

Vildtyp

- Ett viktigt begrepp för att förstå och säkert kunna påvisa antibiotikaresistens

Ágota Varga, ST-läkare, Barn- och ungdomskliniken, Växjö

agota.varga@kronoberg.se

Vetenskaplig handledare: Gunnar Kahlmeter,
Adj. Professor, överläkare på Klinisk
Mikrobiologi Region Kronoberg och Blekinge

Sammanfattning

Introduktion: Vildtypspopulationen (WT) är den delen av bakteriepopulationen som saknar all form av fenotypiskt påvisbara resistensmekanismer. Trots detta, enskilda bakterier i den homogena populationen varierar ändå i vilken utsträckning de påverkas av ett antibiotikum.

Syfte: Att kartlägga orsakerna i variationen inom WT, både avseende inhibitionszon och MIC just för att förstå vad som påverkar fördelningen av zondiametern och MIC värdet hos vildtypsorganismer. Skiljer sig antibiotikakänsligheten åt mellan individer i WT eller finns det andra orsaker till variationen som ex. mikroorganismens andra biologiska egenskaper som tillväxthastighet, metabolism mm. än just relationen till antibiotika?

Material och metod:

Genom detta kvantitativa empiriska forskningsstudie kombineras lappdiffusion, buljongspädning och spektrofotometri som metoder för att objektivt kunna förstå och beskriva orsaken till variationen inom WT med fokus på biologisk variation kontra metodvariation hos 10 stycken *Staphylococcus aureus* WT för erytromycin och 10 stycken *Escherichia coli* WT för meropenem. Isolaten var utvalda beroende på i vilken del av normalpopulationen de tillhörde – nedre, medel eller övre del.

Resultat: Vid upprepad bestämning av ett och samma isolat tenderar värdena att (a) variera $\pm 1-3$ mm mellan mätningar, (b) att dra sig mot populationens centrala område men (c) alltid (med ett undantag) hålla sig inom det vi definierar som den Gauss-fördelade WT. Buljongspädningsmetoden visar att isolaten endast i liten utsträckning skiljer sig från varandra och att man oavsett metod inte reproducerbart kan placera ett isolat ovanför eller nedanför ett annat.

Slutsats: Den ursprungligen registrerade hämningszonen från olika delar av WT skiljer sig upp till ± 2 mm för en art och ett antibiotikum och att det genomsnittliga ”läget i populationen” är reproducerbart men att olika individers ”lägen” överlappar i sådan grad att en mer detaljerad gradering av bakteriens känslighet inom normalpopulationen inte är möjlig eller meningsfull, varken med MIC eller inhibitionszon.

Innehåll

Introduktion	3
Syfte	4
Material och metod	5
Design.....	5
Studiepopulation/urval	5
Metoder	6
Lappdiffusion.....	6
Buljongspädning	7
Spektrofotometri	7
Etik.....	8
Tidsplan.....	8
Resultat.....	9
Lappdiffusion	9
Buljongspädning.....	11
Spektrofotometri.....	13
Diskussion	14
Referenser.....	18

Introduktion

Förvärvad antibiotikaresistens innebär att en mikroorganism som ursprungligen kunde påverkas av ett definierat antibiotikum, genom en genetisk händelse utvecklar motståndskraft mot medlet ifråga (1). Genotypisk resistensbestämning används för detektion av känd resistens, det vill säga R-genen är känd och genetiska metoder kan påvisa dess förekomst (2). Fenotypisk resistensbestämning mäter ett eller flera antibiotikas aktivitet mot bakterier och kan användas för både känd och okänd resistensdetektion och ger samtidigt en gradering av bakteriens känslighet eller resistens (2). Den fenotypiska resistensbestämningen kan göras med buljongspädning (där ”gradienten” skapas genom fallande koncentrationer i individuella bägare med tillväxtmedium), gradientmetod (varvid gradienten av antibiotika skapas i form av mikrolappar med varierande antibiotikamängd utefter en plastremsa) och lappdiffusion (varvid gradienten skapas i agar genom diffusion från ett diffusionscentrum). Den del av en bakteriepopulation som är fri från fenotypiskt påvisbara resistensmekanismer kallas för vildtypspopulationen (WT). Det finns ett flertal studier som visar på en nära korrelation mellan en fenotypisk och genotypisk karakterisering av WT (3). Den nuvarande definitionen av WT för en art och ett antibiotikum bygger på antagandet att individer inom WT saknar gener för resistens. Vildtypen är typiskt en Gaussfördelad population av mätvärden med ett för varje art/antibiotikum har en nedre och en övre ände, där varje ände är en spegelbild av den andra (4). Genom att fastställa slutpunkten för den ”känsligaste” delen av populationen kan den speglade andra änden fastställas. Via buljongspädning bestäms den lägsta koncentration som för ett antibiotikum förmår hämma den enstaka bakterieisolatets tillväxt benämns ”the Minimum Inhibitory Concentration” (MIC) (5, 6). Det högsta MIC-värdet (motvarande den minsta inhibitionszonen) i den så definierade WT benämns ECOFF (epidemiologiska cut-off) (7). ECOFF är alltid ett enstaka värde (MIC eller zon) och utgörs av individer i populationen med MIC-värden $\leq$ ECOFF. Det finns god acceptans avseende ECOFF:s förmåga att skilja mellan individer med och utan antibiotikaresistens. Vår kunskap om skillnaderna mellan individer inom WT är däremot ofullständig. En del av variationen mellan individer i normalpopulationen är teknisk och slumpmässig. Sannolikt spelar också biologiska skillnader mellan individerna roll (8), men vi vet inte i vilken utsträckning de biologiska skillnaderna är direkt relaterade till antibiotikumet i fråga, och hur stor del som orsakas av andra biologiska variationer som kan påverka MIC-värdets respektive inhibitionszonens storlek. Även om vi inte vet i vilken utsträckning variationen inom WT kan förklaras av biologi respektive teknisk variation, så vet vi

