

## 药理与临床

EDTA-2Na联合抗菌药物对铜绿假单胞菌的体外抑菌  
及生物膜抑制作用研究廖文丽<sup>1</sup> 孙瑶<sup>1</sup> 陈涛<sup>1</sup> 喻凯航<sup>2</sup> 徐雯雅<sup>1</sup> 林婕<sup>1</sup> 周铁丽<sup>1,\*</sup>

(1 温州医科大学附属第一医院医学检验中心, 温州 325000; 2 温州医科大学检验医学院 生命科学学院, 温州 325000)

**摘要:** **目的** 探讨乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium, EDTA-2Na)联合抗菌药物对铜绿假单胞菌的体外抑菌及生物膜抑制作用。**方法** 对临床分离的10株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌、8株黏菌素耐药铜绿假单胞菌和8株阿米卡星耐药铜绿假单胞菌,通过微量肉汤稀释棋盘法检测EDTA-2Na分别与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用以及各自单用时对相应耐药菌株的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),并通过计算部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)评价联合抑菌效果;结晶紫生物膜试验检测EDTA-2Na分别与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用及各自单用时对相应耐药菌株生物膜的抑制作用,通过测量 $A_{595}$ 值评价抑制生物膜效果。**结果** EDTA-2Na与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用后对相应耐药菌株的抑菌作用表现为协同或相加,对生物膜也具有明显的协同抑制作用。**结论** EDTA-2Na联合抗菌药物对铜绿假单胞菌具有良好的体外抑菌作用及抑制生物膜作用。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; EDTA-2Na; 微量肉汤稀释棋盘法; 结晶紫生物膜试验**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A*In vitro* inhibitory activity and biofilm inhibition effects of EDTA-2Na combined  
with antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*Liao Wen-li<sup>1</sup>, Sun Yao<sup>1</sup>, Chen Tao<sup>1</sup>, Yu Kai-hang<sup>2</sup>, Xu Wen-ya<sup>1</sup>, Lin Jie<sup>1</sup> and Zhou Tie-li<sup>1</sup>

(1 Laboratory Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000;

2 School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000)

**Abstract Objective** To evaluate the inhibitory and biofilm inhibitory effects of ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA-2Na) combined with antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa* isolates *in vitro*. **Methods** Ten clinical isolates of imipenem-resistant *P. aeruginosa*, eight colistin-resistant *P. aeruginosa* isolates, and eight amikacin-resistant *P. aeruginosa* isolates were collected from different specimens of different inpatients from the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University from 2015 to 2017. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of EDTA-2Na combined with imipenem, colistin or amikacin, and the four drugs used alone against *P. aeruginosa* were detected by the checkerboard dilution method, and the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated to evaluate antibiotic effects. The inhibitory effect of EDTA-2Na combined with imipenem, colistin or amikacin, and the latter three drugs used alone against *P. aeruginosa* were detected by the crystal violet biofilm test, and the  $A_{595}$  values were measured to evaluate biofilm inhibitory effects. **Results** The inhibitory effects of the

收稿日期: 2020-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81971986); 浙江省教育厅一般科研项目(No. Y201942275)

作者简介: 廖文丽, 女, 生于1993年, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: liaowenli0708@163.com

\*通讯作者, E-mail: wyztli@163.com

combinations of EDTA-2Na with imipenem, colistin or amikacin separately for the antibiotic-resistant *P. aeruginosa* isolates were synergistic or additional, and no effects of uncorrelated and antagonism were observed in all these combinations. The biofilm inhibitory effects of the combinations of EDTA-2Na with imipenem, colistin or amikacin separately for the antibiotic-resistant *P. aeruginosa* isolates were synergistic. **Conclusions** EDTA-2Na combined with antibacterial agents can improve the inhibitory and the biofilm inhibitory effects for *P. aeruginosa* *in vitro*.

