วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.1) January – April 2022 บทความวิจัย

การประเมินการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ด้วยวิธี Broth Disk Elution

Evaluation of Broth Disk Elution to Determine Colistin Susceptibility of *Acinetobacter baumannii*

อุรวี อินดา[1], ถวัลย์ ฤกษ์งาม[1] และ เอนก ภู่ทอง[2*]

Auravee Indar[1], Thaval Ruekngam[1] and Anek Pootong[2]

[1]*หลักสูตรเทคนิคการแพทยมหาบัณฑิต คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*

[2]*ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*

[1]*Master's Degree Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University*

[2]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University*

Received : 19 March 2021

Revised : 17 July 2021

Accepted : 4 August 2021

บทคัดย่อ

Acinetobacter baumannii เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคสำคัญของมนุษย์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อโรงพยาบาลและดื้อยาหลายขนาน การทดสอบความไวต่อโคลิสตินมีขั้นตอนการทดสอบที่ซับซ้อน หรือราคาที่สูงของชุดทดสอบสำเร็จรูป การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการทดสอบความไวของยาโคลิสตินต่อ *A. baumannii* ด้วยเทคนิค colistin broth disk elution (CBDE) ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อ *A. baumannii* จำนวน 98 สายพันธุ์ โดยทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี CBDE เปรียบเทียบกับวิธี broth microdilution (BMD) จากนั้น ทำการวิเคราะห์ค่า very major error (VME), major error (ME), categorical agreement (CA), essential agreement (EA), ความจำเพาะและความไวของ CBDE จากการศึกษาพบว่า CBDE มี CA และ EA เท่ากับ 82.7 และ 84.7% โดยมีค่า VME และ ME เท่ากับ 12 (46.2%) และ 5 (6.9%) ตามลำดับ ความไวและความจำเพาะของ CBDE เท่ากับ 53.8 และ 93.1 % ตามลำดับ การทดสอบความไวของยาโคลิสตินด้วยวิธี CBDE ไม่เหมาะสำหรับใช้กับเชื้อ *A. baumannii*

คำสำคัญ : โคลิสติน ; broth disk elution ; *Acinetobacter baumannii*

Abstract

Acinetobacter baumannii is one of the major human pathogen causing nosocomial infections with highly drug-resistant to multiple classes of antibiotics. Antimicrobial susceptibility testing of colistin are more complex and high cost of commercial kit. In this study, we aimed to evaluate the colistin broth disk elution (CBDE) to determine *in vitro* colistin susceptibility against *A. baumannii*. A total of 98 isolates of *A. baumannii* were used in this study. Colistin MICs against *A. baumannii* were determined by CBDE and were compared with broth microdilution method. A very major error (VME), a major error (ME), categorical agreement (CA), essential agreement (EA), specificity, and sensitivity were analyzed. CBDE yield a CA and EA of 82.7 and 84.7%, respectively. Twelve VME (46.2%) and 5 ME (6.9%) were observed. Sensitivity and specificity of CBDE were 53.8 and 93.1%, respectively. CBDE was not suitable to detect colistin susceptibility of *A. baumannii*.

Keywords : colistin ; broth disk elution ; *Acinetobacter baumannii*

***Corresponding author. E-mail** anek.p@allied.tu.ac.th

บทนำ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปกึ่งกลมกึ่งแท่ง (coccobacilli) ที่ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบต่างๆ นอกจากนี้ ปัจจุบันพบอุบัติการณ์การดื้อต่อยาหลายขนานของ *A. baumannii* (multidrug resistant *A. baumannii*; MDRAB) รวมถึง สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ carbapenem (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; CRAB) (Gonzalez-Villoria & Valverde-Garduno, 2016; Higgins *et al*., 2010) ทำให้การรักษามีข้อจำกัดมากยิ่งขึ้น โคลิสตินซึ่งเป็นยารุ่นเก่าในกลุ่ม polymyxin จึงถูกนำกลับมาใช้ ในปัจจุบัน โคลิสตินถือเป็นยาต้านแบคทีเรียที่มีอยู่กลุ่มสุดท้ายที่สามารถใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบที่ดื้อยาหลายขนานได้ อย่างไรก็ตาม การใช้ยาโคลิสตินในการรักษานั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ความเป็นพิษไต (nephrotoxicity) สูง (Nation *et al*., 2017) นอกจากนี้ ยังพบอุบัติการณ์การดื้อต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* (colistin resistance *A. baumannii*; CoRAB) ประมาณ 0.3-5% อีกด้วย (Qureshi *et al*., 2015) ดังนั้น การระบุความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* ก่อนการเลือกใช้ยาจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อช่วยลดความเสี่ยงจากการได้รับยาโคลิสตินโดยไม่จำเป็นของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อโคลิสตินตามแนวทางของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) กำหนดให้ทำการทดสอบค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution (BMD) (CLSI, 2018b) แต่วิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนยุ่งยาก จึงไม่เหมาะกับการทดสอบในงานประจำ สำหรับการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และ gradient diffusion method ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกมักใช้กันนั้นไม่ถูกแนะนำให้ใช้ในการทดสอบความไวต่อโคลิสติน เนื่องจากโมเลกุลของยาโคลิสตินมีขนาดใหญ่ทำให้ยากต่อการแพร่กระจาย (diffusion) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ผลการทดสอบจึงมักคลาดเคลื่อน (Hindler & Humphries, 2013; Matuschek *et al*., 2018; Tan & Ng, 2006) สำหรับ การทดสอบด้วยชุดทดสอบ Broth microdilution ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ แม้ว่าการทดสอบที่ค่อนข้างสอดคล้องกับวิธี BMD ที่เป็นวิธีมาตรฐาน (Hindler & Humphries, 2013; Matuschek *et al*., 2018) แต่วิธีการดังกล่าวมีต้นทุนที่สูงและต้องการเครื่องมือพิเศษ จึงทำให้มีห้องปฏิบัติการที่สามารถทดสอบความไวของเชื้อต่อโคลิสตินได้ในวงจำกัด ดังนั้น วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อโคลิสตินที่มีความสะดวก ความถูกต้องแม่นยำและราคาถูกจึงยังเป็นที่ต้องการในปัจจุบัน