att WT för en art och ett antibiotikum är identisk oavsett var vi hämtar bakterierna geografiskt, djurart, tidsmässigt m.m.

Syfte

Syftet med projektet är att närmare kartlägga orsakerna till variationen i WT, både MIC och inhibitionszon, för att förstå vad som påverkar fördelningen av MIC värdet samt zondiametern hos vildtypsorganismer. Varför uppför sig bakteriearter i detta avseende nästan identiskt, och varför nästan identiskt oavsett vilket antibiotikum som undersöks? Skiljer sig antibiotikakänsligheten åt mellan individer i WT eller finns det andra orsaker till variationen? Några forskare hävdar att den skillnad i MIC som föreligger mellan ytterändarna på vildtypspopulationerna, typiskt 0,125 mg/L till 1,0 mg/L eller 0,016 mg/L till 0,125 mg/L måste kunna utnyttjas i terapeutiska kalkyler och bedömningar. Om å andra sidan, variationen i MIC-värden inom WT i första hand är teknisk, dåligt reproducerbar och kanske dessutom ur biologisk synpunkt mest påverkad av mikroorganismens andra egenskaper (tillväxthastighet, metabolism mm) än just relationen till antibiotika så bör man sträva efter att hålla ihop WT i allt tänkande runt farmakokinetik, farmakodynamik och behandlingsstrategier.

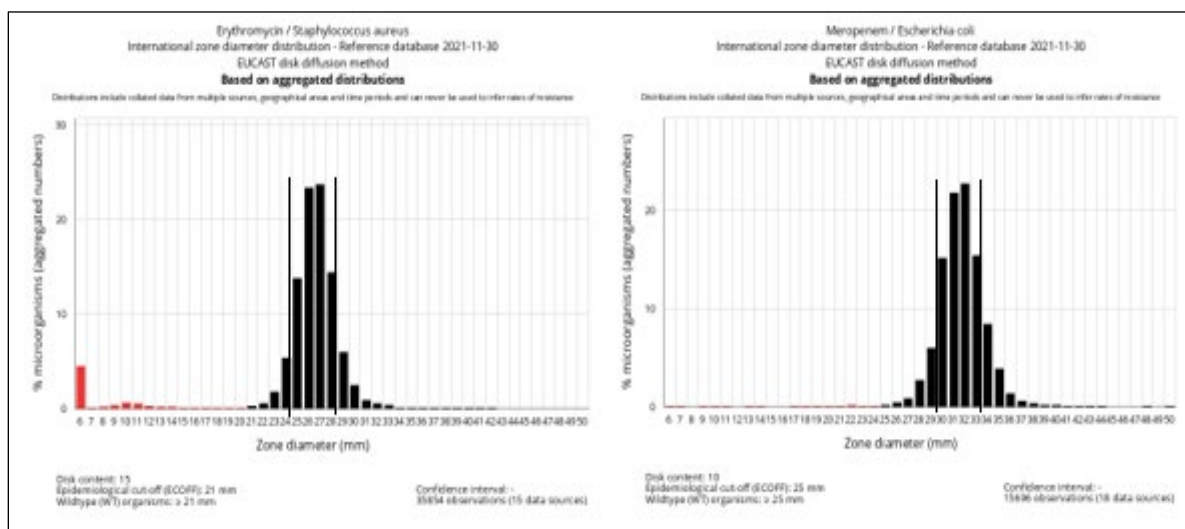
Material och metod

Design

Arbetet är en kvantitativ empirisk forskningsstudie där vi kombinerade olika metoder för att objektivt kunna förstå och beskriva orsaken till variationen inom vildtypspopulationen med fokus på biologisk variation kontra metodvariation.

Studiepopulation/urval

På Klinisk Mikrobiologi i Region Kronoberg och Blekinge har man sedan många år tillbaka sparat bland annat antibiotikaresistens-data i systemet AdBakt. Från databasen söktes fram zon/MIC-fördelningshistogram för *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) samt *Escherichia coli* (*E. coli*). Inklusionskriterien var att isolaten ska tillhöra respektive arts vildtyp: *S. aureus* för erytromycin 15 µg och *E. coli* för meropenem 10 µg. Isolaten var utvalda beroende på i vilken del av normalpopulationen de tillhörde – nedre, medel eller övre del (Figur 1). De utvalda isolaten avlästes upprepat, vid olika tillfällen. Arbeta och avläsningen skedde blint. Den tekniskt ansvarige för laboratoriet var inte informerad om isolatets vildtypstillhörighet.