**Key words** *Pseudomonas aeruginosa*; EDTA-2Na; Checkerboard dilution method; Crystal violet biofilm test

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是医院获得性感染的常见病原菌。近年来, 由于抗菌药物的不合理使用致使铜绿假单胞菌对各类常用抗菌药物的耐药率逐渐增加, 并呈现出多重耐药趋势<sup>[1-3]</sup>, 给临床抗感染治疗带来了巨大挑战。引起铜绿假单胞菌的耐药机制非常复杂, 其中生物膜的形成是铜绿假单胞菌产生耐药性的重要机制。据报道, 65%~80%的人类细菌感染与生物膜有关<sup>[4]</sup>, 形成的生物膜可保护细菌免受宿主的获得性免疫应答以及吞噬细胞的捕食, 使其耐药性比浮游菌高至1000倍<sup>[5]</sup>, 引起了人们极大的关注。有报道称镁和钙等二价金属离子对生物膜胞外基质有重要的营养作用和稳定作用<sup>[6]</sup>, 而EDTA-2Na作为金属离子螯合剂, 可能对生物膜结构具有破坏作用, 本文旨在探讨EDTA-2Na单独以及与多种抗菌药物联合对铜绿假单胞菌浮游菌及生物膜的杀菌作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1. 菌株来源

本研究的10株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌、8株黏菌素耐药铜绿假单胞菌和8株阿米卡星耐药铜绿假单胞菌分离自温州医科大学附属第一医院2015—2017年间不同住院患者的不同标本。所有菌株均采用基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定系统进行鉴定, 确定为铜绿假单胞菌。质控菌株采购自卫生部临检中心的铜绿假单胞菌ATCC 27853。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

微量移液枪(德国Eppendorf公司), DR100型比浊仪(法国Bio-Merieux有限公司), 氯化钠(国药集团化学试剂有限公司), 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱仪, Mueller-Hinton(MH)肉汤、LB肉汤和哥伦比亚血琼脂平板(英国Oxoid公司), 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司), 96孔细胞培养板(美国Corning公司), 全功能微孔板检测酶标仪(美国Biotek公司), EDTA-2Na(上海试一化学试剂有限公司), 亚胺培南、黏菌素和阿米卡星(温州康泰生物技术公

司), 1%结晶紫染液(北京索莱宝科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 药物敏感性试验

EDTA-2Na对铜绿假单胞菌的MIC值测定采用微量肉汤稀释法<sup>[7-8]</sup>, 挑取哥伦比亚血琼脂平板上过夜培养的1~3个纯菌落, 采用无菌生理盐水调浊度至 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 再用MH肉汤将菌液稀释100倍。用MH肉汤将EDTA-2Na制成稀释梯度为0.125~64 mg/mL。依次取各浓度EDTA-2Na各100  $\mu$ L, 分别加入96孔板每行的第1~第10孔中, 再向各孔加入100  $\mu$ L稀释后的菌液, 并且同时做阴性对照, 37℃孵育16~18 h。观察结果并记录各药物的MIC值。

#### 1.2.2 微量肉汤稀释棋盘法

根据临床实验室标准协会(CLSI)2019年标准<sup>[8]</sup>, 采用微量肉汤稀释法检测亚胺培南、黏菌素和阿米卡星对相应耐药铜绿假单胞菌的MIC值。其中, 配制亚胺培南药物浓度为0.125~64  $\mu$ g/mL, 黏菌素浓度为0.125~64  $\mu$ g/mL, 阿米卡星浓度为0.25~128  $\mu$ g/mL。分别取EDTA-2Na联合亚胺培南、黏菌素以及联阿米卡星的组合, 按照棋盘法, 两种药物各取50  $\mu$ L加入96孔板的每孔中, 再加入100  $\mu$ L稀释后的菌液, 37℃孵育16~18 h。观察记录最佳抑菌组合时的各药MIC值, 并计算部分抑菌浓度指数(FICI)以评价联合抑菌效果。