ในปี 2018 Simner และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาค่า MIC ของโคลิสตินอย่างง่ายโดยประยุกต์ใช้วิธี colistin broth disk elution test (CBDE) เพื่อให้เป็นทางเลือกในการทดสอบความไวของยาโคลิสตินที่ห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการได้ การทดสอบดังกล่าวกระทำโดยการแช่แผ่นยาโคลิสติน ขนาด 10 µg จำนวน 0, 1, 2 และ 4 แผ่นในแต่ละหลอดทดลองที่มี cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) ปริมาตร 10 ml เพื่อให้ชะโคลิสตินออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีความเข้มข้นของยาที่ 0, 1, 2 และ 4 µg/ml ตามลำดับ หลังจากเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแล้ว อ่านค่า MIC จากหลอดที่มีความเข้มข้นของโคลิสตินที่น้อยที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่และแปลผลความไวต่อโคลิสตินตามแนวทางของ CLSI โดยเชื้อไวปานกลางต่อโคลิสตินเมื่อมีค่า MIC $\leq$ 2 µg/ml และแปลผลว่า ดื้อต่อโคลิสตินเมื่อมีค่า MIC $\geq$ 4 µg/ml จากการศึกษา พบว่า CBDE มีประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของ *Enterobacteriaceae* และ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* เทียบเท่ากับวิธี BMD มาตรฐาน (Simner *et al*., 2019) อย่างไรก็ตาม ด้วยจำนวนเชื้อ *A. baumannii*

ที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวมีจำนวนจำกัดเพียง 24 สายพันธุ์ จึงไม่สามารถบ่งถึงประสิทธิภาพของวิธีการ CBDE ได้ การประเมินวิธีการโคลิสติน CBDE ใน *A. baumannii* จึงยังมีความจำเป็นก่อนนำวิธีการดังกล่าวไปใช้จริงในห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้จึงทำการประเมินประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* ด้วยวิธี CBDE โดยเปรียบเทียบกับ BMD ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

A. baumanii ที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วยเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย 1) *A. baumanii* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิด เสมหะ ปัสสาวะ เลือดและหนอง ณ โรงพยาบาลหนองคาย จำนวน 68 ตัวอย่าง ในช่วงระหว่าง พฤษภาคม -ธันวาคม พ.ศ. 2563 2) *A. baumannii* เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและถูกส่งมาตรวจยืนยัน ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 98 ตัวอย่าง โดยทำการตรวจจำแนกชนิดด้วยเครื่องอัตโนมัติ Vitek 2 compact (bioMérieux, USA) โดยอ่านผลและแปลผลเพื่อระบุชนิดของเชื้อก็ต่อเมื่อมีค่า % confidence interval (CI) ตั้งแต่ 85% ขึ้นไป และทำการทดสอบความไวของ *A. baumannii* ต่อสารต้านจุลชีพชนิด amikacin, gentamicin, ceftazidime, piperacillin-tazobactam, ciprofloxacin, trimethoprime-sulfamethoxazole, ceftriaxone และ meropenem ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Sensititre™ ARIS™ 2X (Thermo Fisher Scientific Inc, สหรัฐอเมริกา) รายงานผลเป็นค่า MIC ของสารต้านจุลชีพแต่ละชนิด จากนั้นผู้วิจัยทำการแปลผลความไวต่อสารจุลชีพตามเกณฑ์ที่ CLSI กำหนด (CLSI, 2020) ทั้งนี้ รายงานเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (MDR) เมื่อเชื้อดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป

การเตรียมเชื้อตัวอย่าง เชื้อตัวอย่างถูกเพาะบน sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเพาะด้วยกระบวนการดังกล่าวซ้ำอีกครั้ง ก่อนนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบ จากนั้น ทำการเจือจางเชื้อดังกล่าวใน 0.85% Normal saline ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard no. 0.5 จากนั้นนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 600 nm ด้วยเครื่อง nanodrop (Thermo Scientific™, UK) และปรับความขุ่นของเชื้อ โดยต้องมีค่าดูดกลืนแสงระหว่าง 0.08-0.11 ซึ่งได้เชื้อที่ความเข้มข้นประมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml ทั้งนี้ ในการทดสอบด้วย broth microdilution test ต้องนำเชื้อดังกล่าวมาเจือจาง 100 เท่าใน CAMHB เพื่อให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ $1.5x10^6$ CFU/ml และใช้เชื้อที่เตรียมภายใน 15 นาที

การทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสตินด้วย Broth disk elution test

การศึกษานี้ใช้วิธีการทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสตินด้วย Broth disk elution test ตามวิธีของ Simmner และคณะ (Simner *et al*., 2019) โดยใส่แผ่นยาที่มีโคลิสติน ปริมาณ 10 µg (Oxoid®), UK) จำนวน 0, 1, 2, และ 4 แผ่นลงในแต่ละหลอดทดลองที่มี cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) (Thermo Scientific™ , UK) ปริมาตร 10 ml ซึ่งทำให้ได้สารละลายที่มีโคลิสตินที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 2, และ 4 µg/ml ตามลำดับ หลังจาก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ว จึงเติมเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงหรือเชื้อตัวอย่าง *A. baumannii* ที่มีความเข้มข้นประมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml

ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มที่ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา อ่านผลโดยสังเกตความขุ่นซึ่งแสดงถึงการเจริญของเชื้อในแต่ละหลอด และแปลผลการทดสอบตามแนวทางดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แนวทางอ่านและการแปลผลค่า MIC ต่อโคลิสตินด้วยการทดสอบ broth disk elution test (Simner *et al*., 2019)

Media appearance				MIC Result (µg/ml)
Colistin concentration (µg/ml)				
0[a]	1	2	4	
Turbid	Clear	Clear	Clear	≤ 1
Turbid	Turbid	Clear	Clear	2
Turbid	Turbid	Turbid	Clear	4
Turbid	Turbid	Turbid	Turbid	> 4

[a] กรณีหลอดที่มีความเข้มข้นของโคลิสติน เท่ากับ 0 µg/ml ไม่พบการเจริญของเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่ (Clear) นั้นไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid)

การทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสตินด้วย broth microdilution test

ทำการทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสติน ด้วย broth microdilution test ตามวิธีของ CLSI (CLSI, 2018) ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของโคลิสติน ที่ 0.125-32 µg/ml ในการทดสอบ

ผู้วิจัยใช้ colistin sulfate (Sigma-Aldrich, USA) ในการเตรียมสารละลายโคลิสติน โดยเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้ในการทดสอบ ในการทดสอบ ผู้วิจัยเจือจางสารละลายโคลิสตินใน CAMHB (Oxoid®), UK) ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, และ 0.25 µg/ml จากนั้นดูดสารละลายในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96 well untreated-polystyrene plate (Deltalab, Spain) จากนั้น เติมแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ $1.5x10^6$ CFU/ml ปริมาตร 50 µl ลงในหลุมทดสอบที่มีสารละลายโคลิสตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งทำให้ในแต่ละหลุมทดสอบมีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อทดสอบเท่ากับ $5x10^5$ CFU/ml และความเข้มข้นสุดท้ายของยาในหลุมทดสอบ เท่ากับ 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, และ 0.125 µg/ml ทั้งนี้ มีหลุมที่ใส่เฉพาะ CAMHB และใส่ CAMHB พร้อมเชื้อทดสอบเป็นหลุม sterile และ growth control ในการทดสอบ จากนั้น ปิดฝา plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบได้ก็เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อในหลุม sterile control มีลักษณะใสหรือไม่พบการเจริญของเชื้อ ในขณะที่ หลุม growth control ของเชื้อทดสอบนั้น

มีเชื้อเจริญ โดยสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือเชื้อเจริญปรากฏเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมทดสอบ อ่านผลค่า MIC ของโคลิสตินต่อเชื้อทดสอบได้จากหลุมทดสอบที่มีความเข้มข้นของยาโคลิสตินที่น้อยที่สุดที่อาหารเลี้ยงเชื้อยังใสอยู่