Figur 1. Histogram för (a) *Staphylococcus aureus* och erytromycin och (b) *Escherichia coli* och meropenem. De vertikala linjerna visar den nedre, medel och översta delen av vildtypspopulationen (WT)

Efter pilotstudier har vi identifierat totalt 20 stycken vildtyp stammar från blododlingsisolat, varav 10 stycken *S. aureus* och 10 stycken *E. coli*.

Metoder

Samtliga bakteriestammar var avidentifierade och endast arten var känd. De förvarades i frysrör på -70 grader Celsius på Klinisk Mikrobiologi i Växjö. För att undvika och säkerställa att isolaten inte blev kontaminerade under åren togs de en och en fram på egna agarplattor: *S. aureus* isolaten på blod agarplatta och *E. coli* på uriselekt. Varje isolat kontrollerades med Matrix Assisted Laser Desorption – Time Of Flight (MALDI-TOF) som bekräftade bakteriearten med mycket tillförlitliga resultat.

För kvalitetskontroll av material och arbetet användes stammar med kända referensprofiler, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 och *Escherichia coli* ATCC 25922 (15). Det laborativa arbetet utfördes på Klinisk mikrobiologi i Växjö och sammanställningen samt analysen av data gjordes i Excel.

Lappdiffusion

I lappdiffusionsmetoden låter man antibiotikum diffundera från en kommersiellt tillverkad papperslapp med en bestämd mängd antibiotika ut i en agarplatta som tidigare har inokulerats med en bakterieslamning. När diffusionen fullbordats skapas en koncentrationsgradient i agarn. Laboratoriet för den Europiska kommittén för antimikrobiell känslighetstestning (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) har utvecklat standardiserade metoder för snabbväxande bakterier som beskriver förvaring och förberedelse av agarplattor, preparation av inokulat, inokulering av agarplattor, applicering av antibiotikalappar, inkubering av resistensplattor, instruktioner för avläsning av resistensplattor och mätning av inhibitionszoner med skjutmått samt tolkning av resistensbestämning som är i sammanhang med gemensamma europeiska MIC-brytpunkterna (16, 17). Enligt detta har för *S. aureus* använts erytromycin 15 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole 25 µg, cefoxitin 30 µg, levofloxacin 5 µg, rifampicin 5 µg, tetracyclin 30 µg och för *E. coli* meropenem 10 µg, piperacillin-tazobactam 36 µg, trimethoprim 5 µg, ciprofloxacin 5 µg, nitrofurantoin 100 µg och tobramycin 10 µg. Alla antibiotikalappar var från Oxoid (ThermoFischer Scientific). Alla MH plattor hade oxoid agarbas.

Lappdiffusion är den mest använda metoden för resistensbestämning i det dagliga klinisk mikrobiologiska laboratoriearbete. Den kräver ingen dyr utrustning, är extremt flexibel och möjliggör testning av de flesta bakteriearter och antibiotika.

Buljongspädning

MIC-bestämning utförs med mikrobuljongspädning (broth microdilution, BMD) som är referens metoden för känslighets- och resistensbestämning enligt ISO-standard 20776-1:2019 (18). Andra metoder som kan användas för resistensbestämning som exempel lappdiffusion behöver kalibreras mot BMD (17). På EUCAST referenslaboratorium används kommersiellt tillgängliga mikrotiterplattor med 96 brunnar med frystorkade antibiotika.

De kommersiella mikrotiterpanelerna använda i projektet var från ThermoFisher Scientific:

- *S. aureus* – Sensititre SEMSE3, Sensititre SEMSE4 respektive Sensititre SEMSE5, Sensititre SEMSE6.
- *E. coli* – Sensititre SEMEN 5, Sensititre SEMEN6 respektive Sensititre SEMST5, Sensititre SEMST6.

Buljongsspädningen var genomförd enligt standardiserade rekommendationen från EUCAST (12, 17).

Spektrofotometri

Med hjälp av spektrofotometri kan man indirekt mäta bakteriepopulationers utveckling i buljong. Metoden baseras på grumlighetsmätning som är direkt proportionerlig med bakteriemassan som innehåller både levande och döda bakterieceller. Spektrofotometern med hjälp av en ljuskälla mäter absorbansen (optisk densitet -OD), dvs. grumligheten. Med tanken att de flesta bakterier är nästan färglösa, den direkta ljusabsorptionen är minimal. OD-n på indirekt sätt visar antalet bakterier och är ett logaritmiskt värde.

I denna studie har använts Tecan Infinite F50, Magellan absorbansmätare. Våglängden var 620nm. Förvärrt MH buljong tillverkat in-house har testats parallellt med MH buljong från TermoFischer Scientific som har även använts vid buljongspädning, tillsammans med sterilförpackade flatbottnade 96 brunnars mikrotiterplattor. Varje brunn fylldes med ren MH buljong och till detta tillsattes 1 µl, 5 µl eller 10 µl bakterieisolat som var inkuberad i luft över natten. Absorbansmätning var gjord först vid 0 minut (före inkubation), därefter var 30:e minut upp till 7,5 timme.

Etik

Ansökan till Etikprövningsmyndigheten är inte nödvändig för de planerade delarbetena eftersom bakterieisolaten finns avidentifierade och sparade i frys och inte kan identifieras till någon person. Alla försök är *in-vitro*.

