

# Syns det inte så finns det inte?

## - Kan spektrofotometri ersätta visuell avläsning vid buljongspädningsmetoden?

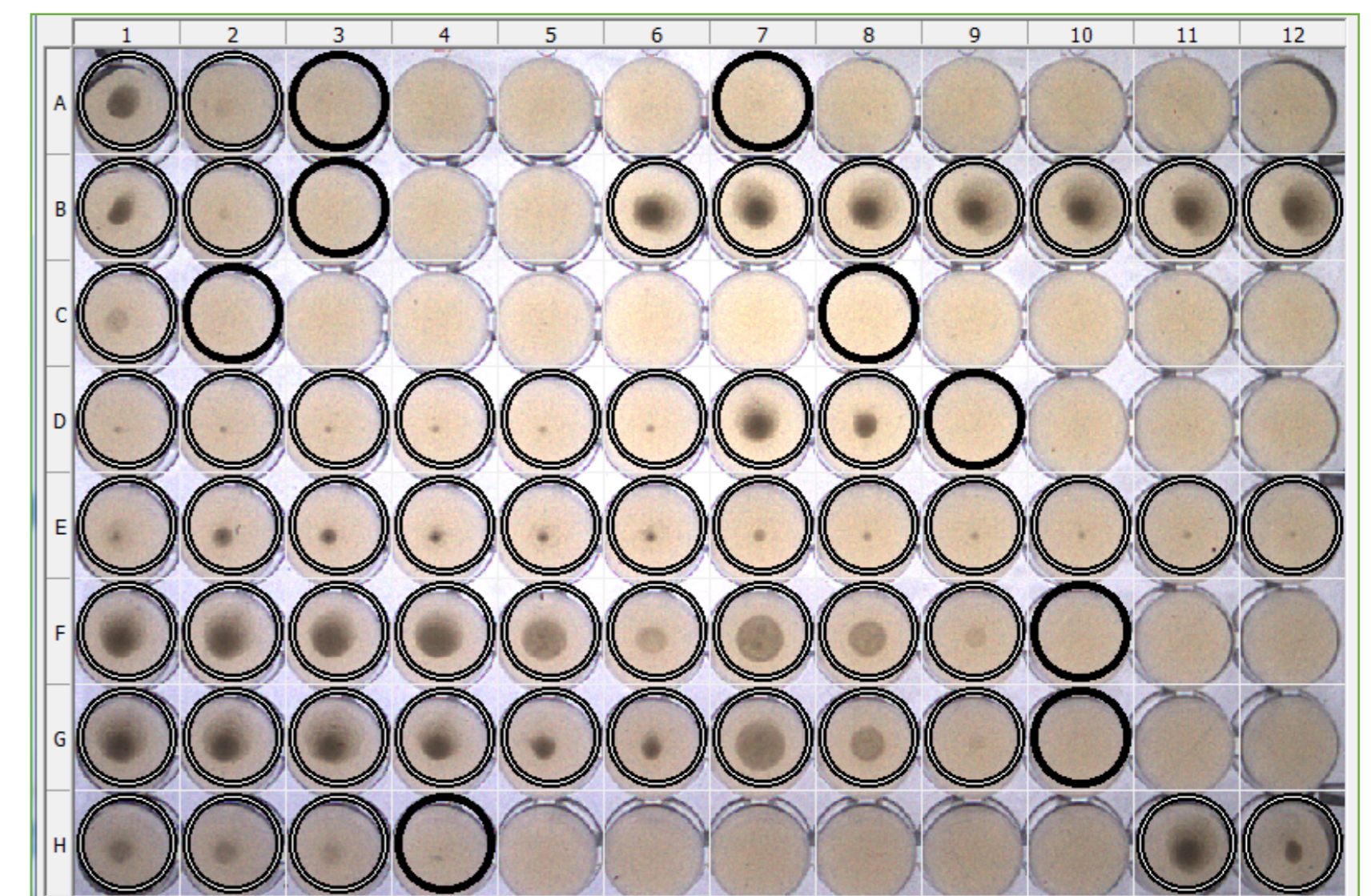
Författare: Emma Axelsson

Handledare: Sofia Somajo, Mikrobiologen Karlskrona

Kurs: Tillämpad laboratoriemetodik III – 2BL005

### SYFTE

Att utvärdera om spektrofotometrisk avläsning vid 620 nm kan ersätta visuell avläsning som är standard vid antibiotikaresistensbestämning med buljongspädningsmetoden.