การแปลผลความไวต่อโคลิสตินและการควบคุมคุณภาพ

ในแต่ละครั้งของการทดสอบด้วย BMD และ CBDE ผู้วิจัยทำการทดสอบค่า MIC ของโคลิสตินต่อเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strain) ประกอบด้วย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* NCTC 13846 เพื่อทำการควบคุมคุณภาพ โดยผู้วิจัยแปลผลการทดสอบแต่ละครั้ง ก็ต่อเมื่อ ค่า MIC ต่อโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* NCTC 13846, *E. coli* ATCC 25922, และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 อยู่ระหว่าง 4-16, 0.25-2, และ 0.5-4 µg/ml ตามลำดับ ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยทำการแปลผลความไวต่อโคลิสตินของเชื้อทดสอบตามแนวทางของ CLSI โดยที่เชื้อ *A. baumannii* ไวปานกลาง (intermediate) ต่อโคลิสติน เมื่อมีค่า MIC $\leq$ 2 µg/ml ในขณะที่ เชื้อที่มีค่า MIC $\geq$ 4 µg/ml ถือเป็นเชื้อดื้อ (resistant) ต่อโคลิสติน (CLSI, 2020)

การรับรองจริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ชุดที่ 3 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โครงการเลขที่ 074/2562 และจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลหนองคาย โครงการเลขที่ 07/2562

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในปัจจุบัน เกณฑ์การพิจารณาความไวต่อโคลิสตินมีเพียง “ไวปานกลาง” (intermediate) และ “ดื้อ” (resistant) ต่อโคลิสตินเท่านั้น (CLSI, 2020) ดังนั้น ผลการทดสอบที่เป็นไวปานกลาง ถูกวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันกับไวต่อยา (susceptible) ในการคำนวนค่า very major error (VME), major error (ME), essential agreement (EA), categorical agreement (CA), sensitivity, และ specificity โดย ค่า VME คือจำนวนตัวอย่างที่มีผลความไวปลอม (false-susceptible) ขณะที่ ME เป็นตัวอย่างที่มีผลความดื้อปลอม (false-resistant) สำหรับ essential agreement (EA) คือตัวอย่างที่มีค่า MIC ด้วยวิธี CBDE อยู่ในช่วง MIC ± 1 ของวิธี BMD และ categorical agreement (CA) คือ ตัวอย่างที่มีความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธี CBDE เหมือนกันกับวิธี CBDE ทั้งนี้ คำนวนค่าต่างๆ ตามสมการที่แสดงใน ภาพที่ 1

ประสิทธิภาพของ CBDE ในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของ *A. baumannii* อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ก็ต่อเมื่อมีค่า EA และ CA มากกว่า 90 % และมีค่า VME and ME น้อยกว่า 3 % (ISO, 2018)

	CBDE	
BMD	Intermediate	Resistance
Intermediate	True susceptible	False resistance
Resistance	False susceptible	True resistance

%VME = [no. false susceptible / (no. false susceptible+ true resistance)] × 100
%ME = [no. false resistance / (no. false resistance + true susceptible)] × 100
%EA= (no. of isolate with MIC ± 1/ Total isolate tested) ×100
%CA = [(no. true resistance + true susceptible)/ total isolate tested] ×100
Sensitivity = [no. true resistance / (no. false susceptible+ true resistance)] ×100
Specificity = [no. true susceptible / (no. true susceptible + false resistance)] ×100

ภาพที่ 1 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อประเมินประสิทธิภาพของ CBDE

ผลการวิจัย

จากการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อ *A. baumannii* จำนวนทั้งสิ้น 98 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน (MDRAB) คิดเป็น 77.6% (76/98) โดยทั้ง 76 สายพันธุ์พบว่าดื้อต่อยา meropenem ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม carbapenem ด้วยเช่นเดียวกัน จากการทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธี BMD ซึ่งที่เป็นวิธีมาตรฐาน พบเป็นเชื้อที่ไวปานกลางและดื้อต่อโคลิสติน จำนวน 72 (73.5%) และ 26 ตัวอย่าง (26.5%) ตามลำดับ ในขณะที่ การทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธี CBDE พบว่าเป็นเชื้อไวปานกลางต่อยาโคลิสติน จำนวน 79 สายพันธุ์ (80.6%) และดื้อต่อยาโคลิสติน จำนวน 19 สายพันธุ์ (19.4%) เมื่อเปรียบเทียบผล MIC และความไวต่อโคลิสตินที่ได้จากวิธีทั้งสองวิธี พบว่า ผลการทดสอบความไวต่อโคลิสติน ด้วยวิธี CBDE สอดคล้องกับวิธี BMD ในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 81 สายพันธุ์ โดยมีค่า %CA คิดเป็น 82.7% โดยเป็นเชื้อดื้อและไวปานกลางต่อโคลิสติน จำนวน 14 และ 67 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในขณะที่ เชื้ออีก 17 ตัวอย่างมีผลการทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธี CBDE ที่ไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน โดยใน 12 ตัวอย่าง พบเป็นเชื้อดื้อยาด้วยวิธีมาตรฐาน (MIC $\geq$ 4 µg/ml) แต่ด้วยวิธี CBDE พบเป็นเชื้อไวปานกลาง (MIC $\leq$ 2 µg/ml) ซึ่งจัดเป็น very major error (VME) แต่อีก 5 ตัวอย่าง พบว่าไวปานกลางต่อโคลิสตินด้วยวิธี BMD (MIC $\leq$ 2 µg/ml) แต่พบเป็นเชื้อดื้อยาด้วยวิธี CBDE (MIC $\geq$ 4 µg/ml) ซึ่งเป็น major error ดังนั้น วิธี CBDE มีค่า %VME และ %ME เท่ากับ 46.2% (12/26) และ 6.9% (5/72) ตามลำดับ สำหรับความไวและความจำเพาะในการทดสอบของวิธี CBDE นั้นมีค่าเท่ากับ 53.8 และ 93.1% ตามลำดับ ค่า MIC ต่อโคลิสตินจากวิธี CBDE มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง MIC±1 ของวิธี BMD ในเชื้อทดสอบ จำนวน 83 ตัวอย่าง ทำให้ %EA ของ CBDE มีค่าเท่ากับ 84.7% โดยที่เชื้อตัวอย่างที่มีผลการทดสอบเป็น VME และ ME ส่วนใหญ่มีค่า MIC อยู่นอกช่วง MIC±1 ของวิธี BMD (จำนวน 9 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ) (ภาพที่ 2)