Tidsplan

Pilotstudierna påbörjades under 2019 och delar som är genomförda kommer presenteras i detta arbete. I fortsättningen planeras utökade tester för att säkerställa att förhållanden som man lyckas fastställa för en art och ett antibiotikum är giltiga för andra art och andra antibiotika samt att kartlägga vilka variabler av tillväxtbetingelser som har störst betydelse för variationen av MIC och inhibitionszon i normalpopulationen. Sistnämnda arbete planeras göras i form av doktorandarbete närmsta åren.

Resultat

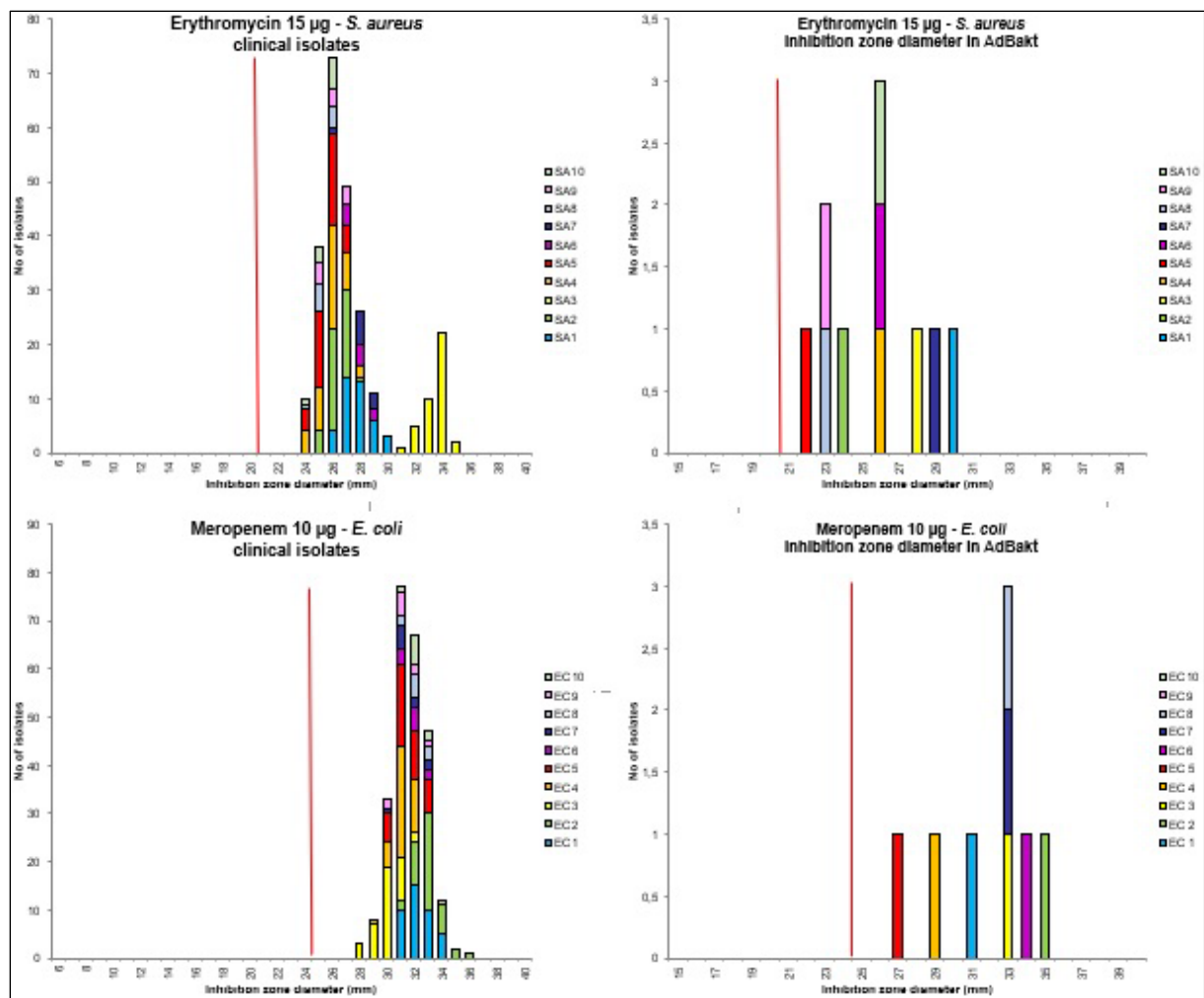
Lappdiffusion

Vid upprepade bestämning av ett och samma isolat ser man en variation av $\pm 2-3$ mm. Isolat som ursprungligen identifierades som tillhörande extremområdena (lågt och högt) drar sig vid omtestning mot medianen av vildtypspopulationen.

Värdena tenderar att (a) variera $\pm 1-3$ mm mellan mätningar (alla isolat har viss och liknande variation på sin zondiameter vid upprepade testningar även om avläsaren är en och samma och de metodologiska förutsättningarna är identiska (Figur 2)), (b) att dra sig mot populationens centrala område men (c) alltid (med ett undantag) hålla sig inom det vi definierar som den Gauss-fördelade vildtypspopulationen.

Ett isolat, SA3, som i labdatasystemet vid ursprunglig rutinavläsning, låg strax över medelkategorin har i princip vid alla testningar legat högre, i snitt 5 mm, än förväntat, oavsett antibiotika.