FICI的计算和判读<sup>[9]</sup>:  $FICI = \frac{\text{联用时甲药的MIC}}{\text{单用时甲药的MIC} + \frac{\text{联用时乙药的MIC}}{\text{单用时乙药的MIC}}}$ 。其中,  $FICI \leq 0.5$ 为协同作用,  $0.5 < FICI \leq 1.0$ 为相加作用,  $1.0 < FICI \leq 2.0$ 为无关作用,  $FICI > 2.0$ 为拮抗作用。

#### 1.2.3 生物膜形成半定量测定

根据参考文献<sup>[10]</sup>, 稍加改进。挑取哥伦比亚血琼脂平板上过夜培养的1~3个纯菌落, 采用无菌生理盐水调浊度至 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, 吸取100  $\mu$ L菌液至新鲜的10 mL LB液体培养基中进行1:100稀释得到所需菌液。根据MIC测定结果, 将EDTA-2Na分别与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用及各自单用,

试验分4组：①对照组加入等体积200μL LB至96孔板中；②加入100μL LB与100μL菌悬液；③加入终浓度为1/4×MIC的亚胺培南、1/4×MIC的黏菌素或1/4×MIC的阿米卡星与100μL菌悬液；④加入终浓度为联合用药MIC下的EDTA-2Na与亚胺培南、黏菌素或阿米卡星与100μL菌悬液。将96孔板置于37℃静置孵育24h。第二天观察对照孔是否污染，无细菌生长方可进行下一步实验。吸出上清液，用PBS清洗2次以去除浮游菌，等待96孔板干燥。每孔加入200μL的0.1%结晶紫染液，静置染色15min，甩掉结晶紫染色液，用自来水轻轻地清洗两次，风干。每孔加入200μL的95%的乙醇，静置10min。使用微量移液枪吸取100μL的液体转移至另一新的96孔板中，使用酶标仪检测在 $A_{595}$ 下的吸光度值。

1.2.4 数据处理及分析

采用SPSS 21.0软件包进行统计学分析，将不同组间生物膜的吸光度 $A_{595}$ 值行配对样本 $t$ 检验， $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。使用GraphPad Prism 8软件绘制生物膜吸光度 $A_{595}$ 值的柱状图。

2 结果

2.1 EDTA-2Na和亚胺培南单用及联合用药对亚胺培南耐药铜绿假单胞菌的MIC值

通过对10株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌单药和联合用药检测发现，EDTA-2Na与亚胺培南联用后，EDTA-2Na与亚胺培南的MIC值较单用时明显降低，联用时亚胺培南的MIC均降至耐药折点以下，降低了4~32倍(表1)。

2.2 EDTA-2Na和黏菌素单用及联合用药对黏菌素耐药铜绿假单胞菌的MIC值

通过对8株黏菌素耐药铜绿假单胞菌单药和联合用药检测发现，EDTA-2Na与黏菌素联用后，EDTA-2Na与黏菌素的MIC值较单用时明显降低，联用时黏菌素的MIC均降至耐药折点以下，降低了8~32倍(表2)。

2.3 EDTA-2Na和阿米卡星单用及联合用药对阿米卡星耐药铜绿假单胞菌的MIC值

通过对8株阿米卡星耐药铜绿假单胞菌单药和联合用药检测发现，EDTA-2Na与阿米卡星联用后，EDTA-2Na与阿米卡星的MIC值较单用时明显降低，联用时阿米卡星的MIC均降至耐药折点以下，降低了4~32倍以上(表3)。

2.4 EDTA-2Na与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用FICI指数分布

根据FICI指数，我们发现EDTA-2Na与黏菌素联用后，全部表现为协同作用，EDTA-2Na与亚胺培南、阿米卡星联用后表现为协同和相加作用，无拮抗作用。具体结果如表4所示。

