kartlade mutationerna i *ftsI* genen och kunde konstatera en ny substituering av aminosyror som inte setts tidigare. BLNAR stammarnas PFGE profiler varierade stort, motsvarande variationen man ser hos BLNAR stammar i normalflora enligt tidigare studier. (13)

Bae *et al.* (januari 2010) studerade 544 isolat av *H. influenzae* i Sydkorea mellan 2005 och 2006. Isolaten togs från nasala aspirat hos patienter som sökt vid ett av 20 primärsjukhus, åldern hos patienterna framgick inte. Den totala resistensen mot ampicillin utgjorde 58,5% och mot amoxicillin-klavulansyra 10,4%. Man såg 41,5% BLNAS, 6,1% BLNAR, 47,2% BLPAR och 5,2% BLPACR. Vidare såg man en högre andel BLNAR och BLPACR än förväntat och bland annat noterades för första gången i Korea ett isolat tillhörande grupp III med tre samtidiga substitutioner av aminosyror (14).

Sakata *et al.* (december 2009) utvärderade 376 kliniska isolat av *H. influenzae* hos barnpatienter i Japan avseende betalaktamasproduktion och resistens mot 20 antibiotika. Stammarna insamlades under 2004 och jämfördes med 448 stammar som insamlats mellan 2000 och 2001. Man såg att andelen BLNAR ökade från 28,8% till 59,3% under perioden. Fördelningen bland övriga stammar var enligt tabellen nedan:

Tabell 4 Prevalens för resistenta stammar bland *H. influenzae* i Japan (Sakata et al, 2009)

Resistens	2000-2001	2004
BLNAS	62,9%	34,3%
BLNAR	28,8%	59,3%
BLPAR	8,3%	6,4%
Totalt	100%	100%

I studien såg man att MIC-värden av betalaktamantibiotika var 2 till 32 gånger högre mot BLNAR än BLNAS. Av resultaten från 2000-2001 framkom inte någon ökad tendens till resistens hos någon av subgrupperna avseende ålder, tidigare antibiotikabruk eller deltagande i förskoleverksamhet. I studien från 2004 såg man en ökning av BLNAR i gruppen barn < 3år (70%), jämfört med barn > 3 år (53%) och i gruppen som fått betalaktamantibiotika tidigare. Deltagande i förskoleverksamhet påverkade inte resultaten (15).

Goto *et al.* (december 2009) har studerat över 10.000 isolat av olika bakterier avseende antibiotika resistens i en longitudinell studie över 25 år. I den studien kan man utläsa att den totala andelen ampicillin-resistenta stammar av *H influenzae* låg stabilt mellan 10% och 20% mellan 1986 fram till 1993. Då steg prevalensen till 40% vilket till stor del förklaras av ökad förekomst av BLNAR, där isolaten utgjorde 30% av de ampicillin-resistenta stammarna, mot 15,4% dessförinnan (16).

Sakata (augusti 2009, artikel på japanska) utvärderade ampicillin-resistensen hos *H. influenzae* över en 10- års-period vid ett sjukhus i Japan. Isolaten var insamlade hos patienter med åldern 1 månad till 12 år som behandlats vid barnklinik mellan 1999 och 2008. Andelen BLNAS var 87,1% 1999 men sjönk till 28,7 2008. Andelen BLNAR ökade från 2,9% till 43,3% under perioden. MIC-brytpunkterna som användes var S < 2 mg/L och R > 4 mg/L (17).

Hagiwara *et al.* (juli 2009, artikel på japanska) isolerade 122 *H. influenzae* från luftvägarna hos vuxna 2007. Andelen BLNAS var 71,0% (MIC <1 mg/L), BLNAR 25,3% (MIC > 2 mg/L) och BLPAR 3,7%. Vid jämförelse med insamlat material från 2002 kunde man se i genetiska studier att andelen BLNAS ökat och att av de resistenta stammarna var andelen BLNAR konstant. Genetisk analys visade att andelen BLNAR med en mutation i PBP3 minskat, till fördel för andelen med två mutationer (18).