Även hos *E. coli* stammarna bekräftades att de enskilda isolaten har sin egen variation vid upprepade testningar och avläsningar, men de hamnar aldrig utanför normalpopulationen (Figur 2). Femtio procent ($n=8$) behöll sin kategori och 50 procent listades till medel delen, oberoende om de har legat i nedre eller övre områden, men egentligen alla isolat ($n=10$) tillhörde WT, dock hos två isolat saknades utgångsvärdet i AdBakt.



Figur 2. Variationen på zondiametern hos de utvalda kliniska isolat jämfört med antibiotikaresistensdata från AdBakt systemet

Resultaten bekräftade att lappdiffusionsmetoden är tekniskt ytterst reproducerbar med låg standarddeviation (Tabell 1).

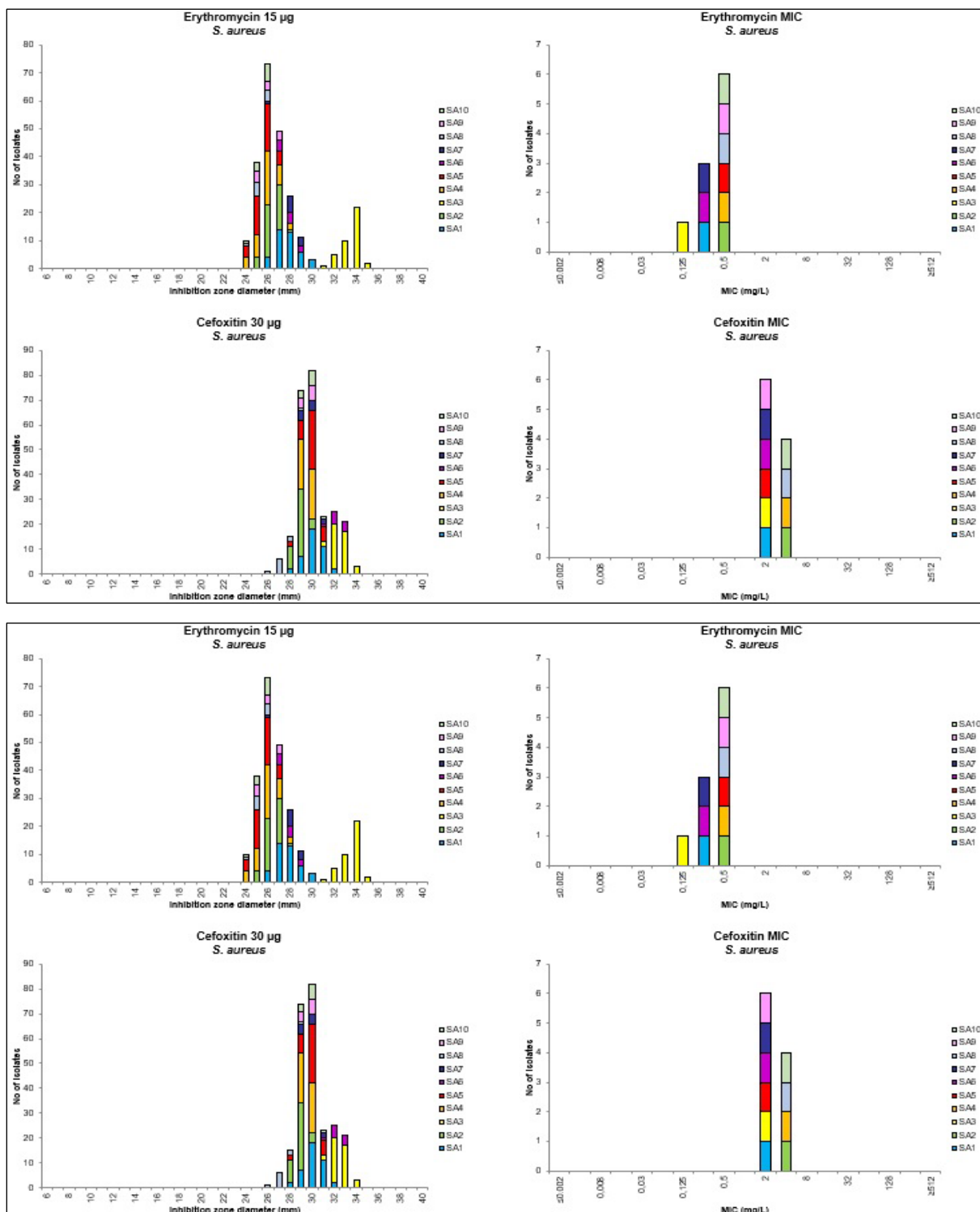
Tabell 1. Standardavvikelse (SD) vid upprepade lappdiffusionstester

SD	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8	SA9	SA10
ERY 15	1,1	0,7	0,9	1,0	0,8	0,8	0,9	0,7	0,9	0,7
TSU 25	1,4	0,7	0,8	0,8	0,8	0,5	1,2	0,6	0,7	0,8
FOX 30	0,9	0,6	0,7	0,5	0,7	0,7	0,8	0,8	0,5	0,6
LEV 5	0,8	0,6	1,2	0,4	1,0	0,7	0,5	1,0	0,7	1,0
RIF 5	0,7	0,6	1,5	0,7	1,1	0,7	0,9	1,1	0,8	0,8
TET 30	0,9	0,7	1,4	0,7	1,1	0,7	1,0	0,7	1,1	0,6

