

**Evaluatie GRAS-rondzending 2017 *Neisseria gonorrhoeae***

**Alje P. van Dam en Ineke Linde**

**Streeklaboratorium GGD (referentielaboratorium gonorrhoe GOREF), Nieuwe Achtergracht 100, Amsterdam**

**[avdam@ggd.amsterdam.nl](mailto:avdam@ggd.amsterdam.nl)**

**[ilinde@ggd.amsterdam.nl](mailto:ilinde@ggd.amsterdam.nl)**

**20 december 2017**

# Samenvatting

Voor de rondzending zijn 10 goed gekarakteriseerde WHO-stammen rondgestuurd. Twee van deze stammen waren in duplo ingesloten, waardoor in totaal 12 stammen verzonden zijn. Stammen zijn door 19 laboratoria op gevoeligheid voor ceftriaxon, azitromycine, ciprofloxacin, door 16 labs voor cefotaxim en door 12 laboratoria voor penicilline getest. Voor ceftriaxon werden 19 major errors (S naar R of vv) gevonden, waarvan 16 voor dezelfde stam (R naar S), waarvan de referentie-gevoeligheid net boven het breekpunt lag. Tweemaal werd een (andere) stam ten onrechte S genoemd, en éénmaal werd een gevoelige stam R genoemd. Voor cefotaxim waren alle resultaten kwalitatief correct. Voor azitromycine werden 8 major errors gerapporteerd, maar daarnaast ook 38 minor errors waarbij I als R werd gerapporteerd (22 x) of R als I (16 x). De stammen met hoge resistentie voor ceftriaxon en azitromycine werden door alle laboratoria herkend. Ciprofloxacin was steeds correct met uitzondering van één stam met low-level resistance die door 16 van de 19 labs als gevoelig of intermediair gerapporteerd werd. Kwantitatief viel op dat de MICs voor cefalosporines, indien afwijkend, vrijwel altijd als lager gerapporteerd werden, terwijl voor azitromycine de afwijking zowel naar boven als naar beneden gericht kon zijn. Indien laboratoria afwijkend ten opzichte van de referentiewaarden rapporteerden was dit doorgaans per antibioticum voor alle stammen in dezelfde richting. Het kwam echter wel voor dat laboratoria hogere MICs voor azitromycine rapporteerden, in combinatie met lagere MICs voor cefotaxim. De drie laboratoria die de minste verschillen ten opzichte van de referentiewaarden lieten zien gebruikten als voedingsbodem een GC-agar met of zonder supplementen, van BD of Biotrading, in combinatie met e-testen van Biomerieux.

## Volledig verslag van de rondzending

### Gekozen stammen

De rondgezonden stammen waren 10 WHO-referentiestammen; 2 van deze stammen zijn in duplo in het panel opgenomen. Stammen 3 en 5 waren identiek, evenals 6 en 9. Deze stammen zijn uitgebreid gekarakteriseerd en de referentie MICs zijn overgenomen uit de publicatie hierover (1). Uitzondering hierbij is cefotaxim, waarvoor geen gegevens in de betreffende publikatie staan. De referentie-MIC is de MIC zoals bepaald op het Streeklaboratorium GGD Amsterdam (referentielab *Neisseria gonorrhoeae*). De reden dat in Nederland cefotaxim nog steeds deel uit maakt van het GRAS-panel is een historische: tot 2009 zijn alleen MIC-gegevens van cefotaxim beschikbaar, omdat ceftriaxon pas sinds 2010 deel uitmaakt van het panel. Daarvoor was de gedachte dat de MICs voor beide cefalosporines vergelijkbaar waren.

De rondgezonden stammen zijn:

- 1 WHO L (1L)
- 2 WHO G (2G)
- 3 WHO U (3U)
- 4 WHO W (4W)
- 5 WHO U (replicate of 3)
- 6 WHO Y (6Y)
- 7 WHO Z (7Z)
- 8 WHO M (8M)
- 9 WHO Y (replicate of 6)
- 10 WHO X (10X)
- 11 WHO V (11V)
- 12 WHO K (12K)

### Deelnemende laboratoria

De stammen zijn getest in 19 laboratoria: GGD Amsterdam, OLVG Amsterdam, Microvida Amphia Breda, RLM Dordrecht, MMI ADRZ Goes, Certe Groningen, HMC Westeinde den Haag, Streeklaboratorium Haarlem, LabMicta Hengelo, Jeroen Bosch Ziekenhuis 's Hertogenbosch, Izore Leeuwarden, LUMC Leiden, MUMC Maastricht, Radboud UMC Nijmegen, Erasmus MC Rotterdam, Star Rotterdam, LMMI ETZ Tilburg, UMCU Utrecht, PAMM Veldhoven.