Sakano *et al.* (juli 2009, artikel på japanska) studerade förändringar i antibiotikaresistens hos 606 stammar av *H influenzae* mellan 1997 och 2006 i Japan. Man såg att andelen BLNAS successivt minskat från 72,0% (1997-1998), 69,6% (1999-2000) till 31% (2005-2006). Andelen BLNAR låg 2005-2006 på 65,5% och man såg en signifikant ökad andel hos barn under 3 år (19).

Niki e *et al.* (juni 2009) har sammanfattat resultatet från en studie utförd av Japanska föreningen för kemoterapi. Man analyserade 206 stammar av *H. influenzae* som insamlats från vuxna patienter med väldefinierad luftvägsinfektion i Japan. Man testade 26 betalaktamantibiotika, varav fyra penicilliner och tre kombinationspreparat av penicillin och betalaktamas-hämmare. Andelen BLNAI var 19,9%, BLNAR 29,1% och BLPAR 6,7% (20).

Jansen *et al.* (oktober 2008) studerade 536 isolat av *H. influenzae* från patienter med luftvägsinfektion insamlade vid 18 europeiska och två kanadensiska centra mellan 2006 och 2007. Man såg en total ampicillin resistens på 25,0%. Andelen BLNAR var 11,4% och BLPAR 13,6%. Jämfört med en studie utförd av författarna 2004/2005 fann man en högre prevalens av ampicillin-resistens generellt. Man

såg att tredje generationens cefalosporiner och amoxicillin-klavulansyra hade fortsatt mycket hög aktivitet mot BLNAR (21).

Seral *et al.* (oktober 2008) såg i en studie av 220 isolat av *H. influenzae* från ett sjukhus i Spanien som insamlats mellan 2005 och 2006 en andel av 1,1% (3 isolat) BLNAR (MIC > 4 mg/L) och 19,1% BLPAR. Aktiviteten för flera betalaktamantibiotika studerades. Man såg bäst aktivitet hos cefditoren (0,06 mg/L) på BLNAR och på BLPAR kunde man rangordna aktiviteten för cefditoren (0,03 mg/L) > cefixime (0,06 mg/L) > ceftriaxone (0,12 mg/L) > cefuroxime (1 mg/L) > amoxicillin-klavulansyra (2 mg/L) > ampicillin (> 8 mg/L) (22).

Garcia-Cobos *et al.* (juli 2008) har utvärderat olika metoder för resistensbestämning av *H. influenzae*. Man studerade 94 kliniska isolat från American Type Culture Collection (ATCC) från luftvägsinfektioner och invasiva infektioner hos barn och vuxna i USA. Man använde mikrodilution, E-test och diskdiffusion och fann att stammarna i denna selekterade referenskollektion utgjordes av BLNAS 26,6%, BLNAR 36,2%, BLPAR 21,3% och BLPACR 16,0%. Studien visade att metoderna i flera fall inte gav överensstämmande resultat (23).

Dabernat *et al.* (juni 2007, artikel på franska) har i sin artikel beskrivit epidemiologin hos *H. influenzae* stammar som insamlats 2004 vid Centre National de Référence i Frankrike. Man såg andelen betalaktamas-producerande stammar vara 26,3% (BLPAR). Man konstaterar att cefpodoxime kvarstår som det mest aktiva antibiotikumet mot *H. influenzae* oavsett resistensmekanism, följt av pristinamycin, telithromycin och amoxicillin-klavulansyra (24).

Skoczynska *et al.* (april 2007) presenterar resultaten från en studie där betalaktamresistens hos 344 isolat av *H. influenzae* har undersökts. Proverna kom från patienter med samhällsförvärd luftvägsinfektion i Polen och samlades in mellan 2002 och 2004. Totalt sett var 9,0% betalaktamas-positiva BLPAR. 12,8% sågs vara BLNAR och 0,3% (ett isolat) var BLPACR. Man utförde PFGE på 45 isolat, vilket indelade isolaten i 15 typer varav två var dominerande och bestod av 4 resp. 6 varianter med 15 resp. 10 isolat. Sammanfattningsvis såg man en stigande prevalens av BLNAR (25).