ในการทดสอบ BMD และ CBDE ผู้วิจัยทำการทดสอบค่า MIC ของเชื้อมาตรฐานทั้งสามชนิดควบคู่ไปกับการทดสอบในแต่ละครั้งด้วยเสมอ ซึ่งจากการศึกษา พบว่าค่า MIC ของเชื้อมาตรฐาน *E. coli* NTCT 13846, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ด้วยวิธี BMD อยู่ในช่วงระหว่าง 4-8, 0.25-0.5, และ 0.5-2 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่า MIC ที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับตามที่ CLSI กำหนด สำหรับ การทดสอบ CBDE พบว่าส่วนใหญ่ มีค่า MIC ประมาณ 4 - >4, ≤ 1, และ ≤1-2 µg/ml ตามลำดับ

A

Colistin MIC (µg/ml) by CBDE

Colistin MIC (µg/ml) by BMD	≤1	2	4	>4
≤0.25	0	0	0	0
0.5	9	0	0	0
1	28	4	1	2
2	20	6	0	2
4	6	3	4	2
8	0	1	2	0
16	0	1	0	1
32	1	0	0	0
>32	0	0	1	4

B

	CBDE		
BMD	Intermediate	Resistance	*Total*
Intermediate	67	5	*72*
Resistance	12	14	*26*
Total	*79*	*19*	***98***

%EA	84.7
%CA	82.7
%VME	46.2
%ME	6.9
Sensitivity (%)	53.8
Specificity (%)	93.1

ภาพที่ 2 ค่า MIC และประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 98 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CBDE เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน BMD

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการศึกษาวิธีการทดสอบความไวของโคลิสตินในกลุ่มเชื้อ *A. baumannii* เนื่องจากเชื้อ *A. baumannii* พบเป็นเชื้อก่อโรคได้หลายระบบโดยเฉพาะผู้ป่วยวิกฤต และมักพบเป็นเชื้อดื้อต่อยาหลายขนาน ซึ่งทำให้ทางเลือกการใช้ยาในการรักษามีน้อยลง กรอบกับในประเทศไทย โคลิสตินเป็นยาในกลุ่ม polymyxin ที่ได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นยาสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายขนานรวมไปถึง MDR *A. baumannii* (Viehman *et al*., 2014) แต่ด้วยยาดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อร่างกายที่สูง การทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* จึงมีความ

จำเป็น เพื่อเป็นแนวทางในการตัดสินใจในการเลือกใช้ยาและให้การบริหารยาดังกล่าวมีความเหมาะสม ส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยด้วยยาดังกล่าวมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ และลดโอกาสของการเกิดเชื้อดื้อยาดังกล่าวได้

แม้ว่า CLSI กำหนดให้วิธี broth microdilution เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อโคลิสติน อย่างไรก็ตาม การทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธี BMD ไม่นิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไป เนื่องจาก วิธีดังกล่าวมีขั้นตอนการปฏิบัติงานที่ละเอียดซับซ้อนหลายขั้นตอน ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องเป็นผู้มีความชำนาญและฝีมือแม่นยำสูง การเตรียมยาที่ใช้ในการทดสอบให้มีความเข้มข้นถูกต้องจึงกระทำค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากใช้ความเข้มข้นในการทดสอบที่ค่อนข้างต่ำ กรอปกับโคลิสตินมีคุณสมบัติเป็น polypeptide cationic ทำให้จับกับพื้นผิวที่มีประจุเป็นลบได้ดี โดยเฉพาะกับภาชนะพลาสติกที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งส่งทำให้ได้ค่า MIC ที่ไม่ถูกต้องได้ (Karvanen *et al.*, 2017) CLSI จึงกำหนดให้ใช้ microtiter well plate ชนิด untreated polystyrene เพื่อลดปัญหาการดูดซับยาดังกล่าว

วิธี agar dilution เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบความไวยาโคลิสตินที่ง่ายและสะดวกกว่าวิธี BMD แต่มีขั้นตอนที่ต้องใช้เวลาในกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในความเข้มข้นระดับต่างๆ เพิ่มเติม จึงพบปัญหาในเรื่องการเตรียมยาในปริมาณน้อย รวมไปถึงการกระจายตัวของยาที่ไม่สม่ำเสมอ ส่วนวิธีการทดสอบ disk diffusion และ วิธี E-test agar diffusion ปัจจุบัน CLSI และ EUCAST ไม่แนะนำให้ใช้ทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วยวิธีทั้งสาม เนื่องจากสามารถให้ผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนสูงที่เป็นผลมาจากการกระจายตัวของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธี Rapid Polymyxin™ Acinetobacter ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการทดสอบเพียง 2 - 4 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบกับวิธี BMD พบว่า Rapid Polymyxin™ Acinetobacter มี CA ต่ำ (59.8%) แต่ VME สูง (58.8%)(Kon *et al.*, 2020) จึงไม่เหมาะที่จะนำวิธีการนี้มาใช้ในห้องปฏิบัติการ ในปัจจุบัน การใช้เครื่องอัตโนมัติด้วยหลักการ broth microdilution ให้ค่าความถูกต้องแม่นยำสูงใกล้เคียงกับวิธี BMD (Matuschek *et al.*, 2018) แต่เครื่องอัตโนมัตินั้น มีข้อจำกัดที่สำคัญคือต้นทุนสูง ทำให้ห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลที่มีงบประมาณจำกัดไม่สามารถนำมาใช้ในงานประจำวันได้ สำหรับการส่งวิเคราะห์ไปยังห้องปฏิบัติการภายนอกที่สามารถทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสตินด้วยวิธีมาตรฐาน แม้ว่าจะสะดวกแต่ด้วยต้องใช้ระยะเวลาในการรอคอยผลการทดสอบที่ค่อนข้างนาน จึงอาจมีผลต่อการรักษาในผู้ป่วยวิกฤติได้

วิธี CBDE ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อปี ค.ศ.1973 โดยนำมาใช้ทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria ด้วยวิธี Broth macrodilution method โดย CBDE เป็นวิธีที่อาศัยหลักการชะสารต้านจุลชีพจากแผ่นยาสำเร็จรูปออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดแทนการเตรียมสารต้านจุลชีพด้วยการชั่งและละลายสารต้านจุลชีพปริมาตรน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้สูง CBDE ได้ถูกนำไปใช้ในทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อ anaerobic bacteria และพบว่า CBDE มีผลการทดสอบที่สอดคล้องกับวิธี agar dilution ที่เป็นวิธีอ้างอิง ตั้งแต่ 84.5 ถึง 99% (Bianchini *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 1986) ในปี ค.ศ.2018 CBDE ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินในเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ เพื่อให้ง่ายและสะดวกต่อการทดสอบประจำวันในห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล โดยพบว่า CBDE ให้ผลการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ที่สอดคล้องกับวิธี BMD ที่เป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม เชื้อ *A. baumannii* ที่ใช้ในการทดสอบมีเพียง 24 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อดื้อต่อโคลิสตินเพียง

2 สายพันธุ์ (Simner *et al*., 2019) ข้อมูลการศึกษาจึงยังไม่เพียงพอที่จะนำ CBDE ไปใช้ในการทดสอบเชื้อ *A. baumannii* ในห้องปฏิบัติการจริงได้

ผู้วิจัยจึงทำการประเมินประสิทธิภาพการทดสอบความไวต่อโคลิสตินด้วย CBDE ในเชื้อ *A. baumannii* complex จำนวน *98* สายพันธุ์ ซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่ใช้เชื้อ *A. baumannii* complex จำนวนมากในการทดสอบ และเชื้อมีค่า MIC ต่อโคลิสตินกระจายตัวในเกือบทุกความเข้มข้นยาที่ใช้ในการทดสอบ CBDE โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่มีค่า MIC ต่อโคลิสติน ณ จุด breakpoint โดยเชื้อมีค่า MIC เท่ากับ 2 และ 4 µg/ml จำนวน 28 (28.6%) และ 15 สายพันธ์ (15.3%) ตามลำดับ ทั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CAMHB สำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในเชิงพานิชย์ในการทดสอบด้วยวิธี CBDE เนื่องจากผู้วิจัยเห็นว่า การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปสามารถลดขั้นตอนการเตรียมอาหาร จึงสะดวกต่อการใช้งานจริงในห้องปฏิบัติการได้

แม้ว่า ในปัจจุบัน CLSI ได้กำหนดให้ใช้ *E. coli* AR bank no. 0349 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เป็นเชื้อมาตรฐานในการทดสอบคุณภาพการทดสอบ CBDE ตามข้อมูลจากการศึกษาปัจจุบันของ Humphries และคณะ ในปี 2019 (Humphries *et al*., 2019) แต่ด้วย การศึกษานี้ได้ดำเนินการศึกษาก่อนมีข้อกำหนดดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ใช้ *E. coli* NCTC 13846 ตามแนวทางที่กำหนดโดย EUCAST (EUCAST, 2019) รวมกับ *P.aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* ATCC 25922 ในการควบคุมคุณภาพการทดสอบ จากการศึกษา ผู้วิจัยพบว่า ค่า MIC ต่อโคลิสตินของ *E. coli* NCTC 13846 มีค่าประมาณ 4 ถึง $>$ 4 µg/ml สำหรับ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า MIC อยู่ในช่วง $\leq$ 1-2 µg/ml ซึ่งสอดคล้องเกณฑ์ที่กำหนดไว้ที่ (EUCAST, 2019) ในขณะที่ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า MIC ต่อโคลิสติน $\leq$1 µg/ml ซึ่งเป็นค่าที่อยู่นอกช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี CBDE ดังนั้น *E. coli* ATCC 25922 จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเชื้อในการควบคุมคุณภาพสำหรับวิธี CBDE (Humphries *et al*., 2019)

จากการทดสอบค่า MIC ต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 98 ตัวอย่าง ผู้วิจัยพบว่าวิธี CBDE มีผลการทดสอบที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเพียง 82.7% โดยมีความคลาดเคลื่อน เป็น VME และ ME เท่ากับ 12 (46.2%) และ 5 (6.9 %) ซึ่งค่าที่สูงกว่าที่ ISO 20776-2:2007 กำหนดไว้ที่ 3% ผลการทดลองนี้เน้นย้ำรายงานการศึกษาปัจจุบันของ Humphries และคณะ (Humphries *et al*., 2019) ที่พบว่า วิธี CBDE มีประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *Enterbacterales* และ *P. aeruginosa* ได้ไม่แตกต่างต่างจากวิธีมาตรฐาน แต่วิธีดังกล่าวนี้ไม่ควรนำไปใช้ในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินในเชื้อ *Acinetobacter* spp. เนื่องจากมีผลการทดสอบที่คลาดเคลื่อน โดยมีค่า VME (5.5%) และ ME (3.3%) สูงกว่าที่ ISO 20776-2:2007 กำหนด นอกจากวิธี CBDE แล้ว ยังพบว่า colistin agar test ที่อาศัยหลักการ agar dilution technique ก็ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ความไวต่อโคลิสตินในเชื้อ *Acinetobacter* spp. ด้วยเช่นเดียวกัน ดังนั้น ในปัจจุบันวิธี BMD อาจเป็นวิธีการเดียวที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของ *Acinetobacter* spp. อย่างไรก็ตาม การทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *A. baumannii* ด้วย BMD พบว่ามีความน่าเชื่อถือที่ต่ำ (82.3%) เมื่อเปรียบกับการทดสอบกับเชื้อกลุ่ม *Enterbacterales* (97.5%) ทั้งนี้ แม้ยังไม่ทราบถึงสาเหตุที่แน่ชัด แต่คาดการณ์ว่าคุณสมบัติบางประการของเชื้อ *Acinetobacter* อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการ

ทดสอบความไวต่อโคลิสตินได้ เนื่องจากเชื้อ *Acinetobacter* spp. มีแนวโน้มสูญเสียการคุณสมบัติการดื้อยาดังกล่าวได้โดย พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์มีค่า MIC ต่อโคลิสตินต่ำลง หลังเก็บรักษาเชื้อไว้ระยะเวลาหนึ่งหรือในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำหลายครั้ง (Hindler & Humphries, 2013) หรืออาจเกิดจากการพัฒนาการดื้อยาในบางกลุ่มเซลล์ของเชื้อที่ไวต่อโคลิสติน เรียกว่าลักษณะการดื้อยาเช่นนี้ว่า heteroresistance ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อ *Acinetobacter* spp. โดยเฉพาะ *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาด้วยยาโคลิสตินมาก่อน ที่สามารถพบ heteroresistance subpopulation ได้สูงถึง 98% (Hawley *et al*., 2008)