SD	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5	EC6	EC7	EC8	EC9	EC10
MER 10	1,0	1,0	1,0	0,7	1,0	0,7	1,0	0,7	0,9	0,8
TRI 5	0,6	0,9	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8
PTZ 36	0,7	0,9	0,6	0,5	0,6	0,4	0,7	0,7	0,9	0,6
CIP 5	0,8	0,9	0,5	1,1	0,7	1,1	0,5	0,9	0,5	1,4
NIT 100	0,7	0,8	0,6	1,0	0,7	0,8	1,1	0,7	0,9	0,9
TOB 10	0,5	0,4	0,6	0,0	0,5	0,5	0,7	0,5	0,4	0,8

Buljongspädning

När MIC-bestämnings- och lappdiffusionsresultat för *S. aureus* och *E. coli* ställs mot varandra, visar det sig att isolaten (oavsett om värderade med MIC eller zon) endast i liten utsträckning skiljer sig från varandra och att man oavsett metod inte reproducerbart kan placera ett isolat ovanför eller nedanför ett annat (undantag det isolat som för alla antibiotika systematiskt uppvisar större zoner än alla andra (Figur 3) och vid vår efterkontroll inte kan placeras i vildtypen). Alla undersökningar genomfördes i enlighet med de standardiserade rekommendationerna från EUCAST (12, 17).



Figur 3. Förhållande mellan inhibitionszon och Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

I ett annat experiment undersöktes MIC-värdets utveckling över inkubationstidens längd, genom att vi utförde avläsning av mikrotiterplattan över tid, där den tidigaste möjliga avläsningstidpunkten för var efter 4 timmars inkubation (Tabell 1).

Tabell 2. Manuell avläsning av den kommersiella mikrotiterplattan en gång i timmen (*S. aureus*, erytromycin) över 18 timmar (standard inkubationstid är 16 – 20h)

MIC over time	4H	5H	6H	7H	8H	9H	10H	11H	12H	13H	14H	15H	16H	18H
SA1 ERY		0,03	0,06	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
SA2 ERY		0,06	0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
SA3 ERY			0,03	0,03	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
SA4 ERY		0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
SA5 ERY		0,06	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
SA6 ERY		0,06	0,12	0,25	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
SA7 ERY	0,03	0,06	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
SA8 ERY	0,06	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
SA9 ERY	0,06	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5
SA10 ERY	0,06	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5

Spektrofotometri

För att lättare kunna mäta tillväxthastigheten som klassiskt utförs som ovan beskrivits (bedömning av grumlighet med det nakna ögat), har vi upphandlat en spektrofotometer där inkubations-temperatur och automatiska avläsningstider kan ställas in (exempelvis, mätning var 10 minut under 24 timmar, vid 35 °C och med kontinuerlig skakning). Vi planerar att fortsätta och utvidga försöken genom att bättre karakterisera MIC-värdets utveckling över tid med tätare mätningar och över hela dygnet.

Diskussion

Syftet med denna kvantitativa empiriska studie var att inleda ett större och mer långsiktigt projekt i vilket vi studerar faktorer som påverkar de fenotypiska mått vi använder för att beskriva bakteriers känslighet för antibiotika, MIC-värdet (Minimum Inhibitory Concentration) och inhibitionszonens storlek runt en väldefinierad antibiotikalapp. Inom bakteriologi och infektionsmedicin har man länge tagit för givet att MIC-värdet (och därmed indirekt hämningszonens storlek) står i direkt relation till mikroorganismens ”känslighet” för ett antibiotikum. Vi vet att MIC-värdets reproducerbarhet, när alla andra faktorer är lika och så standardiserade som möjligt, är ett värde ovanför och ett värde under mål-värdet; i siffror innebär det att ett arbiträrt MIC-värde 1 mg/L vid upprepade bestämningar pendlar mellan 0,5, 1 och 2 mg/L. För hämningszonen motsvarar det teoretiskt och faktiskt $\pm 2 - 3$ mm runt ett arbiträrt värde.

Hos individer i en bakteriepopulation som tillhör den sk. vildtypen varierar uppmätta MIC-värden 3 – 5 spädningssteg; exempelvis uppmäts MIC-värdena 0,25, 0,5 och 1 mg/L eller för en annan art/antibiotikakombination 0,064, 0,125, 0,25 och 0,5 mg/L; eller för att ta ett exempel ur den faktiska verkligheten hos 90 000 *Staphylococcus aureus* utan vankomycinresistens varierar MIC-värdena mellan 0,5, 1 och 2 mg/L och för erytromycin är motsvarande variation 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 och 1 mg/L. Är den skillnad som på nästan exakt samma sätt kan beskrivas för i stort sett alla art/antibiotika-kombinationer ett uttryck för en verklig biologisk variation som teoretiskt sett kunde utnyttjas i behandlingen av patienter, eller är den helt och hållet ett uttryck för den tekniska slumpmässiga variationen som alltid förekommer eller är den ett uttryck för en biologisk variation som inte är direkt knuten till respektive medels aktivitet mot bakterien utan till andra biologiska variabler såsom delningstid (tillväxthastighet), förmåga att ta till vara näringsämnen, individens mottaglighet för antibiotikums effekt vid lätt skiftande miljöförhållanden, m.m.