Litteraturgenomgång - klonal spridning

Skaare *et al.* (2010) publicerade online i september 2009 en studie på *H. influenzae* utförd i Norge. Man analyserade 46 isolat från 15 laboratorier, där 23 var resistentastammar (MIC 1-2 mg/L) och 23 känsliga kontroller (0,125-0,5 mg/L). Isolaten var från både män och kvinnor i åldrarna 1 till 86 år, och från både nedre och övre luftvägar. Isolaten var utvalda från 484 insamlade isolat 2004. Syftet med studien var att kartlägga mutationer i PBP3 och studera hur klonal spridning kan bidra till uppkomst av PBP3 resistens. Man använde sig av MIC-bestämning, gensekvensering av *ftsI* och molekylär typning genom PFGE. Alla resistentastammar uppvisade mutationen Asn526-Lys och kategoriserades därför som grupp II low-BLNAR. 83% tillhörde någon av två kloner, vilket visar på möjligheten att det rör sig om klonal spridning. Genom DNA sekvensering av *ftsI* och PFGE-mönster kunde man se att det fanns helt olika *ftsI* alleler bland annars genetiskt sett oseparatorbara isolat, och även helt lika *ftsI* alleler i helt separata isolat (4).

Skaare presenterade del 2 av Haemophilusprojektet vid RAF-Ms workshop 2010 (publicerat på www.srga.org). Där ingick 196 luftvägsisolat med icke-betalaktamas-medierad betalaktam-resistens (n = 177) och kontroller (n = 17). Man utförde *ftsI* sekvensering, MIC-bestämning (enl CLSI), diskdiffusion, samt betalaktamas-test. Resistensgenotyper utföll såsom BLNAR 55,6%, BLNAS 36,2% (inkl 17 kontroller), BLPAR 4,6% och BLPACR 3,6%. Man kunde se att alternerad PBP3 är en god markör för klinisk resistens med höga MIC-värden för BLNAR/BLPACR (MIC 0,5-8 mg/L), låga för BLNAS/BLPAR (MIC 0,032-1 mg/L) och lägst för kontroller (MIC 0,032-0,5 mg/L) (26).

Garcia-Cobos *et al.* (juli 2007) studerade 354 isolat av *H. influenzae* från luftvägar, likvor, pleura och blod hos såväl barn som vuxna i Spanien, vilka insamlats mellan 2001 och 2002, respektive 2004 och

2006. Man såg att 17,8% var BLNAS, 56% var BLNAR, 15,8% var BLPAR och 10,4% var BLPACR. Man såg 28 olika mutationer i *ftsI* genen och 23 olika aminosyre-substitutioner. PFGE visade att de flesta BLNAR stammar skilde sig genetiskt, men en klonal spridning observerades i en grupp isolat med ökad resistens mot cefotaxime och cefixime, vilka till största delen insamlats mellan 2005 och 2006. Flera av dessa isolat kom från samma geografiska områden i Spanien. Man såg också att BLNAR stammar med liknande PFGE-mönster kunde kopplas till akut media-otit och konjunktivit hos barn (27).

Hotomi *et al.* (november 2007) har utvärderat resistensen hos 264 isolat av *H. influenzae* insamlade i Japan. Isolaten kom från patienter med övre luftvägsinfektion, både barn och vuxna. Enligt CLSI riktlinjer såg man att känsliga stammar utgjorde 61,0% (MIC < 2 mg/L), intermediärt känsliga 14,0% (MIC = 2 mg/L) och resistenta stammar 25% (MIC > 2 mg/L). Av hela kollektionen utgjordes 33,0% av BLNAS. Enligt PCR genotypning hade 65,1% av alla stammar mutationer i *ftsI* och var samtidigt negativa för betalaktamasgenen (*bla*), och definierades därför som genetiskt BLNAR stammar. BLNAR stammarna kunde delas in i 37,1% med grupp I/II mutationer och 28% med grupp III mutationer. Man kunde identifiera 3 kluster med 16 stammar bland BLNAR med identiska eller mycket snarlika DNA mönster. Dessa isolat hade snarlika resistensmönster med MIC 16 mg/L av ampicillin (28).