ข้อจำกัดในการศึกษานี้ประกอบด้วย ความเข้มข้นของโคลิสตินใน CAMHB ที่ถูกชะจากแผ่นยานั้น เป็นเพียงการคาดการณ์จากจำนวนแผ่นยาที่ใช้และปริมาณโคลิสตินที่อยู่ในแต่และแผ่นยาเท่านั้น ผู้วิจัยไม่ได้ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโคลิสตินในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง นอกจากนี้ ยังไม่พบรายงานการศึกษาปริมาณของโคลิสตินที่ถูกชะออกมาใน CAMHB จึงทำให้ยังไม่ทราบความเข้มข้นของโคลิสตินใช้ในการทดสอบด้วยวิธี CBDE ที่แน่ชัด ซึ่งข้อจำกัดนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดสอบด้วย CBDE ได้ จึงควรมีการศึกษาความเข้มข้นของโคลิสตินที่ได้จากการชะออกมาจากแผ่นยาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่า วิธี CBDE ไม่เหมาะที่จะนำไปทดสอบความไวต่อโคลิสตินในเชื้อ *A. baumannii* เนื่องจาก มีความคาดเคลื่อนสูง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้ป่วยเนื่องจากผลไวยาปลอม ในขณะที่ ผลดื้อยาปลอมก็ส่งผลให้ผู้ป่วยพลาดโอกาสในการรักษาด้วยยาที่เหมาะสมที่เป็นทางเลือกตัวสุดท้ายได้ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน ยังไม่มีการทดสอบความไวต่อโคลิสตินของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มีง่าย สะดวก ถูกต้องและแม่นยำ การศึกษาเพื่อพัฒนาปรับปรุงวิธีการทดสอบความไวต่อโคลิสตินสำหรับเชื้อ *Acinetobacter* spp.โดยเฉพาะ *A. baumanii* ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นหรือการคิดค้นวิธีการทดสอบรูปแบบใหม่จึงยังคงมีความสำคัญอยู่

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โรงพยาบาลหนองคายและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขที่เอื้อเฟื้อเชื้อตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยประเภททุนวิจัยทั่วไป สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2562 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Bianchini, H., Canigia, L. F., Predari, S. C., Rollet, R., Litterio, M., Berestein, P., *et al*. (1997). Broth disk elution method for anaerobic bacteria: a collaborative study to assess its reliability for clinical purposes. *Anaerobe, 3*(4), 225-231. doi:10.1006/anae.1997.0110

CLSI. (2018). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (10th ed.). Wayne,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. (2020). *Performance standard for Antimicrobrail Susceptibility testing* (30th ed.). Wayne,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

EUCAST. (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019. Retrieved from https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf

Gonzalez-Villoria, A. M., & Valverde-Garduno, V. (2016). Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. *J Pathog, 2016*, 7318075. doi:10.1155/2016/7318075

Hawley, J. S., Murray, C. K., & Jorgensen, J. H. (2008). Colistin heteroresistance in acinetobacter and its association with previous colistin therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 52*(1), 351-352. doi:10.1128/AAC.00766-07

Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., & Seifert, H. (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother, 65*(2), 233-238. doi:10.1093/jac/dkp428

Hindler, J. A., & Humphries, R. M. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol, 51*(6), 1678-1684. doi:10.1128/jcm.03385-12

Humphries, R. M., Green, D. A., Schuetz, A. N., Bergman, Y., Lewis, S., Yee, R., *et al.* (2019). Multi-center evaluation of colistin broth disk elution and colistin agar test: a report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. . *J Clin Microbiol, 57*(11). doi:10.1128/jcm.01269-19

ISO. (2018). ISO 20776-2:2007, Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Retrieved from https://www.iso.org/standard/41631.html.

Jorgensen, J. H., Redding, J. S., & Howell, A. W. (1986). Evaluation of broth disk elution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria with the newer beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol, 23*(3), 545-550. doi:10.1128/jcm.23.3.545-550.1986

Karvanen, M., Malmberg, C., Lagerbäck, P., Friberg, L. E., & Cars, O. (2017). Colistin Is extensively lost during standard *in vitro* experimental conditions. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 61*(11). doi:10.1128/aac.00857-17

Kon, H., Abramov, S., Amar Ben Dalak, M., Elmaliach, N., Schwartz, D., Carmeli, Y.*, et al.* (2020). Performance of Rapid Polymyxin™ NP and Rapid Polymyxin™ *Acinetobacter* for the detection of polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother, 75*(6), 1484-1490. doi:10.1093/jac/dkaa050

Matuschek, E., Åhman, J., Webster, C., & Kahlmeter, G. (2018). 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. *Clin Microbiol Infect, 24*(8), 865-870. doi:10.1016/j.cmi.2017.11.020

Nation, R. L., Garonzik, S. M., Thamlikitkul, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Forrest, A., Paterson, D. L.*, et al.* (2017). Dosing guidance for intravenous colistin in critically-ill patients. *Clin Infect Dis, 64*(5), 565-571. doi:10.1093/cid/ciw839

Qureshi, Z. A., Hittle, L. E., O'Hara, J. A., Rivera, J. I., Syed, A., Shields, R. K.*, et al.* (2015). Colistin-resistant *Acinetobacter baumanni*i: beyond carbapenem resistance. *Clin Infect Dis, 60*(9), 1295-1303. doi:10.1093/cid/civ048

Simner, P. J., Bergman, Y., Trejo, M., Roberts, A. A., Marayan, R., Tekle, T., *et al.* (2019). Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin *in vitro* activity against Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol, 57*(2). doi:10.1128/jcm.01163-18

Tan, T. Y., & Ng, L. S. (2006). Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother, 58*(4), 864-867. doi:10.1093/jac/dkl330

Viehman, J. A., Nguyen, M. H., & Doi, Y. (2014). Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs, 74*(12), 1315-1333. doi:10.1007/s40265-014-0267-8