Vi studerade teknisk metodvariation, förekomst av resistensmekanismer eller resistensgener men även hur bakterien påverkades av variationer i fysiologiska egenskaper som metabolism, tillväxthastighet, mm. För detta selekterades totalt 10 isolat från vardera två arter och två antibiotika. Vi ville studera om bakteriens ”läge” inom vildtypspopulationen (nedre tredjedelen, mittersta tredjedelen och övre tredjedelen) var uttryck för en reproducerbar egenskap. För *S. aureus* valde vi erytromycin som test-antibiotikum, och för *E. coli* valde vi meropenem.

Initialt har 5 stycken *S. aureus* och 5 stycken *E. coli* testats och de avlästes av samma person under samma omständigheter vid 4 olika tillfällen, sammanlagt 40 gånger. I nästa fas ytterligare 5 SA och 5 EC blev inkluderade, avläsningen skedde på samma sätt, dock för dessa totalt 10 gånger. Alla variabler oavsett vald metod (lappdiffusion eller buljongspädning) skedde enligt EUCAST standardiserade regler (16, 18) och var strikta och fasthållna under hela arbetets gång.

Resultaten visade positiv utfall vad gäller reproducerbarhet inte enbart till antibiotikumet i fråga där stammarna var vildtyper för, utan för alla testade antibiotikum (*S. aureus*: erytromycin 15 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole 25 µg, cefoxitin 30 µg, levofloxacin 5 µg, rifampicin 5 µg, tetracyclin 30 µg och för *E. coli*: meropenem 10 µg, piperacillin-tazobactam 36 µg, trimethoprim 5 µg, ciprofloxacin 5 µg, nitrofurantoin 100 µg och tobramycin 10 µg).

Standardavvikelsen (SD) är måttet på ett antal värdens spridning kring medelvärdet och beräknas med följande formel:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

där x är sampelmedelvärdet MEDE (tal1; tal2;...) och n är sampelstorleken.

Man måste ta hänsyn till att antal avläsningar skiljer sig något mellan olika isolat, men oavsett detta är standardavvikelsen låg, vilket stödjer det ursprungliga resonemanget att variationen av SD är i huvudsak icke relaterat till antibiotikum (Tabell 1). Hombach et al. studerade på ett liknande sätt den tekniska och biologiska variationen via lappdiffusion, dock skedde avläsningen i deras studie automatiskt med en Sirscan läsare. Deras resultat, precis som det som presenteras här bekräftar sambandet mellan tillförlitligt reproducerbart resultat och låga standardavvikelsevärden, genom att optimera variationen i materialet tack vare användning av samma "batch/lot" av agarplattor, antibiotikalappar (8). I samma studie dras slutsatsen att tekniska faktorer påverkar i stor utsträckning lappdiffusionsresultatet men att bakteriens egna biologiska egenskaper styr på ett omfattande sätt variationen i zondiametern och därför är viktigt att inte dela upp populationen utan att undersöka om resistensgener förekommer, annars kommer att föreligga oundvikliga kategoriseringsfel oavsett hur noggrann man är rent tekniskt.

Trots att studien är ganska liten (n=20), finns starka bevis på att den biologiska variationen i en bakteriepopulation är väldigt liten och SD stödjer att denna variation är metodrelaterad så länge vi pratar om vildtypsisolat.

För att säkerställa att lappdiffusionsresultaten är pålitliga gjordes upprepade testningar på utvalda QC stammar och även buljongspädning på alla isolat vid två olika tillfällen utan att hitta några diskrepanser.

Avläsning av BMD plattor för MIC-bestämning sker rutinmässigt efter 16–20 timmar och resultatet blir ett enskilda MIC värde per test. Studiens *S. aureus* stammar avlästes en gång i timmen (Tabell 2), där det tidigaste MIC värdet kunde bestämmas först efter 4 timmars inkubation. Detta gäller även för *E. coli* där avläsningen pågick en gång i timmen första 8 timmarna och sedan vid standardiserad 16–20 timmar. På de kommersiella mikrotiterplattorna som har använts för testning av *E. coli*, är den lägsta möjliga avläsningsbara meropenem koncentrationen 0,016 mg/L. Därför har 66,6 procent av stammarna (n=10) har detta värde som slutlig MIC och hos dessa var det inte möjligt att bedöma MIC-värdets dynamik. Hos de bedömbara resterande 33,3 procent, skedde förändringen från den initiala 0,016mg/L till det slutliga 0,32mg/L någon gång mellan 8 och 16–20 timmar.

Man behöver såklart ta hänsyn till att denna tekniska variabeln kan spela roll i MIC värdets utveckling och att tillväxthastigheten just på grund av temperaturskillnader rent teoretiskt skulle kunnat påverka resultaten, men trots detta ser vi inga kategoriseringsfel eller svängningar i MIC värden. Det avlästa MIC-värdet är högre efter lång inkubationstid vilket inte är oväntat. Huruvida MIC-värdet sedan når en platta kräver tidsmässigt längre försök. Detta medför bekymmer med bindning av vissa antibiotika till materialet i plattor och degeneration över tid av andra antibiotika med resulterande felaktiga mätnivåer.

Merparten av våra resultat stödjer teorin att en stor del av variationen i MIC-värden inom WT är starkt påverkad av mikroorganismers andra biologiska egenskaper, som exempelvis variation i tillväxthastighet, metabolism m.m., än just relationen till antibiotika.