Figur 1: ANA02-platta med utförd buljongspädning vid visuell avläsning. Bildkälla: Malin Larsson

### BAKGRUND

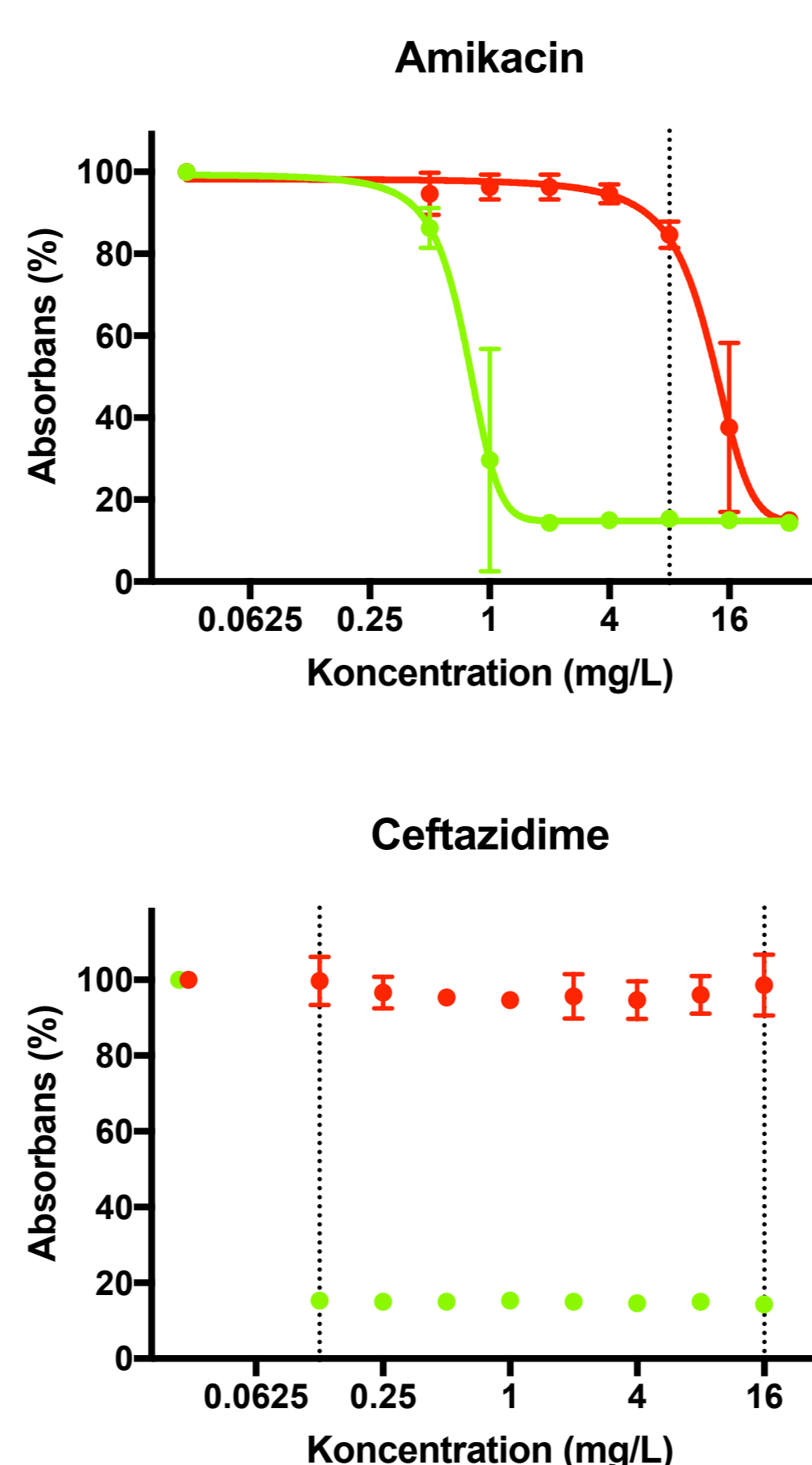
Buljongspädningsmetoden är semi-kvantitativ referensmetod för snabbväxande aeroba bakterier och avläsningen sker visuellt (1). En negativ aspekt med metoden är den subjektiva bedömningen som kräver lång erfarenhet. En möjlig förbättringspotential är att istället genomföra automatiserad avläsning som inte kräver det mänskliga ögat.