Fluit *et al.* (maj 2005) jämförde resistensen hos *H. influenzae* insamlade 1997/1998 (n = 499) med 2002/2003 (n = 416). Isolaten kom från patienter med luftvägsinfektion vid sjukhus i Österrike, Frankrike, Tyskland, Nederländerna, Italien, Spanien, Portugal, Polen, Storbritannien, Irland och Turkiet. Prevalensen var i de olika länderna enligt nedan.

Tabell 5 Prevalens (%) betalektamresistens hos *H. influenzae* i 11 europeiska länder (Fluid *et al.*, 2005)

Land	1997/1998			2002/2003		
	Antal	BLPAR	BLNAR	Antal	BLPAR	BLNAR
Österrike	34	5,9	5,9	-	-	-
Frankrike	92	24,0	8,7	55	29,1	5,5
Tyskland	77	2,6	5,2	50	2,0	2,0
Italien	62	0,0	6,5	30	3,3	3,3
Nederländerna	39	7,7	2,6	34	5,9	5,9
Polen	50	0,0	4,0	35	5,7	20,0
Portugal	41	7,3	14,6	34	38,2	11,8
Spanien	71	23,0	15,5	72	13,9	11,1
Storbritannien	33	21,2	18,2	33	21,2	18,2
Irland	-	-	-	33	9,1	15,2
Turkiet	-	-	-	40	5,0	7,5
TOTALT	499	11,0	8,8	416	13,7	9,6

Vid sekvensering av *ftsI* gener hos 20 utvalda BLNAR-isolat såg man endast kända mutationer. I två isolat fann man emellertid inga mutationer alls. Man såg ingen klonal spridning i denna studie. Såväl BLPAR- som BLNAR-isolat var känsliga för cefixime, levofloxacin, moxifloxacin, azithromycin och telithromycin, däremot inte fullt känsliga för andra testade cefalosporiner. MIC värden bestämdes genom mikrodilution enligt NCCLS riktlinjer (29).

Karlowsky *et al.* (mars 2002) har publicerat en övervakningsstudie av 1434 insamlade isolat av *H. influenzae* vid två sjukhus i USA. Man fann 0,6% BLNAR (nio isolat) med MIC 4 mg/L, där alla isolat var känsliga för amoxicillin-klavulansyra, cefuroxime, cefprozil, makolider och fluorokinoloner. PFGE visade identiska bandmönster (*SmaI* använt som restriktionsenzym), vilket talar för klonal spridning såväl inom vårdinrättningar som mellan sjukhus med skilda geografiska lägen. Detta skulle antyda att isolat av samma PFGE-typ som påvisas i olika studier baserade på populationer med skilda geografiska lägen, skulle kunna härstamma från samma stam (30).

Prevalens i Sverige och Örebro

Det finns ingen artikel publicerad som beskriver prevalensen för betalaktam-resistenta *H. influenzae* i Sverige. Nationellt har man emellertid sett en ökning av den totala mängden betalaktam-resistenta stammar av *H. influenzae*. genom de årliga punktprevalensstudier som presenteras i ResNet (så kallade 100-stamsstudier). Andelen penicillinresistenta isolat har ökat från 11% (1994) och 13% (2005) till 23,3% (2009) av isolaten. Man ser ökningen tydligt för 2008 och att den fortsätter på den högre nivån även 2009. Samtidigt har andelen BLNAR ökat till 4,2% för år 2009. Resultaten är baserade på lappdiffusionstest med penicillin V respektive cefaklor.