2.5 亚胺培南单药及联合EDTA-2Na对亚胺培南耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

生物膜试验的药物浓度根据药敏试验结果进行设计，考虑到MIC下的抗菌药物会直接抑制浮游菌的生长，从而影响对生物膜的检测，因此单药亚胺培南组采用亚抑菌浓度，即1/4×MIC的亚胺培南(以下黏菌素及阿米卡星单药组亦采用1/4×MIC)。通过对10株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌使用亚胺培南单药及联合EDTA-2Na用药检测发现，EDTA-2Na与亚胺培南联用后，细菌的生物膜较LB组及亚胺培南单药组明显下降( $P<0.05$ )，而LB组与亚胺培南单药组的生物膜无显著性差异(图1)。

表1 EDTA-2Na和亚胺培南单用及联合用药对亚胺培南耐药铜绿假单胞菌的MIC值  
Tab. 1 The MIC values of EDTA-2Na and imipenem alone and in combination to imipenem-resistant *P. aeruginosa*

菌株	单药MIC值		联合MIC值		FICI	联合作用形式
	EDTA-2Na/(mg/mL)	IPM/(μg/mL)	EDTA-2Na/(mg/mL)	IPM/(μg/mL)		
TL-1507	4	32	1	2	0.313	协同作用
TL-1518	2	16	1	1	0.563	相加作用
TL-1537	4	32	1	1	0.281	协同作用
TL-1567	2	32	1	2	0.563	相加作用
TL-2886	4	8	0.25	2	0.313	协同作用
TL-2906	4	16	0.5	2	0.250	协同作用
TL-2939	4	16	0.5	2	0.250	协同作用
TL-2964	4	16	0.5	2	0.250	协同作用
TL-3047	4	16	1	2	0.375	协同作用
TL-3092	4	16	1	2	0.375	协同作用

注：IPM，亚胺培南；MIC≥8μg/mL判定为亚胺培南耐药<sup>[8]</sup>

表2 EDTA-2Na和黏菌素单用及联合用药对黏菌素耐药铜绿假单胞菌的MIC值  
Tab. 2 The MIC values of EDTA-2Na and colistin alone and in combination to colistin-resistant *P. aeruginosa*

菌株	单药MIC值		联合MIC值		FICI	联合作用形式
	EDTA-2Na(mg/mL)	COL(μg/mL)	EDTA-2Na(mg/mL)	COL(μg/mL)		
TL-1722	0.5	4	0.125	0.25	0.313	协同作用
TL-1736	4	16	0.125	2	0.156	协同作用
TL-1744	4	32	0.25	2	0.125	协同作用
TL-2314	1	16	0.25	2	0.375	协同作用
TL-2917	1	4	0.25	0.25	0.313	协同作用
TL-2967	2	4	0.25	0.25	0.188	协同作用
TL-3008	2	16	0.125	2	0.188	协同作用
TL-3086	1	64	0.125	2	0.156	协同作用

注：COL，黏菌素；MIC≥4μg/mL判定为黏菌素耐药<sup>[8]</sup>

表3 EDTA-2Na和阿米卡星单用及联合用药对阿米卡星耐药铜绿假单胞菌的MIC值  
Tab. 3 The MIC values of EDTA-2Na and amikacin alone and in combination to amikacin-resistant *P. aeruginosa*

菌株	单药MIC值		联合MIC值		FICI	联合作用形式
	EDTA-2Na(mg/mL)	AMK(μg/mL)	EDTA-2Na(mg/mL)	AMK(μg/mL)		
TL-1537	4	64	0.5	8	0.250	协同作用
TL-1586	2	>256	1	8	0.531	相加作用
TL-1723	4	64	2	8	0.625	相加作用
TL-2258	4	64	2	8	0.625	相加作用
TL-2886	4	64	1	8	0.375	协同作用
TL-2939	4	64	2	8	0.625	相加作用
TL-3047	4	64	0.5	16	0.375	协同作用
TL-3051	4	64	1	16	0.500	协同作用