### Geteste antibiotica

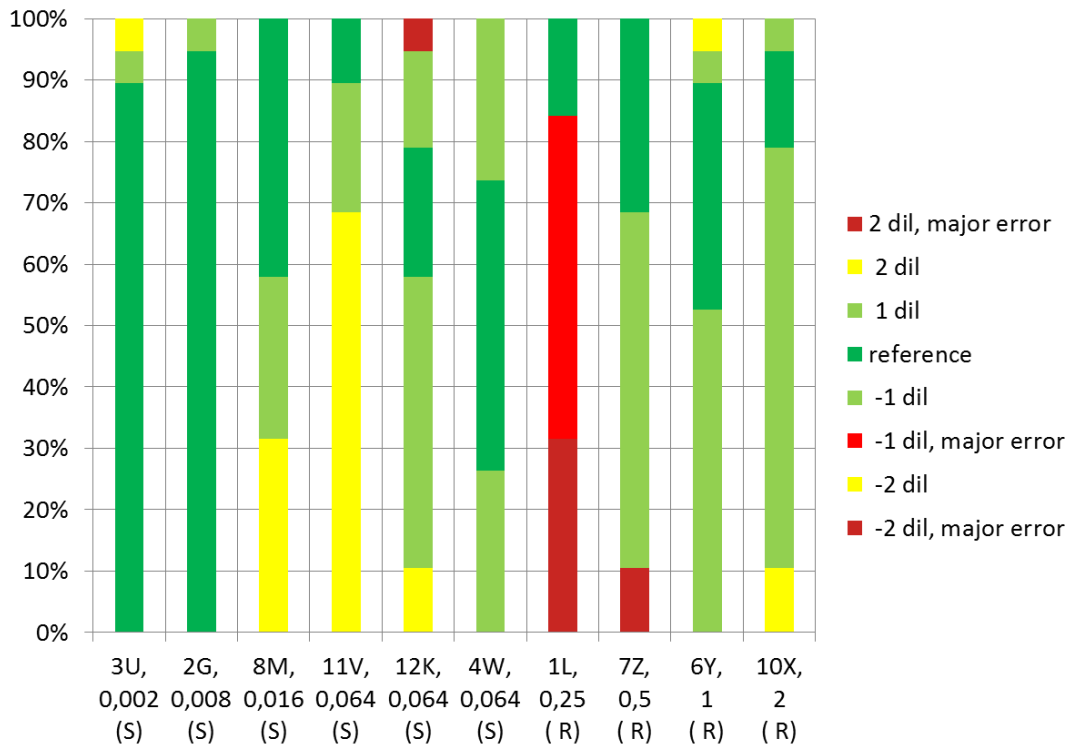
In het volgende overzicht wordt uitsluitend de performance van de laboratoria beschreven voor de middelen ceftriaxon, cefotaxim, azitromycine, ciprofloxacin en penicilline. Ceftriaxon, azitromycine en ciprofloxacin is getest door alle laboratoria, cefotaxim door 16/19 laboratoria en penicilline door 12/19 laboratoria. Ceftriaxon, cefotaxim, azitromycine en ciprofloxacin zijn de middelen die onderdeel uitmaken van GRAS. Penicilline maakt geen deel meer uit van GRAS, maar is door een zo groot aantal deelnemers getest dat deze resultaten ook opgenomen zijn. Sommige laboratoria hebben aanvullende antibiotica getest: spectinomycine, cefixim en/of tetracycline. Zij kunnen de MIC resultaten van deze antibiotica vergelijken met MICs zoals beschreven in (1).