För att finna en förklaring till denna ökade resistens mot betalaktamantibiotika har SMI med laboratoriernas hjälp samlat in isolat för fördjupad analys av resistensmekanismer och för epidemiologisk typning med PFGE. Varje deltagande laboratorium har skickat in 6 konsekutiva isolat ur 100-stamsstudierna från 2008 och 2009 som uppfyllde kriterierna med hämningsszoner av penicillin V 10ug < 16mm och/eller cefaklor 30ug < 23mm. Av de 242 insända betalaktam-resistenta isolaten var cirka tre fjärdedelar betalaktamas-producerande (BLPAR) och övriga betalaktamas-negativa (BLNAR). Totalt sju isolat hade båda resistensmekanismerna och klassades alltså som BLPACR. Till dags dato har hälften av isolaten analyserats med PFGE. Den preliminära analysen visade en stor variation av PFGE-mönster hos BLNAR medan ett par större kluster av BLPAR-isolat redan kunde identifieras. När hela materialet är analyserat bör man kunna uttala sig om ifall den ökade förekomsten av betalaktam-resistenta *H. influenzae* kan bero på en spridning i samhället av vissa framgångsrika kloner (32).

I Örebro läns landsting har prevalensen av betalaktam-resistenta *H. influenzae* varierat enligt ResNet. Mellan åren 1999 och 2005 låg den på 11% – 17%. År 2008 såg man en kraftig ökning till 34% för att 2009 åter vara 15,8%. Inrapportering av BLNAR har gjorts enbart 2008 och 2009, där man ser en ökning från 1% till 3,2%. Ser man till prevalensen 2010 hos patienter med prov inskickade på grund av övre luftvägsinfektion, kan man extrahera data t o m augusti 2010 som visar en prevalens för total betalaktam-resistens på 16,1% (85/528). Av dessa utgörs 9,3% av BLPAS, 5,9% av BLNAR och 0,9% av BLPACR.

Diskussion

Det finns många studier som berör prevalensen för BLNAR i olika subpopulationer i Japan, men betydligt färre för Europa och USA. Flera av studierna ger divergerande resultat, men bilden av en ökad förekomst av BLNAR stammar tycks ändå stå klar. Resultaten sammanfattas i nedanstående tabell.

Tabell 6 Prevalens (%) betalaktamresistens hos *H. influenzae* från 15 studier 2007-2010

Författare, publ år	Insamlat år	Land	Antal	BLNAS	BLNAI	BLNAR	BLPAR	BLPACR
<i>Sawada, 2010</i>	2004-2008	Japan	1317	47,8	8,9	32,7	8,9	3,7
<i>Pérez-Trollow, 2010</i>	2006-2007	Spanien	2736	-	-	0,7	-	-
<i>Kishii, 2010</i>	2005-2008	Japan	191	-	-	49,2	-	-
<i>Bae, 2010</i>	2005-2006	Sydkorea	544	41,5		6,1	47,2	5,2
<i>Sakata, 2009</i>	2004	Japan	376	34,3	-	59,3	6,4	-
<i>Goto, 2009</i>	2002	Japan		-	-	30,0	-	-
<i>Sakata, 2009</i>	2008	Japan	3784	28,3	-	43,3	-	-
<i>Haiwara, 2009</i>	2007	Japan	122	71,0	-	25,3	3,7	-
<i>Sakano, 2009</i>	2005-2006	Japan	606	31,0	-	65,5	-	-
<i>Niki, 2009</i>	2006	Japan	206	19,9	-	29,1	6,7	-
<i>Jansen, 2008</i>	2006-2007	*	536	-	-	11,4	25,3	-
<i>Seral, 2008</i>	2005-2006	Spanien	220	-	-	1,1	19,1	-

<i>Garcia-Cobos, 2008</i>		USA	94	26,6	-	36,2	21,3	16,0
<i>Dabernat, 2007</i>	2004	Frankrike	-	-	-	26,3	-	-
<i>Skosczyńska, 2007</i>	2002-2004	Polen	344	-	-	12,8	9,0	0,3