注：AMK，阿米卡星；MIC≥64μg/mL为阿米卡星耐药<sup>[8]</sup>

表4 EDTA-2Na与亚胺培南、黏菌素及阿米卡星联用的FICI(%，n)

Tab. 4 FICI(%，n) of EDTA-2Na in combination with imipenem, colistin and amikacin

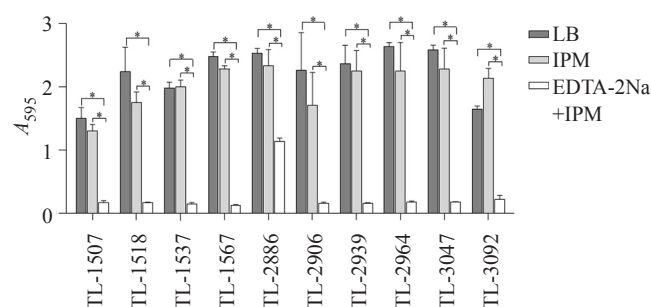
抗菌药物组合	FICI≤0.5	0.5<FICI≤1	1<FICI≤2	FICI>2
EDTA-2Na+IPM	80(8)	20(2)	0	0
EDTA-2Na+COL	100(8)	0	0	0
EDTA-2Na+AMK	50(4)	50(4)	0	0

## 2.6 黏菌素单药及联合EDTA-2Na对黏菌素耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

通过对8株黏菌素耐药铜绿假单胞菌使用黏菌素单药及联合EDTA-2Na用药检测发现，EDTA-2Na与黏菌素联用后，细菌的生物膜较LB组及黏菌素单药组(除TL-2314外)明显下降( $P<0.05$ )，并且除TL-1722与TL-1736外，其余6株菌LB组与黏菌素单药组的生物膜相比具有显著性差异( $P<0.05$ )(图2)。

## 2.7 阿米卡星单药及联合EDTA-2Na对阿米卡星耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

通过对8株阿米卡星耐药铜绿假单胞菌使用阿米



LB：仅加入菌液培养，不加入药物；IPM：亚抑菌浓度，即1/4×MIC的亚胺培南；EDTA-2Na+IPM，联合药敏浓度；\*代表具有统计学差异

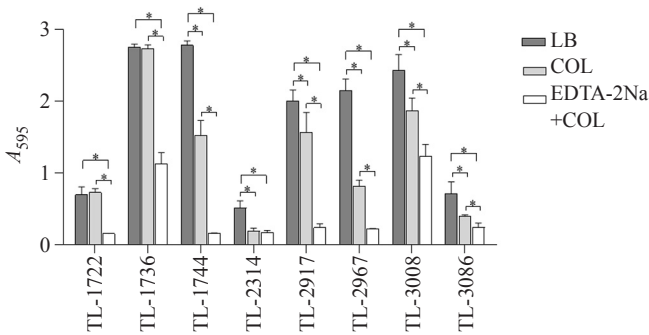
图1 亚胺培南单药及联合EDTA-2Na对亚胺培南耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

Fig. 1 The biofilm inhibition effects of imipenem and EDTA-2Na alone and in combination to imipenem-resistant *P. aeruginosa*

卡星单药及联合EDTA-2Na用药检测发现，EDTA-2Na与阿米卡星联用后，细菌的生物膜较LB组及阿米卡星单药组明显下降( $P<0.05$ )，而LB组与阿米卡星单药组的生物膜无显著性差异(图3)。

## 3 讨论

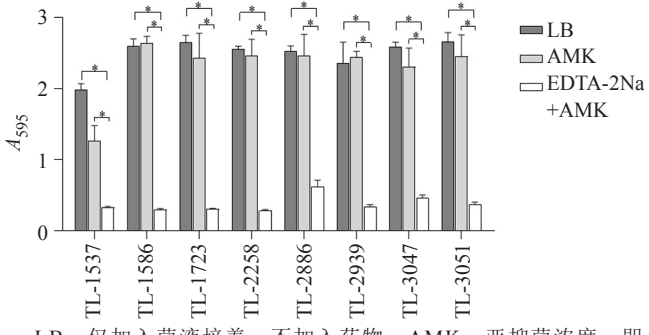




LB: 仅加入菌液培养, 不加入药物; COL: 亚抑菌浓度, 即  $1/4 \times \text{MIC}$  的黏菌素; EDTA-2Na+COL, 联合药敏浓度; \*代表具有统计学差异

图2 黏菌素单药及联合EDTA-2Na对黏菌素耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

Fig. 2 The biofilm inhibition effects of colistin and EDTA-2Na alone and in combination to colistin-resistant *P. aeruginosa*



LB: 仅加入菌液培养, 不加入药物; AMK: 亚抑菌浓度, 即  $1/4 \times \text{MIC}$  的阿米卡星; EDTA-2Na+AMK, 联合药敏浓度; \*代表具有统计学差异

图3 阿米卡星单药及联合EDTA-2Na对阿米卡星耐药铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用

Fig. 3 the biofilm inhibition effects of amikacin and EDTA-2Na alone and in combination to amikacin-resistant *P. aeruginosa*

铜绿假单胞菌常引起严重感染, 包括肺炎、菌血症、尿路感染以及皮肤和软组织感染等。随着近年来广谱抗菌药物的大量应用, 铜绿假单胞菌耐药现象呈现越发严重的发展趋势<sup>[1-3]</sup>。多重耐药菌的出现给临床抗感染治疗带来一定难度, 近年来联合用药逐渐成为抗感染治疗的研究热点<sup>[11-12]</sup>, 可缓解临床治疗压力。乙二胺四乙酸(EDTA)作为一种金属螯合剂, 近年来被用于治疗伤口的浅表感染<sup>[13]</sup>、种植体周围感染<sup>[14]</sup>以及导管相关感染等<sup>[15-16]</sup>, 因其能够结合镁离子和钙离子等, 可有效减少生物膜的形成<sup>[17]</sup>, 达到治疗的目的。目前关于EDTA抗菌的应用多局限于物体表面及伤口表面, 而应用于体内EDTA的剂量与安全性还需要进行进一步的研究。有研究表明, EDTA与抗菌药物联用对铜绿假单胞菌具有较好的抗菌活性<sup>[15,18]</sup>, 但目前国内关于联合用药对耐药性铜绿

假单胞菌感染治疗效果的研究尚不足。

因此本研究探讨了EDTA-2Na与抗菌药物联合对耐药性铜绿假单胞菌浮游菌及生物膜的抑制作用。本研究结果显示, EDTA-2Na与亚胺培南、黏菌素和阿米卡星联用对耐药性铜绿假单胞菌具有较好的抑菌效果。有研究表明, EDTA与阿米卡星联用对铜绿假单胞菌具有抗菌活性<sup>[15]</sup>, 这与本研究得出的结论一致。当EDTA-2Na与抗菌药物联用时, 比单独使用亚抑菌浓度的抗菌药物具有更好的抑制生物膜的效果, 且仅需要较低的EDTA-2Na浓度( $1/32 \times \text{MIC} \sim 1/2 \times \text{MIC}$ )和抗菌药物浓度( $1/32 \times \text{MIC} \sim 1/4 \times \text{MIC}$ )即可达到很好的抑制效果, 为EDTA-2Na潜在的用药安全性奠定了良好的基础。因此, 在治疗由铜绿假单胞菌引起的感染时, EDTA-2Na可作为一种极具前景的抗感染治疗选择。