### METOD

Dygnsfärska kolonier från tre *Escherichia coli*-stammar och tre *Klebsiella pneumoniae*-stammar suspenderades i respektive 0,85 % NaCl-lösning till en turbiditet av  $0,5 \pm 0,1$  McFarland. Inokulaten tillsattes till Mueller-Hinton-buljong som dispenserades ut i SEMEDL-paneler för utvidgad resistensbestämning av gramnegativa bakterier. Efter aerob inkubering vid 35 °C i 16-20 timmar avlästes grumlighet/pellettförekomst visuellt med Sensititre Vizion. Därefter överfördes homogent brunninnehåll till flatbottnade tomma mikrotiterplattor för spektrofotometrisk avläsning vid 620 nm. Efter icke-linjär kurvanpassning beräknades EC50, avrundades uppåt och jämfördes med MIC-värdena.

### RESULTAT

En sigmoidal funktion noterades hos stammar vars MIC-värde låg innanför panelens räckvidd (figur 2). När MIC-värdet var utanför räckvidden uppmättes relativt konstanta absorbansvärden nära 100 eller 15 % av kontrollbrunnen, vilket inte gav någon information om EC50-värdet (figur 3). Totalt noterades 96 % essentiell överensstämmelse (inom  $\pm 1$  spädningssteg) och 96 % kategorisk överensstämmelse (samma S, I, R-kategori) mellan avläsningsmetoderna.



Figur 2 & 3: Relativ absorbans beroende av antibiotikakoncentrationen. Grön serie är *E. coli* ATCC 35218 (resistent (R)) och röd *K. pneumoniae* CCUG 56233 (känslig (S)). Den streckade linjen beskriver i figur 2 brytpunkten mellan S och R, och panelens räckvidd i figur 3.

Tabell I: Jämförelse mellan EC50, dess tolkning till närmsta MIC avrundat uppåt (EC50(t)), 95 % konfidensintervall samt median-MIC-värdet och sant MIC-intervall för amikacin.

Stam	35218	56233
EC50	0,72 mg/L	12 mg/L
EC50(t)	1 mg/L	16 mg/L
95 % konfidensintervall	0,62 – 0,82 mg/L	10,6 – 16,1 mg/L
Median MIC	1 mg/L	32 mg/L
Sant MIC	0,5 – 2 mg/L	16 – 64 mg/L

### DISKUSSION

Det sanna MIC-värdet anses vara inom  $\pm 1$  spädningssteg, vilket EC50 var i 96 % av fallen. Med spektrofotometrisk avläsning används istället konfidensintervall som noteras vara smalare (tabell I). Arbetets brister är vidden och fler bakteriearter behöver studeras. Dessutom måste ytterligare resistensmekanismer undersökas samt att heltäckande antibiotikaspann krävs.

### SLUTSATS

Spektrofotometrisk avläsning med EC50-beräkning kan vara ett lovande alternativ till visuell avläsning. Försök med ytterligare arter och isolat krävs, samt metodeffektivisering.

1. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24(8):865-70.