* 18 europeiska och 2 kanadensiska center

Bäst studerat är emellertid den ökade förekomsten sedan 2002 av BLNAR bland barn i Japan. Noterbart är att i flera artiklar ingår såväl kapslade som okapslade stammar, även om de kapslade utgör en avsevärt mindre del av materialet (11). Sammanfattningsvis ser man att prevalensen av BLNAR beskrivs som 0,7%-65,5% i Japan och 1,1%-26,3% i europeiska länder. Den studie som berör USA som nyligen finns publicerad bygger på isolat hämtade från ATCC och visar 36,2% BLNAR. Detta är dock en missvisande prevalens då det bygger på ett selekterat referensmaterial och inte konsekutivt insamlade stammar. Även den högsta prevalensen beskriven i Europa med 26,3% har studerats på ett selekterat material och bör därför tolkas med försiktighet (24). Denna litteraturgenomgång inkluderar enbart 15 studier och sträcker sig tillbaka till och med 2009, går man längre tillbaka finns fler resultat.

EUCAST brytpunkter för ampicillin-resistens hos *H. influenzae* har bestämts som MIC S \leq 1, R $>$ 1, vilka implementeras i allt fler lokala riktlinjer i europeiska länder. CLSI skall även ha liknande brytpunkter, vilket dock inte går att finna i offentligt publicerade dokument (33). Hotomi *et al.* (2007) hänvisar till dessa dokument och refererar att där även definieras BLNAR stammar såsom de stammar utan detekterbar betalaktamas-produktion och med MIC för ampicillin över 4 mg/L, stammar med MIC = 2 mg/L anses intermediärt känsliga (indeterminant) och känsliga stammar skall ha MIC $<$ 2 mg/L (28). Flera studier tycks dock inte utgå från dessa brytpunkter vilket gör resultaten något svårvärderade. En tendens har ändå varit att följa CLSIs rekommendationer. Vidare diskuterar Hotomi *et al* i sin studie att det inte finns någon internationell konsensus gällande brytpunkter för BLNAR och att andra brytpunkter finns föreslagna (34, 35). Dessutom har man sett att det inte alltid går att återskapa resultaten för resistensfördelning av *H. influenzae* med Etest, då MIC-värden för BLNAR inte kan verifieras, däremot har det visat sig överensstämma för BLNAS.

Utbredningen av spridningsbenägna stammar är sparsamt studerat såväl i Japan som i Europa och USA. Det framkommer i litteraturgenomgången att man noterar spridda kloner i sjukvårdsinrättningar eller i samhället i övrigt. Gazagne *et al.* (1998) fann tidigt tendens till klonal spridning i en studie på 29 isolat av BLNAR insamlade i Frankrike (37). Karlowky *et al.* (2002) kunde beskriva en BLNAR stam som påvisades på två geografiskt skilda institutioner i USA (30). Även Hotomi *et al* (2007) såg klonal spridning i sin studie (28). Fluit *et al* (2005) studerade förekomst av BLNAR i flera europeiska länder och kunde i sin studie inte se någon klonal spridning (29). Slutligen kunde Kishii *et al* (2010) i en artikel, som inte föll ut i sökningen för klonal spridning men som beskrev BLNAR, visa stora skillnader i PFGE-mönster hos BLNAR stammar i sin studie, motsvarande vad som står att finna i normalflora av *H. Influenzae* i luftvägar hos barn (13).

Sammanfattar man vad som skrivits om klonal spridning av *H. influenzae* ser man att resultaten skiljer sig mellan studierna och därför inte ger en enhetlig bild, eller tillräckligt stöd för att klonal spridning är en bidragande faktor till den ökade prevalensen av BLNAR i världen.

Tabell 7 Sammanställning av klonal spridning från 8 studier publicerade 1996-2010

Författare, publ år	Land	Slutsats
<i>Gazagne et al (1998)</i>	Frankrike	Begränsad klonal spridning. 20 unika genprofiler(<i>SmaI</i>)
<i>Karlowky et al (2002)</i>	USA	Kloner inom ett sjukhus och mellan sjukhus.
<i>Fluit et al (2005)</i>	11 länder	Ingen klonal spridning
<i>Hotomi et al (2007)</i>	Japan	Klonal spridning av stammar med MIC 16mg/L
<i>Sunakawa et al (2007)</i>	Japan	Ingen klonal spridning
<i>Garcia-Cobos et al (2007)</i>	Spanien	Klonal spridning vid otit och konjunktivit
<i>Skaare et al (2009)</i>	Norge	83% (19/23) tillhörande två kloner
<i>Kishii et al (2010)</i>	Japan	Många olika PFGE profiler.

När man har letat efter epidemiologiska mönster finns beskrivet att man tidigare sett en ökad förekomst av ampicillin-resistenta stammar av *H. influenzae* bland barn under tre år och vid ökad antibiotikaanvändning, men belägg för att nära samvaro inom barnomsorg skulle ge en klonal spridning saknas. I de fall då klonal spridning identifierats har man sett kluster inom samma sjukhus eller sjukhusets upptagningsområde.

I Sverige finns inga publicerade studier om prevalensen för betalaktam-resistens, BLNAR eller förekomst av klonalt spridda stammar av *H. influenzae*. Prevalensen av BLNAR ligger enligt ResNet-data (100-stamsstudien) på 4,3% 2009.

Referenser

- 1: Black, S. B., H. R. Shinefield, and The Kaiser Permanente Vaccine Study Group. 1992. Immunization with oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (HbOC) vaccine on a large HMO population: extended follow-up and impact on *Haemophilus influenzae* disease epidemiology. *Pediatr. Infect. Dis.* **11**:610–613.
- 2: Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G et al. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of b-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 292–7.
- 3: Khan, W., S. Ross, W. Rodriguez, G. Controni, and A. K. Saz. 1974. *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin: a report of two cases. *JAMA* 229:298–301.
- 4: Skaare D, Allu A-G, Anthonisen I.L., Jenkins A, Lia A, Strand L, Tveten Y, Kristeansen B-E. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated betalactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clin Microbiol Infect* 2010; 1117-1124.
- 5: Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with b-lactam resistance in b-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1693–1699.
- 6: Dabernat H, Delmas C, Seguy M et al. Diversity of b-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2208–2218.
- 7: Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R et al. Rapidly increasing prevalence of b-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1509–1514.
- 8: Matic, V., B. Bozdogan, M. R. Jacobs, K. Ubukata, and P. C. Appelbaum. 2003. Contribution of beta-lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 1018–1021.
- 9: Doern, G. V., J. H. Jorgensen, C. Thornsbery, D. A. Preston, and the *H. influenzae* Surveillance Group. 1986. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *H. influenzae*: a collaborative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 4:95–107.
- 10: Doern, G. V., R. N. Jones, M. A. Pfaller, and K. Kugler. 1999. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:385–389.
- 11: Sawada K, Sato H, Arima M, Hoshino T. [Susceptibility testing for *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric cases during 2004-2008] *Kansenshogaku Zasshi.* 2010 Jul;84(4):441-8. Japanese.
- 12: Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, Dal-Ré R, García-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):2953-9. Epub 2010 May 3.
- 13: Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Kurokawa I, Masaki J, Ubukata K. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J Infect Chemother.* 2010 Apr;16(2):87-93. Epub 2010 Jan 21.
- 14: Bae S, Lee J, Lee J, Kim E, Lee S, Yu J, Kang Y. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):65-71. Epub 2009 Nov 2.
- 15: Sakata H, Toyonaga Y, Sato Y, Hanaki H, Nonoyama M, Oishi T, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug-resistance in the pediatric field: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan. *J Infect Chemother.* 2009 Dec;15(6):402-9. Epub .