### Resultaten

Vergelijking duplo's. Twee stammen, WHO U en Y, werden twee maal in het panel opgenomen als stam 3/5 en 6/9. Achtergrond van deze keuze was dat stam U duidelijk resistent is voor azitromycine, met een MIC van 4, en stam Y resistent is voor ceftriaxon, met een MIC van 1. Bij stam U rapporteerden 18/19 laboratoria in het duplo-monster een MIC met maximaal 1 dilutie verschil. Eén laboratorium rapporteerde voor de duplo's een MIC van 4 en een MIC van 12 voor azitromycine. Voor stam Y was er in totaal 4 maal een verschil te zien in MIC's van groter dan 1 dilutie bij duplo testen van dezelfde stam: één laboratorium rapporteerde MICs voor ciprofloxacin van 8 en > 32, twee laboratoria vonden MICs voor ceftriaxon van 3 en 0,75, respectievelijk 1 en 0,25, en twee laboratoria rapporteerden MICs van 1 en 0,38, resp. 10 en 1 voor azitromycine (10 is mogelijk een administratieve fout, want deze waarde komt niet voor op de E-test). Kwalitatief (S, I of R) waren alle uitkomsten voor de duplo's van WHO U (3 en 5) identiek per laboratorium, evenals alle uitkomsten voor ceftriaxon, cefotaxim, ciprofloxacin en penicilline voor WHO Y (6 en 9). Stam Y heeft een gerapporteerde MIC van 1 en is daarmee volgens EUCAST resistent voor azitromycine. Drie laboratoria vonden in de duplo een kwalitatieve minor error: 1 laboratorium rapporteert voor deze stam MICs van 1 en 0,38 (I en S), 1 laboratorium rapporteert 0,38 en 0,25 (I en S), en 1 laboratorium rapporteert 0,75 en 0,5 (R en I).

Voor de verdere analyse zijn alleen de resultaten van stam 3 en 6 meegenomen.

Ceftriaxon. Van de 10 rondgezonden WHO stammen hadden er 6 een verhoogde MIC tov wild-type stammen. Wild type stammen hebben een MIC van 0.016 of lager. Referentiewaarden voor stammen 4, 11 en 12 was 0.064, waarmee zij wel een verhoogde MIC tov wild-type stammen hebben. De resultaten zijn schematisch weergegeven in figuur 1.

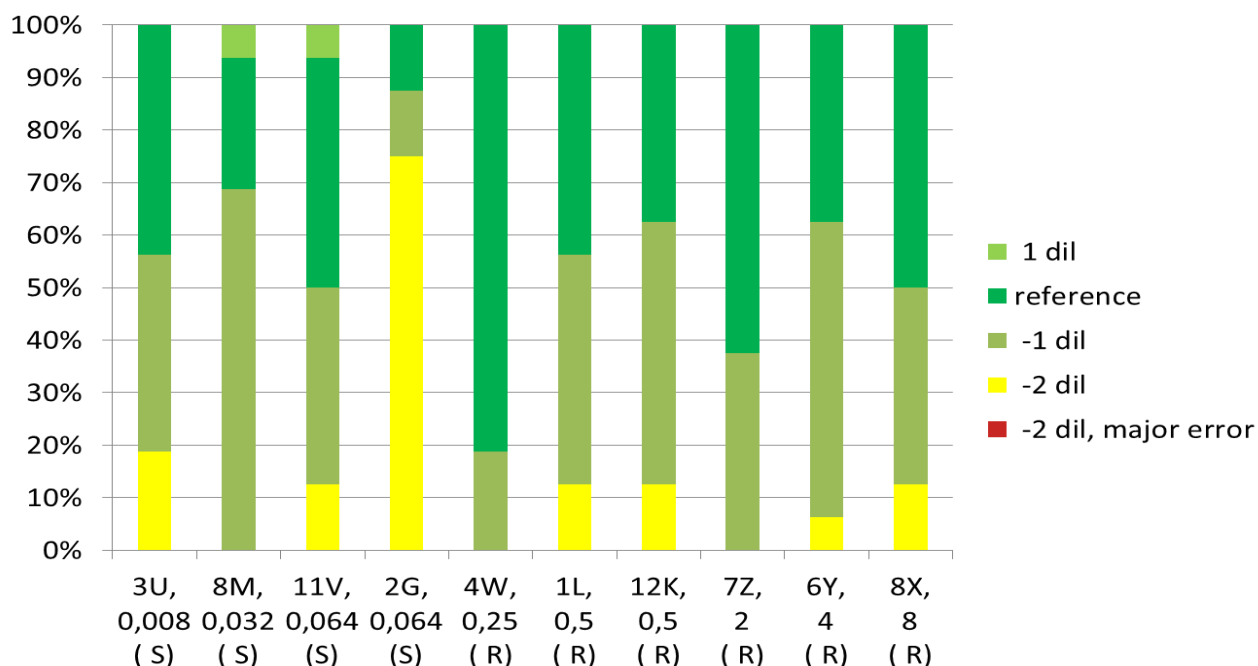


Figuur 1: verdeling van ceftriaxon MIC's tov referentie MIC's over de deelnemende laboratoria.

Stammen 1-12 (muv 5 en 9, duplos van 3 en 6) zijn gesorteerd op MIC weergegeven. Ook is weergegeven onder de bars welke WHO stam dit betrof en of de stam S of R zou moeten zijn. Donkergroen: deel van de labs met dezelfde MIC als referentie, lichtgroen: één MIC dilutie verschil zonder verschil in interpretatie, geel: twee of meer diluties verschil zonder verschil in interpretatie, rood: één dilutie verschil, leidend tot major discrepancy (in dit geval S ipv R), donkerrood: twee diluties verschil, leidend tot major discrepancy.

Figuur 1 laat zien, dat als er MIC verschillen bestaan tov de referentieMIC, de meeste labs een MIC lager dan referentie MIC meten. Lichtgroene, gele en rode delen van de bars boven het donkergroene (volledig correcte) deel zijn uitzonderingen. De meeste laboratoria scoren correct of 1 dilutie verschil tov de referentiewaarde. Resistente stammen 7 (WHO Z), 6 (Y) en 10 (X) worden door vrijwel alle laboratoria correct als resistent gerapporteerd, uitzondering zijn 2 laboratoria die 7(Z) ten onrechte S rapporteren (MIC 0,125). Bij deze stammen is het moleculaire mechanisme achter de resistentie ook duidelijk: specifieke mutaties in het penA gen. Stam 1 (L) wordt door vrijwel alle labs als S gerapporteerd, in tegenstelling tot de referentie. Ook deze stam heeft mutaties in het penA gen, maar het is minder duidelijk dat die de resistentie volledig verklaren. Van de gevoelige stammen levert alleen 12 (K) éénmaal een probleem op. Stammen 12(K) en 4(W) worden ook door vrijwel alle labs herkend als stammen met een verhoogde MIC tov wild-type stammen. Voor 11(V) geldt dit niet.

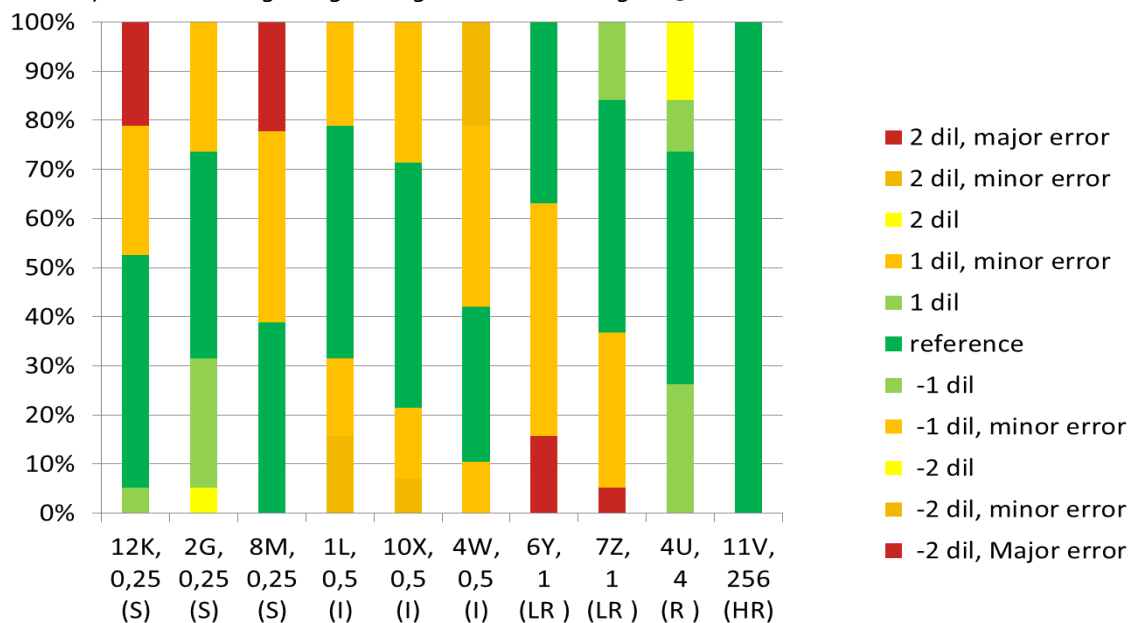
Cefotaxim. Verdeling van gevoeligheden staan in figuur 2



Figuur 2: verdeling van cefotaxim MICs tov referentie MIC's over de deelnemende laboratoria. Legenda zie figuur 1.

Cefotaxim MICs komen nog beter overeen dan ceftriaxon MICs met referentiewaarden (in dit geval gemeten door het GoReflab Amsterdam, omdat deze niet internationaal vastgesteld zijn). Geen major errors. Wel opnieuw: als er andere MICs gemeten worden dan referentie MICs liggen zij doorgaans lager, vrijwel nooit hoger.

Azitromycine. Verdeling van gevoeligheden staan in figuur 3.

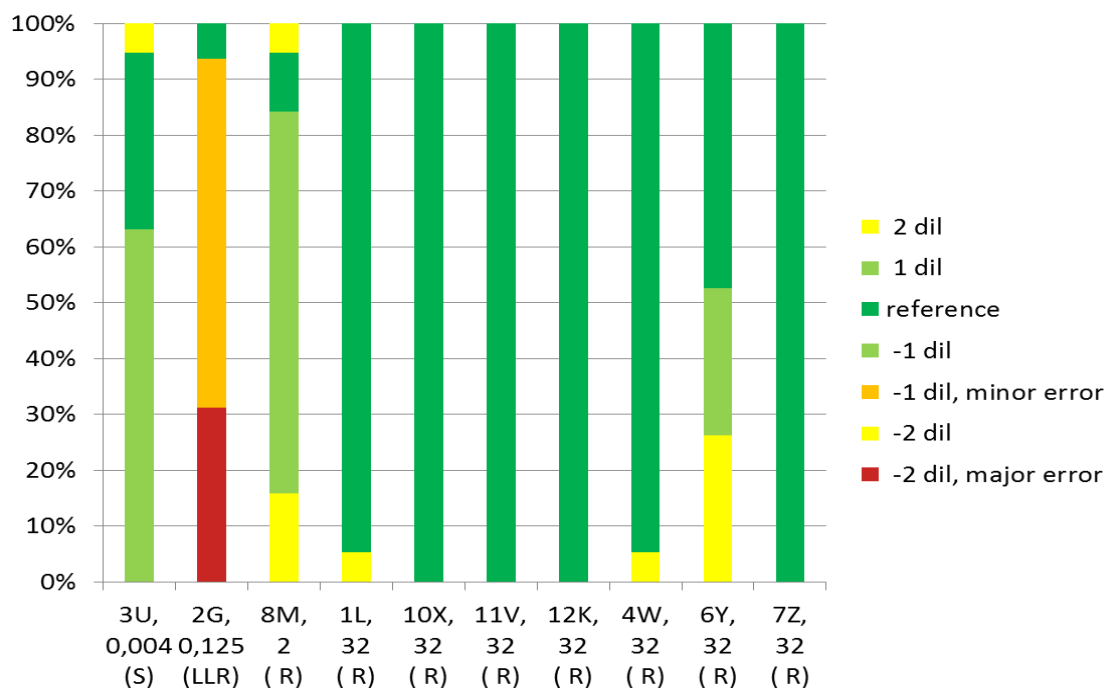


Figuur 3: verdeling van azitromycine MICs tov referentie MIC's over de deelnemende laboratoria. Voor legenda zie figuur 1.

Aanvulling: oranje: 1 dilutie verschil, leidend tot minor error (S naar I of vv, I naar R of vv). bruin: 2 diluties verschil, leidend tot minor error. LR = Lowly Resistant, HR = Highly Resistant

Het beeld bij azitromycine-resistentie ziet er geheel anders uit dan bij de cefalosporines. In de eerste plaats zien we hier vrijwel even veel MIC afwijkingen hoger en lager tov de referentiewaarden. Daarnaast leiden deze afwijkingen ook veel vaker tot een verschil in interpretatie: S naar I, I naar R, S naar R en andersom. Alleen de duidelijk resistente stammen 4(U) en 11(V) worden wel in alle laboratoria herkend. Bij deze twee stammen is ook het achterliggend moleculaire mechanisme geheel duidelijk: specifieke mutaties in het 23SrRNA gen. Deze mutaties zijn niet aanwezig bij 6(Y) en 7(Z); de moleculaire basis voor de verhoogde MIC is niet duidelijk. Bij alle andere stammen dan 4(U) en 11(V) geven veel laboratoria een andere interpretatie dan de interpretatie gebaseerd op de referentiegegevens. Belangrijk struikelblok hierbij is dat hier veel stammen ingesloten waren waarvan de MIC net onder, op of boven de grenswaarde S/I/R lag. In de praktijk komen zulke stammen ook frequent voor. Hun resistenties kunnen dus ook per laboratorium verschillend gerapporteerd worden.

Ciprofloxacin. Verdeling van gevoeligheden terug te vinden in figuur 4.

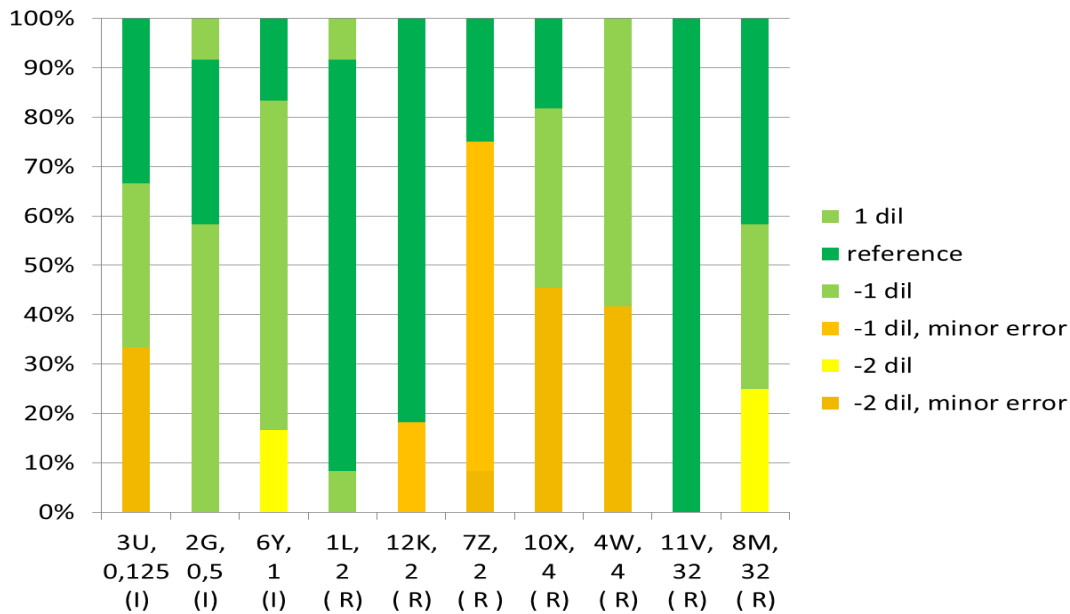


Figuur 4: verdeling van ciprofloxacin MICs tov referentie MIC's over de deelnemende laboratoria. Voor legenda zie fig.1

Aanvulling: LLR = Low Level Resistant.

8 van de 10 stammen waren hoog-resistent voor ciprofloxacin, wat door alle laboratoria gevonden werd. De gevoelige stam werd ook door alle laboratoria correct als S afgegeven. Alleen stam 2, volgens EUCAST criteria S, met een MIC van 0,125 mg/l, werd door vrijwel alle laboratoria als I (0,064 mg/l) of S afgegeven.

Penicilline. Resultaten in figuur 5.



Figuur 5: verdeling van penicilline MICs tov referentie MICs over de deelnemende laboratoria (n=12).  
Legenda zie fig.1

t

Ook hier geen representatieve verdeling van stammen: alle stammen zijn I of R. Net als bij de cefalosporines, afwijkende MICs waren vooral lager. Minor errors (vooral I ipv R) worden frequent gezien.

Vergelijking MICs t.o.v. referentie MIC per deelnemend laboratorium.

Een belangrijke vraag is of laboratoria consequent lagere MICs, dan wel hogere MICs voor een antibioticum rapporteren. In tabel 1 en 2 worden deze gegevens weergegeven voor ceftriaxon en azitromycine.

De verschillen in MICs voor ceftriaxon per laboratorium staan weergegeven in tabel 1. Laboratoria zijn doorgaans consequent in hun verschillen met referentie MICs. Stam 1 (L) wordt vaak als S gerapporteerd, maar bij alle andere stammen rapporteren alle laboratoria vrijwel altijd correct.

De verschillen in MICs voor azitromycine per laboratorium zijn aangegeven in tabel 2. Voor azitromycine geldt net als voor ceftriaxon, dat laboratoria doorgaans consequent zijn in hun richting van afwijkingen. Ofwel hogere, ofwel lagere MIC's..

Stam MIC	1,L 0,25	2,G 0,008	3,U 0,002	4,W 0,064	6,Y 1	7,Z 0,5	8,M 0,016	10,X 2	11,V 0,064	12,K 0,064	Totaal afwijkingen
Lab 1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	1	-2
2	-2	0	0	-1	-1	-1	0	-1	-2	-1	-9
3	-2	1	2	-2	-1	-1	0	-1	-2	-1	-7
4	-2	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	-3
5	-2	0	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-12
6	0	0	0	-1	1	0	0	1	0	0	1
7	-1	0	0	-2	-1	-1	-2	-1	-2	-2	-12
8	-1	0	0	2	2	0	0	-1	-2	2	2
9	-1	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-2	0	-7
10	-1	0	0	-1	-1	-1	-2	-1	-2	-1	-10
11	-1	0	0	-1	0	-1	-1	-1	-2	-1	-8
12	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0	0
13	-1	0	0	-1	-1	-1	-2	-1	-2	-1	-10
14	0	0	0	-1	0	-1	-1	-1	0	1	-3
15	-2	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-9
16	-2	0	0	-2	-1	-1	-2	-2	-2	-1	-13
17	-1	0	0	-1	0	-2	-2	-1	-2	-1	-10
18	-1	0	0	-2	-1	-2	-2	-2	-2	1	-11
19	-1	0	0	-1	0	0	0	0	-2	-1	-5

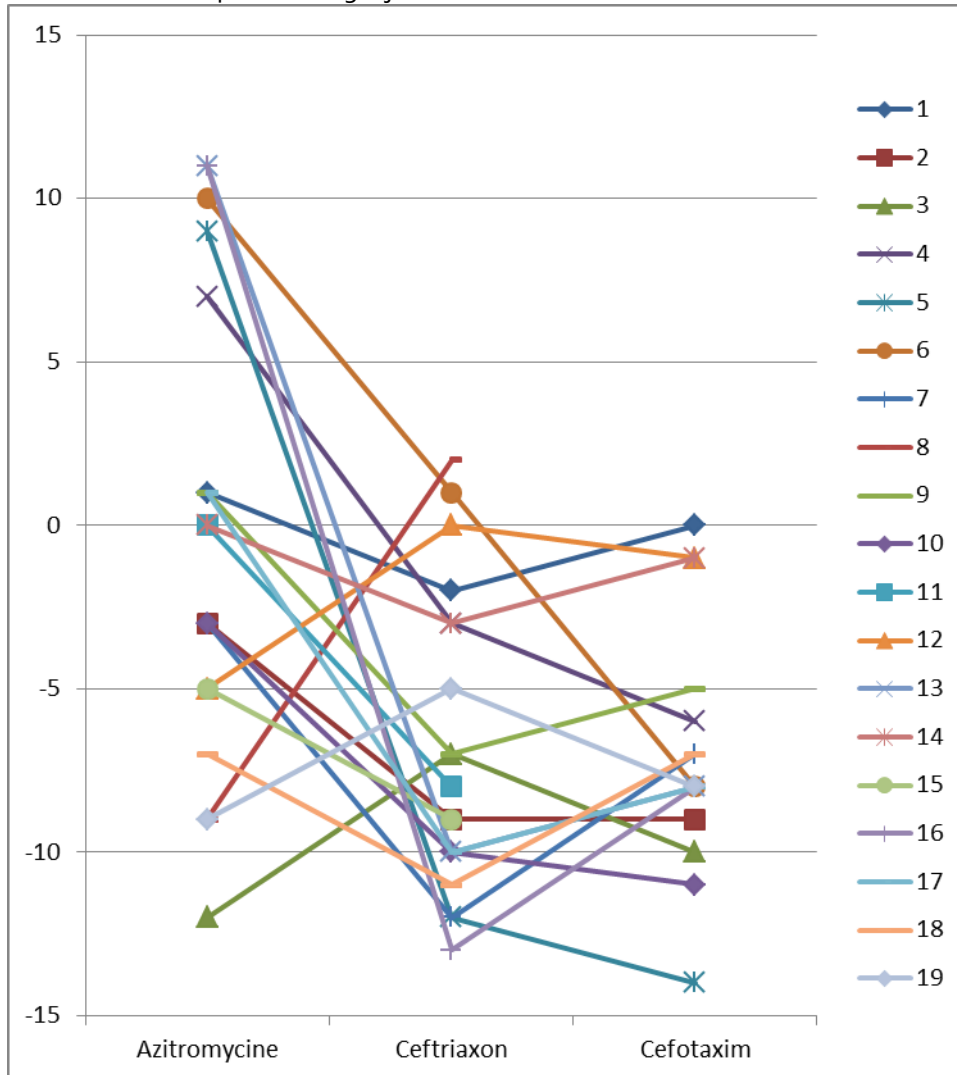
Tabel 1: afwijkingen MIC ceftriaxon tov referentie MIC per lab. 1: 1 dilutie te hoog, 2, 2 diluties te hoog, -1: 1 dilutie te laag, -2: 2 diluties te laag. Major errors (S naar R of R naar S) zijn met geel aangegeven. Totaal afwijkingen: som van alle afwijkende waarden in diluties



	1,L	2,G	3, U	4,W	6,Y	7,Z	8,M	10,X	11,V	12,K	Totaal
MIC Azi	0,5	0,25	4	0,5	1	1	0,25	0,5	256	0,25	Afwijkingen
Lab 1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	1	-3
3	-2	-1	-1	-2	-2	-1	0	-2	0	-1	-12
4	-1	1	2	0	0	1	2	1	0	1	7
5	1	1	1	1	0	1	2	0	0	2	9
6	1	1	1	1	0	1	2	1	0	2	10
7	0	-1	-1	0	-1	0	1	-1	0	0	-3
8	-2	-1	-1	-1	-2	-1	0	-1	0	0	-9
9	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	1	1
10	0	0	0	-1	-1	0	0	-1	0	0	-3
11	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0
12	-1	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0	-5
13	1	1	2	1	0	1	2	1	0	2	11
14	0	0	0	-1	-1	0	1	0	0	1	0
15	-1	-2	0	-1	-1	-1	1	0	0	0	-5
16	1	1	2	1	0	1	2	1	0	2	11
17	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	1	1
18	0	-1	-1	-2	0	-2	0	-1	0	0	-7
19	-2	-1	-1	-1	-2	-1	0	-1	0	0	-9

Tabel 2: afwijkingen MIC azitromycine tov referentie MIC per lab. 1: 1 dilutie te hoog, 2, 2 diluties te hoog, -1: 1 dilutie te laag, -2: 2 diluties te laag. Major errors (S naar R of R naar S) zijn met geel aangegeven. Totaal afwijkingen: som van alle afwijkende waarden in diluties.

Afwijkingen verschillende antibiotica, vergeleken. In figuur 6 zijn de totale waarden van afwijkingen per antibioticum per laboratorium naast elkaar gezet. Opvallend is, dat de laboratoria die doorgaans hogere MIC waarden voor azitromycine rapporteren, juist lagere waarden voor de cefalosporines rapporteren. Enkele laboratoria rapporteren voor beide antibiotica lagere waarden tov de referentiewaarden, enkele laboratoria rapporteren doorgaans conform de referentiewaarden. Conform verwachting zijn totalen voor beide cefalosporines vergelijkbaar.



Figuur 6. Som van alle afwijkingen (Y-as, per antibioticum 1 of 2 MICs lager = -1 of -2; 1 of 2 MICs hoger = +1 of +2) per laboratorium. Som kan per antibioticum variëren van -20 tot 20.

Gebruikte media. Een duidelijke relatie tussen medium en gemeten MIC waarden is lastig te leggen. Opvallend is dat de drie laboratoria die de minste afwijkingen laten zien (1, 12 en 14) media op GC-basis gebruiken, van BD (1 x met Isovitalex, 1 x zonder Isovitalex) of Biotrading. Twee andere laboratoria die medium op GC basis van MP gebruiken rapporteren lagere MICs. De drie laboratoria die de minste afwijkingen laten zien gebruiken Biomerieux E-testen. Aangezien deze worden gebruikt door 18 van de 19 laboratoria zegt dat niet zo veel over de verschillen.

Conclusies. Hoog-resistente stammen voor ceftriaxon en azitromycine worden goed herkend in alle laboratoria. Gerapporteerde MICs bij stammen met een referentie-MIC rond het breekpunt worden echter nogal verschillend gerapporteerd tussen laboratoria. Met name voor azitromycine kan dit een probleem opleveren bij de surveillance, aangezien een substantieel deel van alle gekweekte stammen MICs heeft rond het I/R breekpunt. De keuze voor dit EUCAST-breekpunt valt in de normale verdeling

van WT-MICs en is daarmee wat ongelukkig. Bij een breekpunten  $S \leq 1$ ,  $R \geq 2$  mg/l zouden er nauwelijks geen verschillen tussen labs gevonden zijn in deze rondzending.

Voor de MIC verschillen tussen de laboratoria zijn meerdere verklaringen mogelijk. Verschillen zouden te maken kunnen hebben met verschillen in aflezen: het niet meenemen van microkolonies kan leiden tot te lage MICs. Een andere reden kan het verschil in de gebruikte platen zijn. Laboratoria kunnen overwegen om andere platen te gebruiken. Op verzoek zou het referentielaboratorium éénmalig een set platen kunnen verstrekken zodat de laboratoria ter plaatse kunnen beoordelen of het gebruik van deze platen ten opzichte van hun eigen media inderdaad verschillen oplevert.

20 december 2017, Alje van Dam, Ineke Linde

- (1) Unemo M, Golparian D, Sánchez-Busó L, Grad Y, Jacobsson S, Ohnishi M, Lahra MM, Limnios A, Sikora AE, Wi T, Harris SR. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Nov;71(11):3096-3108.