研究表明, 镁和钙等二价金属离子对生物膜胞外基质有重要的稳定作用<sup>[6]</sup>, 而EDTA可以从革兰阴性菌的细胞壁中移除镁离子和钙离子, 释放脂多糖分子并开放内部的磷脂膜, 使得其他抗菌药物得以进入菌体内部, 从而提高抗菌效果<sup>[18]</sup>, 这可能是本研究中EDTA-2Na具有良好抗菌活性的主要原因。然而, 除具有螯合作用外, EDTA还可能通过其它机制对细菌和生物膜产生作用, 例如抑制外排泵的表达等<sup>[18-19]</sup>, 这些机制仍需进一步研究。

综上所述, EDTA-2Na联用亚胺培南、黏菌素和阿米卡星对耐药性铜绿假单胞菌浮游菌及生物膜均具有较好的抑制作用, 有望成为一种清除生物膜的治疗选择, 为EDTA-2Na潜在地在临床应用奠定了基础。如果能开发EDTA与抗菌药物结合的复合药物, 可为临床抗感染治疗提供新的方向。

### 参考文献

- [1] Chatterjee M, Anju C P, Biswas L, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options[J]. *Int J Med Microbiol*, 2016, 306(1): 48-58.
- [2] Pang Z, Raudonis R, Glick B R, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 177-192.
- [3] Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, et al. Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Genome Biol Evol*, 2017, 9(12): 3238-3245.
- [4] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. *J Chin Med Assoc*, 2018, 81(1):

- 7-11.
- [5] Ciofu O, Tolker-Nielsen T, *Pseudomonas aeruginosa* tolerance and resistance of biofilms to antimicrobial agents-how can escape antibiotics[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 913.
  - [6] Wang T, Flint S, Palmer J. Magnesium and calcium ions: Roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation[J]. *Biofouling*, 2019, 35(9): 959-974.
  - [7] Khazandi M, Pi H, Chan W Y, *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of robenidine, ethylenediaminetetraacetic acid and polymyxin B nonapeptide against important human and veterinary pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 837.
  - [8] CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. 29th ed. CLSI supplement M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019
  - [9] 史利克, 王悦, 董星, 等. 连花清瘟联合美罗培南对耐药菌株的体外抑菌实验[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(8): 1172-1175.
  - [10] Chanda W, Joseph T P, Padhiar A A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* combined effect of linolenic acid and tobramycin on biofilm formation and quorum sensing[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4328-4338.
  - [11] Yamagishi Y, Hagihara M, Kato H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* pharmacodynamics of colistin and aztreonam alone and in combination against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chemotherapy*, 2017, 62(2): 105-110.
  - [12] Loho T, Sukartini N, Astrawinata D A W, *et al.* *In vitro* Antibacterial interaction of doripenem and amikacin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2018, 2018(1): 1-6.
  - [13] Finnegan S, Percival S L. EDTA: An antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care[J]. *Adv Wound Care*, 2015, 4(7): 415-421.
  - [14] Kotsakis G A, Lan C, Barbosa J, *et al.* Antimicrobial agents used in the treatment of peri-implantitis alter the physicochemistry and cytocompatibility of titanium surfaces[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(7): 1-20.
  - [15] Lebeaux D, Leflonguibout V, Ghigo J M, *et al.* *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(6): 1704-1712.
  - [16] Liu F, Hansra S, Crockford G, *et al.* Tetrasodium EDTA Is effective at eradicating biofilms formed by clinically relevant microorganisms from patients' central venous catheters[J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00525-18.
  - [17] Percival S L, Salisbury A M, The efficacy of tetrasodium EDTA on biofilms[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1057: 101-110.
  - [18] Liu Z, Lin Y, Lu Q, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of EDTA and antibacterial agents against the biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infection*, 2016, 45(1): 1-9.
  - [19] Abriouel H, Lavilla Lerma L, Pérez Montoro B, *et al.* Efficacy of "HLE"-a multidrug efflux-pump inhibitor-as a disinfectant against surface bacteria[J]. *Environ Res*, 2018, 165: 133-139.