- 16: Goto H, Shimada K, Ikemoto H, Oguri T; Study Group on Antimicrobial Susceptibility of Pathogens Isolated from Respiratory Infections. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from more than 10,000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. *J Infect Chemother*. 2009 Dec;15(6):347-60. Epub . Review.
- 17: Sakata H.[Changes over 10 years of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolated from children] *Jpn J Antibiot*. 2009 Aug;62(4):341-5. Japanese.
- 18: Hagiwara E, Watanuki Y, Shiihara J, Matsushima A, Enomoto T, Sekine A, Tsuchiya N, Baba T, Shinohara T, Endo T, Sogo Y, Nishihira R, Komatsu S, Kato T, Ogura T, Takahashi H. [Trends in antibiotic susceptibility and genetic beta-lactam resistance patterns among *Haemophilus influenzae* cases isolated from adult patients with respiratory tract infection]*Kansenshogaku Zasshi*. 2009 Jul;83(4):355-62. Japanese.
- 19: Sakano T, Nejishashi N, Furue T, Kinoshita Y, Ono H, Ohta T. [Changes in the drug resistance of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* isolated between 1997 and 2006] *Kansenshogaku Zasshi*. 2009 Jul;83(4):347-54. Japanese.
- 20: Niki Y et al. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2007: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother*. 2009 Jun;15(3):156-67. Epub 2009 Jun 25.
- 21: Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Surveillance study of the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to various antibacterial agents in Europe and Canada. *Curr Med Res Opin*. 2008 Oct;24(10):2853-61. Epub 2008 Aug 28.
- 22: Seral C, Suárez L, Rubio-Calvo C, Gómez-Lus R, Gimeno M, Coronel P, Durán E, Becerril R, Oca M, Castillo FJ. In vitro activity of cefditoren and other antimicrobial agents against 288 *Streptococcus pneumoniae* and 220 *Haemophilus influenzae* clinical strains isolated in Zaragoza, Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Oct;62(2):210-5. Epub 2008 Aug 20.
- 23: García-Cobos S, Campos J, Román F, Carrera C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J.Low beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul;52(7):2407-14. Epub 2008 Apr 28.
- 24: Dabernat H, Seguy M, Faucon G, Delmas C. [Epidemiology of *Haemophilus influenzae* strains collected in 2004 in France and in vitro assessment of their susceptibility to antibiotics]. *Med Mal Infect*. 2007 Jun;37(6):320-4. Epub 2007 May 29. French.
- 25: Skocznyńska A, Kadłubowski M, Waśko I, Fiett J, Hryniewicz W. Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Apr;13(4):377-83.
- 26: Skaare D. <http://www.srga.org/Workshop/RAF-%202010/Presentationer/Dag2/Optimerad%20screen%20för%20HI%20Dagfinn%20Skaare.pdf>. May 18 2010.
- 27: García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, Pérez-Vázquez M, Oteo J, de Abajo F. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2564-73. Epub 2007 Apr 30.
- 28: Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, Yamanaka N. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):3969-76. Epub 2007 Aug 13.
- 29: Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European beta-lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jul;56(1):133-8. Epub 2005 May 25.
- 30: Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, Sahn DF. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):1063-6.
- 31: <http://resnet.smi.se/ResNet/findAntibiotikum.jsp>
- 32: Hallin H; SMI, Sektionen för antibiotikaresistens och vårdhygien. Ökad betalaktamasresistens hos *Haemophilus influenzae*: Power Point presentation on RAF-M workshop 20 may 2010.
- 33: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th Informational Supplement. Document M100-S15. Wayne, Pennsylvania, USA 2005.
- 34: Barry, A. L., P. C. Fuchs, and S. D. Brown. 2001. Identification of betalactamase- negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45:1585– 1588.
- 35: Jones, R. N., M. R. Jacobs, J. A. Washington, and M. A. Pfaller. 1997. A 1994-95 survey of *Haemophilus influenzae* susceptibilities to ten orally administered agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 27:75–83.

36: Gazagne, L., C. Delmas, E. Bingen, and H. Dabernat. 1998. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 36:3629–3635.