Det är välkänd att inkubationsvillkoren samt inokulat-koncentrationen är förenliga/direkt proportionerliga med effekten av antibiotika, där förändringar som förlängd inkubation eller högre respektive lägre inokulat nivåer leder till felaktiga antibiotikaresistensdata, dvs felaktiga MIC värden. Utöver detta den antimikrobiella aktiviteten av antibiotikan påverkas av miljön där de befinner sig, såsom temperatur, pH men även ljus.

Sammanfattningsvis är slutsatsen att den ursprungligen registrerade hämningszonen från olika delar av vildtypspopulationen skiljer sig upp till ± 2 mm för en art och ett antibiotikum och att det genomsnittliga ”läget i populationen” är reproducerbart men att olika individers ”lägen” överlappar i sådan grad att en mer detaljerad gradering av bakteriens känslighet inom normal-populationen inte är möjlig eller meningsfull, varken med MIC eller inhibitionszon.

Nästa steg i studien är att renodlat studera och kartlägga ytterligare variablers påverkan på uppkomsten av ett MIC-värde. I detta syfte kommer de redan utvalda isolaten testas på egen-designade mikrotiterplattor, där alla antibiotikum som även har använts vid lappdiffusion finns med i de koncentrationer där MIC utvecklingen över tid kan monitoreras. För ännu säkrare avläsning och mätning tillväxthastighet kommer BioTek Epoch2 Microplate Spectrophotometer användas som har inbyggd värmekälla samtidig inkubationsmöjlighet likadant som skaknings-funktion för absorptionsmätning där behövs jämn grumlighetsnivå i brunnen.

Referenser

1. EUCAST Definitive Document Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. *Clin. Microbiol. Infect.* 1998;4:291–296. doi: 10.1111/j.1469-0691.1998.tb00061.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Humphries RM. Update on Susceptibility Testing: Genotypic and Phenotypic Methods. *Clin Lab Med.* 2020 Dec;40(4):433-446. doi: 10.1016/j.cl.2020.08.002. Epub 2020 Sep 30. PMID: 33121613.
3. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, Grundman H, Hasman H, Holden MTG, Hopkins KL, Iredell J, Kahlmeter G, Köser CU, MacGowan A, Mevius D, Mulvey M, Naas T, Peto T, Rolain JM, Samuelsen Ø, Woodford N. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Jan;23(1):2-22. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.012. Epub 2016 Nov 23. PMID: 27890457.
4. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect.* 2006 May;12(5):418-25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x. PMID: 16643517.
5. Jennifer M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 48, Issue suppl_1, July 2001, Pages 5–16. Hämtat från: academic.oup.com <2022-03-03
6. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution, *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 9, Issue 8, 2003, Pages ix-xv, ISSN 1198-743X. Hämtat från: www.sciencedirect.com <2022-03-05
7. Gunnar Kahlmeter, Derek F. J. Brown, Fred W. Goldstein, Alasdair P. MacGowan, Johan W. Mouton, Anders Österlund, Arne Rodloff, Martin Steinbakk, Pavla Urbaskova, Alkiviadis Vatopoulos, European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 52, Issue 2, August 2003, Pages 145–148. Hämtat från: academic.oup.com <2022-03-05
8. Hombach M, Ochoa C, Maurer FP, Pfiffner T, Böttger EC, Furrer R. Relative contribution of biological variation and technical variables to zone diameter variations of disc diffusion

- susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jan;71(1):141-51. doi: 10.1093/jac/dkv309. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26462987.
9. Maurer FP, Courvalin P, Böttger EC, Hombach M. Integrating forecast probabilities in antibiograms: a way to guide antimicrobial prescriptions more reliably? *J Clin Microbiol*. 2014 Oct;52(10):3674-84. doi: 10.1128/JCM.01645-14. Epub 2014 Aug 6. PMID: 25100821; PMCID: PMC4187754.
 10. Gunnar Kahlmeter, The 2014 Garrod Lecture: EUCAST – are we heading towards international agreement?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 70, Issue 9, September 2015, Pages 2427–2439. Hämtat från: academic.oup.com <2022-03-05
 11. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method Version 7.0 (January 2022). Hämtat från: www.eucast.org <2022-03-05
 12. EUCAST reading guide for broth microdilution Version 4.0 (January 2022). Hämtat från: www.eucast.org <2022-03-05
 13. Laure NN, Dawan J, Ahn J. Effects of Incubation Time and Inoculation Level on the Stabilities of Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics against *Salmonella* Typhimurium. *Antibiotics* (Basel). 2021 Aug 22;10(8):1019. doi: 10.3390/antibiotics10081019. PMID: 34439069; PMCID: PMC8388968.
 14. B. C. Knight. Growth Factors in Microbiology: Some Wider Aspects of Nutritional Studies with Micro-organisms. *Vitamins and Hormones Series*. 1945, volume 3, pages 105 – 2286
 15. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 12.0, 2022. Hämtat från: www.eucast.org <2022-03-05
 16. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 10.0 (January 2022). Hämtat från: www.eucast.org <2022-03-05
 17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. Hämtat från: www.eucast.org <2022-03-05
 18. International Standard. ISO 20776-1. (2019). *Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial AGENTS Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases*. 2nd ed. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland.