

35-38.

临床杂志, 2020, 36(11): 17-21.

[13] 公不见, 戴文娟, 于荣鑫. 热敏灸联合推拿对腰椎间盘突出症患者 TXB₂、PGE₂ 水平及腰椎功能的影响[J]. 针灸

(收稿日期: 2022-10-14 修回日期: 2023-03-31)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 12. 032

亚抑菌浓度抗菌药物联合对铜绿假单胞菌生物膜的体外作用*

徐 荣, 王乃群, 谭 为, 胡小雄, 吴 雯, 袁 航

江西省宜春市人民医院检验科, 江西宜春 336000

摘 要:目的 比较在 1/2 最低抑菌浓度(MIC)即亚抑菌浓度, 哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢他啶(CAZ)、氨曲南(ATM)、亚胺培南(IPM)、左氧氟沙星(LVX)和庆大霉素(GEN)联合使用对铜绿假单胞菌(PA)生物膜的抑制效果。方法 收集 2020 年 10 月至 2021 年 3 月该院临床分离的黏液型多重耐药 PA 6 株, 确定菌株多位点序列分型(MLST), 并测定 TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX 和 GEN 6 种抗菌药物的 MIC。在聚苯乙烯 96 孔板上构建生物膜, 在 1/2 MIC 抗菌药物作用 48 h 后, 采用结晶紫染色洗脱法定量检测残留生物膜, 计算生物膜抑制指数。结果 6 株黏液型多重耐药 PA 的 MLST 均为 ST 235 型。在 1/2 MIC, 抗菌药物联合使用的生物膜抑制指数均值都大于 50.0%。其中 LVX+IPM 和 LVX+ATM 对菌株的生物膜抑制指数均值大于 70.0%, 与其他药物联用相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX 和 GEN 6 种抗菌药物单独作用的抑制指数都小于 50.0%, 且都显著低于 6 种抗菌药物中任意 2 种联用的组合($P < 0.05$)。结论 临床在治疗 PA 生物膜相关感染时, 应尽量选择联合用药。在相同的耐药水平下, 氟喹诺酮类和碳青霉烯类或单环 β -内酰胺类抗菌药物联用对于生物膜具有更好的抑制效果。

关键词:铜绿假单胞菌; 生物膜; 抗菌药物; 亚抑菌浓度

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)12-1809-03

铜绿假单胞菌(PA)是临床最重要的条件致病菌之一, 可以引起肺部、皮肤软组织、血液和泌尿系统等多个部位的感染。全国和本院 2019 年的细菌耐药监测报告都显示, PA 的临床分离率在革兰阴性致病菌中排第 3 位, 约占 12%^[1-2]。随着抗菌药物的广泛使用, 强大的环境选择压力导致了 PA 的耐药机制越来越复杂和多样, 包括产酶、药物作用靶位改变、主动外排机制、膜通道蛋白缺失和生物膜形成等^[3]。其中生物膜一旦形成, PA 就很难被彻底清除, 这是导致临床出现难治性、慢性感染病例的重要原因^[4]。治疗生物膜相关感染时, 医生往往会联合使用敏感且膜渗透性能好的抗菌药物, 除了及时清除播散性细菌, 还可以降低感染部位的生物膜负载^[5-6]。但是由于细菌耐药性的增加, 尤其是多重耐药菌株的逐渐增多, 抗菌药物在体内的浓度常常达不到最低抑菌浓度(MIC), 即处于亚抑菌浓度状态。此状态下, 对于临床常用抗菌药物联合对 PA 生物膜的作用效果还缺少系统性评价。本研究旨在以临床黏液型多重耐药 PA 菌株为对象, 比较在 1/2 MIC 亚抑菌浓度时, 6 种临床常用抗菌药物联合使用对其生物膜的体外抑制效果。

1 材料与方法

1.1 菌株收集 收集 2020 年 10 月至 2021 年 3 月本院临床微生物室分离的黏液型多重耐药 PA 菌株 6 株。细菌鉴定和药敏试验采用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系

统, 多重耐药的判定标准为对 3 类或 3 类以上临床常用抗菌药物不敏感^[7]。菌株使用含 15% 甘油的无菌肉汤-80℃保存。

1.2 方法

1.2.1 细菌 MIC 测定 复苏 PA 菌株, 统一采用 CLSI 推荐的微量肉汤稀释法检测哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢他啶(CAZ)、氨曲南(ATM)、亚胺培南(IPM)、左氧氟沙星(LVX)和庆大霉素(GEN)6 种抗菌药物的 MIC, 质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。TZP 购自海南通用三洋药业有限公司(批号: 210801-2), CAZ 购自海南海灵化学制药有限公司(批号: 2110211), ATM 购自山东罗欣药业有限公司(批号: 321063008), IPM 购自杭州默沙东制药有限公司(批号: u025798), LVX 购自华夏生生药业有限公司(批号: 210815307), GEN 购自瑞阳制药有限公司(批号: 21052611)。

1.2.2 菌株多位点序列分型(MLST) 将 6 株 PA 送浙江天科高新技术发展有限公司做全基因组测序, 提取管家基因 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE* 的序列放在 PAMLSST 数据(<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>)中比对得到序列型(ST)。

1.2.3 构建 PA 生物膜 使用肉汤活化黏液型 PA, 并调整浓度至 0.5 麦氏比浊度。吸取 30 μ L 菌液加入到含 200 μ L 肉汤的聚苯乙烯 96 孔板中, 常温条件

* 基金项目: 江西省宜春市科技计划项目(JXYC2020KSB003)。

下水平振荡仪上低频振荡,培养 48 h 形成生物膜。使用高压去离子水轻柔冲洗 96 孔板 3 次,去除浮游细菌后,倒扣,室温晾干。

1.2.4 1/2 MIC 抗菌药物联合抑制生物膜效果评价 在已构建的 PA 生物膜中,加入 200 μ L 含有抗菌药物的肉汤,抗菌药物的种类为 TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX 和 GEN 中任意 1 种或 2 种,抗菌药物终浓度为菌株 MIC 的 1/2。同时设立阴性对照孔位,加入等量无药液肉汤。37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后冲洗 3 次去除浮游细菌并晾干,采用结晶紫染色洗脱法定量检测残留生物膜^[8]:(1) 加入 200 μ L 1% 的结晶紫染色液,室温染色 10 min。(2) 冲涤后加入 200 μ L 乙醇:丙酮洗脱液(V:V 为 70:30)室温作用 10 min。(3) 使用酶标仪测定洗脱后孔位 595 nm 的吸光度(A)并计算生物膜抑制指数^[9]。生物膜抑制指数=[(对照孔位 A 值-测试孔位 A 值)/对照孔位 A 值] $\times$ 100%。生物膜抑制效果的评价实验均平行做 2 次,生物膜抑制指数取均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。对正态分布的计量资料两组间均值比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌株 MIC 测定结果 6 种抗菌药物 TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX 和 GEN 对黏液型多重耐药 PA 的 MIC 测定结果见表 1。

2.2 菌株 MLST 结果 测序后提取 6 株黏液型多重耐药 PA 的管家基因 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE* 的序列,放在 PAMLST 数据进行 MLST 数据比对,结果显示均为 ST 235 型。

表 1 6 种抗菌药物对 PA 的 MIC(μ g/mL)						
菌株编号	TZP	CAZ	ATM	IPM	LVX	GEN
PA29016	64	16	32	64	8	16
PA01005	64	16	16	64	16	32
PA09012	64	16	16	32	2	0.5
PA03019	2	4	4	8	0.5	0.5
PA06053	16	8	16	8	1	2
PA26017	64	16	64	128	16	16

2.3 不同抗菌药物组合抑制生物膜效果比较 在 1/2 MIC 时,TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX、GEN 单独或联合对 6 株多重耐药 PA 的生物膜抑制指数见表 2。6 种抗菌药物中任意 2 种联用或单独使用分别作用于 6 株 PA 的生物膜,获得的生物膜抑制指数均符合正态分布(*P*>0.1)。2 种药物联用的 15 种组合当中,LVX+IPM 和 LVX+ATM 的生物膜抑制指数大于 70.0%,GEN+IPM、TZP+ATM、ATM+IPM 和 GEN+TZP 的生物膜抑制指数大于 60.0%,其余 9 种组合的生物膜抑制指数大于 50.0%。6 种药物单独作用于生物膜,抑制指数均小于 50.0%,均值从大到小依次为 LVX、IPM、ATM、GEN、TZP 和 CAZ,其中 LVX 的抑制指数均值为 42.3%。

对 21 组数据进行独立样本 *t* 检验,发现任意 2 种药物联合作用的 15 组数据中,LVX+IPM 和 LVX+ATM 之间及 LVX+ATM、GEN+IPM 与其他药物联用组合相比,生物膜抑制指数差异均有统计学意义(*P*<0.05)。6 种药物单独作用于生物膜的抑制指数间差异无统计学意义(*P*>0.05),但小于任意 2 种抗菌药物联用组合的生物膜抑制指数(*P*<0.05)。

表 2 常用抗菌药物单独或联合对 6 株 PA 的生物膜抑制指数(%)

抗菌药物	PA29016	PA01005	PA09012	PA03019	PA06053	PA26017	$\bar{x}$	<i>s</i>
LVX+IPM	82.0	81.5	77.9	72.8	78.9	79.4	78.8 ^①	3.3
LVX+ATM	74.5	74.6	75.8	70.1	73.1	74.9	73.8 ^②	2.0
GEN+IPM	66.3	67.4	65.8	67.4	58.2	66.5	65.3 ^③	3.5
TZP+ATM	59.3	61.3	68.0	49.2	64.3	74.4	62.8 ^③	8.5
ATM+IPM	64.7	61.7	67.2	55.5	54.6	68.8	62.1 ^③	6.0
GEN+TZP	56.6	58.1	65.8	68.8	53.0	63.6	61.0 ^③	6.0
GEN+CAZ	57.7	61.1	54.5	52.5	63.2	52.0	56.8 ^③	4.6
GEN+ATM	47.7	55.0	61.2	57.1	66.0	51.4	56.4 ^③	6.6
LVX+GEN	62.4	55.3	52.7	58.1	55.1	51.2	55.8 ^③	4.0
LVX+CAZ	63.9	51.4	51.4	64.3	57.6	45.7	55.7 ^③	7.5
TZP+CAZ	57.6	44.8	52.5	58.1	51.9	67.9	55.5 ^③	7.8
CAZ+IPM	60.6	47.9	68.9	55.9	49.6	48.7	55.3 ^③	8.3
TZP+IPM	46.9	54.5	61.7	54.2	52.4	61.0	55.1 ^③	5.6
LVX+TZP	53.5	54.1	52.0	54.5	53.4	44.8	52.1 ^③	3.7
CAZ+ATM	47.3	52.6	53.9	54.3	50.2	46.8	50.9 ^③	3.3
LVX	39.0	45.2	39.1	36.7	50.3	43.7	42.3	5.0
IPM	37.4	35.0	33.0	41.1	31.2	41.2	36.5	4.2
ATM	30.4	36.3	36.2	32.6	35.6	40.0	35.2	3.3
GEN	29.2	33.4	38.1	31.0	35.1	32.0	33.1	3.2
TZP	37.7	31.8	29.6	37.0	34.6	26.7	32.9	4.3
CAZ	29.0	30.8	31.1	32.1	26.9	36.6	31.1	3.3

注:与其他药物联用组合及 6 种药物单用相比,^①*P*<0.05;与除 LVX+IPM 外的其他药物联用组合及 6 种药物单用相比,^②*P*<0.05;与 6 种药物单用相比,^③*P*<0.05。

3 讨 论

黏液型 PA 由于细胞外存在大量藻酸盐成分,比非黏液型菌株更容易形成可见的生物膜结构,但生物膜却是致病菌在体内定植的普遍模式^[10]。当生物膜相关菌株同时为多重耐药菌时,临床医生将很难选择合适的抗菌药物使用方案。TZP、CAZ、ATM、IPM、LVX 和 GEN 分别是青霉素类+酶抑制剂、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类的代表性抗菌药物,本研究通过比较在亚抑菌浓度下,这些药物对本院 6 株 ST 235 型多重耐药 PA 菌株的生物膜体外联合抑制效果,发现 LVX+IPM 联用的抑制效果最好,其次为 LVX+ATM。说明在相同的耐药水平下,氟喹诺酮类与碳青霉烯类或单环 β -内酰胺类抗菌药物联用对于 PA 生物膜具有更好的抑制效果。

由于不携带正电荷,具有良好的生物膜穿透性,氟喹诺酮类被认为是生物膜内作用效果最好的一类抗菌药物^[11-12]。有文献报道, LVX+IPM 对 PA 慢性肺部感染有很好的治疗效果^[13]。由于亚抑菌浓度下长时间作用,很多抗菌药物包括氟喹诺酮类和 IPM 都可以诱导 PA 生物膜的形成及耐药性的加强,因此临床选择抗菌药物时,首先仍应根据药敏试验结果选择敏感的药物进行抗生物膜治疗^[14-16]。

既往的体外联合用药表明, β -内酰胺类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类抗菌药物联合治疗 PA 感染时,通常表现为协同、相加或无关^[17-18]。本研究当中,6 种抗菌药物任意 2 种组合后,对生物膜的抑制效果均好于抗菌药物单独使用,因此临床上在治疗生物膜相关感染时应尽量选择联合用药。

本研究使用的 6 株黏液型多重耐药 PA 均分离自本院临床患者,经 MLST 数据对比,显示都归属 ST 235 型,具有一定的同源性,这可能是导致本研究中的各组生物膜抑制指数均呈正态分布的主要原因。由于不同地区 PA 菌株的耐药基因与表型不同,抗菌药物的体外抑制效果与体内也可能存在差异,因此抗菌药物联合应用对 PA 生物膜抑制效果的比对结论后续仍有必要进一步验证。

参考文献

[1] 2019 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国合理用药探索, 2021,18(3):1-11.
 [2] 李娜,易小翠,徐荣,等. 2015—2017 年宜春市人民医院病原菌分布及耐药性分析[J]. 现代预防医学,2019,46(7): 1316-1320.
 [3] SUBEDI D,VIJAY A K,WILLCOX M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective[J]. Clin Exp Optom,2018,101(2): 162-

171.
 [4] 徐荣,胡小雄,谭为. 铜绿假单胞菌生物膜研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(23):2938-2941.
 [5] ROY R, TIWARI M, DONELLI G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action [J]. Virulence, 2018,9(1):522-554.
 [6] WU H, MOSER C, WANG H Z, et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections [J]. Int J Oral Sci, 2015,7(1):1-7.
 [7] 徐雅萍,霍瑞,闫中强,等. MDR,XDR,PDR 细菌:国际专家关于获得性耐药暂行定义的提案[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(1):231-240.
 [8] NESSE L L, BERG K, VESTBY L K. Effects of norspermidine and spermidine on biofilm formation by potentially pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* wild-type strains[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(6): 2226-2232.
 [9] CHEN C, LIAO X, JIANG H, et al. Characteristics of *Escherichia coli* biofilm production, genetic typing, drug resistance pattern and gene expression under aminoglycoside pressures [J]. Environ Toxicol Pharmacol,2010,30(1):5-10.
 [10] DAVIES D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents[J]. Nat Rev Drug Discov,2003,2(2):114-122.
 [11] LONG T E, KEDING L C, LEWIS D D, et al. Anionic fluoroquinolones as antibacterials against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Bioorg Med Chem Lett,2016,26(4):1305-1309.
 [12] 杜虎,陈在贤. 氟喹诺酮类药物对铜绿假单胞菌生物膜的清除效应[J]. 重庆医学,2005,34(4):592-594.
 [13] 徐辉. 左氧氟沙星联合亚胺培南对铜绿假单胞菌慢性肺部感染免疫低下大鼠抗菌作用及耐药机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2017.
 [14] RANIERI M R, WHITCHURCH C B, BURROWS L L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials[J]. Curr Opin Microbiol, 2018,45(1):164-169.
 [15] 徐运娥,卢忠义,敖弟书,等. 亚抑菌浓度亚胺培南西司他丁钠诱导铜绿假单胞菌生物被膜形成的体外研究[J]. 遵义医科大学学报,2022,45(4):433-437.
 [16] 张智琪. 氟喹诺酮药物诱导铜绿假单胞菌生物膜及耐药机制研究[D]. 太原:山西医科大学,2018.
 [17] 郑荣,曹伟,李彩霞. 体外联合用药对多重耐药铜绿假单胞菌抗菌活性的研究[J]. 中国现代医学杂志,2008,18(6):813-815.
 [18] 刘丽文,韩克军,陈正荣. 联合用药对多耐药铜绿假单胞菌的体外活性[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(10):1262-1264.

(收稿日期:2022-10-12 修回日期:2023-04-12)