

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20256729

· 论 著 ·

## 多黏菌素 B 联合新型 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对耐多黏菌素 B 细菌生物膜的影响

田森梅<sup>1,3</sup>, 郭思维<sup>1,2,3</sup>, 颜冰倩<sup>1,3</sup>, 蒋蓉<sup>1,2,3</sup>, 徐兵<sup>1,2,3</sup>, 李昕<sup>1,2,3</sup>

(1. 长沙市第三医院药学部, 湖南长沙 410015; 2. 长沙抗菌药物临床研究所, 湖南长沙 410015; 3. 抗耐药微生物药物湖南省重点实验室, 湖南长沙 410015)

**[摘要]** **目的** 探讨多黏菌素 B 联合新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对耐多黏菌素 B 铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌生物膜的活性及机制。**方法** 采用微量肉汤稀释法和卡尔加里生物膜装置测定所有抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)、最低生物膜抑制浓度(MBIC)和最低生物膜根除浓度(MBEC);采用结晶紫染色法评估亚 MIC 剂量下多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦、头孢他啶/阿维巴坦、美罗培南/阿维巴坦、氨曲南/阿维巴坦、美罗培南/法硼巴坦及亚胺培南/雷利巴坦抑制生物膜形成和根除成熟生物膜的效果;筛选出抗生物膜活性最佳的联合方案,采用硫酸苯酚法、细菌运动试验以及群体感应抑制试验初步探讨该联合方案的抗生物膜机制。**结果** 所有抗菌药物的 MBIC 和 MBEC 均高于 MIC,基于多黏菌素 B 的联合方案均能抑制铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌生物膜形成并根除成熟的生物膜,其中多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦抑制率和根除率最高,分别为 67.99%~90.16%、58.26%~63.86%。多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦可抑制肺炎克雷伯菌的胞外多糖,抑制率为 34.04%~61.10%,该组合还能减小细菌的泳动和蹭行运动直径。头孢吡肟/阿维巴坦单药对群体感应信号分子的抑制作用呈浓度依赖性,与多黏菌素 B 联合后,抑制作用与单药效果一致。**结论** 多黏菌素 B 和头孢吡肟/阿维巴坦可能是临床治疗多黏菌素 B 耐药菌株生物膜相关严重感染的潜在方案,其作用机制可能与抑制细菌胞外多糖和运动能力有关。

**[关键词]** 生物膜;铜绿假单胞菌;肺炎克雷伯菌;耐多黏菌素 B;新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R378

## Effect of polymyxin B combined with novel $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations on biofilms of polymyxin B-resistant bacteria

TIAN Miaomei<sup>1,3</sup>, GUO Siwei<sup>1,2,3</sup>, YAN Bingqian<sup>1,3</sup>, JIANG Rong<sup>1,2,3</sup>, XU Bing<sup>1,2,3</sup>, LI Xin<sup>1,2,3</sup> (1. Department of Pharmacy, The Third Hospital of Changsha, Changsha 410015, China; 2. Changsha Institute of Clinical Application of Antimicrobial agents, Changsha 410015, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Anti-Resistance Microbial Drugs, Changsha 410015, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the activity and mechanism of polymyxin B combined with novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations on biofilm of polymyxin B-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) of all antimicrobial agents were determined by micro-broth dilution method and MBEC<sup>TM</sup> assay. The crystal violet staining method was adopted to evaluate the effect of polymyxin B combined with cefepime/avibactam, ceftazidime/avibactam, meropenem/avibactam, aztreonam/avibactam,

**[收稿日期]** 2024-09-09

**[基金项目]** 抗耐药微生物药物湖南省重点实验室基金项目(2023TP1013)

**[作者简介]** 田森梅(2000-),女(汉族),湖南省常德市人,初级药师,主要从事抗感染药物临床药理学研究。

**[通信作者]** 李昕 E-mail: xin-li@cssdsyy.com

meropenem/vaborbactam, and imipenem/relebactam at sub-MIC doses on inhibition of biofilm formation and eradication of mature biofilm. The best combination scheme for anti-biofilm activity was screened out, and anti-biofilm mechanism of this combination scheme was preliminarily explored with phenol-sulfuric acid method, bacterial motility test, and quorum sensing inhibition test. **Results** The MBIC and MBEC of all antimicrobial agents were higher than MIC. The combination regimen based on polymyxin B could inhibit the formation of biofilms and eradicate mature biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The combination of polymyxin B with cefepime/avibactam had the highest inhibition and eradication rates, ranging 67.99% - 90.16% and 58.26% - 63.86%, respectively. The combination of polymyxin B and cefepime/avibactam could inhibit the extracellular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae*, with inhibition rates of 34.04% - 61.10%, this combination could also reduce the swimming and twitching motility diameters of bacteria. Cefepime/avibactam monotherapy on quorum sensing signaling molecules presented concentration dependent inhibitory effect, and when combined with polymyxin B, the inhibitory effect was consistent with that of monotherapy. **Conclusion** Polymyxin B and cefepime/avibactam may be potential scheme for clinical treatment for severe biofilm-associated infection caused by polymyxin B-resistant strains, and their mechanisms may be related to the inhibition of bacterial extracellular polysaccharides and motility. **[Key words]** biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; polymyxin B; novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations

由于临床上抗微生物药物的广泛使用甚至滥用,治疗多重耐药细菌感染性疾病已成为重大挑战。尽管多黏菌素 B 作为治疗多重耐药革兰阴性杆菌的最后一道防线,但近年来,耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌对多黏菌素 B 耐药并不少见,耐药率为 4%~40%<sup>[1-2]</sup>。铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌是引起医院内感染常见的革兰阴性杆菌,可导致呼吸道、泌尿道或血流感染,而生物膜的形成是铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌的重要毒力特征<sup>[3-4]</sup>。生物膜是细菌黏附在生命体或非生命体表面形成的结构化群落,对抗微生物药物高度耐药,对宿主的免疫系统也具有高度抗性,其耐药机制有多种,如胞外聚合物基质限制了药物的渗透,群体感应系统的调节,以及生物膜内细菌的低代谢低活性等。相关研究<sup>[5-6]</sup>表明,65%~80%的细菌感染都与生物膜相关,其病死率高、治愈率低。因此,寻找新的对抗耐多黏菌素 B 菌株生物膜相关感染的有效策略极为重要。

既往研究<sup>[7]</sup>表明,对于多黏菌素 B 敏感的鲍曼不动杆菌,多黏菌素 B 可减少其生物膜形成。有研究<sup>[8]</sup>显示,多黏菌素 B 联合美罗培南可显著减少多黏菌素 B 耐药的铜绿假单胞菌生物膜的形成。本课题组前期研究<sup>[9]</sup>证实,多黏菌素 B 联合新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对多黏菌素 B 耐药的铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌有明显的协同杀菌作用,但对于这两种细菌产生的生物膜是否也具有同样的协同作用目前尚未见报道。本研究旨在探讨多黏菌素 B 联合新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对多黏菌素 B 耐药的铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌生物膜的影

响,并初步探讨有效组合的作用机制,以期为临床治疗生物膜相关感染提供合理的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 菌株来源于课题组保存的综合性三级甲等医院临床分离的非重复多黏菌素 B 耐药菌株(铜绿假单胞菌 4 株,肺炎克雷伯菌 10 株)。铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 作为质控菌株。紫色色杆菌 CV026 由 Selleck 公司提供。

1.1.2 主要试剂和仪器 多黏菌素 B 对照品(批号:130313 - 201310)、头孢他啶对照品(批号:130484 - 201205)、头孢吡肟对照品(批号:130524 - 201404)、美罗培南对照品(批号:130506 - 201403)、氨曲南对照品(批号:130507 - 201303)均购自中国食品药品检定研究院;阿维巴坦对照品(批号:1192491 - 61 - 4,南京力博维制药有限公司),亚胺培南对照品(批号:22Z092 - B1,上海甄准生物科技有限公司),雷利巴坦对照品(批号:C20J11L118468,上海源叶生物科技有限公司),法硼巴坦对照品(批号:61241,MCE 公司)。群体感应信号分子 C6-HSL 标准品(N-己酰基-L-高丝氨酸内酯,西格玛奥德里奇贸易有限公司),胰蛋白胍大豆肉汤(TSB,北京索莱宝科技有限公司),0.1%结晶紫染液(厦门安永博科技有限公司),5%苯酚水溶液(瑞楚生物科技有限公司),M-H 琼脂、胰蛋白胍及

酵母提取物(OXOID 公司),酶标仪(瑞士 Tecan 公司),卡尔加里生物膜装置(加拿大 Innovotech 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 菌株生物膜形成能力筛选 试验菌株复苏传代后,采用 0.9% 的无菌生理盐水调成 0.5 麦氏单位的菌悬液,使用无菌胰蛋白胨大豆肉汤按 1:100 稀释,取 200  $\mu\text{L}$  稀释后的菌液加入 96 孔板中,每株菌平行接种 3 孔,不含细菌的空白肉汤培养基作为阴性对照,96 孔板放入培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h。结晶紫染色后使用酶标仪测量 OD<sub>595</sub> 值,将试验菌株分为下列类别:无生物膜形成菌(试验组 OD<sub>595</sub>  $\leq$  对照组 OD<sub>595</sub>),弱生物膜形成菌(对照组 OD<sub>595</sub>  $<$  试验组 OD<sub>595</sub>  $\leq 2 \times$  对照组 OD<sub>595</sub>),中等生物膜形成菌( $2 \times$  对照组 OD<sub>595</sub>  $<$  试验组 OD<sub>595</sub>  $\leq 4 \times$  对照组 OD<sub>595</sub>),强生物膜形成菌( $4 \times$  对照组 OD<sub>595</sub>  $<$  试验组 OD<sub>595</sub>)。筛选强生物膜形成菌株作为后续试验菌株。

1.2.2 抗菌药物敏感性试验 采用微量肉汤稀释法测定多黏菌素 B、头孢吡肟/阿维巴坦、头孢他啶/阿维巴坦、美罗培南/阿维巴坦、氨曲南/阿维巴坦、美罗培南/法硼巴坦以及亚胺培南/雷利巴坦对试验菌株的最低抑菌浓度(MIC)。使用卡尔加里生物膜装置测定所有抗菌药物对生物膜的最低生物膜抑制浓度(MBIC)和最低生物膜根除浓度(MBEC)<sup>[10]</sup>。

1.2.3 多黏菌素 B 与新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单药或联合对生物膜形成的抑制作用 试验菌株复苏传代,采用 0.9% 的无菌生理盐水调成 0.5 麦氏单位的菌悬液,使用无菌肉汤按 1:100 稀释,加入微量 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。新鲜配制无菌的多黏菌素 B、头孢吡肟/阿维巴坦(4:1)、头孢他啶/阿维巴坦(4:1)、美罗培南/阿维巴坦(4:1)、氨曲南/阿维巴坦(3:1)、美罗培南/法硼巴坦(1:1)及亚胺培南/雷利巴坦(2:1)的肉汤稀释液,取 100  $\mu\text{L}$  添加至含菌的 96 孔板中,使孔内各药物终浓度为 1/4 MIC。对于每株试验菌株,给药方案分为空白对照组、多黏菌素 B 单药组、新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单药组及两者联合组。将配制好的含药 96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 18~22 h,结晶紫染色并用酶标仪测量 OD<sub>595</sub> 值。生物膜形成抑制率 = (对照组 OD<sub>595</sub> - 试验组 OD<sub>595</sub>) / 对照组 OD<sub>595</sub>  $\times 100\%$ 。

1.2.4 多黏菌素 B 与新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单药或联合对成熟生物膜的根除作用 试验菌株复苏传代,采用 0.9% 的无菌生理盐水调成 0.5

麦氏单位的菌悬液,使用无菌 TSB 按 1:100 稀释,取 200  $\mu\text{L}$  加入微量 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h 形成成熟生物膜。弃掉培养基,采用无菌注射用水冲洗孔 3 次,每孔加入总体积 200  $\mu\text{L}$  的抗菌药物肉汤稀释液,孔内药物终浓度为 1/2 MIC。对于每株试验菌株,试验方案分为空白对照组、多黏菌素 B 单药组、新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单药组以及多黏菌素 B 与新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂联合组。将加入药物的 96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$  继续培养 18~22 h,结晶紫染色并用酶标仪测量 OD<sub>595</sub> 值。成熟生物膜根除率 = (对照组 OD<sub>595</sub> - 试验组 OD<sub>595</sub>) / 对照组 OD<sub>595</sub>  $\times 100\%$ 。

1.2.5 多黏菌素 B 与头孢吡肟/阿维巴坦单药或联合对细菌胞外多糖的影响 选择生物膜抑制和根除效果最好的组合进行研究。试验菌株复苏传代,采用 0.9% 的无菌生理盐水将试验菌株调成 0.5 麦氏单位的菌悬液,取 330  $\mu\text{L}$  加入配制好的含药离心管中,放入恒温震荡培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h。将每株菌分为 4 组:空白对照组、多黏菌素 B 单药组、头孢吡肟/阿维巴坦单药组、多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦组。将上述培养的菌悬液在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下离心,取上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤器过滤,随后加入三倍体积的无水乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$  静置过夜。再次离心,弃除上清液,加入无菌蒸馏水溶解沉淀。采用硫酸苯酚法测定多糖溶液含量,在 490 nm 处测定其吸光度值<sup>[11]</sup>。胞外多糖含量抑制率 = (对照组 OD<sub>490</sub> - 试验组 OD<sub>490</sub>) / 对照组 OD<sub>490</sub>  $\times 100\%$ 。

1.2.6 多黏菌素 B 与头孢吡肟/阿维巴坦单药或联合对细菌运动的影响 选择生物膜抑制和根除效果最好的组合进行研究。依据参考文献<sup>[12]</sup>配制泳动平板和蹭行平板放于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。试验菌株传代复苏后,采用 0.9% 的无菌生理盐水调成 0.5 麦氏单位的菌悬液,用无菌 TSB 以 1:100 稀释至含不同药物稀释液的离心管中,分为空白对照组、多黏菌素 B 单药组、头孢吡肟/阿维巴坦单药组、多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦组。在生化培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 18~22 h。对于泳动试验,取 1  $\mu\text{L}$  菌液接种于泳动平板的表面,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,记录细菌的生长圈直径。对于蹭行试验,取 1  $\mu\text{L}$  菌液接种至培养基与培养皿结合处,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,记录细菌运动直径。细菌运动抑制率 = (对照组直径 - 试验组直径) / 对照组直径  $\times 100\%$ 。

1.2.7 多黏菌素 B 与头孢吡肟/阿维巴坦单药或联合对群体感应的影响 将 CV026 复苏传代,在 LB 液体培养基中震荡培养过夜。取 500  $\mu\text{L}$  的 1 mg/mL 的信号分子标准品至 10 mL 的菌液中,混匀。按照菌液:LB 培养基为 1:19 的比例,加入尚未凝固的无菌 LB 固体培养基,混匀后倒入无菌空白平板,至凝固。将平板放入 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 1 h。取出打孔,孔内加入总体积为 50  $\mu\text{L}$  的不同浓度的药物,放入培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,记录孔周围抑制圈直径的大小。

1.2.8 统计分析 所有试验重复 3 次后应用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行分析绘图。采用单因素方差分析比较两组间抗生物膜活性差异,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 菌株生物膜形成能力 本研究中对照组  $\text{OD}_{595} = 0.101$ ,其中 3 株铜绿假单胞菌(P001、P002 和 P003)和 5 株肺炎克雷伯菌(K001、K002、K003、K004 和 K005)的  $\text{OD}_{595}$  值为 0.647~1.230,均  $> 4 \times$  对照组  $\text{OD}_{595}$ ,为强生物膜形成菌株,故作为后续研究的试验菌株。见图 1。

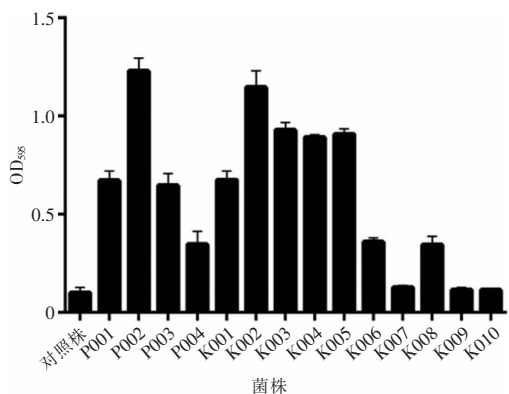


图 1 多黏菌素 B 耐药菌株形成生物膜的能力

Figure 1 Biofilm forming ability of polymyxin B-resistant strains

2.2 抗菌药物敏感性试验 结果显示,所有菌株均对多黏菌素 B 耐药,MIC 为 4~128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。多黏菌素 B 和新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对生物膜的 MBIC 均是 MIC 的 4~1 024 倍,除了美罗培南/法硼巴坦以外,其他抗菌药物的 MBEC 均  $> 1 024 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。见表 1。

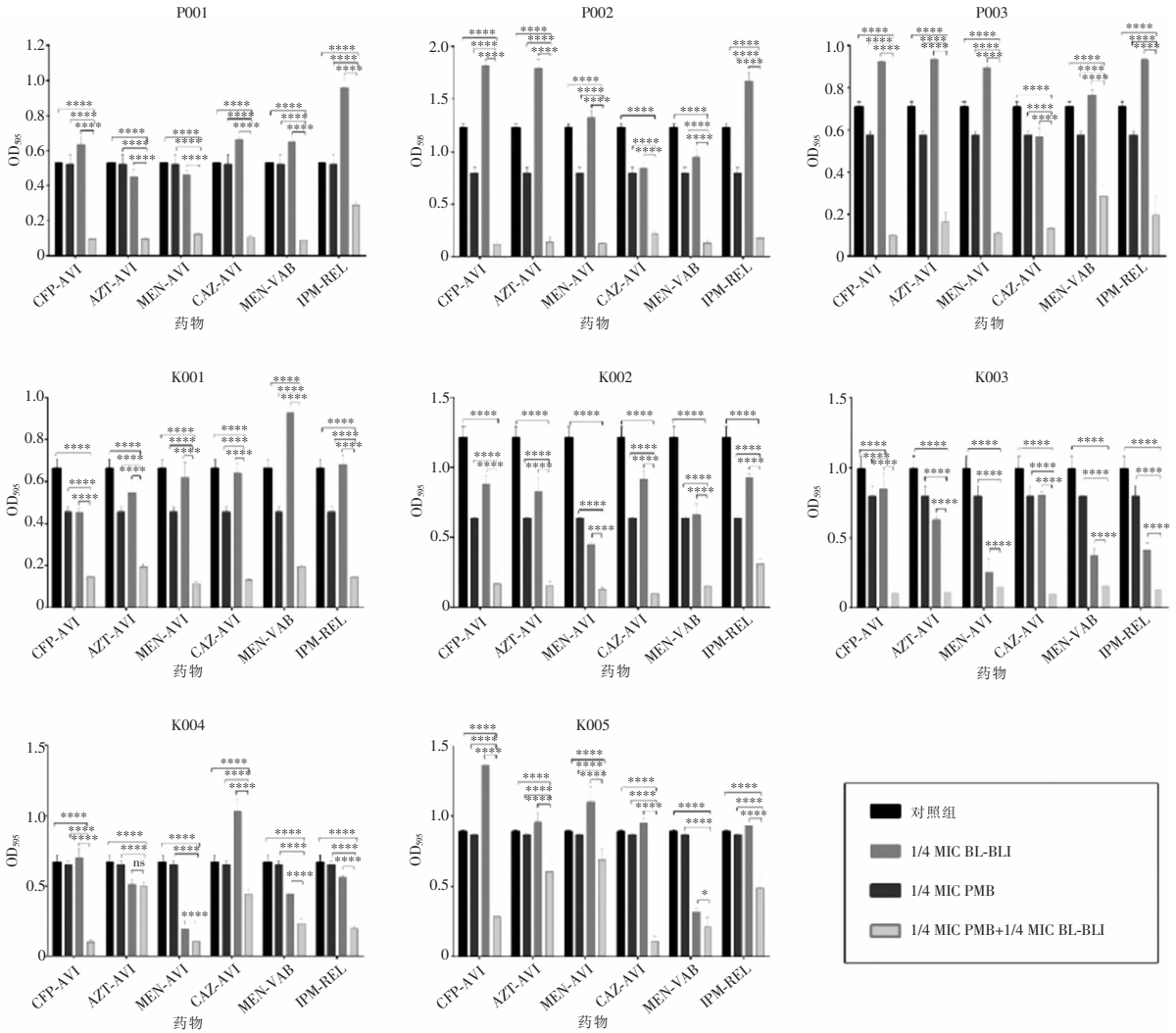
表 1 多黏菌素 B 和新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对生物膜的 MIC、MBIC、MBEC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Table 1 MIC, MBIC and MBEC of polymyxin B and novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

抗菌药物	MIC	MBIC	MBEC
头孢他啶/阿维巴坦	2~16	128~1 024	$> 1 024$
头孢吡肟/阿维巴坦	2~32	64~1 024	$> 1 024$
氨曲南/阿维巴坦	2~32	128~1 024	$> 1 024$
亚胺培南/雷利巴坦	1~8	8~1 024	$> 1 024$
美罗培南/阿维巴坦	4~16	16~1 024	$> 1 024$
美罗培南/法硼巴坦	4~16	16~128	256
多黏菌素 B	4~128	32~ $> 1 024$	$> 1 024$

2.3 多黏菌素 B 和新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单独及联合使用对生物膜形成的抑制作用 亚 MIC 剂量下单药多黏菌素 B 及单药新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对 8 株耐多黏菌素 B 菌株的生物膜形成的抑制作用微弱。与对照组和单药组相比,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦、头孢他啶/阿维巴坦、美罗培南/阿维巴坦、亚胺培南/雷利巴坦及美罗培南/法硼巴坦可以降低所有试验菌株  $\text{OD}_{595}$  的值(均  $P < 0.05$ );多黏菌素 B 联合氨曲南/阿维巴坦可以降低 7 株(87.50%)试验菌株的  $\text{OD}_{595}$  值(均  $P < 0.05$ )。其中,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦对生物膜形成的抑制率高达 67.99%~90.16%。见图 2。

2.4 多黏菌素 B 和新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂单独及联合使用对成熟生物膜的根除作用 与对照组和单药组相比,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦( $n = 8, 100\%$ )、头孢他啶/阿维巴坦( $n = 7, 87.50\%$ )、美罗培南/阿维巴坦( $n = 8, 100\%$ )、氨曲南/阿维巴坦( $n = 6, 75.00\%$ )、亚胺培南/雷利巴坦( $n = 5, 62.50\%$ )及美罗培南/法硼巴坦( $n = 4, 50.00\%$ )可降低成熟生物膜的  $\text{OD}_{595}$  值,差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),见图 3。亚 MIC 剂量下单药多黏菌素 B 对 8 株耐多黏菌素 B 菌株生物膜的根除率为 0.90%~47.79%,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦、头孢他啶/阿维巴坦、氨曲南/阿维巴坦、美罗培南/阿维巴坦、亚胺培南/雷利巴坦、美罗培南/法硼巴坦对成熟生物膜的根除率可分别提高至 58.26%~63.86%、21.96%~68.05%、22.36%~61.39%、37.21%~61.90%、3.45%~60.80%、1.95%~58.02%。



注:PMB为多黏菌素 B,CAZ为头孢他啶,CFP为头孢吡肟,AVI为阿维巴坦,MEN为美罗培南,AZT为氨曲南,VAB为法硼巴坦,IPM为亚胺培南,REL为雷利巴坦,BL-BLI为β-内酰胺酶抑制剂复方制剂; \*表示  $P < 0.05$ , \*\*\*\*表示  $P < 0.0001$ , ns表示差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

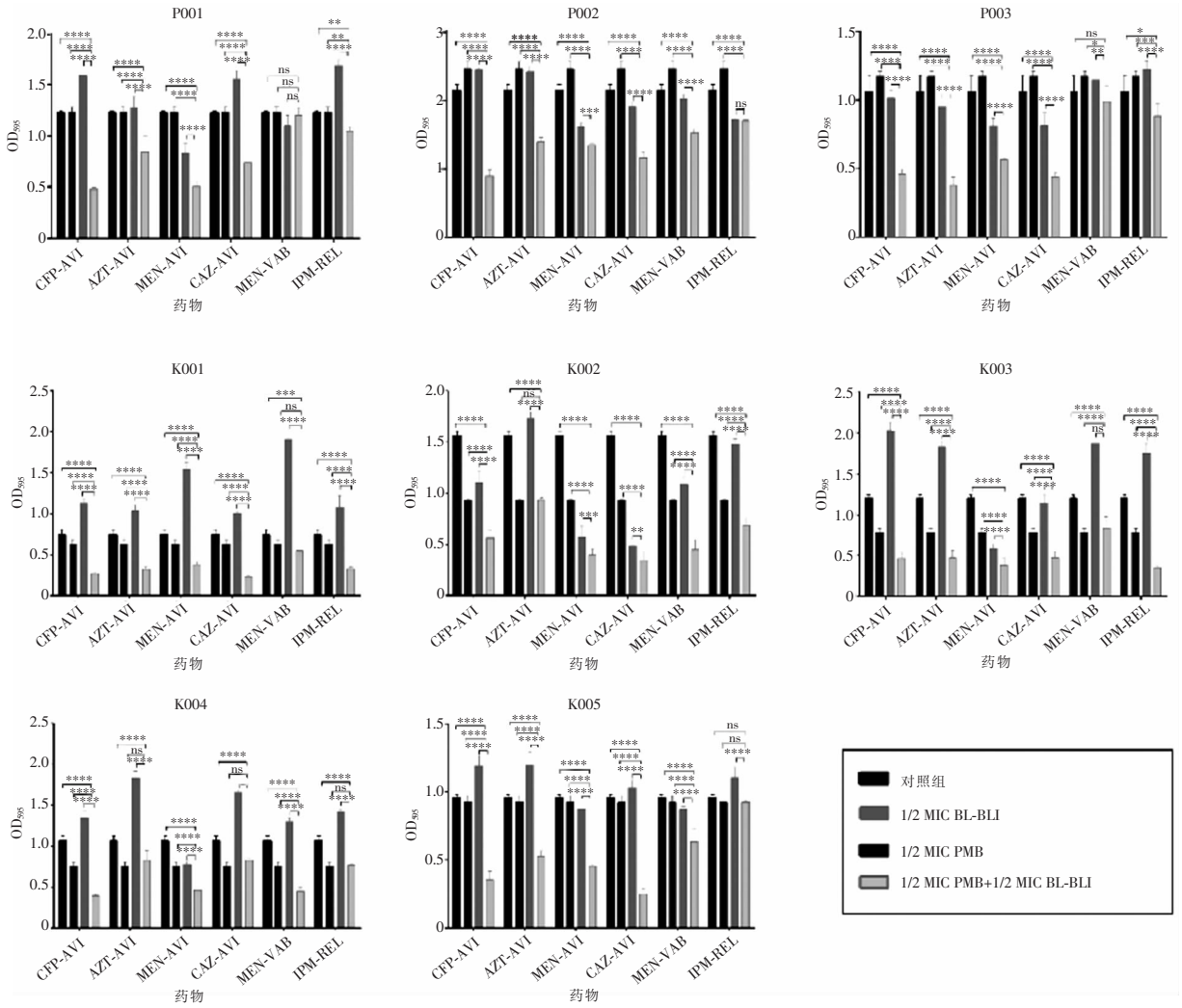
图 2 多黏菌素 B 联合新型 β-内酰胺酶抑制剂复方制剂对生物膜形成的抑制作用

Figure 2 Effect of polymyxin B combined with novel β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations on inhibition of biofilm formation

2.5 多黏菌素 B 和头孢吡肟/阿维巴坦单用及联合对胞外多糖含量的影响 多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦后,所有菌株的  $OD_{490}$  值与对照组相比均有所下降,对铜绿假单胞菌的胞外多糖抑制率为 7.47%~13.94%,而对肺炎克雷伯菌的胞外多糖抑制率高达 34.04%~61.10%,见图 4。

2.6 多黏菌素 B 和头孢吡肟/阿维巴坦单独及联合使用对细菌运动能力的影响 蹭行运动试验结果

显示,对照组的运动直径为  $(8.80 \pm 0.30) \text{ mm} \sim (54.77 \pm 0.32) \text{ mm}$ ,联合组的运动直径下降至  $(3.20 \pm 0.11) \text{ mm} \sim (29.27 \pm 0.44) \text{ mm}$ ,抑制率均  $> 50\%$ 。铜绿假单胞菌的泳动试验结果显示,对照组的运动直径为  $(16.43 \pm 0.29) \text{ mm} \sim (67.67 \pm 0.39) \text{ mm}$ ,联合组的运动直径下降至  $(3.10 \pm 0.21) \text{ mm} \sim (11.80 \pm 0.21) \text{ mm}$ ,抑制率高达 80.93%~93.10%,见图 5、6。



注: PMB 为多黏菌素 B, CAZ 为头孢他啶, CFP 为头孢吡肟, AVI 为阿维巴坦, MEN 为美罗培南, AZT 为氨曲南, VAB 为法硼巴坦, IPM 为亚胺培南, REL 为雷利巴坦, BL-BLI 为 β-内酰胺酶抑制剂复方制剂; \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P < 0.0001$ , ns 表示差异无统计学意义。

图 3 多黏菌素 B 联合新型 β-内酰胺酶抑制剂复方制剂对成熟生物膜的根除作用

Figure 3 Effect of polymyxin B combined with novel β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations on eradication of mature biofilm

2.7 多黏菌素 B 与头孢吡肟/阿维巴坦对群体感应的影响 多黏菌素 B 单药的抑制圈直径与对照组相比, 差异无统计学意义。当头孢吡肟/阿维巴坦浓度  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  时, 其单药对群体感应信号分子 C6-HSL 的抑制作用呈现剂量依赖性, 表现为抑制圈直径增加, 且随着药物浓度增加而变大, 见图 7。多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦的情况下, 当组合中头孢吡肟/阿维巴坦浓度  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  时, 抑制圈直径与对照组相比, 差异有均统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见图 8。但联合后的结果与相同浓度单药头孢吡肟/阿维巴坦相似。

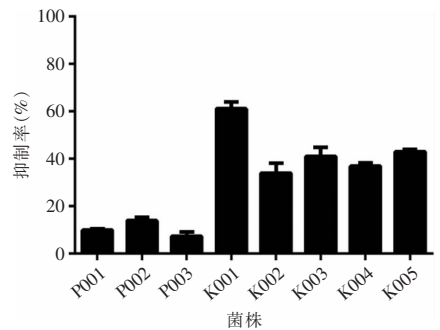


图 4 多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦对不同菌株胞外多糖的抑制率

Figure 4 Inhibition rate of polymyxin B combined with cefepime/avibactam on extracellular polysaccharides of different bacterial strains



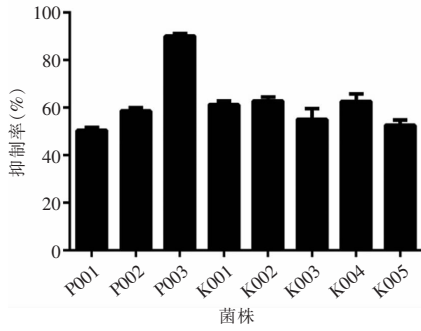


图 5 多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦对耐多黏菌素 B 菌株蹭行运动的抑制率

Figure 5 Inhibition rate of polymyxin B in combination with cefepime/avibactam on the twitching motility of polymyxin B-resistant strains

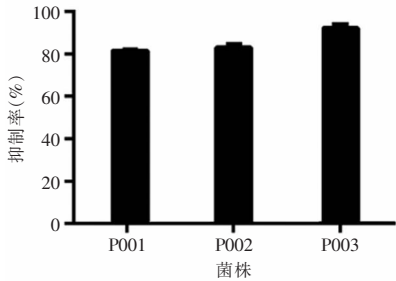


图 6 多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦对铜绿假单胞菌泳动运动的抑制率

Figure 6 Inhibition rate of polymyxin B combined with cefepime/avibactam on the swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa*

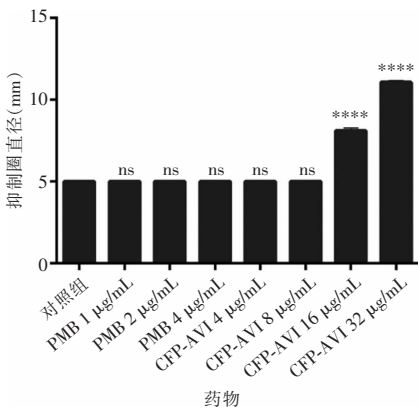
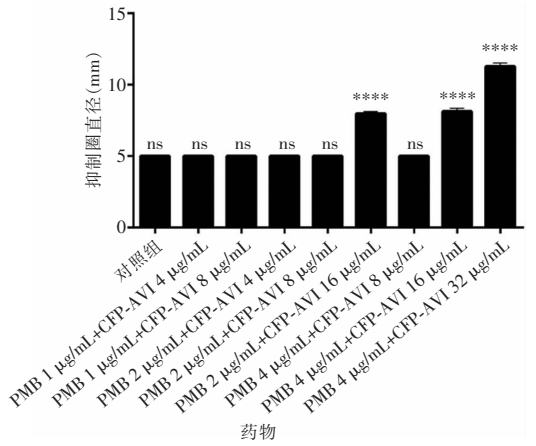


图 7 多黏菌素 B 和头孢吡肟/阿维巴坦单药对群体感应的抑制圈的直径

Figure 7 Diameter of the inhibition circle of quorum sensing of polymyxin B and cefepime/avibactam mono-therapy



注: PMB 为多黏菌素 B, CFP 为头孢吡肟, AVI 为阿维巴坦; \*\*\*\* 表示与 Control 组比较,  $P < 0.0001$ , ns 表示差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

图 8 多黏菌素 B 和头孢吡肟/阿维巴坦联合对群体感应的抑制圈的直径

Figure 8 Diameter of the inhibition circle of quorum sensing of polymyxin B and cefepime/avibactam combinations

### 3 讨论

耐多黏菌素 B 的铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌均极易形成生物膜, 导致临床相关感染治疗难度增加。本研究收集的 14 株临床菌株中, 11 株可以形成生物膜, 其中, 8 株为强生物膜形成菌株。此外, 多黏菌素 B 和新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对生物膜的 MBIC 和 MBEC 远高于浮游菌的 MIC, 进一步证实了生物膜的形成使其对抗菌药物的耐药性更强, 常规的抗菌药物浓度往往不能有效对抗生物膜。

本研究结果表明, 多黏菌素 B 联合 6 种新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂均可以协同抑制耐多黏菌素 B 菌株生物膜的形成; 然而对于成熟的生物膜, 多黏菌素 B 联合基于阿维巴坦的新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂根除成熟生物膜的有效率较另外两种酶抑制剂高, 其中多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦这一组合显示出最强的抑制和根除效果。在生物膜形成初期, 其结构还未成熟, 细菌对抗菌药物抵抗力相对较弱, 相比于根除成熟的生物膜, 抗菌药物能更容易抑制生物膜的形成。在临床生物膜相关感染的治疗中, 既要考虑抗菌药物预防浮游菌形成生物膜的能力, 更要考虑其根除成熟生物膜的能力。本研究结果提示多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦在抗耐多黏菌素 B 铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯

菌生物膜方面具有一定的应用前景。

细菌黏附是生物膜形成的初始阶段,对生物膜形成起着至关重要的作用。细菌胞外多糖作为生物膜胞外聚合物基质的重要成分,不仅能保护成熟的生物膜免受各种外界刺激,还能促进细菌在生物或非生物表面黏附和定植。此外,鞭毛介导的泳动和Ⅳ型菌毛介导的蹭行运动可以为细菌提供更强的侵袭力和扩散能力<sup>[5,13-16]</sup>。O'Toole 等<sup>[17]</sup>研究表明,鞭毛介导的泳动和Ⅳ型菌毛介导的蹭行与细菌的初始黏附相关,对于鞭毛和Ⅳ型菌毛基因缺陷的铜绿假单胞菌,其形成生物膜的能力也明显下降。多黏菌素 B 能够抑制多黏菌素 B 敏感的多重耐药鲍曼不动杆菌的胞外多糖、胞外蛋白质的生成从而发挥抗生物膜作用;头孢菌素类抗生素如头孢他啶,可以增加细胞外吲哚浓度,下调 *ibpA* 基因,以及降低细菌运动性,从而抑制大肠埃希菌中生物膜的黏附和形成<sup>[7,18]</sup>。本研究初步探讨了多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦的抗生物膜机制,结果提示,对于肺炎克雷伯菌,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦可能通过抑制细菌胞外多糖产生和细菌运动能力而发挥抗生物膜作用;对于铜绿假单胞菌,该组合主要通过抑制细菌运动发挥抗生物膜作用。群体感应是一种细菌间信息传递机制,生物膜的形成与群体感应系统的调节密切相关,N-酰基高丝氨酸内酯是革兰阴性菌最常见的一类信号分子<sup>[19-22]</sup>。本研究中,选择了 N-酰基高丝氨酸内酯作为信号分子标准品,发现头孢吡肟/阿维巴坦在浓度  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  时对信号分子标准品的抑制作用呈现剂量依赖性,但与多黏菌素 B 联合后抑制作用并没有表现出增强,提示该药物组合的协同抗生物膜活性可能与该机制无关。群体感应系统产生的信号分子还有自诱导物、吲哚等,生物膜的形成也与其Ⅲ型分泌系统以及外排泵基因相关<sup>[23-25]</sup>。多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦的协同抗生物膜活性是否与上述因素有关,还有待进一步的研究。

综上所述,本研究证实了多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦、头孢他啶/阿维巴坦、美罗培南/阿维巴坦、氨曲南/阿维巴坦、亚胺培南/雷利巴坦及美罗培南/法硼巴坦可有效对抗耐多黏菌素 B 的铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌生物膜,其中,多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦展现出最佳协同抗生物膜活性,其抗生物膜机制可能与抑制细菌胞外多糖和细菌运动有关。本试验仅基于多黏菌素 B 联合新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂的体外静态抗生物膜

活性进行研究,不能反映人体内药物浓度的变化过程,其疗效还有待在体外动态药物代谢动力学/药物效应动力学(pharmacokinetic/pharmacodynamic, PK/PD)模型和体内研究中进一步证实。本研究还初步探讨了多黏菌素 B 联合头孢吡肟/阿维巴坦的抗生物膜机制可能与胞外多糖及运动有关,为更深入研究抗生物膜机制如群体感应相关基因表达、外膜囊泡分泌等奠定了基础。本研究结果可为今后临床治疗耐多黏菌素 B 的铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌生物膜相关感染提供合理参考依据。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参 考 文 献]

- [1] Macesic N, Nelson B, Mcconville TH, et al. Emergence of polymyxin resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* through diverse genetic adaptations: a genomic, retrospective cohort study[J]. Clin Infect Dis, 2020, 70(10): 2084 - 2091.
- [2] Doi Y, van Duin D. Polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: complexity at every level[J]. Clin Infect Dis, 2020, 70(10): 2092 - 2094.
- [3] Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8671.
- [4] Guerra MES, Destro G, Vieira B, et al. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 877995.
- [5] 田森梅,李昕,郭思维,等. 抗菌生物被膜研究新进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(1): 108 - 112.  
Tian MM, Li X, Guo SW, et al. Research progress in addressing bacterial biofilms[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2024, 24(1): 108 - 112.
- [6] Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, et al. Survival strategies of infectious biofilms[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(1): 34 - 40.
- [7] 刘燕,薛凌波,姜萍,等. 多黏菌素 B 对 ICU 肺部感染患者分离鲍氏不动杆菌生物膜形成能力的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(4): 501 - 505.  
Liu Y, Xue LB, Jiang P, et al. Effect of polymyxin B on biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with pulmonary infection in ICU[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2022, 32(4): 501 - 505.
- [8] Wickremasinghe H, Yu HH, Azad MAK, et al. Clinically relevant concentrations of polymyxin B and meropenem synergistically kill multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and minimize biofilm formation[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(4): 405.
- [9] Li Y, Guo SW, Li X, et al. Evaluation of the *in vitro* synergy of polymyxin B-based combinations against polymyxin B-resist-



- ant Gram-negative bacilli[J]. *Microb Pathog*, 2022, 166: 105517.
- [10] Ceri H, Olson M, Morck D, et al. The MBEC assay system: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing[J]. *Methods Enzymol*, 2001, 337: 377–385.
- [11] 刘姝灵, 税剑, 马小华, 等. 肺炎克雷伯菌胞外多糖抗生物膜活性研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(3): 303–308.
- Liu SL, Shui J, Ma XH, et al. Anti-biofilm activity of *Klebsiella pneumoniae* extracellular polysaccharide [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2021, 21(3): 303–308.
- [12] 税剑, 王海晨, 陶晓燕, 等. 铜绿假单胞菌泳动、蹭行能力及Ⅲ型分泌系统与成膜能力的关系[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2021, 50(3): 345–351.
- Shui J, Wang HC, Tao XY, et al. Relationship of biofilm-forming ability of *Pseudomonas aeruginosa* with swimming motility, twitching motility and virulence gene distribution[J]. *Journal of Zhejiang University(Medical Sciences)*, 2021, 50(3): 345–351.
- [13] Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(1): e1001264.
- [14] Cai YM, Hutchin A, Craddock J, et al. Differential impact on motility and biofilm dispersal of closely related phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6232.
- [15] Deligianni E, Pattison S, Berrar D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability *in vitro*[J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 38.
- [16] Billings N, Millan MR, Caldara M, et al. The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(8): e1003526.
- [17] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30(2): 295–304.
- [18] Sun FJ, Yuan Q, Wang Y, et al. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole[J]. *J Chemother*, 2020, 32(1): 7–14.
- [19] Gao M, Peng Y, Shen Y, et al. Study of the biofilm mechanism of C4-HSL and C6-HSL in the degradation of quinoline [J]. *J Biotechnol*, 2023, 376: 53–63.
- [20] Holden I, Swift I, Williams I. New signal molecules on the quorum-sensing block[J]. *Trends Microbiol*, 2000, 8(3): 101–103.
- [21] Ge C, Sheng HK, Chen X, et al. Quorum sensing system used as a tool in metabolic engineering [J]. *Biotechnol J*, 2020, 15(6): e1900360.
- [22] 钱妩燕, 江涛. 病原菌群体感应系统的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32(6): 425–430.
- Qian WY, Jiang T. Quorum sensing in human pathogens[J]. *International Journal of Respiration*, 2012, 32(6): 425–430.
- [23] Kroken AR, Chen CK, Evans DJ, et al. The impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells is independent of *fleQ* and correlates with bistability of type three secretion system gene expression [J]. *mBio*, 2018, 9(3): e00668–18.
- [24] Muñoz-Cázares N, Castillo-Juárez I, García-Contreras R, et al. A brominated furanone inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and type III secretion, attenuating its virulence in a murine cutaneous abscess model[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8): 1847.
- [25] 刘姝灵, 向延根, 马小华, 等. 肺炎克雷伯菌生物膜相关研究进展[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(3): 533–536.
- Liu SL, Xiang YG, Ma XH, et al. The progress in research on *Klebsiella pneumoniae* biofilm[J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2020, 27(3): 533–536.

(本文编辑: 翟若南)

**本文引用格式:** 田森梅, 郭思维, 颜冰倩, 等. 多黏菌素 B 联合新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂复方制剂对耐多黏菌素 B 细菌生物膜的影响 [J]. *中国感染控制杂志*, 2025, 24(1): 58–66. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256729.

**Cite this article as:** TIAN Miaomei, GUO Siwei, YAN Bingqian, et al. Effect of polymyxin B combined with novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations on biofilms of polymyxin B-resistant bacteria[J]. *Chin J Infect Control*, 2025, 24(1): 58–66. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256729.